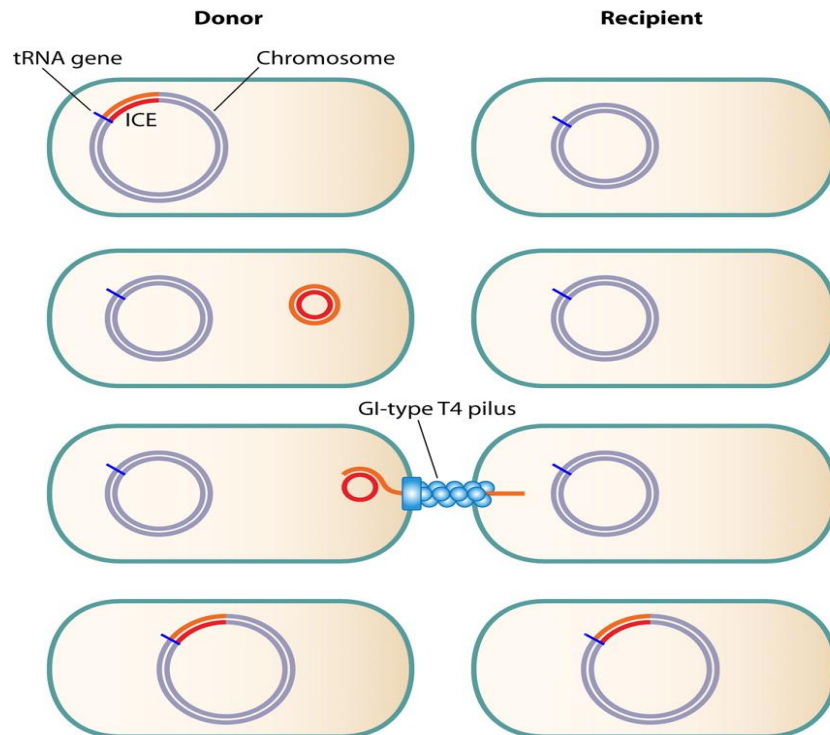




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της συζευκτικότητας στο στέλεχος NCIMB 11163 του αιθανολοπαραγωγού βακτηρίου *Zymomonas mobilis*



Καρύδη Χριστίνα
ΑΜ: 1113201300048

Επιβλέπουσα:
Επίκουρη Καθηγήτρια Αικατερίνη-Μαρία Παππά

Αθήνα 2017

Ευχαριστίες

Η διπλωματική εργασία είναι το πιο σημαντικό μάθημα της σχολής, καθώς παρέχει ανεκτίμητες γνώσεις και εμπειρίες σε πρακτικό επίπεδο. Με τον τρόπο αυτό, προετοιμάζει τον φοιτητή για τις απαιτήσεις της μετέπειτα επαγγελματικής του πορείας.

Η διακρόνηση της διπλωματικής μου εργασίας στον τομέα γενετικής και βιοτεχνολογίας υπήρξε απαιτητική και ταυτόχρονα πολύ ενδιαφέρουσα λόγω της εκμάθησης ποικίλων εργαστηριακών μεθόδων και της καλλιέργειας της επιστημονικής σκέψης. Σ' όλη αυτήν την πορεία λοιπόν, υπήρξε σημαντική η συμβολή ανθρώπων που με βοήθησαν να ξεπεράσω τις όποιες προκύψουσες δυσκολίες.

Επομένως, θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως την επιβλέπουσά μου Επίκουρη Καθηγήτρια Αικατερίνη-Μαρία Παππά, η οποία με εμπιστεύτηκε, με στήριξε και με καθοδήγησε σ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου. Με τις πολύτιμες γνώσεις της, με βοήθησε να διδαχθώ μέσα από τα λάθη και τις παραλήψεις μου, καθώς και να προσεγγίζω και να επιλύω με επιστημονικό τρόπο τυχόν προβλήματα στην πειραματική διαδικασία. Με τον τρόπο αυτό, απέκτησα σημαντικά εφόδια για το μέλλον μου ως επιστήμονα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μιλτιάδη Τύπα για το συνεχές ενδιαφέρον του για την πορεία της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του σε θέματα σπουδών.

Επίσης, οφείλω ένα θερμό ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου για την καθοδήγησή μου στα πρώτα μου βήματα, αλλά και στην επίλυση των μετέπειτα πρακτικών μου αποριών, και κυρίως στον υποψήφιο διδάκτορα Γιάννη Σαββάκη και στον Ιάσονα Χαραμή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου που με στήριξαν σ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου πορείας, τόσο στις χαρούμενες όσο και στις δύσκολες στιγμές.

Σας ευχαριστώ ειλικρινά!

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή.....	9
1.1	Οριζόντια Γενετική μεταφορά	11
1.1.1	Βακτηριακή σύζευξη	11
1.1.1.1	Σημαντικά συζευκτικά συστήματα	13
1.1.1.1.1	Συζευκτικά συστήματα εντεροβακτηρίων	13
1.1.1.1.1.1	IncF.....	13
1.1.1.1.1.2	IncPa.....	16
1.1.1.1.2	Συζευκτικό σύστημα του <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
1.1.1.1.2.1	<i>VirB/VirD4</i> σύστημα	18
1.1.1.1.2.2	<i>Tra/Trb</i> σύστημα	20
1.1.1.1.3	Σύγκριση συζευκτικών συστημάτων	22
1.1.1.2	Συζευκτική παρακίνηση.....	23
1.1.2	Γονιδιωματικές νησίδες	26
1.1.2.1	Γενικά χαρακτηριστικά	26
1.1.2.2	Εξελικτική προέλευση	28
1.1.2.3	Ενσωμάτωση, ανάπτυξη και αποκοπή.....	29
1.2	<i>Zymomonas mobilis</i>	32
1.2.1	Γενικά χαρακτηριστικά	32
1.2.2	Γενικός μεταβολισμός.....	34
1.2.3	Οξειδωτικό στρες και αναπνοή.....	39
1.2.3.1	Προσαρμογή σε καταστάσεις στρες	39
1.2.4	Βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον.....	39
1.2.4.1	Γενετική τροποποίηση	41
1.2.5	Γονιδιωματική.....	44
1.2.5.1	Στέλεχος NCIMB 11163.....	44
2	Υλικά και μέθοδοι	47
2.1	Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια	48
2.2	Θρεπτικά υλικά	49
2.3	Αντιβιοτικά/βαρέα μέταλλα.....	49

2.4	Ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών.	50
2.4.1	<i>Zymomonas mobilis</i>	50
2.4.2	<i>Escherichia coli</i>	51
2.5	Αποθήκευση στελεχών	51
2.6	Μετρήσεις ανάπτυξης βακτηριακών καλλιεργειών	51
2.6.1	Φωτομέτρηση.....	51
2.6.2	Μετρήσεις βιώσιμων κυττάρων.....	52
2.7	Απομονώσεις πλασμιδιακού DNA	53
2.7.1	<i>Zymomonas mobilis</i>	53
2.7.1.1	Μικρής κλίμακας πλασμιδιακή απομόνωση.....	53
2.7.2	<i>Escherichia coli</i>	54
2.7.2.1	Μικρής κλίμακας πλασμιδιακή απομόνωση.....	54
2.7.2.2	Μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακή απομόνωση.....	55
2.8	Μετασχηματισμός κυττάρων <i>Zymomonas mobilis</i>	56
2.8.1	Παρασκευή δεκτικών κυττάρων <i>Z. mobilis</i> :.....	56
2.8.2	Διαδικασία ηλεκτροδιάτρησης	56
2.9	Σύζευξη βακτηρίων σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης	57
2.10	Έλεγχος πλασμιδιακής σταθερότητας	58
2.1	Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων	59
2.2	Απομόνωση ζώνης από πήκτωμα αγαρόζης	59
2.3	Ενζυμικές αντιδράσεις	59
2.3.1	Πένψεις με περιοριστικά ένζυμα	60
2.3.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	60
2.4	Προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για βιοπληροφορική ανάλυση.....	61
3	Αποτελέσματα.....	62
3.1	Βιοπληροφορική ανάλυση	63
3.2	Μέθοδοι καλλιέργειας	68
3.3	Καμπύλες ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών	69
3.3.1	<i>Z. mobilis</i> NCIMB 11163	69
3.3.2	<i>Z. mobilis</i> CP4.....	71

3.3.3	<i>E. coli</i> S17.1.....	71
3.4	Μελέτες ως προς την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα	72
3.4.1	Συγκριτική μελέτη ανοχής στο αρσενικό μεταξύ των στελεχών NCIMB 11163 και CP4 73	
3.4.2	Συγκριτική μελέτη ανοχής σε αρσενικό και ναλιδιξικό οξύ μεταξύ των <i>Z. mobilis</i> NCIMB 11163 και <i>E. coli</i> S17.1.....	75
3.5	Εισαγωγή των πλασμιδίων pBBR1MCS και pBBR1MCSK στα στελέχη NCIMB 11163 και CP4	76
3.5.1	Μετασχηματισμός.....	77
3.5.2	Σύζευξη.....	78
3.5.3	Έλεγχος μετασχηματισμένων και μετασυζευγμένων αποικιών.....	79
3.5.4	Ελέγχος σταθερότητας των πλασμιδίων pBBR1MCS και pBBR1MCSK στο στέλεχος NCIMB 11163	80
3.5.5	Συζεύξεις με δότη το NCIMB 11163.....	82
3.5.5.1	Συζεύξεις με στόχο την παρακίνηση του pBBR1MCS και pBBR1MCSK από το 11163 στο DH5a	82
3.5.5.2	Συζεύξεις με στόχο την παρακίνηση του pBBR1MCS από το 11163 στο CP4.....	83
3.5.5.3	Τριγονεϊκή σύζευξη με δότες τα DH5a(pRK2013) NCIMB 11163(pBBR1MCS) και δέκτη το CP4 <i>rif^r</i>	84
3.5.5.4	Συζεύξεις με στόχο την παρακίνηση του pJC1 από το 11163 στο CP4.....	86
4	Συζήτηση.....	89
4.1	Βιοπληροφορική ανάλυση	90
4.2	Καλλιέργεια και χαρακτηριστικά του στελέχους NCIMB 11163 σε σχέση με άλλους οργανισμούς.....	93
4.3	Εισαγωγή των πλασμιδίων pBBR1MCS και pBBR1MCSK στα στελέχη NCIMB 11163 και CP4	94
4.3.1	Συζεύξεις με δότη το NCIMB 11163.....	95
4.4	Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές.....	97
5	Βιβλιογραφία	99
6	Παραρτήματα	107

Περίληψη

Το *Zymomonas mobilis* έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια λόγω της αξιοσημείωτης απόδοσης στην παραγωγή αιθανόλης. Ωστόσο, η αδυναμία ανάπτυξης του επί φθηνών λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων έχει οδηγήσει στην ανάγκη ανάπτυξης διαφόρων εργαστηριακών τεχνικών, με σκοπό την γενετική τροποποίηση του οργανισμού. Στην προσπάθεια εύρεσης και εκμετάλλευσης χρήσιμων ιδιοτήτων του χρωμοσώματος έχουν σχετικά πρόσφατα πραγματοποιηθεί οι αλληλουχίσεις των γονιδιωμάτων πολλών στελεχών του είδους. Μεταξύ αυτών, ανακαλυφθήκε η ύπαρξη δύο γονιδιωματικών νησίδων (μεγέθους 25 και 79 kb) στο χρωμόσωμα του στελέχους NCIMB 11163, πιθανότατα λόγω φαινομένων οριζόντιας γενετικής μεταφοράς, που περιέχουν γονίδια σχετιζόμενα με την διαδικασία της βακτηριακής σύζευξης. Η εξέταση της δομής και λειτουργίας των συγκεκριμένων γονιδίων, αλλά και γενικότερα της συζευκτικότητας του στελέχους υπήρξε ο κύριος στόχος της συγκεκριμένης εργασίας.

Στο πρώτο στάδιο μελέτης της συζευκτικότητας του οργανισμού, βρέθηκε ότι τα πλασμίδια pZA1001 και pZA1003 περιέχουν συζευκτικά γονίδια, και μάλιστα φαίνεται ότι το pZA1003 είναι πιθανότατα παρακινούμενο. Όσον αφορά στο χρωμόσωμα, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδιωματικών νησίδων και βρέθηκε ότι περιλαμβάνουν όλα σχεδόν τα γονίδια που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία της συζευκτικής γέφυρας, αλλά πολύ λίγα χαρακτηρισμένα γονίδια για την επεξεργασία του DNA. Υπό αυτές τις συνθήκες υποθέτουμε ότι υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα το συζευκτικό σύστημα του χρωμοσώματος να μπορεί να παρακινήσει άλλους φορείς, παρά να παρακινηθεί ή να συζευχθεί το ίδιο. Ακόμα, βρέθηκε ότι η γονιδιωματική νησίδα των 79 kb, που περιέχει την πλειονότητα των συζευκτικών γονιδίων, εμφανίζει αξιοσημείωτη ομολογία με τμήμα ενός μεγάλου γραμμικού πλασμιδίου του *Novosphingobium resinovorum* SA1, και αρά υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να έχει προέλθει από τον οργανισμό αυτό μέσω φαινομένου οριζόντιας μεταφοράς.

Με την ολοκλήρωση της βιοπληροφορικής ανάλυσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό την διερεύνηση της ενδογενούς συζευκτικής ικανότητας. Αρχικά, μελετήθηκαν οι βέλτιστες μέθοδοι καλλιέργειας του στελέχους και αποδείχθηκε ότι ο εγκλεισμός είναι πιο πλεονεκτικός σε σχέση με την επίστρωση. Παράλληλα, λόγω του ότι φέρει γονίδια ανθεκτικότητας στο αρσενικό στο πλασμίδιο pZA1001, μελετήθηκε η ανθεκτικότητά του στο συγκεκριμένο βαρέο μέταλλο σε σχέση με άλλα στελέχη, στην προσπάθεια εύρεσης δεικτών που να διαχωρίζουν τον δότη από τον δέκτη στα πειράματα σύζευξης. Στη συνέχεια, εν απουσία γενετικών δεικτών που να οπτικοποιούν την συζευκτική μεταφορά του χρωμοσώματος, επιχειρήθηκε η χρήση γνωστών παρακινούμενων φορέων για τη μελέτη της ικανότητας παρακίνησής τους από το χρωμόσωμα. Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- οι ευρέως φάσματος ξενιστών pBBR1MCS και pBBR1MCSK, που είναι βασισμένοι στο φυσικό πλασμίδιο pBBR1 και έχουν αποδειχθεί από το εργαστηριό μας ότι έχουν υψηλή σταθερότητα στο *Z. mobilis*, και
- ο πρόσφατα κατασκευασμένος από το εργαστήριό μας pJC1, που είναι δυαδικός φορέας βασισμένος εν μέρει στο ενδογενές πλασμίδιο pZA10003 του στελέχους και εν μέρει στο πολυαντιγραφικό πλασμίδιο pBLUESCRIPT.

Οι φορείς εισήλθαν στο εσωτερικό του στελέχους με διαδικασίες μετασχηματισμού και σύζευξης. Η μελέτη της σταθερότητας των δύο πρώτων φορέων έδειξε μεγάλη πτώση στον

αριθμό των ανθεκτικών κυττάρων στους χρησιμοποιούμενους δείκτες, κάτω από μη επιλεκτικές συνθήκες.

Η πραγματοποίηση ενδοειδικών και διαειδικών συζευκτικών πειραμάτων, δηλαδή μεταξύ διαφορετικών στελεχών του *Z. mobilis* ή μεταξύ στελεχών *Z. mobilis* και *E. coli*, με σκοπό την παρακίνηση των προαναφερθέντων φορέων, είχε αρνητικά αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό δεν οδηγεί στην εξαγωγή απόλυτων συμπερασμάτων για την λειτουργία ή όχι του συζευκτικού συστήματος, παρά μόνο στην βεβαίωση περί αδυναμίας παρακίνησης των συγκεκριμένων, χρησιμοποιούμενων φορέων

Summary

Zymomonas mobilis has been extensively used in recent years due to its remarkable performance in ethanol production. However, its inability to grow on cheap lignocellulosic substrates has led to the need to develop various laboratory techniques for the genetic modification of the organism. In attempting to find and exploit useful properties of the chromosome, genomic sequences of many strains have recently been published. Among these, two genomic islands (size 25 and 79 kb) were discovered on the NCIMB 11163 chromosome, probably due to horizontal gene transfer phenomena, containing genes related to the bacterial conjugation process. Examination of the structure and function of the particular genes, but also of the strain conjugational ability in general, has been the main objective of this study.

In the first stage of this study, it was found that plasmids pZA1001 and pZA1003 contained conjugation genes, and indeed it appears that pZA1003 is most likely mobilizable. As far as the chromosome is concerned, bioinformatics analysis of the genomic islands has shown that they include almost all the necessary genes for the formation of the mating bridge, but very few genes for DNA processing. Under these conditions, we assume that there is a greater likelihood that the chromosome may mobilize other vectors than conjugatively transfer itself. Moreover, it has been found that the 79 kb genomic island, containing the majority of the conjugative genes, exhibits remarkable homology with part of a large linear plasmid of *Novosphingobium resinovorum* SA1, and there is a high probability that it has originated from this organism through a horizontal transfer phenomenon.

Upon completion of the bioinformatic analysis, experiments were performed to investigate endogenous conjugative capacity. Initially, the optimal strain culture methods were studied and encapsulation proved to be more advantageous than spread plate. At the same time, due to the fact that this strain carries arsenic resistance genes in plasmid pZA1001, its resistance to this heavy metal was studied in relation to other strains in attempting to find genetic markers that separate the donor from the recipient in the conjugation experiments. Subsequently, in the absence of genetic markers to visualize the chromosome conjugative transfer, the use of known mobilizable vectors was attempted to study the ability of the chromosome to mobilize them. The vectors used:

- the broad host range pBBR1MCS and pBBR1MCSK, which are based on the native plasmid pBBR1 and have been shown by our laboratory to have high stability in *Z. mobilis*, and
- the newly constructed pJC1 from our laboratory, which is a binary vector, based in part on the pZA10003 endogenous plasmid of NCIMB 11163 and in part on the pBLUESCRIPT.

The vectors were introduced into the strain by transformation and conjugation procedures. The study of the first two vectors' stability showed a large decrease in the number of resistant cells in the markers used, under non-selective conditions.

The performance of inter-species and intra-species conjugative experiments, that is between different *Z. mobilis* strains or between *Z. mobilis* and *E. coli* strains respectively, in order to mobilize the aforementioned vectors, had negative results. This does not lead to conclusive evidence on whether or not the conjugative system works, except on the attestation of inability to mobilize the particular vectors used

1 Εισαγωγή

1.1 Οριζόντια Γενετική μεταφορά

Τα βακτηριακά γονιδιώματα εξελίσσονται μέσω μεταλλαγών, ανακατατάξεων ή φαινομένων οριζόντιας γενετικής μεταφοράς. Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί φέρουν, εκτός από τα σημαντικά γονίδια που σχετίζονται με τις κύριες μεταβολικές διεργασίες, και άλλα πλεονάζοντα γονίδια που αποκτώνται μέσω της οριζόντιας γενετικής μεταφοράς, και που μπορούν να αποδώσουν κάποιο πλεονέκτημα υπό συγκεκριμένες επιλεκτικές-περιβαλλοντικές συνθήκες. Η οριζόντια γενετική μεταφορά συμβάλλει στη διαφοροποίηση και την προσαρμογή των μικροοργανισμών, προσφέροντάς τους νέες ιδιότητες (Juhás *et al.*, 2009). Υπάρχουν 3 τρόποι οριζόντιας γενετικής μεταφοράς: η σύζευξη, ο μετασχηματισμός και η μεταγωγή. Στην παρούσα διπλωματική θα αναλυθεί εκτενώς το φαινόμενο της βακτηριακής σύζευξης

1.1.1 Βακτηριακή σύζευξη

Η βακτηριακή σύζευξη είναι ένα από τους κύριους τρόπους διεκπεραίωσης της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς και έχει παίξει σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση των γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά μεταξύ των παθογόνων βακτηρίων. Αποτελεί, μαζί με την αντιγραφή του DNA, μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες που εξασφαλίζουν την επιβίωση των πλασμιδίων (Smillie *et al.*, 2010). Τα συζευκτικά πλασμίδια διασπείρονται αυτόνομα καθώς περιλαμβάνουν όλα τα απαραίτητα γονίδια για την πλασμιδιακή μεταφορά. Πολλά από αυτά μπορούν να μεταφέρονται σε μεγάλο εύρος ξενιστών, ξεπερνώντας όχι μόνο το επίπεδο του γένους, αλλά πολλές φορές και του βασιλείου. Πράγματι, ορισμένα πλασμίδια έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται και να αντιγράφονται σε όλα τα gram θετικά βακτήρια, αλλά και στα gram θετικά και στα gram αρνητικά, ενώ παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι κάποια μεταφέρονται ακόμα και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το γενετικό υπόβαθρο των συζευκτικών συστημάτων φαίνεται να αποτελείται από δύο κατηγορίες γονιδίων, εκείνα που σχετίζονται με τη δημιουργία της συζευκτικής γέφυρας (Mating pair formation, Mpf) και εκείνα που σχετίζονται με την επεξεργασία του DNA (DNA transfer and replication, Dtr). Αναλυτικότερα, το Mpf σύστημα είναι υπεύθυνο για την συγκρότηση του συστήματος μεταφοράς του DNA από τον δότη στον δέκτη και είναι ουσιαστικά ένα πρωτεϊνικό εκκριτικό κανάλι (τύπου T4SS¹) μέσω του οποίου μεταφέρεται το DNA (Smillie *et al.*, 2010). Το συζευκτικό κανάλι που παράγεται είναι ένα επιμηκυμένο κυλινδρικό εξάρτημα του κυττάρου, που διαμεσολαβεί την αρχική επικοινωνία δότη-δέκτη, και καλείται συζευκτικό τριχίδιο. Έχει βρεθεί στα περισσότερα βακτηριακά συζευκτικά συστήματα, ακόμα και στο *VirB/VirD4* του *Agrobacterium tumefaciens*, στο οποίο η κατασκευή

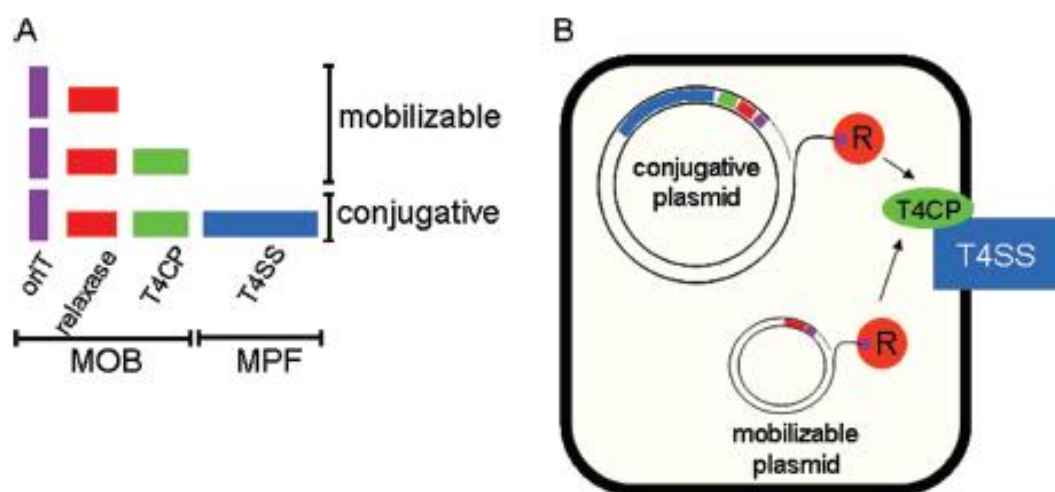
¹ Τα βακτηριακά συστήματα έκκρισης τύπου IV (type IV secretion systems, T4SS), αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια συστημάτων που συμμετέχουν στην εξωκυτταρική μεταφορά του DNA και των πρωτεϊνών. Τα T4SS είναι αρκετά διαδεδομένα μεταξύ πολλών gram θετικών και gram αρνητικών βακτηρίων. Εκείνα, τα συστατικά των οποίων ομοιάζουν με το αρχέτυπο σύστημα *VirB/D4* T4SS του *Agrobacterium tumefaciens*, κατηγοριοποιούνται ως τύπου IVA, ενώ εκείνα που σχετίζονται με το *Dot/Icm* T4SS της *Legionella pneumophila*, ως τύπου IVB (Christie and Cascales 2005).

ονομάζεται T-τριχίδιο. Στα συζευκτικά συστήματα αναγνωρίζονται δύο κύριες κατηγορίες συζευκτικών τριχιδίων: το F-τριχίδιο (παραγόμενο από τα IncF, -H, -T και -J συστήματα) και το P-τριχίδιο (παραγόμενο από τα IncP, -N, -W και -I συστήματα). Το F-τριχίδιο είναι μακρύ και εύκαμπτο, 2-20 μm σε μήκος και 8nm σε πλάτος. Αντίθετα, το P-τριχίδιο έχει μικρότερο μήκος (0,2-1 μm), είναι άκαμπτο και επομένως σπάει ευκολότερα. Το Dtr σύστημα είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό του ριλαξοσώματος και τη θραύση του Dna στο *oriT* (Schroder and Erich, 2005). Η ριλαξάση² είναι μία πρωτεΐνη-κλειδί στη συζευκτική διαδικασία, καθώς αναγνωρίζει το *oriT*, μία μικρή αλληλουχία DNA (περίπου 500 ζβ), η οποία είναι στην πραγματικότητα η μόνη αλληλουχία που είναι απαραίτητη *in cis* έτσι ώστε το πλασμίδιο να είναι συζευκτικά μεταφερόμενο. Η ριλαξάση καταλύει τα αρχικά και τελικά στάδια της σύζευξης, δηλαδή το αρχικό κόψιμο του *oriT* στον δότη, την παραγωγή του μονού DNA κλώνου που θα μεταφερθεί και, προσδεδεμένη συνεχώς στο 5' άκρο, την τελική επαναδιοργάνωση του πλασμιδίου στον δέκτη. Επιπλέον, βοηθητικοί παράγοντες, που κωδικοποιούνται από το Dtr σύστημα, προσδένονται στο *oriT* προς σχηματισμό του ριλαξοσώματος. Αυτοί διευκολύνουν την πρόσδεση της ριλαξάσης και συμβάλλουν στην εισοδό του κλώνου στο συζευκτικό κανάλι. Η σύνδεση του συστήματος Mprf με το Dtr γίνεται μέσω της πρωτεΐνης γεφύρωσης (coupling protein, CP). Η πρωτεΐνη αυτή μεταφέρει το υποστρώμα (DNA συνδεδεμένο με πρωτεΐνες του Dtr συστήματος) στην είσοδο του Mprf καναλιού και ύστερα πιθανώς συμμετέχει στην ενεργή μεταφορά του υποστρώματος στον δέκτη. Πλασμίδια που δεν διαθέτουν Mprf σύστημα αλλά κωδικοποιούν το δικό τους Dtr και, αρκετά συχνά, την δικιά τους CP καλούνται παρακινούμενα (Mob).

Μέσω φυλογενετικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε η κατάταξη αυτών των συζευκτικών συστημάτων σε έξι MOB οικογένειες: MOBF, MOBH, MOBQ, MOBC, MOBP και MOBV. Τέτοια πλασμίδια μπορούν να μεταφερθούν από ένα βακτήριο σε ένα άλλο στην περίπτωση που είναι παρόν ένα εξωγενές Mprf σύστημα που αλληλεπιδρά με το Dtr (αυτό μπορεί να βρίσκεται είτε στο χρωμόσωμα είτε σε κάποιο δεύτερο πλασμίδιο). Τέλος, κάποια πλασμίδια δεν είναι ούτε συζευκτικά ούτε παρακινούμενα. Αυτά εξαπλώνονται με φυσικό μετασχηματισμό ή μεταγωγή (Schroder and Lanka, 2005; Smillie *et al.*, 2010; Christie and Gordon, 2014).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ο όρος της πλασμιδιακής ασυμβατότητας. Πρόκειται για την αδυναμία σταθερής συνύπαρξης δύο πλασμιδίων, κατά την πάροδο των γενεών, στην ίδια βακτηριακή κυτταρική σειρά. Τα εξελικτικά κοντινά πλασμίδια τείνουν να είναι ασύμβατα, ενώ τα φυλογενετικά απομακρυσμένα τείνουν να είναι συμβατά. Ο πιο κοινός λόγος για την ασυμβατότητα δύο πλασμιδίων, είναι η κατοχή κοινού συστήματος αντιγραφής και σταθεροποίησης, με την ίδια ειδικότητα της Rep πρωτεΐνης ή το ίδιο ρυθμιστικό πρότυπο. Ωστόσο, η ασυμβατότητα μπορεί να οφείλεται και σε άλλα είδη ανταγωνισμού, για παράδειγμα μεταξύ κοινών συστημάτων καταμερισμού. Η ασυμβατότητα μπορεί να οδηγήσει σε αμοιβαία εκδίωξη και των δύο πλασμιδίων ή σε εκδίωξη μόνο του ενός, σε περίπτωση που το άλλο προσφέρει κάποιο πλεονέκτημα στον ξενιστή. Τα ασύμβατα πλασμίδια ανήκουν στην ίδια κατηγορία ασυμβατότητας (incompatibility group) (Thomas, 2014).

² Οι συζευκτικές ριλαξάσες είναι δομικά όμοιες με τις εναρκτήριες πρωτεΐνες του συστήματος αντιγραφής του κυλιόμενου κύκλου και καταλύουν παρόμοιες βιοχημικές αντιδράσεις.



Εικόνα 1-1: (Α) Σχηματική όψη της γενετικής σύστασης των συζευκτικά μεταφερόμενων πλασμιδίων. Τα συζευκτικά πλασμίδια κωδικοποιούν και τα 4 συστατικά της συζευκτικής μηχανής: *oriT* (μωβ), μία ριλαζάση (R, κόκκινο), μία IV τύπου πρωτεΐνη γεφύρωσης (T4CP) (πράσινο) και ένα IV τύπου εκκριτικό σύστημα (T4SS, μπλε). Τα παρακινούμενα πλασμίδια περιέχουν μόνο ένα MOB σύστημα (με ή χωρίς T4CP) και χρειάζονται το Mpf σύστημα ενός δεύτερου συζευκτικού πλασμιδίου για να μεταφερθεί μέσω σύζευξης. (Β) Βασικές αλληλεπιδράσεις στην πορεία της σύζευξης. Η ριλαζάση κόβει μία συγκεκριμένη θέση μέσα στο *oriT* και με αυτό το βήμα ξεκινά η σύζευξη. Ο DNA κλώνος που περιέχει την ριλαζάση προσκολλημένη στο 5' άκρο μετακινείται μέσω της συζευκτικής διαδικασίας. Η ριλαζάση αλληλεπιδρά με την T4CP και ύστερα και με άλλα συστατικά του T4SS. Το DNA εισέρχεται στον δέκτη μέσω της δραστηριότητας ATPάσης της T4CP

1.1.1.1 Σημαντικά συζευκτικά συστήματα

1.1.1.1.1 Συζευκτικά συστήματα εντεροβακτηρίων

Η μελέτη της σύζευξης των εντεροβακτηρίων έχει επικεντρωθεί στα συστήματα των F πλασμιδίων και των μελών της IncPa οικογένειας

1.1.1.1.1.1 IncF

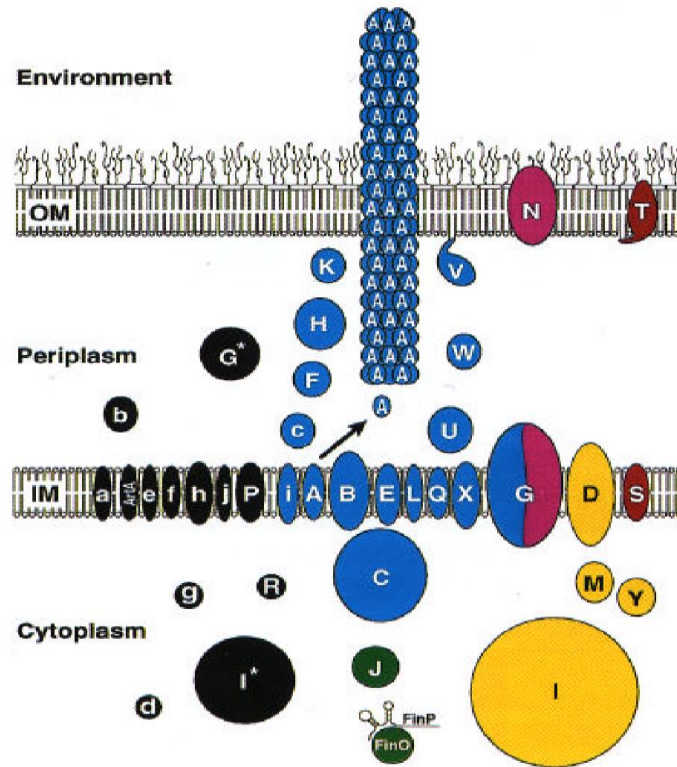
Ο παράγοντας F παραμένει παραδειγματικός ως προς το συζευκτικό του σύστημα, καθώς συμβάλλει στην κατανόηση του τρόπου μεταφοράς μακρομορίων (μέσω του T4SS συστήματος) μεταξύ των μεμβρανών των Gram αρνητικών βακτηρίων. Τα F-τύπου συζευκτικά συστήματα έχουν βρεθεί σε πολλά πλασμίδια, αλλά και σε γονιδιωματικές νησίδες πάνω στα βακτηριακά χρωμοσώματα. Το DNA μεταφέρεται κατά μήκος ελαφρώς πεπιεσμένων κυτταρικών μεμβρανών, που αναφέρονται ως συζευκτικές συνδέσεις (conjugation junctions). Αυτές οι συνδέσεις σχηματίζονται υπό την παρουσία Mpf ή άλλων T4SS πρωτεϊνών. Η σύζευξη ξεκινά με την επικοινωνία του F-τριχιδίου με έναν κατάλληλο δέκτη, οδηγώντας έτσι σε σταθερή σύνδεση μεταξύ δότη-δέκτη. Πριν την έναρξη της μεταφοράς του DNA, δομείται το ριλαξόσωμα και προσδένεται στο *oriT*.

Ένα συζευκτικό σινιάλο, πιθανώς παραγόμενο από την σύνδεση του τριχιδίου με το κύτταρο-δέκτη, φαίνεται να οδηγεί στην εξειδικευμένη σύνδεση του ριλαξοσώματος με την CP και το εσωτερικό του συζευκτικού πόρου. Η σύνδεση του ριλαξοσώματος με την CP οδηγεί στο ξεδίπλωμα του DNA, παράγοντας ένα μονό κλώνο, ο οποίος μεταφέρεται με κατεύθυνση 5' προς 3' (Lawley *et al.*, 2003).

Το F πλασμίδιο έχει μέγεθος 100 kb. Μεταξύ των αλληλουχιών που περιέχει, βρίσκονται δύο μεταθετά στοιχεία, οι IS3 αλληλουχίες. Αυτές είναι υπεύθυνες για την ενσωμάτωση του πλασμιδίου στο βακτηριακό χρωμόσωμα, μετατρέποντας τους δότες από F⁺ σε Hfr. Η περιοχή που κωδικοποιεί για τα *tra* συζευκτικά γονίδια καταλαμβάνει περίπου 33,3 kb και αναφέρεται ως *tra* περιοχή. Αυτή περιλαμβάνει 36 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης τα οποία, με εξαίρεση το *artA*, κωδικοποιούνται από τον ίδιο κλώνο DNA. Από αυτά, τα προϊόντα των *traA*, *traQ* και *traX* συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των υπομονάδων του F-τριχιδίου. Το πρώτο κωδικοποιεί την προπιλλίνη, η οποία ωριμάζει μέσω ακετυλίωσης από τις πρωτεΐνες TraQ και TraX. Ακόμα, η πλειοψηφία των *tra* γονιδίων συμμετέχει στην σύνθεση του τριχιδίου (*traL*, *traE*, *traK*, *traB*, *traV*, *traC*, *traW*, *traU*, *traF*, *traH*, *traG*, *trbC*, *trbI*). Όσον αφορά στο Dtr σύστημα, το ρόλο της ριλαξάσης έχει η TraI, ενώ επιπλέον οι πρωτεΐνες TraY, TraM και TraD λειτουργούν ως βοηθητικοί παράγοντες για τη θραύση του *oriT* και τη μεταφορά του μονού κλώνου. Επιπλέον, το F πλασμίδιο κωδικοποιεί δύο πρωτεΐνες υπεύθυνες για τον επιφανειακό αποκλεισμό, τις TraT και TraS. Ο επιφανειακός αποκλεισμός αποτρέπει την δυνατότητα να λειτουργήσει ένας δότης ταυτόχρονα και ως δέκτης, μειώνοντας έτσι το μεταβολικό κόστος της συνεχούς ύπαρξης συζευκτικών διαδικασιών. Φαίνεται ότι η ύπαρξη της TraS σ'ένα πιθανό δέκτη εμποδίζει τη μετάδοση του συζευκτικού σινιάλου ενώ η TraT εμποδίζει τη σύνδεση δότη-δέκτη. Όσον αφορά στη ρύθμιση της έκφρασης των *tra* γονιδίων, έχουν βρεθεί υποκινητές που προηγούνται των γονιδίων *traM*, *traJ*, *traY*, *trbF*, *traS*, *traT* και *traD*. Επιπλέον, έχουν βρεθεί δύο υποκινητές, οι *PfinP* και *PartA* οι οποίοι ενεργοποιούν την μεταγραφή προς την αντίθετη κατεύθυνση από εκείνη της πλειοψηφίας των *tra* γονιδίων. Σε αρκετά F⁺ κύτταρα, η έκφραση των *tra* γονιδίων καταστέλλεται από ένα φαινόμενο που καλείται παρεμπόδιση γονιμότητας (fertility inhibition, fin). Δύο γονίδια δρουν συνδυαστικά για να καταστείλουν την έκφραση του ρυθμιστικού γονιδίου *traJ*. Αυτά είναι το *finP*, που παράγει ένα antisense μόριο RNA, και το *finO*. Στο F-πλασμίδιο ωστόσο, η αλληλουχία του γονιδίου *finO* διακόπτεται από την ύπαρξη του μεταθετού στοιχείου IS3 και επομένως είναι ανενεργό. Η λειτουργία του αποκαθίσταται όταν δρα το γονίδιο *in trans* από ένα δεύτερο συμβατό πλασμίδιο (Firth *et al.*, 1996). Λεπτομερέστερα, η λειτουργία και η τοπολογία της κάθε πρωτεΐνης της *tra* περιοχής δίνεται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 1-1: Τα γονίδια της *tra* περιοχής (Firth et al., 1996)

Γονίδιο	Λειτουργία	Τοποθεσία
<i>finO</i>	Ρύθμιση	Κυτόπλασμα
<i>finP</i>	Ρύθμιση	Κυτόπλασμα
<i>traA</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Εσωτερική μεμβράνη και εξωκυτταρικά
<i>traB</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Εσωτερική μεμβράνη
<i>traC</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Κυτόπλασμα/εσωτερική ή μεμβράνη
<i>traD</i>	Επεξεργασία του DNA	Εσωτερική μεμβράνη
<i>traE</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Εσωτερική μεμβράνη
<i>traF</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Περίπλασμα
<i>traG</i>	Βιογένεση τριχιδίου και σταθεροποίηση σύνδεσης δότη-δέκτη	Εσωτερική μεμβράνη
<i>traH</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Περίπλασμα
<i>traI</i>	Επεξεργασία του DNA	Κυτόπλασμα
<i>traJ</i>	Ρύθμιση	Κυτόπλασμα
<i>traK</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Περίπλασμα
<i>traL</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Εσωτερική μεμβράνη
<i>traM</i>	Επεξεργασία του DNA	Κυτόπλασμα
<i>traN</i>	σταθεροποίηση σύνδεσης δότη-δέκτη	Εξωτερική μεμβράνη
<i>traQ</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Εσωτερική μεμβράνη
<i>traS</i>	Επιφανειακός αποκλεισμός	Εσωτερική μεμβράνη
<i>traT</i>	Επιφανειακός αποκλεισμός	Εξωτερική μεμβράνη
<i>traU</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Περίπλασμα
<i>traV</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Εξωτερική μεμβράνη
<i>traW</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Περίπλασμα
<i>traX</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Εσωτερική μεμβράνη
<i>traY</i>	Επεξεργασία του DNA	Κυτόπλασμα
<i>trbC</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Περίπλασμα
<i>trbI</i>	Βιογένεση τριχιδίου	Εσωτερική μεμβράνη



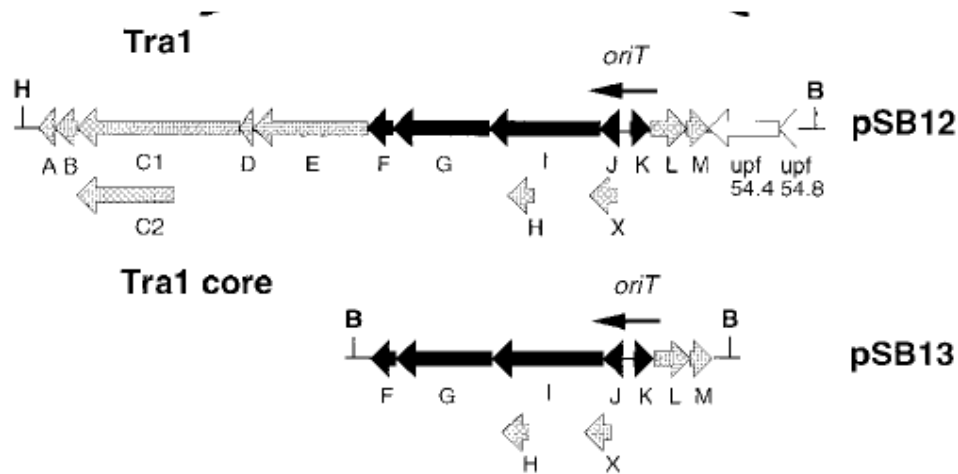
Εικόνα 1-2: Η τοπολογία των Tra πρωτεϊνών. Πρόκειται για ένα διάγραμμα των εσωτερικών (IM) και εξωτερικών (OM) μεμβρανών της *E. coli*. Στην εικόνα φαίνονται οι κυτταρικές τοποθεσίες και τα σχετικά μεγέθη των Tra πρωτεϊνών. Οι λιποπρωτεΐνες TraT και TraV εμφανίζονται να είναι συνδεδεμένες μέσω αμινοτελικών ουρών με λιπιδικά κατάλοιπα της εξωτερικής μεμβράνης. Φαίνονται επίσης το antisense RNA του *finP* καθώς και το προϊόν του *finO* καθώς αυτό μπορεί να παραχθεί *in trans* από άλλα πλασμίδια. Οι λειτουργίες των *tra* (κεφαλαία) *trb* (μικρά) γονιδίων είναι: μπλε βιογένεση τριγιδίου, καφέ επιφανειακός αποκλεισμός, μπροντό σταθεροποίηση σύνδεσης δότη-δέκτη, πράσινο ρύθμιση, κίτρινο επεξεργασία του DNA, μαύρο αγνωστο/μη απαραίτητο (Firth et al., 1996).

1.1.1.1.1.2 IncPa

Πρόκειται από τα καλύτερα μελετημένα συζευκτικά συστήματα των εντεροβακτηρίων μαζί με το F σύστημα, περιλαμβάνει τα πλασμίδια RK2, RP1 και RP4 και έχει υψηλή ομοιότητα με το IncPb σύστημα. Τα γονίδια του Pa συστήματος που εμπλέκονται στη σύζευξη είναι οργανωμένα σε δύο διακριτές περιοχές, την *Tra1* και *Tra2*. Η *Tra2* αποτελείται από ένα σύνολο 15 *trb* γονιδίων, από τα οποία τα *trbB*, *-C*, *-D*, *-E*, *-F*, *-G*, *-H*, *-I*, *-J* και *-L* είναι απαραίτητα για τη σύζευξη της *E. coli* K-12 και αποτελούν τον πυρήνα του *Tra2*. Τα 10 αυτά γονίδια συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του συζευκτικού τριγιδίου και εξασφαλίζουν σταθερότητα στη σύνδεση δότη-δέκτη. Η λειτουργία του *trbK* γονιδίου συνίσταται στον επιφανειακό αποκλεισμό που εμποδίζει τη μεταφορά του DNA μεταξύ κυττάρων που φέρουν αμφότερα ένα IncPa συζευκτικό σύστημα (δεν είναι επομένως απαραίτητη για την πραγματοποίηση της σύζευξης) (Haase et al., 1995). Η *Tra1* περιοχή περιέχει 13 γονίδια αλλά μόνο ένας πυρήνας που αποτελείται από πέντε γονίδια (*traF*, *-G*, *-I*, *-J* και *-K*) είναι απαραίτητος για την σύζευξη στα στελέχη *E. coli* K12. Η πρωτεΐνη TraF έχει ενεργότητα πρωτεάσης και ο ρόλος συνίσταται στην

ωρίμανση και κυκλοποίηση της προπιλίνης TrbC. Η TraG πρωτεΐνη είναι ουσιαστικά η CP που συνδέει το Mpf σύστημα με το Dtr. Το τελευταίο αποτελείται από τα προϊόντα των γονιδίων *traI* (ριλαξάση), *traJ* και *traK* (πρωτεΐνες που προσδένονται στο *oriT*). Η επιπλέον ύπαρξη των *traM* και *traL* γονιδίων συμβάλλει στην αύξηση της συζευκτικής αποδοτικότητας. Τα υπόλοιπα γονίδια της περιοχής *Tra1* μπορεί να είναι σημαντικά για τη διαειδική μεταφορά. Πράγματι, υπάρχουν ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη TraC έχει σημαντική συμβολή στην επιτυχή πλασμιδιακή μεταφορά μέσω σύζευξης μεταξύ διαφορετικών gram αρνητικών βακτηρίων. Το *oriT* βρίσκεται μέσα στην περιοχή *Tra1*.

Η παρακίνηση μέσω ενός IncPa συστήματος απαιτεί την ύπαρξη των γονιδίων του πυρήνα *Tra2*, εκτός από το *trbK*, συν τα γονίδια *traF* και *traG* (Bates *et al.*, 1998).



Εικόνα 1-3: Η *Tra1* περιοχή. Τα γονίδια που επισημαίνονται με σκουρόχρωμα βέλη αποτελούν τον πυρήνα της *Tra1*. Το *oriT* βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων *traJ* και *TraK* ενώ με βέλος αναγράφεται η κατεύθυνση της μεταφοράς του DNA κατά τη διάρκεια της σύζευξης

1.1.1.1.2 Συζευκτικό σύστημα του *Agrobacterium tumefaciens*

Το *Agrobacterium tumefaciens* (κλάση: Άλφαπρωτεοβακτήρια, τάξη: Rhizobiales) είναι ένα παθογόνο βακτήριο των φυτών, ικανό να προκαλέσει ογκογένεση λόγω της μόλυνσης με ένα τμήμα DNA που προέρχεται από το ενδογενές του, Ti (tumor-inducing) πλασμίδιο. Τα Rhizobiales φέρουν ένα κοινό *repABC* σύστημα αντιγραφής, το οποίο μπορεί να αποκτήσει, να διατηρήσει και να μεταφέρει κατακόρυφα μεγάλες ποσότητες γενετικής πληροφορίας, αποφέροντας έτσι ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών στον ξενιστή. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό πολλών από τα *repABC* πλασμίδια είναι η ικανότητα κωδικοποίησης ενός συζευκτικού συστήματος οριζόντιας μεταφοράς. Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα συστήματα μεταφοράς που σχετίζονται με *repABC* πλασμίδια, από τα οποία τα πρώτα δύο είναι καλά χαρακτηρισμένα. Το πρώτο (class I) αποτελείται από ένα χιμαιρικό IncQ-IncP Dtr σύστημα (*traAFBH* και *traCDG* οπερόνια) και ένα IncP Mpf σύστημα, ενώ το δεύτερο (class II) φέρει ένα Dtr σύστημα ανάλογο του πρώτου, χωρίς τα γονίδια *traF*, *traB* και *traH*, και ένα Mpf σύστημα (καλείται *anhB*) ανάλογο του *VirB* των Ti πλασμιδίων (θα αναφερθεί στη συνέχεια). Τα συζευκτικά συστήματα των

δύο αυτών κατηγοριών υπάγονται σε αυστηρή ρύθμιση: το πρώτο από έναν μηχανισμό μοριακής σηματοδότησης (quorum sensing, QS) (δες *tra/trb* σύστημα), ενώ το δεύτερο από έναν *rctA/rctB* μηχανισμό (δεν αναλύεται). Από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα συστήματα της πρώτης κατηγορίας των *repABC* πλασμιδίων είναι το *Ti* του *A. tumefaciens*. Τα *Ti* πλασμίδια φέρουν γονίδια που σχετίζονται με δύο διαφορετικού τύπου συζευκτικά συστήματα: το *VirB/VirD4* σύστημα υπεύθυνο για τη μεταφορά τμήματος του πλασμιδίου (T-DNA) και άλλων πρωτεϊνών κατά τη μόλυνση των φυτικών κυττάρων και το *Tra/Trb* σύστημα, υπεύθυνο για τη μεταφορά του πλασμιδίου μεταξύ βακτηρίων. Τα δύο συστήματα είναι γενετικά ανεξάρτητα (Farrand *et al.*, 1996).

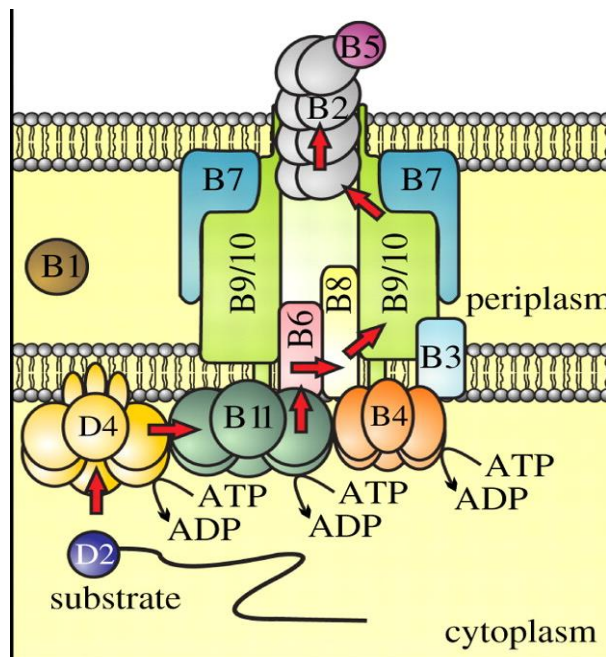
1.1.1.1.2.1 *VirB/VirD4* σύστημα

Πρόκειται για ένα αρκετά μελετημένο σύστημα. Όπως κάθε συζευκτικό σύστημα έτσι κι αυτό αποτελείται από *cis* και *trans* στοιχεία. Τα *cis* στοιχεία περιλαμβάνουν δύο ευθείς (direct) επαναλήψεις των 25 ζευγών βάσεων που οριοθετούν την T- περιοχή του DNA, και οι οποίες είναι λειτουργικά ομόλογες με το *oriT* των κλασσικών συζευκτικών συστημάτων. Τα *trans* στοιχεία παρέχονται κυρίως από δύο οπερόνια: τα *virB* και *virD*. Το πρώτο οπερόνιο (μεγέθους 12 kb) κωδικοποιεί 11 γονίδια (*virB1-virB11*), τα προϊόντα των οποίων συμβάλλουν στη δημιουργία της συζευκτικής γέφυρας (Mpf σύστημα), δηλαδή το T-τριχίδιο. Οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζουν υψηλή ομολογία με το Mpf σύστημα του *IncN* πλασμιδίου pKM101 (Farrand *et al.*, 1996). Το δεύτερο οπερόνιο κωδικοποιεί πέντε γονίδια (*virD1-virD5*). Τα *virD1* και *virD2* (ριλαξάση) κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την μεταφορά και αντιγραφή του DNA (Dtr σύστημα), τα *virD3* και *virD5* για πρωτεΐνες χωρίς ιδιαίτερη συμβολή στην επεξεργασία του DNA και το *virD4* για την CP (Christie, 2004). Διάφορες φυλογενετικές αναλύσεις οδήγησαν στην κατάταξη των ριλαξασών σε 8 MOB γκρουπ. Συγκεκριμένα, η *VirD2* ανήκει στην οικογένεια MOBP, ενώ παράλληλα οι αλληλουχίες στόχοι της, δηλαδή οι περιοχές που οριοθετούν το *oriT* είναι όμοιες με τις αντίστοιχες του *IncP* συστήματος. Εκτός από το *VirD* οπερόνιο, φαίνεται να είναι απαραίτητη και η δράση του *VirC* οπερονίου για τη μεταφορά του T-DNA. Πράγματι, η δράση της *VirD2* υποβοηθείται από τους παράγοντες *VirD1*, *VirC1* και *VirC2*. Ο *VirD1* είναι σημαντικός για την θραύση του υπερελικωμένου δίκλωνου πλασμιδίου από την ριλαξάση. Οι *VirC1* και *VirC2* προσδένονται σε μία αλληλουχία παρακείμενη των δεξιών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (που οριοθετούν το T-DNA) στα *Ti*-πλασμίδια (τύπου οκτοπίνης). Η πρόσδεση αυτή συμβάλλει στην τελική συσσώρευση και μεταφορά στα φυτικά κύτταρα πολλών αντιγράφων του T-DNA. Επιπλέον, οι δύο αυτοί βοηθητικοί παράγοντες διευκολύνουν τη σύνδεση της *VirD2* με την CP.

Στη δημιουργία του της συζευκτικής γέφυρας συμμετέχουν οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το *VirB* οπερόνιο. Η σύνδεση με το κύτταρο-δέκτη πραγματοποιείται με την ύπαρξη του συζευκτικού τριχιδίου (πολυμερές της πιλλίνης *VirB2*) και της συγκολλητίνης *VirB5*. Οι *VirB2* πρωτεΐνες είναι μικρές (~7-kDa) με υδρόφιλα N- και C-τελικά άκρα. Οι πιλλίνες αυτές συντίθενται σαν πρόδρομες πρωτεΐνες που στη συνέχεια υφίστανται επεξεργασία και κυκλοποίηση. Η *VirB5* παίζει σημαντικό ρόλο στον πολυμερισμό του συζευκτικού τριχιδίου. Στον δέκτη, η CP (*VirD4*) μεταφέρει το μονόκλωνο T-DNA και μαζί ορισμένες βακτηριακές πρωτεΐνες, όπως *VirE3*, *VirF*, *VirD5* και την *VirE2* (πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο μονόκλωνο T-DNA και το

προστατεύει). Όλες οι CP πρωτεΐνες φαίνεται να έχουν δραστηριότητα ATPάσης, αλλά δύο επιπλέον ATPάσες (VirB4, VirB11) είναι απαραίτητες για την μεταφορά του DNA μέσω του διαμεμβρανικού καναλιού. Η ολοκλήρωση της δομικής συγκρότησης και της λειτουργίας της συζευκτικής γέφυρας επιτυγχάνεται με τις πρωτεΐνες VirB3, VirB6 (υψηλά υδροφοβική, ελέγχει και ρυθμίζει τη λειτουργία του συζευκτικού καναλιού), VirB7, VirB8, VirB9 και VirB10 (Zechner *et al.*, 2012). Από αυτές, οι VirB7, VirB9 και VirB10 συνιστούν ένα σύμπλοκο με μορφή δακτυλίου που αναφέρεται ως σύμπλοκο πυρήνα (core complex) (Christie and Gordon, 2014). Τέλος, η VirB1 είναι μία τρανσγλυκοζυλάση, μη απαραίτητη για τη σύζευξη, η οποία διασπά την πεπτιδογλυκάνη και διευκολύνει επομένως την δημιουργία της συζευκτικής γέφυρας διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος (Guglielmini *et al.*, 2014).

Τα T4SS γονίδια ενεργοποιούνται ως απόκριση σε περιβαλλοντικά σήματα. Για παράδειγμα, φαινολικά μόρια και μονοσακχαρίτες, που απελευθερώνονται από τους τραυματισμένους ιστούς των φυτών, ενεργοποιούν ένα ρυθμιστικό σύστημα (VirA/VirG) το οποίο με τη σειρά του ρυθμίζει την έκφραση του *vir* συνεργειώματος (Christie, 2004). Η πορεία της σύζευξης είναι ως εξής: 1) πρόσδεση της VirD4 στο T-DNA, 2) μεταφορά στην ATPάση VirB11 (στη συγκεκριμένη μεταφορά είναι απαραίτητη η σύνθεση της VirB7) 3) μεταφορά στις ενσωματωμένες πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης, VirB6 και VirB8 (βήμα που απαιτεί την λειτουργία και των 3 ATPασών VirD4, VirB4 και VirB11), 4) μεταφορά στις πρωτεΐνες του περιπλασμικού χώρου και της εξωτερικής μεμβράνης



Εικόνα 1-4: Η αρχιτεκτονική της συζευκτικής μηχανής του *vir* συστήματος. Αποτελείται από ενεργειακά μέρη (μετατροπή ATP σε ADP), το πυρήνικο σύμπλοκο (*virB9/10* και *B7*) και τις

αλληλεπιδράσεις με τα υπολοιπα πρωτεϊνικά μέρη καθώς και το συζευκτικό τριχίδιο. Με κόκκινα βέλη επισημαίνεται η διαδρομή που ακολουθεί το DNA μέσω της συζευκτικής συσκευής.

1.1.1.1.2.2 *Tra/Trb* σύστημα

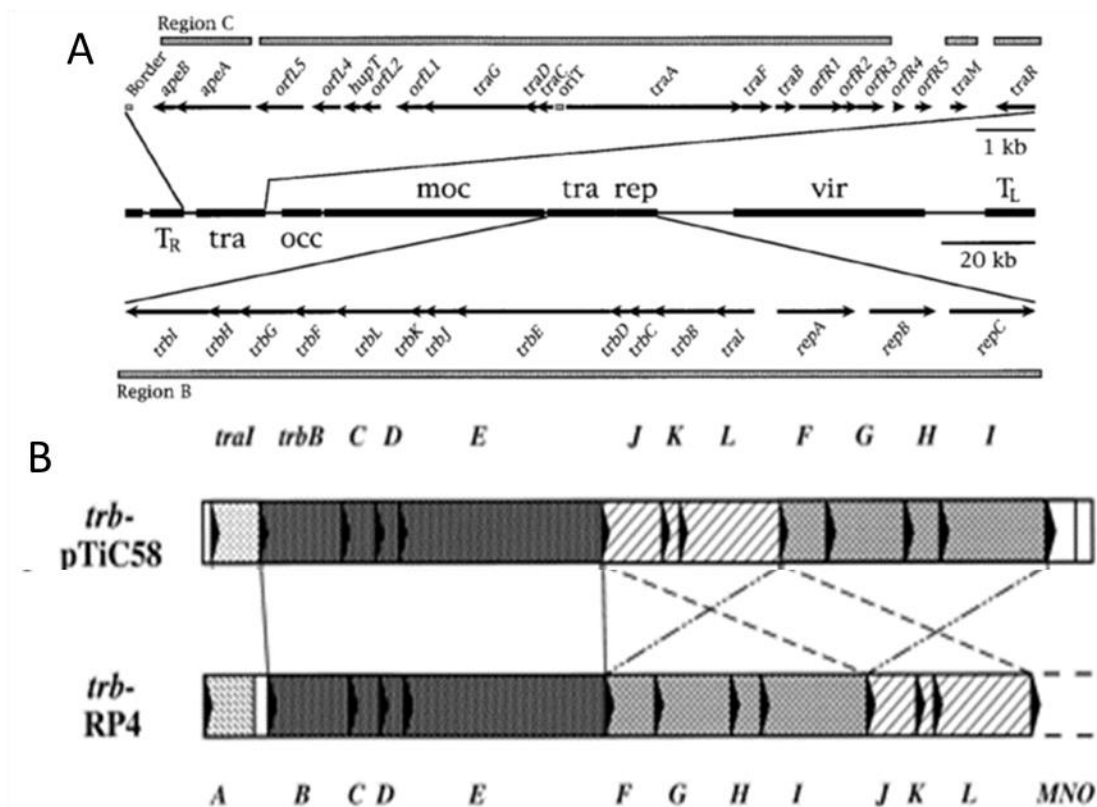
Το συγκεκριμένο συζευκτικό σύστημα αποτελείται από δύο τύπους γονιδίων: τα *tra* γονίδια (*Dtr*), μεταξύ των οποίων βρίσκεται και το λειτουργικό *oriT*, και τα *trb* (*Mpf*). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται έχουν υψηλή ομολογία με τις αντίστοιχες *Tra* και *Trb* του RP4 πλασμιδίου και πολύ χαμηλότερη με τις *Vir*. Εξάιρεση αποτελεί η πρωτεΐνη *TraA* η οποία λειτουργεί ως νικάση (nickase)-ελικάση και δεν φέρει ομολογία με τα *IncP* πλασμίδια ή τις *Vir* πρωτεΐνες αλλά με άλλα (τουλάχιστον 6) συζευκτικά ή παρακινούμενα πλασμίδια. Αν και υπάρχει εκτεταμένη ομολογία μεταξύ των *trb* συστημάτων του *A. tumefaciens* και του RP4, φαίνεται ότι το *Mpf* σύστημα των *IncP* πλασμιδίων δεν μπορεί να αντικαταστήσει το *Mpf* του *Ti*. Πράγματι, το *Ti* πλασμίδιο (με μη λειτουργικά τα *trb* γονίδια) δεν μπορεί να παρακινηθεί από τα *IncP* συζευκτικά γονίδια, και ούτε ένα το *trb* σύστημα του *Ti* μπορεί να παρακινήσει έναν φορέα βασισμένο στο RP4 (Li *et al.*, 1998).

Το συγκεκριμένο συζευκτικό σύστημα του *A. tumefaciens* εξελίχθηκε από τουλάχιστον δύο-τρεις διαφορετικές πηγές. Τρεις διακριτές περιοχές περιέχουν το σύνολο των συζευκτικών γονιδίων: *TraI*, *TraII* και *TraIII*. Η πρώτη κωδικοποιεί ένα ρυθμιστικό γονίδιο, το *traR*, το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη της μεταγραφής των *tra* γονιδίων. Συγκεκριμένα, η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων γίνεται μέσω ενός συστήματος μοριακής σηματοδότησης της οικογένειας *LuxR*, το οποίο αποτελείται από τον μεταγραφικό ενεργοποιητή *TraR* και την 3-όξο-οκτανόιλ- ομοσερινο- λακτόνη (AAI). Η συνθετάση της AAI είναι προϊόν του γονιδίου *traI*, το πρώτο γονίδιο του *trb* οπερονίου, και η μεταγραφή της εξαρτάται από ένα πυκνοεξαρτώμενο σινιάλο. Στη συνέχεια, η AAI προσδένεται στο *TraR* και προκαλεί διμερισμό και σταθεροποίηση του ενεργοποιητή. Η ενεργοποιημένη μορφή του *TraR* ενεργοποιεί τη μεταγραφή των *tra* και *trb* οπερονίων. Ένα επιπλέον στοιχείο, το *TraM* (το γονίδιο βρίσκεται κοντά στο *traR*), είναι κοινό στα QS συστήματα και ο ρόλος του συνίσταται στην καταστολή της πρόωρης ενεργοποίησης του *tra* ρυθμιστικού συστήματος υπό την απουσία κατάλληλου σήματος. Πρόκειται ουσιαστικά για έναν απενεργοποιητή που δρα προσδεδεμένο στο *TraR*, εμποδίζοντας έτσι τη δράση του ενεργοποιητή (Wetzel *et al.*, 2015; Alt-Mörbe *et al.*, 1996).

Η *TraII* βρίσκεται κοντά στην *TraI*, αλλά είναι γενετικά διακριτή από αυτή. Η περιοχή αυτή περιέχει τα *Dtr* γονίδια τα οποία χωρίζονται σε δύο σετ, το καθένα από τα οποία πιθανώς αποτελεί ένα οπερόνιο, και οριοθετούν μία περιοχή μήκους 258 ζευγών βάσεων. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει το *oriT* καθώς και τους υποκινητές που ρυθμίζουν την έκφραση των *tra* γονιδίων. Στην αριστερή μεριά, πιο κοντά στον υποκινητή βρίσκεται το γονίδιο *traC* και ακολουθούν τα γονίδια *traD* και *traG*. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται σε πολύ μικρή απόσταση και μάλιστα τα πλαίσια ανάγνωσης των *traD* και *traG* αλληλεπικαλύπτονται κατά τέσσερα νουκλεοτίδια. Αντίστοιχα, δεξιά του *oriT* βρίσκονται με σειρά τα γονίδια *traA*, *traF* και *traB*. Η διάταξη των *tra* γονιδίων διαφέρει από την αντίστοιχη του F-πλασμιδίου καθώς τα γονίδια δεν είναι προσανατολισμένα με κοινό τρόπο. Ωστόσο, είναι όμοια με την *Tra1* περιοχή του *IncPa* συζευκτικού συστήματος (και στα δύο τα γονίδια είναι οργανωμένα σαν δύο διακριτές μεταγραφικές μονάδες και το *oriT* βρίσκεται μεταξύ αυτών). Με γενετικές αναλύσεις βρέθηκε από τους

Farrand και συνεργάτες ότι τα γονίδια *traF* και *traG* (CP, περιέχει αμινοτελική αλληλουχία-οδηγητή που συνεπάγεται εντοπισμό στις μεμβράνες) είναι πλήρως απαραίτητα για τη σύζευξη, το *traB* όχι, ενώ δεν υπάρχουν καταληκτικά δεδομένα για τα *traC* και *traD* (πιθανώς βοηθητικοί παράγοντες για την πρόσδεση της ελικάσης). Η TraA πρωτεΐνη φέρει υπομονάδα ελικάσης, όμοια με την αντίστοιχη της TraI του F συστήματος και επομένως, πρόκειται για την ριλαξάση στο συγκεκριμένο σύστημα (Farrand *et al.*, 1996). Η ριλαξάση αυτή έχει υψηλή ομολογία με την MobA ριλαξάση και, σε αντίθεση με την VirD2, κατατάσσεται στην οικογένεια MOBQ (Zechner *et al.*, 2012).

Τέλος, η TraIII περιέχει ένα ακόμα ρυθμιστικό γονίδιο καθώς και όλα τα απαραίτητα Mpf γονίδια. Η περιοχή αυτή ονομάζεται και *trb* και βρίσκεται περίπου 100 kb μακριά από τις δύο Tra περιοχές. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει 12 γονίδια, 11 από τα οποία (*trbB*, *-C*, *-D*, *-E*, *-J*, *-K*, *-L*, *-F*, *-G*, *-H*, και *-I*) κωδικοποιούν προϊόντα με υψηλή αναλογία προς τις Trb πρωτεΐνες του RP4. Το δωδέκατο γονίδιο (*traI*) κωδικοποιεί τον αυτοεπαγωγέα AAI. (Cook *et al.*, 1996). Η ενεργοποίηση του οπερονίου πραγματοποιείται από τη συνδυαστική δράση των TraR και TraI. Οι TrbB και TrbD, όμοια με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του IncP, περιέχουν μοτίβα για πρόσδεση νουκλεοτιδίων και παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για τη μεταφορά του DNA. Οι πρωτεΐνες με την μικρότερη ομολογία ως προς το IncP σύστημα είναι οι TrbK και TrbH. Η πρώτη, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, εμπλέκεται στον επιφανειακό αποκλεισμό και είναι επαρκής για αυτή την λειτουργία όταν υπερεκφράζεται. Ωστόσο, όταν εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα απαιτεί την ύπαρξη της TrbJ, μιας πρωτεΐνης απαραίτητης στη συζευκτική διαδικασία. Η TrbK του IncP έχει ένα μοτίβο για λιπιδική πρόσδεση, το οποίο απουσιάζει από στην TrbK του Ti πλασμιδίου. Συνεπώς, ο επιφανειακός αποκλεισμός στο Ti πλασμίδιο φαίνεται να λειτουργεί σε μειωμένα επίπεδα ή και καθόλου (Alt-Morbe *et al.*, 1996). Οι Pei-Li Li και συνεργάτες απέδειξαν το 1999 ότι από τα 12 *trb* γονίδια, όλα είναι απαραίτητα για τη σύζευξη εκτός από τα *trbK* και *trbI* (αυξάνει την απόδοση της σύζευξης) σε αντίθεση με το IncP σύστημα όπου μόνο ένα γονίδιο δεν είναι απαραίτητο (*trbK*). Ωστόσο, το ομόλογο του *trbI* γονιδίου στο *vir* σύστημα (*virB10*) είναι άκρως σημαντικό για τη συζευκτική διαδικασία ως μέρος του πυρηνικού συμπλόκου, και επομένως φαίνεται ότι τα δύο αυτά γονίδια έχουν διαφορετικούς ρόλους στα δύο Mpf συστήματα. Το *traI* γονίδιο είναι επίσης απαραίτητο προκειμένου να γίνει η επαγωγή του *trb* οπερονίου (Li *et al.*, 1999).



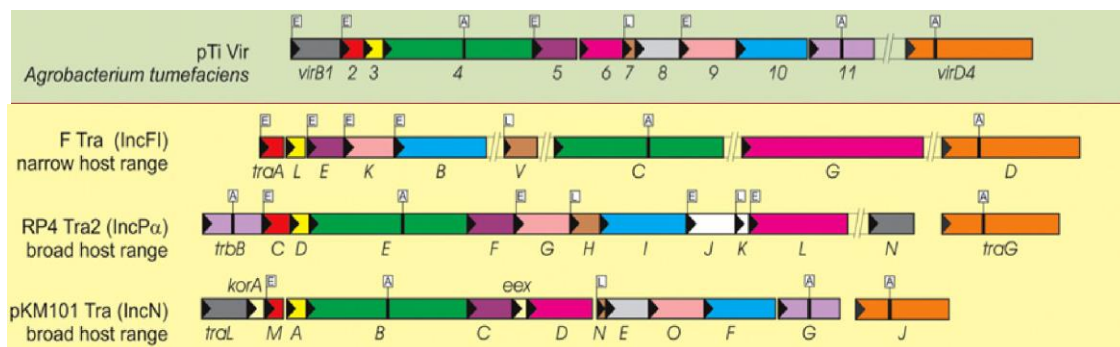
Εικόνα 1-5: Α.Γενετικός χάρτης των tra και trb περιοχών στο Ti πλασμίδιο τύπου οκτοπίνης. Τα traR και traI κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που υφίστανται μοριακή σηματοδότηση, ενώ το traM κωδικοποιεί έναν ανταγωνιστή για το traR. Τα υπόλοιπα tra γονίδια εμπλέκονται στην επεξεργασία του DNA και τα trb στην δημιουργία του συζευκτικού πόρου. Άλλες περιοχές του Ti πλασμιδίου περιλαμβάνουν: **TR-TL**:οριοθετούν το T-DNA, **occ**: γονίδια καταβολισμού της οκτοπίνης, **moc**: γονίδια καταβολισμού μανιτόλ-οπινών (mannityl opine), **rep**: γονίδια αυτοαντιγραφής, **vir**: γονίδια για τη μεταφορά του T-DNA (Alt-Morbe et al., 1996). **Β. Σύγκριση γονιδίων των trb συστημάτων των pTiC58 και RP4.** Τα ομόλογα γονίδια φαίνονται και κοινό πρότυπο σκίασης (Li et al.,1998).

1.1.1.1.3 Σύγκριση συζευκτικών συστημάτων

Τα συζευκτικά συστήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω διαφέρουν σε αρκετά σημεία:

- Ως προς το συζευκτικό τριχίδιο: Στο F σύστημα το συζευκτικό τριχίδιο είναι μακρύ και εύκαμπτο, επιτρέποντας την πραγματοποίηση της σύζευξης τόσο σε στερεά όσο και σε υγρά υποστρώματα. Αντίθετα, στα IncP συστήματα το συζευκτικό τριχίδιο είναι κοντό και άκαμπτο και επομένως η σύζευξη πραγματοποιείται μόνο σε στερεά μέσα.
- Ως προς το υπόστρωμα που μεταφέρεται: Αν και λίγα συστήματα έχουν εκτενώς μελετηθεί, τα F φαίνεται να εμπλέκονται μόνο στη μεταφορά του DNA, σε αντίθεση με τα P και I συστήματα που μπορούν να μεταφέρουν και πρωτεΐνες ή νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα.
- Ως προς τα γονίδια που λαμβάνουν μέρος και τις μεταξύ τους ομοιότητες: Διαφορετικά γονίδια εμπλέκονται στη συζευκτική διαδικασία των συστημάτων

που περιγράφηκαν. Αρκετά από αυτά έχουν υψηλή ομολογία και κοινή δομή και λειτουργία μεταξύ των συζευκτικών συστημάτων. Άλλα φαίνονται να είναι μοναδικά και ένα συγκεκριμένο τύπο. Η *tra* περιοχή του F πλασμιδίου κωδικοποιεί τα 8 από τα 10 υψηλά συντηρημένα γονιδιακά προϊόντα του T4SS συμπεριλαμβανομένων της TraA (πιλλίνη), TraB, -K (τύπου σεκρετίνης), -V (λιποπρωτεΐνη), TraC (NTPάση) -E, -L και TraG που αντιστοιχούν στα TrbCP, -IP, -GP, -HP, -EP, -JP, -DP και TrbLP του IncPa συστήματος. Ο παράγοντας F δεν φέρει ομόλογα για τα TrbBP (NTPάση) και TrbFP, αλλά έχει κάποια επιπλέον γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την σύζευξή του (TraF, -H, -U, -W, την καρβοξυτελική περιοχή του TraGF και το TrbCF). Αυτά τα επιπλέον γονίδια σχετίζονται με χαρακτηριστικούς φαινότυπους των F συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων του συζευκτικού τριχιδίου και του τύπου της σύνδεσης μεταξύ δότη-δέκτη (Lawley *et al.*, 2003). Με παρόμοιο τρόπο, μόνο 9 ομόλογα των *virB* γονιδίων βρίσκονται στο IncP σύστημα. Τα *virB1*, *virB8* και *virD4* δεν εμφανίζουν κάποια ομολογία. Επιπλέον, το *virB* σύστημα δε φέρει ομόλογα για δύο Trb πρωτεΐνες, τις TrbJ και TrbK. Επιπλέον, μπορεί να υπάρχουν και δομικές διαφορές μεταξύ των συστημάτων, όπως πχ η ύπαρξη υδροφιλικού καρβοξυτελικού άκρου στην TrbL αλλά όχι στην ομόλογη της VirB6 (Christie and Gordon, 2014).



Εικόνα 1-6: Τα γονίδια που εμπλέκονται στα κύρια συζευκτικά συστήματα. Με ίδια χρώματα επισημαίνονται οι ομολογίες (Schröder and Lanka, 2005)

1.1.1.2 Συζευκτική παρακίνηση

Ένας μεγάλος αριθμός πλασμιδίων, συμπεριλαμβανομένου του RSF1010, είναι συζευκτικά παρακινούμενα. Τα παρακινούμενα πλασμίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες για την τροποποίηση και μεταφορά του DNA, αλλά στερούνται των γονιδίων για τη δημιουργία του συζευκτικού πόρου. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούν *in trans* τα Mpf γονίδια άλλων συζευκτικών πλασμιδίων.

Στη συγκεκριμένη κατηγορία ανήκουν τα IncQ πλασμίδια, τα οποία χαρακτηρίζονται από μικρό μέγεθος, την ικανότητά τους να παρακινούνται από αρκετά συζευκτικά πλασμίδια και το μεγάλο εύρος ξενιστών τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά έχουν ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό των πλασμιδίων σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα. Τα πιο μελετημένα IncQ πλασμίδια είναι τα RSF1010, R1162 και R300B, τα οποία έχουν απομονωθεί από τους οργανισμούς *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και

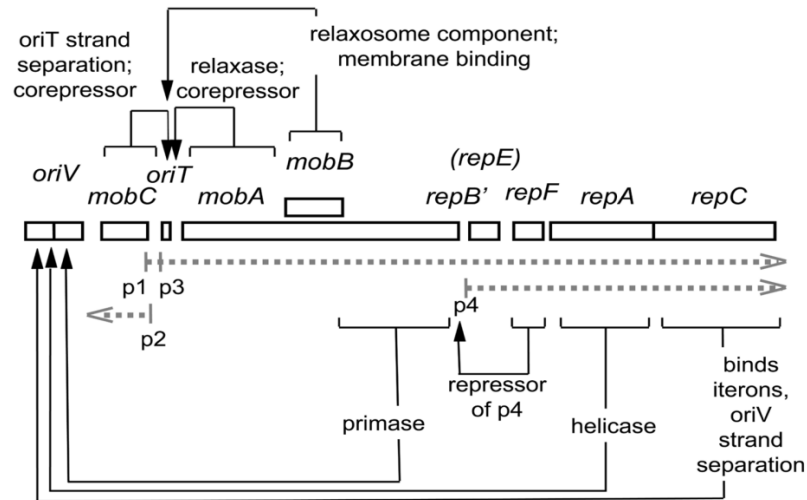
Salmonella enterica αντίστοιχα. Παρόλο που δεν διαθέτουν από μόνα τους συζευκτικές ικανότητες, μπορούν να παρακινηθούν σε υψηλές συχνότητες από άλλα συζευκτικά πλασμίδια (ιδιαίτερα αποδοτικά είναι τα IncP πλασμίδια). Πράγματι, τα IncQ έχουν επιτυχώς παρακινηθεί σε μεγάλο αριθμό ξενιστών συμπεριλαμβανομένων αρκετών gram αρνητικών και θετικών βακτηρίων, κυανοβακτηρίων, φυτών και ζώων.

Όσον αφορά στο σύστημα της κινητοποίησης, διαθέτουν τρία γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες MobA (MB: 77,945), MobB (MB:15,097) και MobC (MB:10,867) καθώς και την περιοχή του *oriT*. Η MobA είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη που συνίσταται από μία αμινοτελική ριλαξάση και μία καρβοξυτελική πριμάση. Οι δύο υπομονάδες φαίνονται να λειτουργούν ανεξάρτητα. Το καρβοξυτελικό άκρο συντίθεται από την ίδια περιοχή και αλληλουχία όπως η πρωτεΐνη RepB, η οποία εμπλέκεται με τον αναδιπλασιασμό του πλασμιδίου. Η ενεργότητα της ριλαξάσης συνδέεται με τη θραύση του DNA στο *oriT*, ενώ η ενεργότητα της πριμάσης με την έναρξη της αντιγραφής του DNA, που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της συζευκτικής μεταφοράς. Οι πρωτεΐνες MobB και MobC λειτουργούν ως βοηθητικοί παράγοντες ως προς τη θραύση και μεταφορά του DNA. Η MobB συντίθεται από το εσωτερικό του *mobA* γονιδίου, αλλά μέσω ενός διαφορετικού πλαισίου ανάγνωσης, ενώ η MobC μεταγράφεται ξεχωριστά από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο αντίθετο άκρο του *oriT*. Πιο συγκεκριμένα, η λειτουργία της MobB φαίνεται να συνίσταται στη σταθεροποίηση του ριλαξοσώματος, ενώ της MobC στο ξετύλιγμα του DNA, στο σημείο τομής, επιτρέποντας ευκολότερη πρόσβαση στην ριλαξάση. Σε μονόκλωνο DNA η δράση της τελευταίας είναι αμελητέα.

Ενδιαφέρονσα είναι η περίπτωση του pTF1 πλασμιδίου το οποίο φέρει μόνο δύο σχετικές πρωτεΐνες, την MobL (η αμινοτελική περιοχής της σχετίζεται με την περιοχή της ριλαξάσης της MobA) και την MobS (σχετίζεται με την MobC). Δεν έχουν βρεθεί ούτε πρωτεΐνες ομόλογες της MobB ούτε αλληλουχίες με δραστικότητα πριμάσης).

Ένα εναλλακτικό σύστημα κινητοποίησης των πλασμιδίων IncQ ομοιάζει με τα IncP. Συγκεκριμένα, αποτελείται από πέντε πρωτεΐνες, MobA, MobB, MobC, MobD και MobE, οι οποίες έχουν χαμηλή αλλά ξεκάθαρη ομοιότητα με τις TraI, TraJ, TraK, TraL και TraM αντίστοιχα της *Tra1* περιοχής των IncP συστημάτων.

Όσον αφορά στα *oriT*, έχουν αναγνωρισθεί 5 οικογένειες. Το Mob σύστημα που περιλαμβάνει δύο ως τρεις πρωτεΐνες ανήκει σ'εκείνη την οικογένεια των *oriT* αλληλουχιών που περιλαμβάνει τα pTF1, pSC101 και pTiC58. Αντίστοιχα, τα πλασμίδια με το Mob σύστημα των 5 γονιδίων ανήκουν στην οικογένεια που περιλαμβάνει και τα πλασμίδια IncP. Γενικά, η τοποθεσία και ο προσανατολισμός του *oriT* σε σχέση με το *mobA* φαίνεται να είναι υψηλά συντηρημένα μεταξύ των IncQ πλασμιδίων. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των RSF1010 Mob συστημάτων είναι η ικανότητα μεταφοράς ενός τμήματος του πλασμιδίου, από τη στιγμή που αυτό οριοθετείται από δύο *oriT*. Δηλαδή, η μεταφορά μπορεί να ξεκινά στο πρώτο *oriT* και να τερματίζεται στο άλλο. Για να πραγματοποιηθεί αυτό απαιτείται μία δεύτερη θραύση στο DNA, η οποία προκαλείται από την ίδια MobA πρωτεΐνη (Rawlings and Tietze, 2001; Meyer, 2010).



Εικόνα 1-7: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας των πρωτεϊνών του RSF1010 πλασμιδίου στις διαδικασίες της αντιγραφής, της μεταφοράς και της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Η κατεύθυνση των μεταγράφων υποδεικνύεται με διακεκομμένες γραμμές, ενώ τα p1-p4 αντιστοιχούν σε υποκινητές. Οι λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών αναφέρονται μέσα σε παρένθεση (Meyer 2010)

1.1.2 Γονιδιωματικές νησίδες

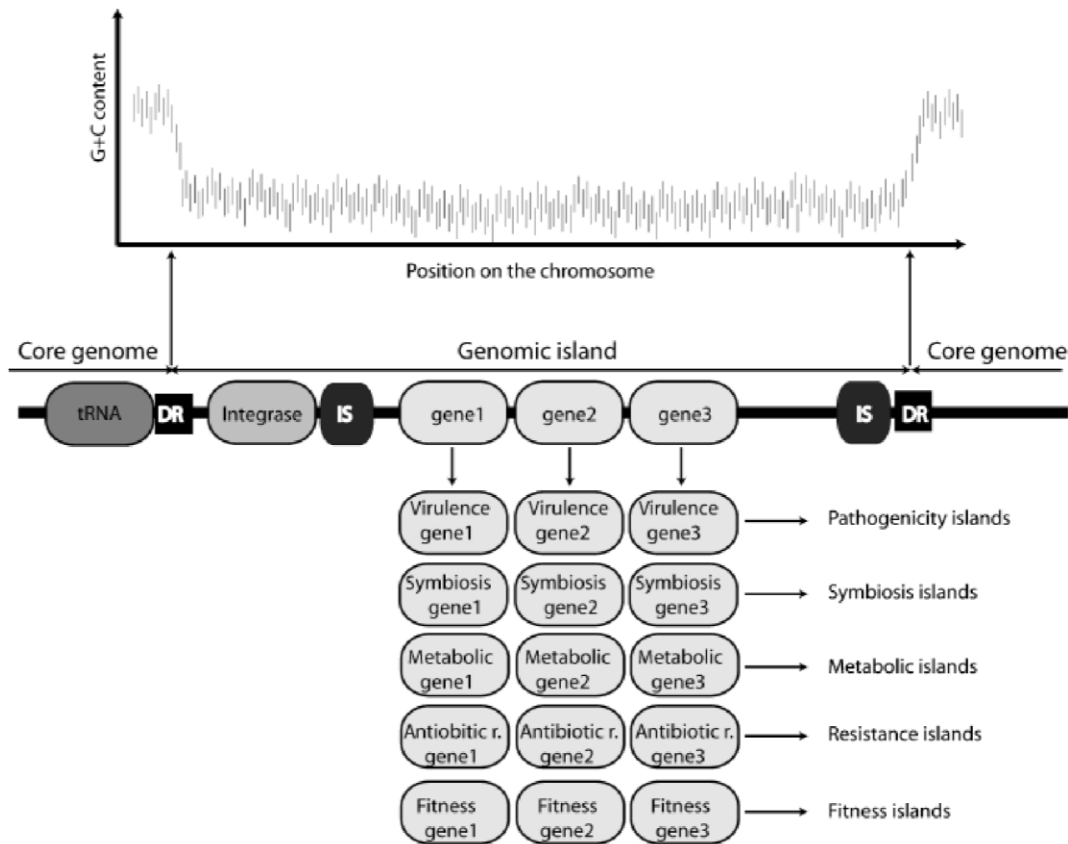
1.1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Είναι ευρέως γνωστό ότι η οριζόντια γενετική μεταφορά που διευκολύνεται μέσω των γονιδιωματικών νησίδων (genomic islands, GEIs) έχει παίξει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη ορισμένων βακτηριακών ειδών (*H. Influenzae*). Οι γονιδιωματικές νησίδες αποτελούν διακριτά DNA τμήματα, συνήθως μεταξύ 10 και 200 kb, ορισμένα από τα οποία είναι κινητά ενώ κάποια άλλα όχι, ή δεν είναι πλέον κινητά, και διαφέρουν μεταξύ συγγενικών στελεχών. Ορισμένες GEIs είναι ικανές για ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ξενιστή, για αποκοπή και μεταφορά σε έναν καινούργιο ξενιστή μέσω σύζευξης, μετασχηματισμού και μεταγωγής. Είναι κρίσιμης σημασίας για την εξέλιξη ενός μεγάλου εύρους βακτηρίων καθώς μεσολαβούν στη διάδοση ποικίλων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, καθώς και των καταβολικών γονιδίων, διαμορφώνοντας έτσι νέα μεταβολικά μονοπάτια. Η αναδιαμόρφωση των γονιδιωμάτων οφείλεται όχι μόνο στην ικανότητα απόκτησης και απώλειας των GEI-γονιδίων, αλλά και στην πιθανότητα μεταφοράς ορισμένων τμημάτων από το χρωμόσωμα ενός βακτηρίου-δότη σ'έναν άλλον ξενιστή, κατά την εκτομή της GEI. Έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα αυτομεταφερόμενα πλασμίδια καθώς ενσωματώνονται στο χρωμόσωμα, και επομένως δεν χρειάζεται να διασφαλίζουν συνεχώς την αντιγραφή και συντήρησή τους. Γενικά οι περισσότερες GEIs που είναι γνωστά σήμερα μοιράζονται τα εξής χαρακτηριστικά:

1. έχουν μέγεθος 10 με 200 kb
2. Συχνά ενσωματώνονται στο τέλος tRNA γονιδίων
3. Συχνά πλαισιώνονται από τέλειες ή σχεδόν τέλειες ευθείες (σε αντιδιαστολή με τις ανεστραμμένες) επαναλήψεις³ (direct repeats, DR) μήκους 16-20 bp. Οι DRs συνήθως προκύπτουν από την ένθεση μέσω ανασυνδυασμού ειδικής θέσης της GI στην περιοχή στόχο και μπορούν να λειτουργήσουν σαν αλληλουχίες αναγνώρισης για την ενζυματική εκτομή.
4. Οι GEIs συχνά φέρουν λειτουργικά ή κρυπτικά γονίδια που κωδικοποιούν ιντεγκράσες ή παραγόντες που σχετίζονται με τα συστήματα της πλασμιδιακής σύζευξης ή βακτηριοφάγους που συμμετέχουν στη μεταφορά της γονιδιωματικής νησίδας.
5. Συχνά περιέχουν αλληλουχίες εισδοχής ή τρανσποζόνια τα οποία μπορεί να είχαν εμπλακεί στην μεταφορά γενετικού υλικού στη GI ή στην διαγραφή κάποιου DNA τμήματος της.

³ Ευθείες επαναλήψεις (DR) είναι ταυτόσιμες ή αρκετά ομόλογες αλληλουχίες που βρίσκονται σε 2 ή περισσότερα αντίγραφα με τον ίδιο προσανατολισμό στο ίδιο μόριο DNA. Δεν είναι απαραίτητα παρακείμενες.

6. Μπορούν να φέρουν γονίδια που προσφέρουν ένα σχετικό πλεονέκτημα στο βακτήριο-ξενιστή. Ανάλογα με το γονιδιακό τους περιεχόμενο οι GEIs μπορούν να περιγραφούν ως παθολογικές, συμβιωτικές, μεταβολικές, ή να προσδίδουν κάποια ανθεκτικότητα ή κάποια άλλη προσαρμογή (εικόνα 1-8)
7. Διαφοροποιούνται από το υπόλοιπο γονιδίωμα λόγω της διαφορετικής εκατοστιαίας περιεκτικότητας των εκάστοτε βάσεων και κυρίως της G/C αναλογίας.

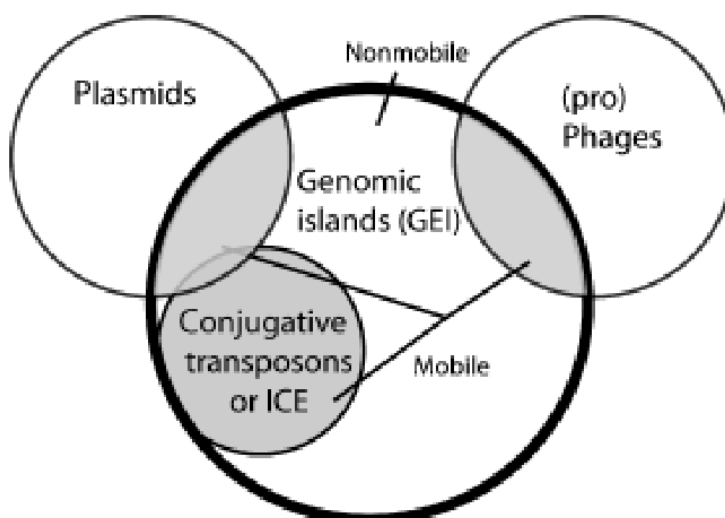


Εικόνα 1-8: Γενικά χαρακτηριστικά των γονιδιωματικών νησίδων. Οι GEIs είναι μεγάλα τμήματα DNA των οποίων τα νουκλεοτιδικά χαρακτηριστικά διαφέρουν από το υπόλοιπο χρωμόσωμα. Οι GEIs συνήθως εισέρχονται στο τέλος tRNA γονιδίων και πλαισιώνονται από ευθείες επαναλήψεις. Συχνά περιέχουν γονίδια σχετιζόμενα με κάποιο φαινόμενο γονιδιακής μεταφοράς, όπως ιντεγκράσες, τρανσποζάσες κτλ. Μπορεί να φέρουν γονίδια που σχετίζονται με ανθεκτικότητα τα αντιβιοτικά, με αυξημένη δυνατότητα παθογένειας, με κάποια μεταβολική διεργασία ή να προσδίδουν ικανότητα προσαρμογής σε ορισμένο περιβάλλον ή συμβίωσης με κάποιον οργανισμό (Juhas et al., 2009)

1.1.2.2 Εξελικτική προέλευση

Εκτεταμένη έρευνα των τελευταίων χρόνων υπέδειξε ότι οι GEIs έχουν πολλές και παράλληλες εξελικτικές προελεύσεις καθώς, κάποιες από αυτές περιέχουν γονίδια που σχετίζονται με βακτηριοφάγους ή με το συζευκτικό σύστημα ορισμένων πλασμιδίων. Επομένως, η κατηγοριοποίησή τους είναι πολύ δύσκολη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, υπάρχουν εκτεταμένες ομοιότητες μεταξύ των συστημάτων μεταφοράς των GEIs και ορισμένων γνωστών πλασμιδίων, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει στην εντύπωση ότι τα γονίδια που επάγουν τη μεταφορά των πλασμιδίων υπήρξαν ο πρόγονος για τη δημιουργία των γονιδιωματικών νησίδων. Ωστόσο, πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι ορισμένες GEIs διαθέτουν εξελικτικά απαρχαιομένα συστήματα αυτομεταφοράς που δεν υπάρχουν σε κανένα γνωστό πλασμίδιο. Τα συστήματα αυτομεταφοράς των GEIs διαμορφώνουν ένα διακριτού τύπου T4SS, που έχει μακρινή συγγένεια με τα γνωστά T4SS των πλασμιδίων. Αξίζει να αναφερθεί ότι πολλά από τα γονίδια των GEIs είναι καινούργια, άγνωστης λειτουργίας και χωρίς ομολογία με άλλα γνωστά είδη. Παρόλα αυτά, μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο και να επιφέρουν προσαρμοστικό πλεονέκτημα στον οργανισμό-ξενιστή.

Ακόμα λιγότερη πληροφορία είναι διαθέσιμη όσον αφορά στις περιβαλλοντικές συνθήκες που επηρεάζουν την μεταφορά των γονιδιωματικών νησίδων. Αρχικά, είχε θεωρηθεί ότι η μεταφορά πραγματοποιούταν αυθόρμητα ή ήταν συντηρητική. Ωστόσο, μια σειρά παρατηρήσεων υπέδειξε ότι η έναρξη της αυτό-κινητοποίησης βασίζεται σε αυστηρά ρυθμιζόμενα γεγονότα



Εικόνα 1-9: Διάφοροι τύποι γονιδιωματικών νησίδων. Οι GEIs περιλαμβάνουν πολλές κατηγορίες στοιχείων, όπως ICE/συζευκτικά τραπεζοζόνια, ενσωματωμένα πλασμίδια και ίσως ακόμα και κρυπτικούς ή κατεστραμμένους προφάγους. Οι γκρι περιοχές αντιστοιχούν στις αυτομεταφερόμενες GEIs (Juhás et al., 2009)

1.1.2.3 Ενσωμάτωση, ανάπτυξη και αποκοπή

Καθώς δεν έχουν όλες οι γονιδιωματικές νησίδες τα ίδια συστατικά είναι δύσκολο να γίνει λόγος για ένα καθορισμένο τρόπο λειτουργίας τους ή για ένα καθορισμένο “κύκλο ζωής” (λειτουργίες απαραίτητες για τη διατήρηση, την εκτομή, τη μεταφορά και την ένθεση). Ένας μεγάλος αριθμός των GEIs που έχουν την ικανότητα αυτόνομης κινητοποίησης, μπορούν να εξέρχονται από το χρωμόσωμα, να κωδικοποιούν όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την αυτό-μεταφορά σε ένα άλλο κύτταρο και να επανενσωματώνονται στην περιοχή στόχο στο γονιδίωμα του νέου ξενιστή. Οι GEIs που φέρουν ταυτόχρονα όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά, και των οποίων η αυτό-μεταφορά πραγματοποιείται μέσω σύζευξης, αποτελούν μέρος μίας ολοένα αυξανόμενης ομάδας στοιχείων που ονομάζονται συζευκτικά στοιχεία με ικανότητα ενσωμάτωσης (integrative and conjugative elements, ICEs) (Juhas *et al.*, 2009). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα περισσότερα ICEs είναι ενσωματωμένα στο χρωμόσωμα του ξενιστή και δεν εκφράζονται τα συζευκτικά γονίδια. Ωστόσο, υπό συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες επάγεται η έκφραση των γονιδίων με αποτέλεσμα το ICE να αποκόπτεται από το χρωμόσωμα και να σχηματίζει ένα κυκλικό ενδιάμεσο δίκλωνο μόριο DNA, που ομοιάζει με πλασμίδιο. Η μεταφορά της γονιδιωματικής νησίδας στη συνέχεια πραγματοποιείται με τρόπο ανάλογο με εκείνο των πλασμιδίων (αν και φαίνεται απλούστερη, λόγω της μειωμένης παρουσίας γονιδίων που αφορούν την μεταφορά). Ορισμένα από τα γονίδια της νησίδας αντιπροσωπεύουν το Mpf σύστημα, ενώ άλλα το Dtr. Όπως και στα πλασμίδια, η ριλαξάση που κωδικοποιείται από το ICE αναγνωρίζει και κόβει το *oriT*, και στη συνέχεια, ένας μονός κλώνος DNA μεταφέρεται στο κύτταρο-δέκτη μέσω του συζευκτικού πόρου που επίσης κωδικοποιείται από το ICE (Waldor, 2010; Salyers *et al.*, 1995). Το DNA (αναφέρεται ως T-DNA) εισέρχεται ως μονόκλωνο στον δέκτη, όπου μετατρέπεται σε δίκλωνο και στη συνέχεια ανασυνδιάζεται στο χρωμόσωμα χρησιμοποιώντας μία ιντεγκράση. Τα περισσότερα ICEs ενσωματώνονται σε συγκεκριμένη θέση, κυρίως σε ένα tRNA γονίδιο, ενώ ορισμένα φαίνεται να μπορούν να ενσωματωθούν σε πολλές θέσεις. Σε κάθε περίπτωση αν το ICE διατηρηθεί στον αρχικό δότη θα πρέπει να επανενσωματωθεί στο χρωμόσωμα. Η ενσωμάτωση αυτή λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια ιντεγκρασών, ομόλογων με τις αντίστοιχες των βακτηριοφάγων. Σε πολλές περιπτώσεις, η επαγωγή των συζευκτικών γονιδίων γίνεται στην στατική φάση πιθανότατα ως ένδειξη ότι ο ξενιστής δεν αυξάνεται αποτελεσματικά, και επομένως το ICE είναι πιθανότερο να επιβιώσει εάν μεταφερθεί οριζόντια παρά κάθετα. Ωστόσο, η έκφραση μπορεί να επιβαρύνει τον ξενιστή, αυξάνοντας κατά πολύ το μεταβολικό κόστος, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί ακόμα και να τον σκοτώσει (Johnson and Grossman, 2016). Τα ICEs περιλαμβάνουν και τα συζευκτικά τρανσποζόνια (conjugative transposons), τα οποία είναι ενσωματωμένα DNA στοιχεία τα οποία αποκόπτονται από το γονιδίωμα του κυττάρου/ξενιστή και σχηματίζουν ένα κυκλικό μόριο, αντιπροσωπεύοντας έτσι μία ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ πλασμιδίου και τρανσποζονίου. Το κυκλικό ενδιάμεσο μπορεί είτε να ξανασωματωθεί στο ίδιο κύτταρο (ενδοκυττάρια μετάθεση), είτε να μεταφερθεί μέσω σύζευξης σ’ ένα δέκτη και να ενσωματωθεί στο καινούργιο γονιδίωμα (διακυτταρική μετάθεση). Τα συζευκτικά τρανσποζόνια είχαν αρχικά βρεθεί σε gram θετικά βακτήρια/κόκκους, αλλά είναι πλέον γνωστό ότι είναι παρόντα σε μία μεγάλη ποικιλία gram θετικών και gram αρνητικών στελεχών. Έχουν ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα ξενιστών, και πιθανότατα συνεισβάλλουν,

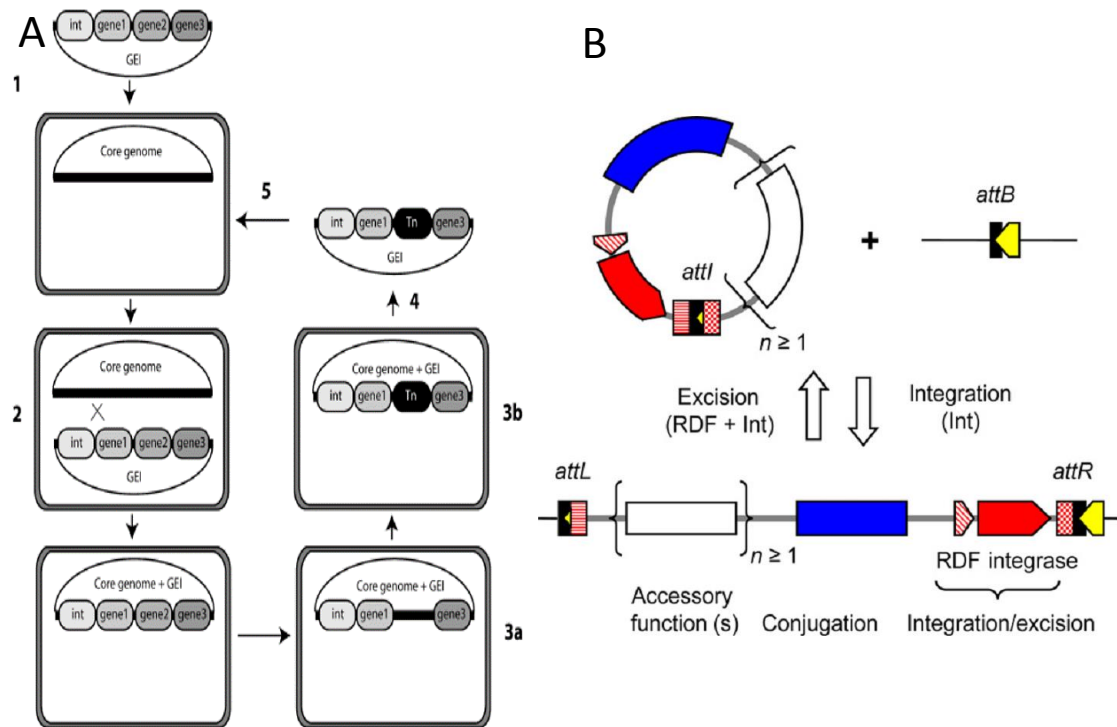
όσο περίπου και τα πλασμίδια, στη διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά σε κάποια παθογόνα γένη (Salyers *et al.*, 1995).

Εκτός από τα ICEs, υπάρχει και άλλη μία κατηγορία GEIs που έχουν την ικανότητα αυτόνομης αποκοπής και ενσωμάτωσης, αλλά δεν φέρουν όλα τα απαραίτητα γονίδια για τη συζευκτική τους μεταφορά και επομένως, χρησιμοποιούν τον συζευκτικό πόρο (MPF) άλλων ICEs ή συζευκτικών πλασμιδίων. Αυτά καλούνται παρακινούμενα στοιχεία με ικανότητα ενσωμάτωσης (integrative mobilizable elements, IMEs) (Bellanger *et al.*, 2014). Σε αυτό το σημείο, αξίζει να αναφερθεί ότι τα ICEs έχουν την ικανότητα παρακίνησης όχι μόνο άλλων γονιδιωματικών νησίδων, αλλά και ορισμένων παρακινούμενων πλασμιδίων και τμημάτων του χρωμοσώματος (Osorio *et al.*, 2008; Waldor, 2010).

Ανεξαρτήτου του τρόπου μεταφοράς, η αποκοπή των GEIs βασίζεται σε μία ιντεγκράση (οικογένεια ρεκομπινάσης τυροσίνης), που καταλύει ανασυνδυασμό ειδικής θέσης μεταξύ ταυτόσιμων αλληλουχιών που βρίσκονται εκατέρωθεν της νησίδας (*attL* και *attR*). Με αυτόν τον τρόπο απελευθερώνεται ένα κυκλικό ενδιάμεσο μόριο που φέρει μία περιοχή *attI* (θέση πρόσδεσης του GEI) και προκύπτει μία κενή θέση ανασυνδυασμού *attB* στο χρωμόσωμα (Puymège *et al.*, 2013). Το κυκλικό ενδιάμεσο μπορεί είτε να ξαναενσωματωθεί στο ίδιο κύτταρο (ενδοκυττάρια μεταφορά), είτε να μεταφερθεί μέσω σύζευξης σ' ένα δέκτη και να ενσωματωθεί στο καινούργιο γονιδίωμα (διακυτταρική μεταφορά). Στην περίπτωση της διακυτταρικής μεταφοράς, το νεοεισερχόμενο DNA πρέπει να εξασφαλίσει την μακροπρόθεσμη επιβίωσή του στο εσωτερικό του βακτηρίου-ξενιστή. Αν το οριζόντια μεταφερόμενο DNA προσφέρει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα για το κύτταρο και δεν είναι ενεργειακά ζημιοφόρο κάτω από μη επιλεκτικές συνθήκες, είναι λιγότερο πιθανό να χαθεί. Το εισερχόμενο DNA σε ένα πλασμίδιο πρέπει να είναι ικανό να πολλαπλασιάζεται ανεξάρτητα, αλλά ταυτόχρονα με το χρωμοσωμικό διπλασιασμό και την κυτταρική διαίρεση. Εν απουσία ενός ανεξάρτητου πολλαπλασιασμού, τα πλασμίδια μπορούν να “επιβιώσουν” μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού με το χρωμόσωμα του κυττάρου-ξενιστή, που προωθείται από την ύπαρξη κατάλληλων αλληλουχιών.

Αντίθετα, η διατήρηση των GEIs εξαρτάται από την ενσωμάτωση στο χρωμόσωμα του κυττάρου-δέκτη, με ανασυνδυασμό μεταξύ των ταυτόσιμων αλληλουχιών των *attI* και *attB*. Από τη στιγμή της ενσωμάτωσής της, η γονιδιωματική νησίδα θα διατηρηθεί αυτόματα μέσω της χρωμοσωμικής αντιγραφής. Απώλεια μπορεί να συμβεί μόνο σε περίπτωση εκτομής της.

Για λόγους μόνο εν μέρει κατανοητούς, οι γονιδιωματικές νησίδες συχνά ενσωματώνονται στο 3' άκρο των tRNA γονιδίων. Η εισαγωγή καταλύεται από ειδικής θέσης ρεκομπινάσες φαγικού τύπου, τις ιντεγκράσες που συνήθως κωδικοποιούνται από τις GEI. Οι ιντεγκράσες δεν είναι αυστηρά συντηρημένες μεταξύ όλων των GEIs και μπορούν να θέτουν ως στόχο διαφορετικά tRNA γονίδια. Οι ιντεγκράσες εμπλέκονται επίσης στην εκτομή των GEIs η οποία μπορεί να υποβοηθηθεί από μία εκτομάση (excisionase). Το *int* γονίδιο που κωδικοποιεί την ιντεγκράση είναι συχνά τοποθετημένο στο ένα άκρο της γονιδιωματικής νησίδας, δίπλα στο tRNA γονίδιο. (Juhás *et al.*, 2009).



Εικόνα 1-10: Α. Ένθεση, ανάπτυξη και εκτομή των GEIs. Ο σχηματικό κύκλος της κινητής GI αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα: (1) είσοδος στον ξενιστή μέσω οριζόντιας μεταφοράς, (2) ενσωμάτωση στο χρωμόσωμα του ξενιστή με ανασυνδυασμό ειδικής θέσης, (3) ανάπτυξη του GI μέσω γενετικών ανακατατάξεων, απώλειες (α) ή πρόσληψη γονιδίων (b), (4) εκτομή από το χρωμόσωμα, (5) μεταφορά σε καινούργιο δέκτη (Juhas et al. 2009). **Β. Σχηματική αναπαράσταση των ενσωματωμένων και κυκλικών μορφών των ICEs.** Η ιντεγκράση καταλύει τόσο την ένθεση ειδικής θέσης όσο και την αποκοπή. Ο RDF είναι ένας συμπαραγόντας που συμμετέχει στη διαδικασία της αποκοπής. Οι λεπτές μαύρες γραμμές αντιπροσωπεύουν το γονιδίωμα του ξενιστή, ενώ οι παχιές γκρι το γονιδίωμα του ICE. Τα βέλη αντιπροσωπεύουν ORFs (Bellanger et al., 2014).

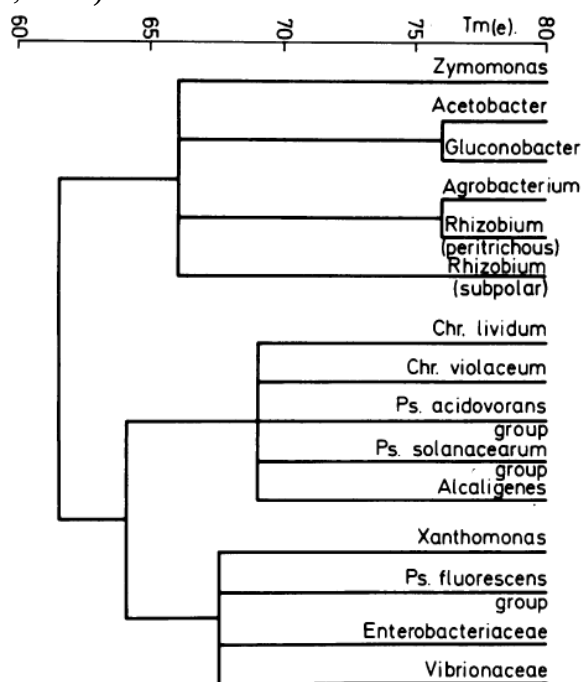
1.2 Zymomonas mobilis

1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το *Zymomonas mobilis* είναι ένα αρνητικό κατά gram, ραβδοειδές βακτήριο που απομονώθηκε για πρώτη φορά ως ζημιογόνος παράγοντας του μηλίτη, ενώ κατόπιν ανιχνεύθηκε ως πρόσμειξη και σε άλλα αλκοολούχα ή μη ποτά, όπως η μπύρα και ο χυμός αχλάδι αντίστοιχα, στην Ευρώπη και τη Νότιο Αμερική (Swings and De Ley, 1977; Weir, 2016).

Πρόκειται για ένα βακτήριο ικανό να μεταβολίζει γλυκόζη, φρουκτόζη και σουκρόζη, προς παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Ο λόγος της ποσότητας της αιθανόλης που παράγει προς την ποσότητα της γλυκόζης που καταναλώνει κατά την ζύμωση είναι τουλάχιστον 1,5 (περίπου 2 mol αιθανόλης και 2 mol αερίου CO₂ παράγονται για κάθε mol εξόζης που μεταβολίζεται). Η αλκοολική ζύμωση που πραγματοποιεί ακολουθεί τον μηχανισμό Entner-Doudoroff, όπως βρέθηκε από τους Gibbs και DeMoss το 1950.

Ανήκει στους λίγους αναερόβιους οργανισμούς, που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα, που χρησιμοποιεί ένα βιοχημικό μονοπάτι γνωστό στους αυστηρά αερόβιους οργανισμούς (Kerstens and De Ley, 1968). Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι έχει επιπλέον ικανότητα καθήλωσης αζώτου, μέσω του ελέγχου της ικανότητας ενσωμάτωσης ¹⁵N₂. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι παράγει 50% ταχύτερα αιθανόλη ανά κύτταρο και λιγότερη βιομάζα σε σύγκριση με την ανάπτυξη επί παρουσία NH₄⁺, όταν παρέχεται N₂ αντί για αμμώνιο. Όλα σχεδόν τα στελέχη του *Z. mobilis* κωδικοποιούν τη νιτρογενάση (Kremer *et al.*, 2015).



Εικόνα 1-11: Ομοιότητες rRNA αλληλουχιών μεταξύ διαφόρων taxa (Swings and De Ley 1977)

Πρόκειται για αεροανθεκτικό αναερόβιο οργανισμό, με κυτταρικές διαστάσεις 1.0–2.0 × 4.0–5.0 μm, με κινητά ή όχι στελέχη (το 30% είναι κινητά) και βέλτιστες παραμέτρους ανάπτυξης: θερμοκρασία ίση με 25–30 °C (ικανότητα για επιβίωση μεταξύ 15 και 36 °C) και pH ίσο με 7.3 (κυμαίνεται μεταξύ 3.8 και 7.5). Συχνά διατάσσεται σε ζεύγη ή διαμορφώνει δομές ροζέτας και αλυσίδας. Δεν σχηματίζει σπόρια, δομές κάψας, ενδοκυτταρικά λιπίδια ή γλυκογόνο. Οι αποικίες του είναι γυαλιστερές λευκές ή κρεμώδεις με διάμετρο 1–2 mm, ύστερα από παραμονή δύο ημερών στους 30°C, ενώ η διακύμανση του PH σε διάστημα τριών ημερών είναι 4,8–2,5. Παρατηρείται μία φρουτώδης οσμή, κυμαινόμενης έντασης

ανάλογα με το στέλεχος. Το G+C περιεχόμενο του γονιδιώματος είναι περίπου 47.5–49.5% με μέση θερμοκρασία τήξης (Tm) 89.3–89.5 °C. Ανάλυση του μεγέθους του γονιδιώματος σε 40 στελέχη έδειξε ότι είναι σχετικά μικρό με μοριακό βάρος περίπου 1.5×10^9 .

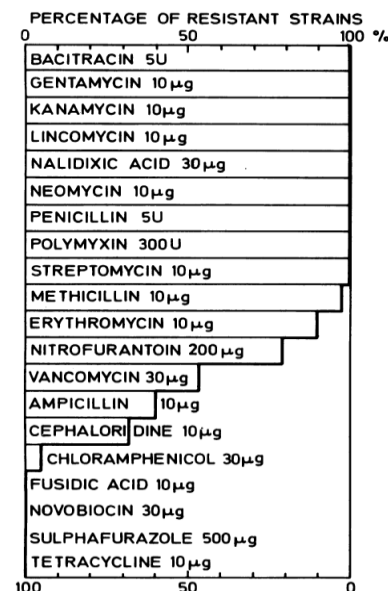
Πολλές γνώμες έχουν διατυπωθεί σχετικά με την ταξινόμηση του γένους *Zymomonas* και την σχέση με άλλους οργανισμούς. Όταν οι Kluyver και van Niel δημιούργησαν το γένος *Zymomonas* το 1936, το συσχέτισαν με 14 γένη μεταξύ των οποίων τα *Pseudomonas*, *Acetobacter* και *Rhizobium*, της οικογένειας *Pseudomonadaceae*. Αρχικά το γένος δεν αναγνωρίστηκε από το *Bergey's Manual* το 1948, αλλά στη συνέχεια τοποθετήθηκε μεταξύ των οργανισμών άγνωστης ταξινόμησης, όπως τα *Enterobacteriaceae* και *Vibrionaceae*. Η ανάλυση μορφολογικών, μεταβολικών χαρακτηριστικών και rRNA αλληλουχιών για 38 στελέχη του γένους *Zymomonas*, απομονωμένα από διαφορετικές πηγές, από τους J. De Ley και συνεργάτες, έδειξε ότι όλα εκτός από ένα (*Zymomonas anaerobia* var. *pomaceae*) είχαν όμοια αλληλουχία και μέγεθος DNA και όμοιο πρωτεϊνικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο. Επομένως, πολλά στελέχη που μέχρι τότε θεωρούνταν διαφορετικά είδη ομαδοποιήθηκαν σε ένα κοινό, το *Zymomonas mobilis*. Τέλος, αποδείχθηκε μεγάλη συσχέτιση μεταξύ των γενών *Zymomonas*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Agrobacterium* και *Rhizobium* τόσο λόγω της ανάλυσης rRNA προτύπων όσο και λόγω των παρόμοιων οικολογικών τους θώκων (J. Swings and J. De Ley 1976-1977, Patrick M. Weir 2016). Σήμερα, το γένος ταξινομείται στην οικογένεια *Sphingomonadaceae* στην ομοταξία των Αλφαπρωτεοβακτηρίων, όπως βρέθηκε με rRNA αναλύσεις από τους Jung-Soon Lee και συνεργάτες το 2000.

Επικράτεια	Bacteria
Φύλο	Proteobacteria
Ομοταξία	Alphaproteobacteria
Τάξη	Sphingomonadales
Οικογένεια	Sphingomonadaceae
Γένος	<i>Zymomonas</i>
Είδος	<i>Zymomonas mobilis</i>
Υποείδη	<u><i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>francensis</i></u>
	<u><i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i></u>
	▪ <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> ATCC 10988 ▪ <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> ATCC 29191 ▪ <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> ATCC 31822 ▪ <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> IRMH52 ▪ <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> NCIMB 11163 ▪ <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> NRRL B-12526 ▪ <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> str. CP4 = NRRL B-14023 ▪ <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> ZM4 = ATCC 31821
	<u><i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i></u>
	▪ <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i> ATCC 29192

Πίνακας 1-2: Η συστηματική κατάταξη του *Zymomonas mobilis*

Λόγω της ικανότητάς του για αναερόβια ζύμωση και για παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αιθανόλης με ταχύ ρυθμό, το *Z. mobilis* έχει μελετηθεί εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες.

Οι περισσότερες έρευνες από το 1980 έχουν επικεντρωθεί στην χρήση του συγκεκριμένου βακτηρίου σαν παραγωγό αιθανόλης σε βιομηχανική κλίμακα. Πριν το 1978 η κύρια σημασία του *Zyotomonas* ήταν ο ρόλος του στην αλλοίωση αλκοολούχων ποτών. Αργότερα χρησιμοποιήθηκε στους τροπικούς για την παραγωγή ενός μεξικανικού ποτού από αγάβη και κρασιών από φοίνικα (Seo *et al*, 2005). Επιπλέον, έχουν μελετηθεί εκτενώς οι ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του *Zyotomonas* και άλλων μικροοργανισμών. Το γεγονός ότι παράγει αντιμικροβιακές ουσίες (zymocins) υπήρξε ώθηση για διερεύνηση επί των θεραπευτικών του δυνατοτήτων (Weir, 2016). Αξιοσημείωτη ιδιότητα του οργανισμού είναι η υψηλή και μεγάλου εύρους ανθεκτικότητα του *Z. mobilis* σε πολλά αντιβιοτικά και ανασταλτικές ουσίες (Swings and De Ley 1977).

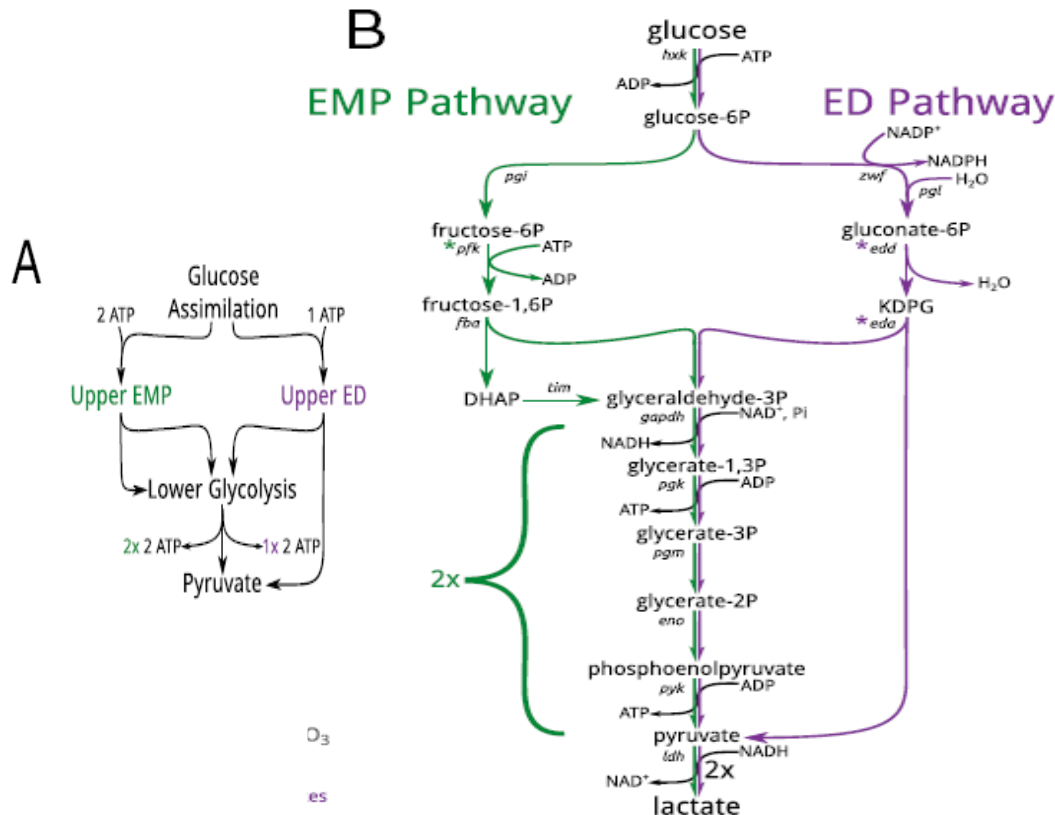


Εικόνα 1-12: Η ανθεκτικότητα και η ευαισθησία του *Z. mobilis* σε διάφορα αντιβιοτικά. Στον πάνω άξονα αντιπροσωπεύεται το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών ως προς τα αναφερόμενα αντιβιοτικά, ενώ στον κάτω το ποσοστό των ευαίσθητων στελεχών

1.2.2 Γενικός μεταβολισμός

Γλυκόλυση είναι η διαδικασία κατά την οποία η γλυκόζη αποικοδομείται αναερόβια σε μερικώς οξειδωμένα κατάλοιπα, όπως πυροσταφυλικό, το οποίο συνήθως συνδέεται και με την παραγωγή του ATP. Πολλά στάδια κλειδιά του κεντρικού αυτού μεταβολισμού τα οποία είναι κοινά για τα περισσότερα χημειοετερότροφα δυνητικά αναερόβια βακτήρια, απουσιάζουν από το *Z. mobilis*. Πράγματι, το γλυκολυτικό μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) δεν λειτουργεί στο συγκεκριμένο βακτήριο. Πρόκειται για τον μόνο οργανισμό που χρησιμοποιεί το ED μονοπάτι αναερόβια στη θέση του EMP. Η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη (η οποία διασπάται σε γλυκόζη και φρουκτόζη) είναι οι μόνες πηγές άνθρακα και ενέργειας που υποστηρίζουν την ανάπτυξη στο *Z. mobilis*. Αυτά τα κατάλοιπα προσλαμβάνονται από τα κύτταρα με υψηλής ταχύτητας διευκολυνόμενη διάχυση, εισέρχονται στο μονοπάτι Entner-Doudoroff ύστερα από ATP-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση με τη βοήθεια ειδικών κινασών και τελικά μεταβολίζονται προς αιθανόλη και CO₂ (με απόδοση έως και 98%). Η ταχεία παραγωγή και η υψηλή απόδοση αιθανόλης οφείλεται στην ύπαρξη της αποκαρβοξυλάσης του πυροσταφυλικού (ZMO1360) και δύο πολύ ειδικών αλκοολικών αφυδρογονασών (ZMO1236, ZMO1596) (Seo *et al.*, 2005).

Τα μονοπάτια EMP και ED έχουν κοινά στοιχεία (η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται και ύστερα διασπάται σε δύο ενώσεις των τριών ατόμων άνθρακα που μεταβολίζονται περαιτέρω προς παραγωγή ATP), ενώ παράλληλα, έχουν κοινή πορεία από την δημιουργία της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης (G3P) ως και το πυροσταφυλικό, γνωστή ως κατώτερη γλυκόλυση (lower glycolysis). Στο EMP μονοπάτι η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται δύο φορές και διασπάται σε G3P και φωσφορική διυδροξυακετόνη, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του ATP. Στο ED μονοπάτι, η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται μόνο μία φορά και οξειδώνεται προς 6-φωσφορο-2-κετο-3-δεοξυγλυκονικό οξύ (KDPG), το οποίο διασπάται σε πυροσταφυλικό και G3P. Από αυτά μόνο το G3P χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP. Σε ορισμένους οργανισμούς οι δύο αυτές μεταβολικές πορείες διαφέρουν ελαφρά ως προς τους οξειδοαναγωγικούς συμπαράγοντες που διαθέτουν, η κυριότερη ωστόσο διαφορά έγκειται στην διαφορετική αποδοτικότητα σε ATP: το ED μονοπάτι παράγει μόνο ένα μόριο ATP ανά μόριο γλυκόζης ενώ το EMP δύο, και επομένως μπορεί να χαρακτηριστεί ότι το *Z. mobilis* έχει ανεπάρκεια ως προς το ATP. Προκειμένου να εξασφαλίσει αρκετή ενέργεια για τον μέγιστο ρυθμό αύξησης των 90 λεπτών, αναγκάζεται να διατηρεί υψηλή εισροή άνθρακα που ξεπερνά το 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ της συνολικής κυτταρικής πρωτεΐνης. Αυτή η ταχεία εισροή διευκολύνεται από την αντίστοιχα υψηλή έκφραση γλυκολυτικών και αιθανολοπαραγωγών ενζύμων τα οποία συνιστούν το 50% του συνόλου των κυτταρικών διαλυτών πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα, η παραγωγή του ATP μετατρέπεται σε μία εξαιρετικά ταχεία διαδικασία οδηγώντας σε περίσσεια ενέργειας στο κύτταρο (Kalnenieks *et al.*, 2014). Ακόμα, λόγω αυτής της μικρής απόδοσης σε ATP, θα μπορούσε εσφαλμένα να θεωρηθεί ότι το EMP μονοπάτι είναι καλύτερο από το ED, ωστόσο φαίνεται ότι εξελικτικά το ED μονοπάτι δεν έχει ως κύρια λειτουργία τον μεταβολισμό της γλυκόζης, αλλά τη διάσπαση σακχάρων, όπως το γλυκονικό, που δεν μπορούν να μεταβολιστούν μέσω του EMP μονοπατιού. Επιπλέον, θεωρείται ως ένα παράδειγμα πάλαιομεταβολισμού καθώς διαφορετικές μορφές του ED μονοπατιού εμφανίζεται και σε κάποια αρχαία (Flamholz *et al.*, 2013).



Εικόνα 1-13: Δομική σύγκριση και ενεργειακές διαφορές μεταξύ των ED (μωβ) και EMP (πράσινο) μονοπατιών. (Α) Τα δύο μονοπάτια αλληλεπικαλύπτονται αλλά διαφέρουν στην απόδοση ως προς το ATP. Το EMP μονοπάτι υδρολύει δύο ATP για να φωσφορυλιώσει την γλυκόζη δύο φορές και ανακτά 4 μόρια ATP μέσω του μεταβολισμού δύο φωσφορικών τριοζών (στην κατώτερη γλυκόλυση) καταλήγοντας σε συνολικό κέρδος 2 ATP μορίων. Αντίθετα, το ED μονοπάτι αξιοποιεί ένα ATP τη φωσφορυλίωση και ανακτά δύο (η γλυκόζη διασπάται σε ένα μόνο προϊόν ικανό να μεταβολιστεί) καταλήγοντας σε κέρδος ενός μορίου ATP. **(Β)** Σχήμα των ED και EMP μονοπατιών που υποδεικνύει ότι η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται ενδοκυτταρικά από την εξωκινάση και ότι το γαλακτικό οξύ είναι το τελικό προϊόν. Το κάθε μονοπάτι περιέχει μοναδικά ένζυμα (σημειωμένα με *), αλλά έχουν κοινές όλες τις αντιδράσεις της κατώτερης γλυκόλυσης. Η pfk είναι μοναδικό ένζυμο του EMP μονοπατιού ενώ οι edd και eda είναι μοναδικά του ED. Συντομογραφίες: eda = KDPG αλδολάση, edd = αφυδρατάση του 6-φωσφογλυκονικού, eno = ενολάση, fba = αλδολάση της 1,6 διφωσφορικής φρουκτόζης, gapdh = αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης, hvk = εξωκινάση, ldh = γαλακτική αφυδρογονάση, pfk = 6-φωσφοφρουκτοκινάση, pgi = ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, pgk = PGA κινάση, pgl = 6-φωσφορική γλυκονολακτονάση, pgm = PGA μούταση, pyk = κινάση του πυροσταφυλικού, tim = ισομεράση των φωσφορικών τριοζών, zwf = αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (Flamholz et al, 2013).

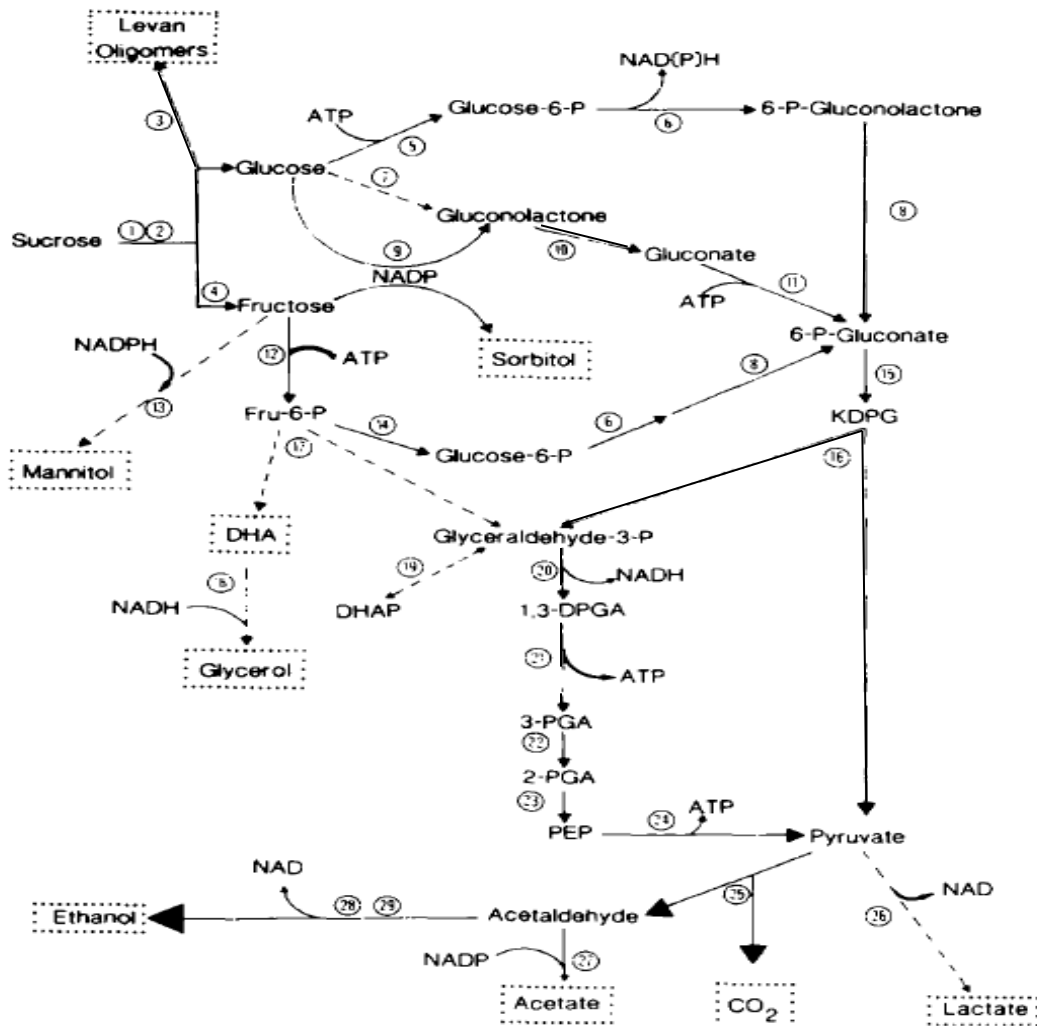
Όσον αφορά στο μεταβολισμό της φρουκτόζης, αυτή εισέρχεται στο μονοπάτι και φωσφορυλιώνεται από μία ATP-εξαρτώμενη κινάση. Κύριος ρυθμιστής της αντίδρασης είναι η συγκέντρωση της γλυκόζης (αύξηση γλυκόζης και 6-φωσφορικής γλυκόζης -> μείωση απόδοσης φωσφορυλίωσης). Το V_{max} της φρουκτοκινάσης είναι παρόμοιο με αυτό της γλυκοκινάσης. της μετατροπής της 6-φωσφορικής φρουκτόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη, μία αντίδραση που διαμεσολαβείται από την ισομεράση της 6-

φωσφορικής γλυκόζης. Το 6-φώσφογλυκονικό σχηματίζεται από την 6-φωσφορική γλυκόζη μέσω της συνδυασμένης δράσης δύο ενζύμων: της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης και της 6-φωσφορικής γλυκονολακτονάσης. Το πρώτο έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί NAD ή NADP με περίπου ίδια αποδοτικότητα, με αποτέλεσμα να μπορεί και να παράγει αναγωγικά ισοδύναμα στη μορφή του NADPH και να ισορροπεί οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω NADH-εξαρτώμενης αναγωγής της ακεταλδεΐδης προς αιθανόλη. Η αντίδραση αυτή διαμεσολαβείται από δύο ισοένζυμα αλκοολικής αφυδρογονάσης. Το ένζυμο adhI απαιτεί την παρουσία ψευδαργύρου ενώ το adhII σιδήρου (Panesar *et al.*, 2006). Η ακεταλδεΐδη και το CO₂ σχηματίζονται από το πυροσταφυλικό με μία αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης που διαμεσολαβείται από την αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού. (Conway, 1992).

Η παραγόμενη αιθανόλη είναι λιγότερη (απόδοση καταβολισμού φρουκτόζης: 90% ενώ αιθανόλης: 95%). Η παραγωγή παραπροϊόντων, όπως μαννιτόλη, σορβιτόλη, διυδρόξυακετόνη, γλυκερόλη, οξικό και γαλακτικό οξύ, μπορεί να είναι υπεύθυνη γι' αυτή την μειωμένη απόδοση.

Υπό την παρουσία οξυγόνου, η αυξημένη δράση του ενζύμου οξειδάση του NADH οδηγεί σε μειωμένη διαθέσιμη ποσότητα του NADH για την αναγωγή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της πρώτης. Επιπλέον, το *Z. mobilis* δεν διαθέτει τα απαραίτητα ένζυμα για την οξείδωση της ακεταλδεΐδης προς οξικό οξύ. Η παραγωγή της ακεταλδεΐδης έχει πιθανά πλεονεκτήματα επί της αιθανόλης λόγω της εκτεταμένης βιομηχανικής της σημασίας.

Τα περισσότερα πειράματα επί της ικανότητας ζύμωσης του *Z. mobilis* έχουν πραγματοποιηθεί με την χρήση υποστρωμάτων γλυκόζης. Το *Z. mobilis* έχει απόδοση περίπου 120 g αιθανόλη/L-1 υγρού θρεπτικού * h-1 σε συστήματα συνεχούς καλλιέργειας (Panesar *et al.*, 2006).



Εικόνα 1-14: Τα καταβολικά μονοπάτια στο *Z. mobilis*. Η σακχαρόζη, η γλυκόζη και η φρουκτόζη μεταβολίζονται μέσω του ED μονοπατιού και οι παράπλευρες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα (διακεκομμένες γραμμές) καταλήγουν κυρίως στην παραγωγή αιθανόλης και CO₂ (μεγάλα βέλη) καθώς και άλλων παραπροϊόντων (διακεκομμένα πλαίσια). **Συντομογραφίες:** KDPG = 2-κέτο-3-δεοξυ-6-φωσφογλυκονικό, DHA = διυδροξυακετόνη, DHAP = φωσφορική διυδροξυακετόνη, 1,3 DPGA = 1,3 διφωσφογλυκερινικό, 3-PGA = 3-φωσφογλυκερινικό, 2-PGA = 2-φωσφογλυκερινικό, PEP = φωσφοενολοπυροσταφυλικό. Τα ένζυμα είναι: 1 σακχαράση (ιμπερτάση, εξωκυτταρική) 2, 3 λεβανσακχαράση, 4 ινβερτάση (ενδοκυτταρική), 5 γλυκοκινάση 6 αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, 7 αφυδρογονάση της γλυκόζης (μεμβρανική), 8 6-φωσφορική γλυκονολακτονάση 9 οξειδοαναγωγάση γλυκόζης-φρουκτόζης, 10 γλυκονολακτονάση, 11 κινάση του γλυκονικού, 12 φρουκτοκινάση, 13 αφυδρογονάση της μαννιτόλης, 14 ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, 15 αφυδρατάση του 6-φωσφογλυκονικού, 16 KDPG αλδολάση, 17 αλδολάση της 6-φωσφορικής φρουκτόζης (υποθετική) 18 αφυδρογονάση της γλυκερόλης (υποθετική), 19 ισομεράση της φωσφορικής τριόζης, 20 αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης, 21 PGA κινάση, 22 PGA μούτωση, 23 ενολάση, 24 κινάση του πυροσταφυλικού, 25 αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού, 26 γαλακτική αφυδρογονάση, 27 αφυδρογονάση της γλυκεριναλδεΐδης 28, 29 αλκοολικές αφυδρογονάσεις I και II (εσοένζυμα) (Sprenger, 1993).

1.2.3 Οξειδωτικό στρες και αναπνοή

Το *Z. mobilis* είναι ένας δυνητικά αναερόβιος οργανισμός, και επομένως είναι λογικό να φέρει κάποιον μηχανισμό έναντι του οξειδωτικού στρες. Ο πιο διαδεδομένος οξειδοαναγωγικός μηχανισμός είναι το σύστημα της οξειδωμένης/αναγμένης γλουταθειόνης (GSSG/GSH). Τόσο η αναγωγή (ZMO1211) και η συνθετάση της γλουταθειόνης (ZMO1913) όσο και η συνθετάση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης (ZMO1556) είναι παρούσες. Επιπλέον, γονίδια που κωδικοποιούν για καταλάση (ZMO0928), υπεροξειδική δισμουτάση (ZMO1060) και δύο υπεροξειδάσες (ZMO1136, ZMO1573) είναι επίσης παρόντα. Εκτός από τα απαραίτητα γονίδια για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, το γονιδίωμα περιέχει επίσης κωδικές αλληλουχίες που σχετίζονται με το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπως διάφορα οξειδοαναγωγικά σύμπλοκα σιδήρου-θείου (ZMO1032), το κυτόχρωμα b (ZMO0957), το κυτόχρωμα c1 (ZMO0958), φλαβοπρωτεΐνες (ZMO1479, ZMO1480), πρωτεΐνες που χρησιμεύουν στη βιοσύνθεση της ουβικινόνης (ZMO1189, ZMO1669), NADH αφυδρογονάση (ZMO1113) κτλ. Ωστόσο, δεν βρέθηκαν γονίδια σχετιζόμενα με τα κυτοχρώματα c και d, τα οποία χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων. Η έκθεση σε αερόβιες συνθήκες οδηγεί σε αυξημένη μεταβολική ικανότητα αλλά σε μειωμένη απόδοση παραγωγής αιθανόλης και ταυτόχρονη συσσώρευση άλλων προϊόντων όπως ακεταλδεΐδη, ακετόνη και οξικό οξύ. Αυτό οφείλεται στην οξείδωση μέρους του NADH λόγω της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας.

1.2.3.1 Προσαρμογή σε καταστάσεις στρες

Η μετουσίωση και η συσσωμάτωση των πρωτεϊνών, λόγω έκθεσης σε υψηλές θερμοκρασίες ή αιθανόλη, είναι σημαντικά προβλήματα για τα κύτταρα και αντιμετωπίζονται με την επαγωγή των εξαιρετικά συντηρημένων heat shock proteins, η λειτουργία των οποίων συνίσταται στην απομάκρυνση ή την επαναδίπλωση των υποβαθμισμένων κυτταρικών πρωτεϊνών. Πράγματι το γονιδίωμα του περιέχει ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που κωδικοποιούν θερμοεπαγόμενους μοριακούς συνοδούς, όπως DnaK (ZMO0660), DnaJ (ZMO0661, ZMO1069, ZMO1545, ZMO1546, ZMO1690), GrpE (ZMO0016) και άλλες (Seo *et al.*, 2005)

1.2.4 Βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον

Η συνεχής ζήτηση και εκμετάλλευση των ορυκτών καυσίμων και η επακόλουθη αύξηση των τιμών έχει ωθήσει στην αναζήτηση εναλλακτικών τεχνολογιών και υποστρωμάτων για την κάλυψη των παγκόσμιων ενεργειακών απαιτήσεων. Ως αποτέλεσμα, τις τελευταίες δεκαετίες η έρευνα έχει στραφεί στην χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, και κυρίως μεθανίου, υδρογόνου και αιθανόλης. Σήμερα, η *Escherichia coli* και ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελούν παγκοσμίως τους πιο διαδεδομένους οργανισμούς για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Ιδιαίτερα, η τροποποίηση των στελεχών

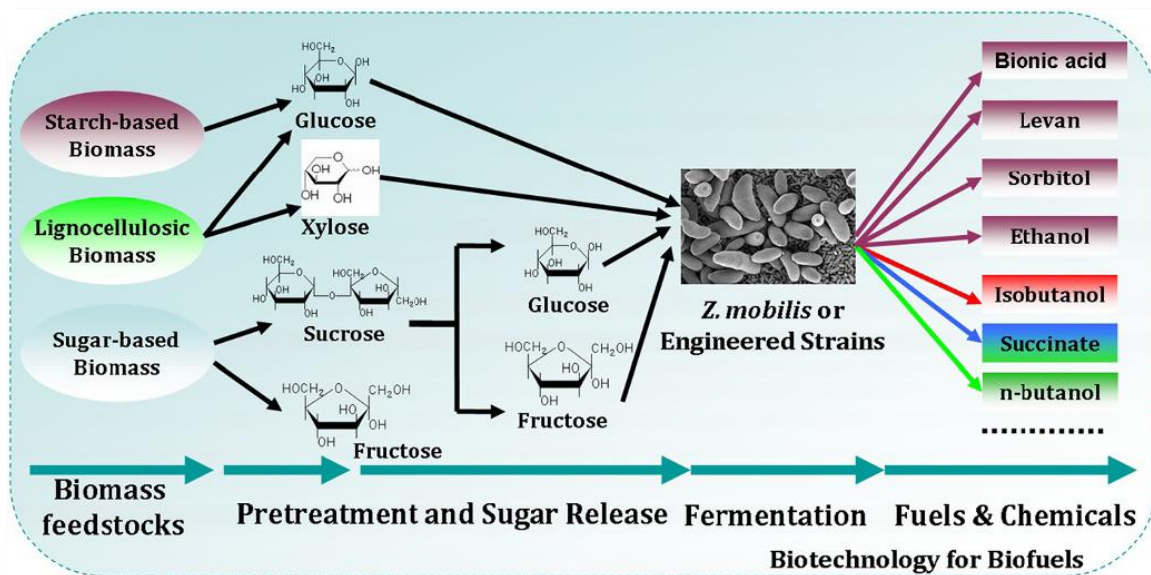
μέσω γενετικής μηχανικής, με σκοπό τον μεταβολισμό μιας ποικιλίας υποστρωμάτων, την παραγωγή επιθυμητών προϊόντων και υψηλότερες αποδόσεις, έχει υποστεί μεγάλη πρόοδο και έχει θέσει την βάση για εφαρμογές σε βιομηχανική κλίμακα. Υπό αυτές τις συνθήκες, το *Z. mobilis* αποτελεί μέχρι και σήμερα εξαιρετικό υποψήφιο οργανισμό για την παραγωγή βιοκαυσίμων (αιθανόλης) και άλλων μεταβολιτών μέσω γενετικής τροποποίησης, λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που διαθέτει (πίνακας 1-3). Πράγματι, ο υψηλότερος ρυθμός πρόσληψης σακχάρων (2-3 φορές γρηγορότερα από τις ζύμες) και η υψηλότερη απόδοση στην παραγωγή αιθανόλης (~95%) σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος και τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας, τον καθιστούν εξαιρετικό εργαλείο για την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας. Επιπλέον, ως αναερόβιος, χρειάζεται απλούστερες συνθήκες ανάπτυξης καθώς δεν απαιτεί ελεγχόμενη προσθήκη οξυγόνου για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Αντίστοιχα, ως ωσμοανθεκτικός, μπορεί να ανεχθεί υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων (πλεονέκτημα ζύμωσης σε θρεπτικά υψηλών ποσοτήτων σακχάρων) και αιθανόλης (μέχρι 16%). Τέλος, σε σχέση με την *E.coli* έχει περιοριστικά ένζυμα υψηλής απόδοσης και ως αποτέλεσμα δεν μπορεί να προσβληθεί από βακτηριοφάγους (Seo *et al.*, 2005).

Παράμετροι	<i>Z. mobilis</i>	Ζύμη
Μετατροπή σακχάρων σε αιθανόλη (%)	96	96
Μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης	12	12
Απόδοση σε ATP (ανά mol γλυκόζης) (Entner-Doudoroff vs Embden-Meyerhoff)	1	2
Ρυθμός παραγωγικότητας της αιθανόλης ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) ^a	5,67	0,67
Ογκομετρική παραγωγικότητα αιθανόλης ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) ^b	200	29
Εύρος pH για την παραγωγή της αιθανόλης	3,5-7,5	2-6,5
Βέλτιστη θερμοκρασία (°C)	25-30	30-38

Πίνακας 1-3: Σύγκριση ιδιοτήτων του *Z. mobilis* και της ζύμης

Αναμφισβήτητα, το *Z. mobilis* έχει πολλά επιθυμητά χαρακτηριστικά λόγω του διακριτού μεταβολικού του μηχανισμού. Μειονεκτήματα του οργανισμού είναι το προορισμένο εύρος υποστρωμάτων (πηγών άνθρακα) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξή του. Για την βελτιστοποίηση του ως αιθανολοπαραγωγό βακτήριο και την ανάπτυξη του σε φθηνά υποστρώματα εφαρμόστηκαν πολλές τεχνικές και μέθοδοι γονιδιακής τροποποίησης, συμπεριλαμβανομένης της μεταβολικής διεύρυνσης, ώστε να μπορεί να αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας ξυλόζη και αραβινόζη έναντι της ακριβότερης γλυκόζης (Kalnenieks *et al.*, 2014; Sprenger, 1992; Rogers *et al.*, 2007). Η δημιουργία ανασυνδυασμένων στελεχών του *Z. mobilis* ικανών να μεταβολίζουν πεντόζες έχει μεγάλες προοπτικές για την παραγωγή βιοκαυσίμων βασισμένων στην αιθανόλη. Ωστόσο, το συγκεκριμένο βακτήριο, πέρα από την κύρια ικανότητα για βιοσύνθεση της αιθανόλης, μπορεί να αξιοποιηθεί και για την παραγωγή άλλων προϊόντων (Kalnenieks, 2006), όπως φρουκτόζη (με την χρήση σακχαρόζης και ένα αρνητικά μεταλλαγμένο στέλεχος ως προς την φρουκτοκινάση), σορβιτόλη, γλυκονικό οξύ, λεβάνη (πολυμερές φρουκτόζης), ολιγομερή φρουκτόζης και αρκετά ένζυμα (Kalnenieks, 2006). Από έρευνα των Park *et al.* έχει βρεθεί ότι η ενεργότητα των ενζύμων-κλειδιών του ED μονοπατιού (πχ γλυκοκινάση) δεν επηρεάζεται από την σχετικά υψηλή συγκέντρωση

της παραγόμενης αιθανόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Ωστόσο, η μεγαλύτερη δυσκολία για την εμπορική χρήση αυτών των ενζύμων είναι η πολύ χαμηλή απόδοση σε βιομάζα κυττάρων του *Z. mobilis* ($0.02\text{--}0.03\text{ g g}^{-1}$ υποστρώματος γλυκόζης) σε σύγκριση με άλλους αερόβιους μικροοργανισμούς (0.5 g g^{-1}). Επιπλέον, το *Z. mobilis* έχει ατελή κύκλο του κιτρικού οξέος και υπάρχει η δυνατότητα, μέσω επιλεκτικής αποσιώπησης γονιδίων (knock out), να τροποποιηθεί ο μεταβολισμός ώστε να μην καταλήγει σε τερματικά προϊόντα (αιθανόλη και γαλακτικό) αλλά σε άλλα, πολύτιμα προϊόντα, όπως ηλεκτρικό οξύ (Rogers *et al.*, 2007).



Εικόνα 1-15: Γενική διαδικασία παραγωγής καυσίμων και μεταβολικών/χημικών προϊόντων από το *Z. mobilis* (He *et al.*, 2014)

1.2.4.1 Γενετική τροποποίηση

Πολλές διεξοδικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στο *Z. mobilis* από το 1980 χωρίς ωστόσο να έχει ακόμα επιτευχθεί, σε βιομηχανική κλίμακα, η ικανότητα παραγωγής αιθανόλης μέσω μεταβολισμού λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας. Πράγματι, η τροποποίηση των στελεχών του *Z. mobilis* είναι αρκετά πιο δύσκολη σε σχέση με την ζύμη ή την *E. coli* και γι' αυτό απαιτείται η ανάπτυξη πιο προηγμένων τεχνολογιών, ο έλεγχος των μεταβολικών πορειών και η βελτιστοποίηση των ρυθμιστικών μονοπατιών με σκοπό την αύξηση της αποδοτικότητας των επιθυμητών προϊόντων. Αυτές οι καινοτόμες τεχνολογίες είναι απαραίτητες για περαιτέρω τροποποίηση των στελεχών και του μεταβολισμού τους με σκοπό την παραγωγή καυσίμων και άλλων χημικών προϊόντων. Επιπλέον, τα νέα εργαλεία που δημιουργούνται συνεχώς για τη μεταβολική διεύρυνση και τροποποίηση των *E. coli* και *S. cerevisiae* θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και στο *Z. mobilis*. Ποικίλες βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις, όπως οι γονιδιακές αλληλουχίσσεις, η γενετική μηχανική και τα omics, μπορούν επίσης να συντελέσουν βάση για μεταβολική ή γονιδιακή τροποποίηση, βελτιώνοντας έτσι την

επιβίωση και την αρμοστικότητα σε περιπτώσεις περιβαλλοντικής καταπόνησης (He *et al.*, 2014).

Κλασικά γενετικά εργαλεία έχουν διερευνηθεί και εκτεταμένως χρησιμοποιηθεί (συμπεριλαμβανομένης της χρήσης πλασμιδίων-φορέων, συστημάτων μεταθετών στοιχείων για μεταλλαξογένεση, τροποποιημένων ρυθμιστικών στοιχείων, γονιδίων αναφοράς όπως GFP (green fluorescent protein) τεχνικών γονιδιακής απαλοιφής και μετασχηματισμού) θα συντελέσουν στην τροποποίηση του είδους για ακόμα καλύτερες επιδόσεις σε βιομηχανική κλίμακα (Yang, 2016). Μέχρι και σήμερα, οι κυριότεροι μέθοδοι βελτιστοποίησης των στελεχών του *Z. mobilis* είναι:

- η μεταλλαξογένεση με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Πολλές προσπάθειες έχουν γίνουν για τη μεταβολική διεύρυνση του *Zygomonas mobilis* έτσι ώστε να μπορεί να αναπτύσσεται επί φθηνών και άφθονων υποστρωμάτων, όπως άχυρο και κυτταρίνη. Κύρια μέθοδος για την δημιουργία τέτοιων στελεχών είναι η απομόνωση των απαραίτητων γονιδίων και η κλωνοποίηση τους σ' ένα φορέα, σταθερό εντός του οργανισμού. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς για την κλωνοποίηση επιθυμητών γονιδίων μπορεί να είναι:
 - κανονικά ενδογενή του ίδιου του στελέχους
 - ευρέως φάσματος ξενιστών
 - προερχόμενα από την σύντηξη επιμέρους πλασμιδίων *E. coli* – *Z. mobilis*.
 - τροποποιημένα πλασμίδια ευρέως φάσματος ξενιστών ώστε να περιλαμβάνουν στοιχεία του *Z. mobilis*, όπως πχ υποκινητές κτλ (Panesar *et al.*, 2006)

Η διάκριση των ανασυνδυασμένων στελεχών βασίζεται σε ένα δείκτη επιλογής, που συνήθως είναι κάποιο είδος αντιμικροβιακών ουσιών. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι φορείς στο *Z. mobilis* προέρχονται από τη σύντηξη 2 πλασμιδίων (1 της *E. coli* και ένα του *Z. mobilis*), έτσι ώστε να περιέχουν τα *oriV* και των δύο οργανισμών. Αυτοί οι φορείς παρέχουν πλεονέκτημα καθώς διατηρούνται και απομονώνονται ευκολότερα από την *E. coli*, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπουν την εισαγωγή νέων γονιδίων στο *Z. mobilis*. Πολλοί τέτοιοι φορείς έχουν δημιουργηθεί τα τελευταία χρόνια. Τέτοιοι είναι 1) το pDS212 μεγέθους 7,9 kb (Afendra and Drainas, 1987) το οποίο προήλθε από τον ανασυνδυασμό των πλασμιδίων pBR325 και pZM02 (φυσικό ενδογενές πλασμίδιο του *Z. mobilis* ATCC 1098), το οποίο υπήρξε πλεονεκτικό ως προς το μέγεθος, τους δείκτες επιλογής (χλωραμφαινικόλη, τετρακυκλίνη) και τη σταθερότητα και στους δύο οργανισμούς, 2) τα pLOI197 (11,9 kb, με *mob* περιοχή από το RSF1010 και δείκτη χλωραμφαινικόλης) και pLOI193 (13,4 kb, με *mob* περιοχή από το RP4 και δείκτες χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη, αλλά με χαμηλές αποδόσεις μετασχηματισμού λόγω του μεγάλου μεγέθους και 3) τα pZ7C και pZ7-184, (από συνδυασμό του ενδογενούς πλασμιδίου pZMO7 του *Z. mobilis* NCIMB 11163 με τα πλασμίδια pUC18 και pACYC-184 της *E. coli* αντίστοιχα).

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισάγονται στον οργανισμό μέσω δύο κύριων μεθόδων:

1. **Σύζευξη:** Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε από τις πρώτες μελέτες για τη γονιδιακή τροποποίηση του οργανισμού (Buchholz and Eveleigh, 1986; Carey *et al.*, 1983). Η διαδικασία απαιτεί την χρήση ενός οργανισμού-δότη (συνήθως *E. coli*), ο οποίος έχει ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα ένα συζευκτικό σύστημα (πχ S17.1 που φέρει το RP4 σύστημα) και επομένως έχει την ικανότητα να μεταφέρει σ'ένα δέκτη τυχόν παρακινούμενα πλασμίδια. Έτσι, το κλωνοποιημένο πλασμίδιο (το οποίο πρέπει να είναι παρακινούμενο) εισάγεται στον δότη με κάποιο σύστημα μετασχηματισμού και στη συνέχεια πραγματοποιείται η διαδικασία της σύζευξης σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης ή υγρό μέσο ανάλογα με τον τύπο του συζευκτικού συστήματος (όπως αναφέρθηκε πιο πάνω τα IncP συστήματα παράγουν κοντό και άκαμπτο τριχίδιο και η σύζευξη είναι δυνατή μόνο σε στερεό μέσο σε αντίθεση με τα IncF συστήματα στα οποία η σύζευξη είναι δυνατή τόσο σε υγρό όσο και σε στερεό μέσο).
 2. **Μετασχηματισμός:** Ως αρχικοί μέθοδοι μετασχηματισμού του *Z. mobilis* χρησιμοποιήθηκαν οι σφαιροπλάστες, μία διαδικασία που προτάθηκε από τους Yanase και συνεργάτες (Yanase *et al.*, 1986), και το CaCl₂ των Su και Goodman (Su and Goodman, 1987). Ωστόσο, αυτές οι διαδικασίες έχουν χαμηλές αποδόσεις, ενώ ταυτόχρονα είναι αρκετά περίπλοκες και χρονοβόρες. Επομένως, σήμερα η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος μετασχηματισμού είναι η ηλεκτροδιάτρηση. Αυτή περιλαμβάνει την εφαρμογή ενός μικρής-διάρκειας και υψηλής-έντασης ηλεκτρικού πεδίου που καθιστά τα κύτταρα διαπερατά σε DNA, επιτρέποντας έτσι την είσοδο των πλασμιδιακών φορέων ή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στο εσωτερικό του κυττάρου (Liang and Lee, 1998).
- η μεταλλαξογένεση μέσω μεταθετών στοιχείων. Τυπικά μεταθετά στοιχεία για το *Z. mobilis* είναι Tn5, Tn10, Tn501, Tn951, Tn1725 και mini Mu τα οποία εισάγονται μέσω συζευκτικών ή παρακινούμενων πλασμιδίων από την *E. coli* προς το *Z. mobilis*. Η μεταλλαξογένεση μέσω mini Mu είναι πολύ πιο επιτυχημένη απ' ότι με τα υπόλοιπα μεταθετά στοιχεία και οδηγεί σε μεγάλο αριθμό διαφοροποιημένων φαινοτύπων πχ αυξοτροφίες. Κατά την είσοδό του στο κύτταρο εισάγεται σε πολλές διαφορετικές θέσεις στο χρωμόσωμα με μη επιλεκτικό τρόπο (Pappas *et al.*, 1997; He *et al.*, 2014)
 - Η μεταλλαξογένεση μέσω UV και χημικών παραγόντων. Μέσω αυτής της μεθόδου έχουν προκύψει πολλές μεταλλαγές σχετικά με αυξοτροφίες, ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, ικανότητα ανοχής σε υψηλές ποσότητες ακεταλδεϋδης, αιθανόλης, άλατος, σουκρόζης, οξέος κτλ (He *et al.*, 2014). Η δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας έγκειται στην δυσκολία επιδιόρθωσης του (κατεστραμμένου) DNA. Η χρήση της UV και του EMS (αίθυλο σουλφονικό μεθάνιο) δεν δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στη δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών του *Z. mobilis*. Αντίθετα, το MNNG (N-μέθυλ-N-

νίτρο-νιτροζογουανιδίνη) χαρακτηρίζεται ως πολύ ισχυρό μεταλλαξογόνο (ελέγχθηκε για παραγωγή αυξοτροφιών, ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και σε βαρέα μέταλλα). Η διαφορά της δράσης των παραπάνω παραγόντων έγκειται στον διαφορετικό τρόπο δράσης τους: Η UV και το EMS προκαλούν σημειακές μεταλλαγές ενώ το MNNG πολλαπλές μεταλλαγές και μεγαλύτερου εύρους βλάβες. Γενικότερα σε κάθε περίπτωση απαιτούνται μεγαλύτερες ποσότητες αλκυλιωτικών παραγόντων και UV για επίτευξη μεταλλαγών στο *Z. mobilis* σε σχέση με την *E. coli*, λόγω καλύτερων επιδιορθωτικών συστημάτων (Typas and Galani, 1992)

1.2.5 Γονιδιοματική

Οι πρώτες προσπάθειες χαρακτηρισμού του γονιδιώματος του *Z. mobilis* έγιναν από τους Swings και De Ley, οι οποίοι χαρακτήρισαν ότι το γονιδίωμα έχει GC περιεχόμενο περίπου 47.5–49.5%, με μέση θερμοκρασία τήξης (Tm) 89.3–89.5 °C και μικρό μοριακό βάρος περίπου 1.5×10^9 (Swings and De Ley, 1977). Έκτοτε, έχουν αλληλουχηθεί τα γονιδιώματα πολλών στελεχών του είδους όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Στέλεχος	Accession number	Περιγραφή			Αναφορές
		Μέγεθος (Mb)	Πλασμίδια	Πρωτεΐνες	
ZM4 (ATCC31821)	NC_006526.2	2.06	5	1,738	(Seo <i>et al.</i> 2005)
NCIMB11163	NC_013355.1	2.22	4	1,884	(Kouvelis <i>et al.</i> 2009)
ATCC 29191	NC_018145.1	2.01	3	1,709	(Desiniotis <i>et al.</i> 2012)
ATCC 29192	NC_015709.1	2.06	2	1,748	(Kouvelis <i>et al.</i> 2011)
ATCC 10988	NC_017262.1	2.14	6	1,803	(Pappas <i>et al.</i> 2011)
CP4 (NRRL B-14023)	NC_022900.1	2.16	5	1,840	(Kouvelis <i>et al.</i> 2014)

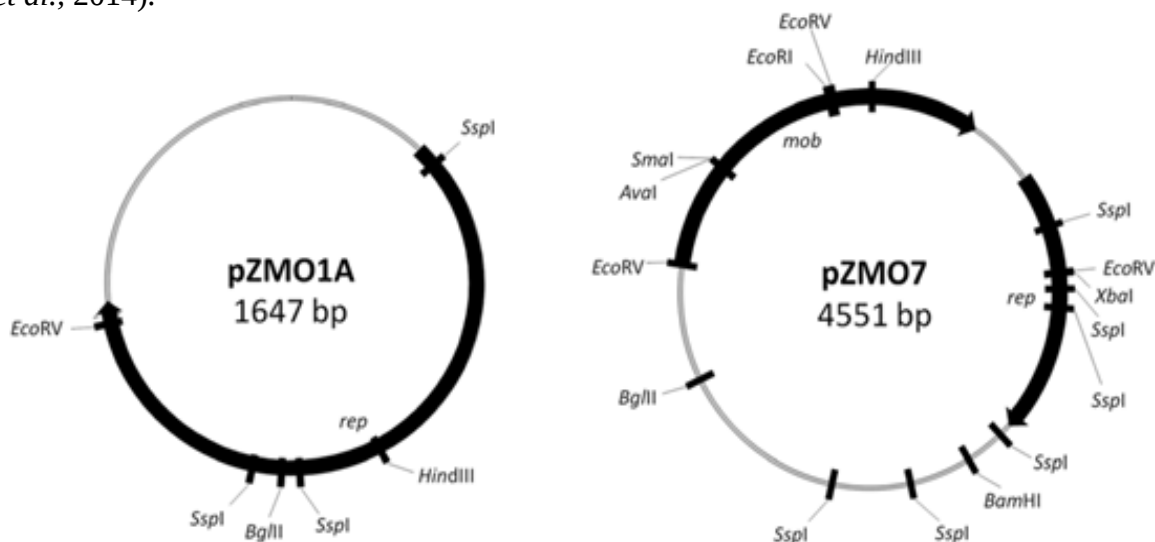
Πίνακας 1-4: Το γονιδίωμα διαφόρων στελεχών του είδους *Z. mobilis* ((He *et al.* 2014)

1.2.5.1 Στέλεχος NCIMB 11163

Πρόκειται για ένα στέλεχος απομονωμένο στην Μεγάλη Βρετανία του οποίου το γονιδίωμα έχει καταχωρηθεί σε βάσεις δεδομένων σχετικά πρόσφατα (Kouvelis *et al.* 2009). Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει ένα κυκλικό χρωμόσωμα (CP001722.1) μεγέθους 2.124,771 kb και τέσσερα πλασμίδια: p11163_1 (pZA1001, CP001723), p11163_2 (pZA1002, CP001724), p11163_3 (pZA1003 ή pZMO7, CP001725) και pZM01

(GQ293074.1, όμοιο με το pZM01 του *Z. mobilis* ATCC 10988), μεγέθους 53,380 kb 40.8 kb, 4,551 kb και 1,647 kb αντίστοιχα. Το συνολικό GC περιεχόμενο του χρωμοσώματος είναι 46.83%, ενώ των πλασμιδίων 42,32%, 43,80%, 36,37% και 39,49% αντίστοιχα.

Το χρωμόσωμα φέρει αρκετές μοναδικές περιοχές σε σχέση με τα άλλα στελέχη του *Z. mobilis*, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι δύο γονιδιωματικές νησίδες, μεγέθους 25 και 79 kb. Αυτές δεν εμφανίζουν νουκλεοτιδική ομολογία με άλλα στελέχη του είδους και έχουν διαφορετικό GC περιεχόμενο από το χρωμόσωμα. Συγκεκριμένα, το GC περιεχόμενο της νησίδας μεγέθους 25 kb είναι 54,92%, ενώ της νησίδας μεγέθους 79 kb 61,58%. Άξια προσοχής είναι επίσης η ύπαρξη ενός T4SS στην νησίδα των 79 kb, το οποίο σχετίζεται με *trb* συζευκτικό σύστημα του πλασμιδίου Ti του *Agrobacterium tumefaciens* (IncRh1), καθώς και πολλαπλών τρανσποζασών και φαγικών στοιχείων. Στα πλασμίδια έχουν αναγνωριστεί τα γονίδια που σχετίζονται με την αντιγραφή, τον μεταβολισμό, τη μεταφορά και τη ρυθμίστη. Μεταξύ των ιδιοτήτων του οργανισμού συμπεριλαμβάνονται η ύπαρξη ενός οπερονίου ανθεκτικότητας στο αρσενικό που βρίσκεται στο πλασμίδιο p11163_1, καθώς και μίας μοναδικής 12-kb CRISPR εισδοχής που διακόπτει τη νουκλεοτιδική συνοχή στο πλασμίδιο p11163_2 (Kouvelis *et al.*, 2009). Επιπλέον, χαρακτηριστική είναι η ικανότητα παρακίνησης του pZA1003 λόγω της ύπαρξης μίας *mob* πρωτεΐνης (YP_006962142), μήκους 433 αμινοξικών καταλοίπων (So *et al.*, 2014).



Εικόνα 1-16: Γενετικοί χάρτες των μικρότερων πλασμιδίων του στελέχους NCIMB 11163 (So *et al.*, 2014)

1.3 Σκοπός της Εργασίας

Το βακτήριο *Z. mobilis* έχει μελετηθεί εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων του για παραγωγή μεγάλης ποσότητας αιθανόλης. Η συζευκτικότητα του οργανισμού έχει υπάρξει αντικείμενο μελέτης, κυρίως όσον αφορά

στην συμπεριφορά του ως δέκτη γενετικού υλικού. Η ενδογενής συζευκτικότητα, ωστόσο, έχει αναφερθεί ελάχιστα (Walia *et al.*, 1984), και ως σήμερα δεν έχει υπάρξει κάποια αξιοσημείωτη ανακάλυψη που να τοποθετεί το *Z. mobilis* μεταξύ των συζευκτικών δοτών. Η πρόσφατη αλληλούχιση των γονιδιωμάτων πολλών στελεχών του είδους, οδήγησε στην εύρεση μίας μοναδικής περιοχής στο στέλεχος NCIMB 11163, η οποία περιέχει έναν σημαντικό αριθμό γονιδίων, ομόλογων με τα αντίστοιχα γνωστών συζευκτικών συστημάτων. Ιδιαίτερα, τα γονίδια αυτά εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με το συζευκτικό σύστημα του *A. tumefaciens* που είναι υπεύθυνο για την μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ των βακτηριακών ειδών. Επομένως, η μελέτη της μοναδικής αυτής περιοχής του NCIMB 11163 σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη του *Z. mobilis*, μπορεί να εμπλουτίσει την ήδη υπάρχουσα γνώση περί φαινομένων οριζόντιας γενετικής μεταφοράς, καθώς και περί δομής και λειτουργίας των ποικίλων συζευκτικών συστημάτων. Επιπλέον, οι πληροφορίες για ένα ενδογενές συζευκτικό σύστημα του *Z. mobilis* μπορεί να συμβάλλουν στην δημιουργία νέων εργαλείων γενετικής τροποποίησης του οργανισμού. Συγκεκριμένα, η εκμετάλλευση των συζευκτικών γονιδίων και του *oriT* μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία εξειδικευμένων φορέων, ειδικών για τον οργανισμό, ενδοειδικά μεταφερόμενων, διευκολύνοντας έτσι την μεταφορά επιθυμητών χαρακτηριστικών μεταξύ των διαφόρων στελεχών. Επομένως, στην παρούσα διπλωματική εφαρμόστηκαν ποικίλες βιοπληροφορικές και εργαστηριακές αναλύσεις με σκοπό την αποσαφήνιση της δομής και λειτουργίας του μοναδικού αυτού συζευκτικού συστήματος.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Τα βακτηριακά στελέχη και τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2-1: Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	Φυσιτικός τύπος	De Lima <i>et al.</i> 1972
<i>Zymomonas mobilis</i> NCIMB 11163	Φυσιτικός τύπος	Dadds <i>et al.</i> 1973
<i>Escherichia coli</i> S17.1	<i>E. coli</i> 294, pro ⁻ , res ⁻ , mod ⁺ , RP4 2-Tc::Mu-Km::Tn7, Sm ^r	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Escherichia coli</i> DH5a	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>lacIZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> (φ80dlac Δ(<i>lacZ</i>)M15)	Hanahan, 1983

Πίνακας 2-2: Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν

ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
pRK2013	Kan ^R	
pBBR1MCS	Cm ^r , ColE1 origin	Kovach ME, 1994
pBBR1MCSK	Km ^r , Cm ^r , ColE1 origin	Αδημοσίευτα αποτελέσματα, Σαββάκης 2014
pJC1	Cm ^R , ColE1/pMB1/pBR322/pUC ori, pZA1003 ori	Αδημοσίευτα αποτελέσματα, Χαραμής 2017

2.2 Θρεπτικά υλικά.

Ως πλήρες θρεπτικό μέσο (CM) για την καλλιέργεια του *Z. mobilis* χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω (Galani *et al.*, 1985).

Πίνακας 2-3: Σύσταση θρεπτικού CM

CM	g/l dH ₂ O
Γλυκόζη (a-D-glucose)	20
Θεικό αμμώνιο [(NH ₄) ₂ SO ₄]	1
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH ₂ PO ₄)	1
Θεικό μαγνήσιο [MgSO ₄ (7H ₂ O)]	0,5
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	5

Ως πλήρες θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια του *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω (Sambrook *et al.*, 1989).

Πίνακας 2-4: Σύσταση θρεπτικού LB

LB	g/l dH ₂ O
Τρυπτόνη (tryptone)	10
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	5
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	10

Τα αντίστοιχα στερεά θρεπτικά υλικά προέκυπταν με την προσθήκη 1.5% (w/v) άγαρ.

2.3 Αντιβιοτικά/βαρέα μέταλλα

Η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά υπήρξε σημαντικός δείκτης για τον έλεγχο ύπαρξης συγκεκριμένων χαρακτηριστικών στο χρωμόσωμα ή συγκεκριμένων πλασμιδίων. Η παρασκευή τους περιελάμβανε τη δημιουργία ενός αρχικού stock υψηλής συγκέντρωσης, το οποίο φιλτραριζόταν και αποθηκευόταν στους 25 °C, στους 4 °C ή στους -20 °C. Από το διάλυμα αυτό,

λαμβάνονταν ο κατάλληλος όγκος και αραιωνόταν σε θρεπτικό υλικό προκειμένου να λάβει την απαραίτητη συγκέντρωση (πίνακας 2-6)

Πίνακας 2-5: Stocks αντιβιοτικών/βαρέων μετάλλων και συνθήκες φύλαξης

Αντιβιοτικό/Βαρέο μέταλλο	Συντομογραφία	Συγκέντρωση stock (mg/mL)	Διαλύτης	Θερμοκρασία αποθήκευσης (°C)
Χλωραμφαινικόλη	Cm	30 και 60	EtOH	-20
Καναμυκίνη	Kan	100	stdH ₂ O	4
Στρεπτομυκίνη	Str	100	stdH ₂ O	4
Ναλιδιξικό οξύ	Nal	30	stdH ₂ O	4
ΡΙφαμυκίνη	Rif	25	EtOH	-20
Αρσενικό (As ₂ O ₃)	As ₂ O ₃	0,25 (mM)	NaOH	25

Πίνακας 2-6: Οι Συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με τον οργανισμό

Αντιβιοτικό/Βαρέο μέταλλο	Συγκέντρωση για <i>E. coli</i> (μg/ml)	Συγκέντρωση για <i>Z. mobilis</i> (μg/ml)
Χλωραμφαινικόλη	30	120
Καναμυκίνη	50	150
Στρεπτομυκίνη	50	-
Ναλιδιξικό οξύ	10	-
ΡΙφαμυκίνη	-	25
Αρσενικό (As ₂ O ₃)	-	0.03 (mM)

2.4 Ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών.

2.4.1 *Zymomonas mobilis*

Η επώση των καλλιιεργειών των στελεχών του *Z. mobilis* γινόταν στους 30°C. Οι υγρές καλλιέργειες αναπτύσσονταν στατικά, σε σχετικά αναερόβιες συνθήκες, σε εργαστηριακές φιάλες με βιδωτό καπάκι, με τον όγκο της καλλιέργειας να είναι περίπου ίσο με τα 9/10 του όγκου της φιάλης. Η ανάπτυξη πραγματοποιούνταν επίσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες με πώμα, των 15 ml. Σε πρώτο στάδιο γινόταν εμβολιασμός μονής αποικίας από τρυβλίο, είτε με κρίκο εμβολιασμού είτε με οδοντογλυφίδα, σε 3 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού εντός δοκιμαστικού σωλήνα. Από αυτήν την προκαλλιέργεια και ύστερα από ανάπτυξη της, λαμβανόταν ποσότητα για εμβολιασμό 0,1% σε νέο θρεπτικό υλικό. Η νέα αυτή καλλιέργεια αναμενόταν να φτάσει στη μέση-τέλος της εκθετικής φάσης σε περίπου 14-16 ώρες. Οι στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία petri πραγματοποιούνταν με τρεις τρόπους: Πρώτον, ποσότητα υγρής καλλιέργειας λαμβανόταν με κρίκο εμβολιασμού και μεταφερόταν σε στερεό θρεπτικό με τη μέθοδο των παραλλήλων γραμμών (streaking). Δεύτερον, ποσότητα υγρής καλλιέργειας μεταφερόταν στο στερεό θρεπτικό και επιστρωνόταν με διανομέα. Τρίτον, ποσότητα υγρής καλλιέργειας μεταφερόταν σε άδειο τρυβλίο Petri, στη συνέχεια προστίθετο τηγμένο άγαρ θερμοκρασίας περίπου 40 °C και

ακολουθούσε ανακίνηση προς όλες τις κατευθύνσεις (εγκλεισμός). Ο τελευταίος τρόπος ανάπτυξης στερεής καλλιέργειας είναι ενδεικτικός για αναεροβίωση. Τα τρυβλία τυλίγονταν με μεμβράνη και τοποθετούνταν στον επωαστήρα ανεστραμμένα. Η μέτρηση αποικιών *Z. mobilis* στην επιφάνεια στερεών θρεπτικών μέσων πραγματοποιούνταν μετά το πέρας 3-4 ημερών.

2.4.2 *Escherichia coli*

Η ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών στελεχών *E. coli* γινόταν στους 37 °C, υπό ανάδευση, σε κωνικές φιάλες στις οποίες το θρεπτικό υλικό κατελάμβανε το πολύ το 1/5 του όγκου (20%), εξασφαλίζοντας αερόβιες συνθήκες ανάπτυξης. Η ανάδευση πραγματοποιούνταν σε shakerincubator της εταιρείας LabTech. Ανάπτυξη καλλιέργειας τέλους εκθετικής φάσης πραγματοποιούνταν ύστερα από 16 h (rpm=100) με εμβολιασμό φρέσκου θρεπτικού υλικού από μονή αποικία ή με μεταφορά μικρής ποσότητας από προκαλλιέργειας με κρίκο. Ανάπτυξη καλλιέργειας μέσα στην ημέρα γινόταν υπό ανάδευση στις 180 rpm. Οι στερεές καλλιέργειες πραγματοποιούνταν είτε με την μέθοδο των παραλλήλων γραμμών είτε με επίστρωση με διανομέα, και έδιναν μετρήσιμες αποικίες ύστερα από μία μέρα επώασης στους 37 °C.

2.5 Αποθήκευση στελεχών

Οι καλλιέργειες των στελεχών σε στερεά θρεπτικά μέσα, αμέσως μετά το τέλος της ανάπτυξης, φυλάσσονταν στους 4°C για 1-2 μήνες. Για μεγαλύτερης διάρκειας φύλαξη προστίθετο γλυκερόλη, σε υγρές καλλιέργειες μέσης προς τέλους εκθετικής αύξησης, σε τελική συγκέντρωση 30%. Αυτές φυλάσσονταν σε ειδικά πλαστικά φιαλίδια με βιδωτό πώμα (cryovials) όγκου 1,8 mL στους -20° και - 80°C

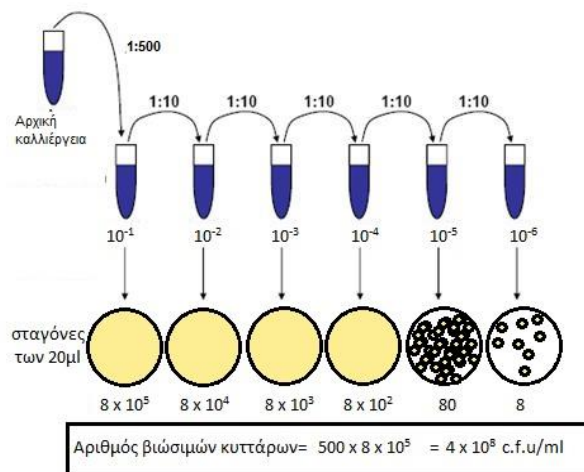
2.6 Μετρήσεις ανάπτυξης βακτηριακών καλλιεργειών

2.6.1 Φωτομέτρηση

Για μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) και τον προσδιορισμό της εκάστοτε φάσης ανάπτυξης μίας υγρής καλλιέργειας, γινόταν φωτομέτρηση 1 mL καλλιέργειας σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους –ορατού Ultraspec 2000 της εταιρείας Pharmacia Biotech και σε μήκος κύματος 600 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείτο 1 mL καθαρού θρεπτικού ίδιου με αυτό στο οποίο αναπτυσσόταν ο οργανισμός. Η δημιουργία καμπύλης αύξησης του εκάστοτε στελέχους πραγματοποιείτο μέσω φωτομέτρησης ανά διάστημα δύο ωρών, από την στιγμή του εμβολιασμού έως και την στάτική φάση.

2.6.2 Μετρήσεις βιώσιμων κυττάρων

Οι μετρήσεις του αριθμού των βιώσιμων βακτηριακών κυττάρων των καλλιιεργειών (viable counts) γίνονται με τη μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων των Miles και Misra. Ως ισοοσμωτικό διάλυμα για τις αραιώσεις χρησιμοποιείται αποστειρωμένο διάλυμα 0,9% w/v NaCl. Η διαδικασία διεξάγεται σε πλάκες πολλαπλών θέσεων (microtiter plates), οι οποίες αποστειρώνονται με χρήση UV για 10 λεπτά. Ο τελικός όγκος κάθε αραιώσης ήταν συνήθως 200 μL (20 μL καλλιέργειας ή της προηγούμενης αραιώσης και 180 μL 0,9% NaCl) και σπάνια 250 μL (25 μL + 225 μL αντίστοιχα). Από κάθε αραιώση λαμβάνονταν 2-3 σταγόνες 20 μL και τοποθετούνταν σε τμήμα ενός κατάλληλα διαχωρισμένου τρυβλίου (χωρισμένο σε 8 μέρη). Η μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων γινόταν σε σταγόνες 20 μL που τοποθετούνταν από την κάθε δεκαδική αραιώση στα κατάλληλα τρυβλία. Μετά από κατάλληλη περίοδο επώασης ανάλογα με τον μικροοργανισμό πραγματοποιείται μέτρηση του αριθμού των αποικιών από τις αραιώσεις (συνήθως τις δύο τελευταίες), υπολογίζονταν οι μέσοι όροι και γινόταν η αναγωγή του αριθμού κυττάρων ανά ml αρχικής καλλιέργειας. Η μέθοδος παρουσιάζεται συνοπτικά στην εικόνα 2-1



Εικόνα 2-1: Μέθοδος viable counts. Στην εικόνα φαίνονται η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων καθώς και η διαδικασία υπολογισμού των αποτελεσμάτων.

2.7 Απομονώσεις πλασμιδιακού DNA

Οι πλασμιδιακές απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης (Sambrook and Russell, 2001). Χρησιμοποιήθηκαν για το *Z. mobilis* και το στέλεχος DH5A pBBR1MCS της *E. coli*. Διακρίνονται σε μικρής και μεσαίας κλίμακας.

Σύσταση απαραίτητων διαλυμάτων

STE: 50 mM Tris·Cl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8.0

GET: 50 mM glucose, 25 mM Tris·Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0

SolII: 1% SDS, 0.2N NaOH σε H₂O (*E. coli*) ή TE₅₀ (*Z. mobilis*). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε πλαστικό μπουκάλι.

SolIII (100 ml): 60 ml CH₃COOK 5 M, 11.5 ml CH₃COOH, 28.5 ml H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο.

TE₁₀: 100 mM Tris·Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0

TE₅₀: 50 mM Tris·Cl pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0

2.7.1 *Zymomonas mobilis*

2.7.1.1 Μικρής κλίμακας πλασμιδιακή απομόνωση

(Οι όγκοι των διαλυμάτων που αναγράφονται είναι για καλλιέργεια έως 8 ml).

Χρησιμοποιείται η φυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5424.

1. Καλλιέργεια όγκου έως 8 mL (κυρίως 5 ml) φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για 1 min. Πολύ καλή απομάκρυνση του υπερκείμενου.
2. Αναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε ~120 µl δ/τος GET (ώστε ο τελικός όγκος να είναι 150 µl).
3. Προσθήκη 300 µL δ/τος λύσης SolII (σε TE₅₀) και παραμονή του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
4. Προσθήκη 300 µl παγωμένου δ/τος SolIII (παγωμένο δ/μα οξικού καλίου 3M pH 4.8). Απότομες αναστροφές (3-4) και επώαση του δείγματος στον πάγο για 10 min.
5. Φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 10 min. Κρατιέται το υπερκείμενο.
6. Εκχύλιση του υπερκείμενου με προσθήκη ίσου όγκου δ/τος φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής (δ/μα φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1). Ανάδευση με vortex για 5-10 sec (μέχρι ομογενοποίησης και ανάμιξης των φάσεων) και φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 5 min. Κρατείται προσεκτικά η υδατική φάση. Επανάληψη εκχυλίσεων έως ότου εξαλειφθεί η μεσόφαση.
7. Ακολουθεί εκχύλιση με δ/μα χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1 με προσθήκη ίσου όγκου δ/τος με την υδατική φάση σε κάθε eppendorf, ανάδευση με vortex για 5-10 sec (μέχρι ομογενοποίησης και ανάμιξης των φάσεων) και φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 5 min. Κρατείται προσεκτικά η υδατική φάση.

8. Κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη άλατος NaCl 5M ή NaAc 3M όγκου ίσου με το 1/10 του όγκου της υδατικής φάσης και με προσθήκη ισοπροπανόλης όγκου ίσου με τα 8/10 του όγκου της υδατικής φάσης. Ακολουθούν 3-4 αναστροφές και φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 15 min.
9. Απόρριψη υπερκειμένου, ξέπλυμα του ιζήματος με 0.5 ml 70% αιθανόλη και φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 5 min. Απομακρύνεται η αιθανόλη και γίνεται spin για απομάκρυνση των υπολειμμάτων της με πιπέτα.
10. Στέγνωμα του ιζήματος στους 65°C (για <1 min). Προσθήκη 10 - 20 µl TE₅₀ και RNάσης σε τελική συγκέντρωση 50 µg/ml. Επώαση στους 65°C για 20 min (κάθε 5 min αναδεύεται ο όγκος στο κάθε eppendorf με tap-tap και spin).

2.7.2 *Escherichia coli*

2.7.2.1 Μικρής κλίμακας πλασμιδιακή απομόνωση

1. Φυγοκέντρωση καλλιέργειας όγκου 1,5 ml - 3 ml (ή και 5 ml) σε 12000 rpm για 1,5 min σε Eppendorf Centrifuge 5424.
2. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 100 µl GET.
3. Προσθήκη 200 µl δ/τος SolII και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 - 2 min.
4. Προσθήκη 200 µl δ/τος SolIII και RNase με τελική συγκέντρωση 20 µg/ml, και επώαση σε πάγο για 2 - 5 min.
5. Φυγοκέντρωση για 10 min σε 12000 rpm στη μικροφυγόκεντρο και συλλογή του υπερκειμένου με χρήση πιπέτας.
6. Προσθήκη ίσου όγκου δ/τος φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1, δυνατή ανάμιξη με vortex μέχρι ομογενοποίησης και ανάμιξης των φάσεων του διαλύματος και φυγοκέντρωση για 5 - 7 min στις 12000 rpm στη μικροφυγόκεντρο.
7. Προσεκτική συλλογή του υπερκειμένου χωρίς αυτό να αναμιχθεί με την μεσόφαση και επανάληψη του σταδίου 6 μέχρι πλήρους εξάλειψης της μεσόφασης.
8. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου, δυνατή ανάμιξη με vortex μέχρι ομογενοποίησης και ανάμιξης των φάσεων του διαλύματος και φυγοκέντρωση για 5 - 7 min στις 12000 rpm στη μικροφυγόκεντρο.
9. Προσεκτική συλλογή του υπερκειμένου.
10. Κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με 0,8V όγκος ισοπροπανόλης ή 2,5V όγκος αιθανόλης 100 % v/v (όπου V ο όγκος που συλλέχθηκε από το στάδιο της φαινόλης-χλωροφορμίου). Ήπια ανάδευση 3 - 4 φορές με αναστροφές και φυγοκέντρωση για 15 min στις 12000 rpm στη μικροφυγόκεντρο.
11. Απόρριψη υπερκειμένου και ξέπλυμα ιζήματος με 70% αιθανόλη.
12. Στέγνωμα ιζήματος και προσθήκη ~ 20 µl TE₁₀ (Tris 10 mM, EDTA 1 mM).
13. Επώαση στους 65 °C για 20 min για αποδιάταξη νουκλεασών.

2.7.2.2 Μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακή απομόνωση

1. Προετοιμασία προκαλλιέργειας με εμβολιασμό μονής αποικίας σε 2 - 3 ml θρεπτικού και στη συνέχεια καλλιέργειας 100 ml με 0,1 % εμβόλιο από την προκαλλιέργεια και επώαση overnight (o/n).
2. Φυγοκέντρηση των 100 ml στην Sorvall RC-5C (κεφαλή SS34) στις 7000 rpm για 7 min στους 4 °C. Σε αυτό το στάδιο τα ιζήματα μπορούν να φυλαχθούν στην κατάψυξη.
3. Αναδιάλυση του ιζήματος με 2 ml δ/τος GET.
4. Προσθήκη 4 ml δ/τος SolII, ήπια ανάμιξη του περιεχομένου με 3 - 4 αναστροφές και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 - 10 min.
5. Προσθήκη 4 ml δ/τος SolIII, ανάμιξη του περιεχομένου με 3 - 4 απότομες αναστροφές και επώαση σε πάγο για 20 min.
6. Φυγοκέντρηση στην Sorvall RC-5C (κεφαλή SS34) στις 12000 rpm για 20 min στους 4 °C.
7. Φιλτράρισμα του υπερκειμένου με χρήση τριπλής γάζας.
8. Καταβύθιση του DNA με προσθήκη ισοπροπανόλης όγκου 8/10 του όγκου του περιεχομένου, ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για 30 min. Σε αυτό το σημείο το περιεχόμενο μπορεί να φυλαχθεί στο ψυγείο.
9. Φυγοκέντρηση στην Sorvall RC-5C (κεφαλή SS34) στις 12000 rpm για 20 min στους 4°C.
9. Ξέπλυμα του ιζήματος με αιθανόλη 70% v/v.
10. Στέγνωμα του ιζήματος, αναδιάλυση αυτού σε 1,4 ml TE, προσθήκη 2 µl RNase (stock 10 mg/ml) και επώαση για 15 - 20 min στους 37 °C.
11. Διαχωρισμός του υπερκειμένου σε δύο eppendorf's από 700 µl στο καθένα και εκχυλίσεις με ίσου όγκου δ/τος φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) τόσες ώστε να μην εμφανίζεται μεσόφαση και φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm σε Eppendorf Centrifuge 5424.
12. Προσεκτική συλλογή του υπερκειμένου χωρίς αυτό να αναμιχθεί με την μεσόφαση και επανάληψη του σταδίου 12 μέχρι πλήρους εξάλειψης της μεσόφασης.
13. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου, δυνατή ανάμιξη με vortex μέχρι ομογενοποίησης και ανάμιξης των φάσεων του διαλύματος και φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm στη μικροφυγόκεντρο.
14. Προσεκτική συλλογή του υπερκειμένου.
15. Κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με 0,8V όγκος ισοπροπανόλης και 0,1V αλατιού NaCl 5 M ή NaAc 3 M (όπου V ο όγκος που συλλέχθηκε από το στάδιο της φαινόλης-χλωροφορμίου). Ήπια ανάδευση 3 - 4 φορές με αναστροφές και φυγοκέντρηση για 15 min στις 12000 rpm στη μικροφυγόκεντρο.
16. Απόρριψη υπερκειμένου και ξέπλυμα ιζήματος με 70% αιθανόλη.
17. Στέγνωμα ιζήματος και προσθήκη ~ 20 µl TE₁₀ (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) ή stdH₂O.
18. Επώαση στους 65 °C για 20 min για αποδιάταξη νουκλεασών.

2.8 Μετασχηματισμός κυττάρων *Zymomonas mobilis*

Οι μετασχηματισμοί του *Zymomonas mobilis* πραγματοποιούνταν με τη μέθοδο του electroporation, ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο.

2.8.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *Z. mobilis*:

Όλες οι φυγοκεντρήσεις γίνονται στη φυγόκεντρο Hermle στους 4°C (cold room) αφού προηγηθεί ισοζύγισή των σωλήνων με ακρίβεια 2 δεκαδικών.

Όλοι οι χειρισμοί (προσθήκη διαλυμάτων και αναδιαλύσεις) γίνονται στον πάγο.

1. Από φρέσκια προκαλλιέργεια σταδίου τέλους εκθετικής φάσης (O.D.= ~1,2) γίνεται εμβολιασμός 0.1% v/v σε θρεπτικό CM σε μπουκάλι τύπου shot (με μπλε καπάκι). Ο εμβολιασμός γίνεται σε κατάλληλη ώρα και η καλλιέργεια επωάζεται στον κλίβανο των 30°C τόσες ώρες ώστε την επόμενη μέρα αφού γίνει φωτομέτρηση της καλλιέργειας, η οπτική πυκνότητα να είναι: OD₆₀₀~0.5 για το CP4, ενώ για το NCIMB 11163 ποικίλλει ανάλογα με τις . Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon, φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 8 min στη Hermle και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
2. Τα κύτταρα αναδιαλύονται σε παγωμένο αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό όγκου ίσου με τον αρχικό όγκο της καλλιέργειας.
3. Φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 8 min και αναδιάλυση των κυττάρων σε παγωμένο αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό όγκου ίσου με το μισό (1/2) του αρχικού όγκου της καλλιέργειας.
4. Επανάληψη του προηγούμενου σταδίου.
5. Φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 8 min και αναδιάλυση των κυττάρων σε παγωμένο αποσταγμένο αποστειρωμένο νερό όγκου ίσου με το 1/50 του αρχικού όγκου της καλλιέργειας.
6. Φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 8 min και αναδιάλυση των κυττάρων σε παγωμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% v/v όγκου ίσου με το 1/500 του αρχικού όγκου της καλλιέργειας (αναδιάλυση σε μικρότερη ποσότητα δ/τος καθώς τα κύτταρα αυξάνουν τον όγκο).
7. Τα αναδιαλυμένα κύτταρα φυλάσσονται σε δείγματα (aliquots) των 40 µl στους -80°C.

2.8.2 Διαδικασία ηλεκτροδιάτρησης

Η συσκευή ηλεκτροδιάτρησης που χρησιμοποιήθηκε είναι η BTX Electro Cell Manipulator 600 της εταιρείας BTX Inc, οι κυβέττες έχουν κενό 1 mm και είναι της ίδιας εταιρείας και οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροδιάτρηση στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2-7: Συνθήκες ηλεκτροδιάτρησης του *Z. mobilis*

Resistance (R)	R5 (129 ΩHM)
Mode (T)	High Voltage (2.5 kV)
Charging Voltage (S)	1.4 kV
Capacitance	Δεν χρησιμοποιείται σε περίπτωση High Voltage Mode
Pulse length	~5 msec

1. Στο erpendorf των δεκτικών κυττάρων, προστίθεται το DNA αναδιαλυμένο σε stdH₂O (1 έως 10 μl).
2. Το μείγμα μεταφέρεται σε κυβέττα που προηγουμένως έχει τοποθετηθεί στον πάγο. Η κυβέττα στεγνώνεται καλά από υπολείμματα νερού/πάγου και εφαρμόζεται στην συσκευή. Ο παλμός μεταφέρεται με το κουμπί “Automatic charge”.
3. Μόλις σβήσει η φωτεινή ένδειξη, προστίθεται ακαριαία στην κυβέττα 1 ml προθερμασμένου θρεπτικού υλικού CM, ακολουθούν ήπιες αναδεύσεις και όλο το μείγμα μεταφέρεται σε erpendorf όπου επωάζεται στους 30oC για 3 ώρες στατικά.
4. Μετά το πέρας της ανάνηψης, γίνεται επίστρωση σε τρυβλία επιλογής.
5. Παράλληλα, γίνονται μετρήσεις βιώσιμων κυττάρων (viable counts) τόσο από τα παγωμένα δείγματα των δεκτικών κυττάρων όσο και μετά την ανάνηψη των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Η επιτυχία του μετασχηματισμού κρίνεται με τους παρακάτω τύπους:

$$\text{συχνότητα μετασχηματισμού} = \frac{\text{αριθμός των μετασχηματισμένων κυττάρων/ml}}{\text{αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν μετά την ανάνηψη/ml}}$$

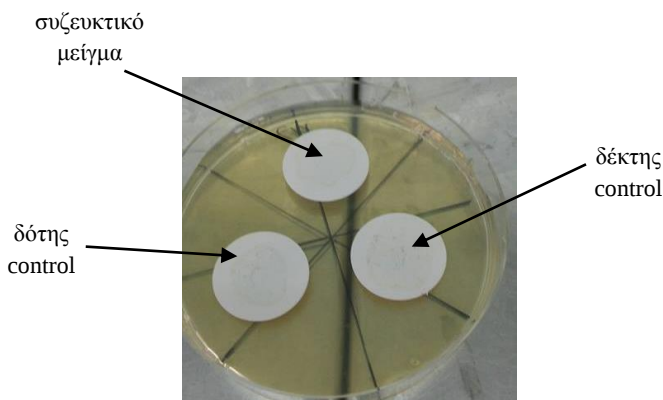
$$\text{απόδοση μετασχηματισμού} = \frac{\text{αριθμός των μετασχηματισμένων κυττάρων/ml}}{\mu\text{g DNA}}$$

2.9 Σύζευξη βακτηρίων σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης

Η πορεία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Συλλέγονται καλλιέργειες από τον δότη και τον δέκτη σε κατάλληλη OD₆₀₀.
2. Φυγοκεντρούνται οι αναγκαίες ποσότητες ποσότητες από την κάθε καλλιέργεια ώστε να επιτευχθεί η ζητούμενη αναλογία δότη-δέκτη. Η φυγοκέντρηση για τις καλλιέργειες της *E. coli* γίνεται στις 12000 rpm για 1 min, ενώ για τις καλλιέργειες του *Z. mobilis* στις 9.000 rpm για 30 sec. Απορριπτεται το υπερκείμενο και προστίθεται φυσικός ορός NaCl 0,9%. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση. Προαιρετικά, μπορεί να επαναληφθεί ξέπλυμα με φυσικό ορό και φυγοκέντρηση άλλη μια φορά.

3. Αναδιαλύεται το ίζημα σε κάθε erppendorf στην ελάχιστη ποσότητα φυσικού ορού που απομένει μετά την απόρριψη υπερκλειμένου (~50μl) (σε ορισμένες συζεύξεις που πραγματοποιήθηκαν, η τελική επαναδιάλυση έγινε στο θρεπτικό υλικό του οργανισμού και όχι σε φυσικό ορό). Γίνεται συνένωση ιζημάτων τοποθετώντας την ποσότητα του δότη στο erppendorf με τον δέκτη.
4. Το μείγμα των ιζημάτων τοποθετείται σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης, το οποίο έχει τοποθετηθεί σε τρυβλίο με μη επιλεκτικό στερεό θρεπτικό υλικό, κατάλληλο για τον δέκτη (LB για *E. coli*, CM για *Z. mobilis*), με προσοχή να μην βγει η σταγόνα του μείγματος εκτός του φίλτρου και διαρρεύσει πάνω στο θρεπτικό υλικό. Επώάζεται (όχι ανεστραμμένα) για 4-5 ώρες στην θερμοκρασία που αναπτύσσεται ο δέκτης (το χρονικό διάστημα μπορεί να αλλάξει για βελτίωση αποτελεσμάτων και καλύτερη απόδοση) . Σημείωση: στο ίδιο τρυβλίο τοποθετούνται φίλτρα με σταγόνες από αντίστοιχα αναδιαλυμένα ιζήματα κυττάρων, μόνο του δότη ή μόνο του δέκτη, ως αρνητικοί μάρτυρες του εκάστοτε πειράματος.
5. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, το κάθε φίλτρο ξεπλένεται με 1 ml φυσικό ορό, ώστε να αφαιρεθούν όλα τα κύτταρα, σε ένα άδειο αποστειρωμένο τρυβλίο. Το κυτταρικό εναιώρημα συλλέγεται σε Erppendorf και Ακολουθεί διαδικασία μέτρησης βιωσιμότητας σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υλικό και αντιβιοτικά ανάλογα την επιθυμητή καταμέτρηση (δύναται η καταμέτρηση τελικού αριθμού κυττάρων δότη, δέκτη, κύτταρα δέκτη που δέχθηκαν το πλασμίδιο κοκ). Ο αριθμός των μετασυσζευγμένων κυττάρων στην περίπτωση του *Z. mobilis* έγινε με δύο μεθόδους: Μισό από το μείγμα της ανάνηψης εγκλείστηκε σε μη στερεοποιημένο ακόμα άγαρ (εγκλεισμός), ενώ το άλλο μισό επιστρώθηκε με διανομέα



Εικόνα 2-2: Διευθέτηση φίλτρων στο τρυβλίο της σύζευξης

2.10 Έλεγχος πλασμιδιακής σταθερότητας

Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκε η σταθερότητα των πλασμιδίων pBBR1MCS και pBBR1MCSK στο στέλεχος NCIMB 11163. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Από φρέσκια προκαλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους (τέλος εκθετικής φάσης ανάπτυξης) έγινε εμβόλιο 0,1% v/v σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα: **1)** με 4 ml επιλεκτικού

θρεπτικού υλικού (χλωραμφαινικόλη 120 µg/ml) και 2) με 4 ml μη επιλεκτικού θρεπτικού υλικού (CM). Κάθε 24 (για την καλλιέργεια στο μη επιλεκτικό θρεπτικό υλικό) ή 48 ώρες (για την καλλιέργεια στο επιλεκτικό θρεπτικό υλικό, καθώς παρουσιάζε υστέρηση στην ανάπτυξη), γινόταν μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων τόσο σε επιλεκτικά όσο και σε μη επιλεκτικά τρυβλία από την κάθε καλλιέργεια, καθώς και επανάληψη των ανακαλλιιεργειών στα αντίστοιχα επιλεκτικά ή μη επιλεκτικά θρεπτικά υλικά. Το διάστημα αυτό αντιπροσώπευε την πάροδο των 10 γενεών.

Η πλασμιδιακή σταθερότητα υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$\frac{\text{αριθμός αποικιών σε επιλεκτικό τρυβλίο/ml}}{\text{αριθμός αποικιών σε μη επιλεκτικό τρυβλίο/ml}}$$

2.1 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση δειγμάτων DNA. Η συγκέντρωση αγαρόζης στα πηκτώματα ηλεκτροφόρησης ήταν 0,8 - 1% w/v, ως διαλύτης για την παρασκευή του πηκτώματος και ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούνταν το TAE 1x (40 mM Tris-οξικό, 1 mM EDTA). Οι συνήθεις συνθήκες ηλεκτροφόρησης κατά τη διάρκεια της ημέρας ήταν 2-5 V/cm. Η χρωστική που χρησιμοποιούνταν για το φόρτωμα το δειγμάτων ήταν η 6x DNA Loading Dye με σύσταση 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60 mM EDTA. Η οπτικοποίηση του DNA γινόταν δυνατή με προσθήκη 0.5µg/mL τελικής συγκέντρωσης βρωμιούχου αιθιδίου κατά την παρασκευή του πηκτώματος ή εναλλακτικά με εμβάπτιση του μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0.5 µg/ml για 15 λεπτά.

Η φωτογράφιση του πηκτώματος πραγματοποιούνταν σε UVP μέσω του προγράμματος Grab-it (annotating grabber, 2.04.7, Synoptics LTD).

Οι 1Kb Gene Ruler και λ HindIII ήταν οι δείκτες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2 Απομόνωση ζώνης από πήκτωμα αγαρόζης

Οι απομονώσεις ζωνών από πηκτώματα αγαρόζης πραγματοποιούνταν με στήλες της NucleoSpin® εταιρείας MN. Αρχικά η επιθυμητή ζώνη κοβόταν από το πήκτωμα με νυστέρι, με τη βοήθεια φωτός UV, και κατόπιν υπολογιζόταν, με ζύγιση, το βάρος της. Μετά τον υπολογισμό του βάρους της ζώνης ακολουθούνταν το πρωτόκολλο της εταιρείας και τέλος γινόταν εκτίμηση της ποσότητας του DNA με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης.

2.3 Ενζυμικές αντιδράσεις

2.3.1 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα

Οι αντιδράσεις πέψεων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες πραγματοποιούνταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας που παρέχει το περιοριστικό ένζυμο. Κατά κανόνα, οι πέψεις πραγματοποιούνταν σε τελικό όγκο 20μl, προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα DNA (υπολογίζεται σε ηλεκτροφόρηση με ladder λ/HindIII), το buffer (κατάλληλο του κάθε ενζύμου) ανάλογα την συμπύκνωση του (συνήθως 2μl γιατί διατίθενται σε 10x συγκέντρωση) και συμπληρώνοντας τον υπόλοιπο όγκο με stdH₂O. Ο μέγιστος όγκος αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 50 μl.

2.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την απομονώση και για την ενίσχυση επιθυμητών τμημάτων DNA πραγματοποιούνταν αντίδραση PCR, στον θερμικό κυκλοποιητή Genius της Techne 96x0.2ml w Hot Top.

Σε όλες της αντιδράσεις PCR που στήθηκαν, προτιμήθηκε η hot start PCR σαν τεχνική που διαφέρει από την συμβατική στο ότι η προσθήκη της πολυμεράσης γίνεται προς το τέλος (<1 min πριν τελειώσει) η αποδιάταξη του DNA.

Η αντίδραση γινόταν σε τελικό όγκο 50 μl και τα αντιδραστήρια ήταν τα εξής: Hifi πολυμεράση, dNTP mix και Buffer της KAPA Biosystems, αλληλουχία του DNA προς ενίσχυση και primers (forward/backward). Η αλληλουχία των primers που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η εξής:

BamZAF: 5'- CATGGATCCGAAGATTTGTTTTCTGTCTA - 3' T_m = 52.2 °C
BamZAR: 5'- ACTGGATCCGAAGATGATTGGGTAAAAG - 3' T_m = 55 °C

Όλες οι PCR που πραγματοποιήθηκαν είχαν ως στόχο την ενίσχυση του πλασμιδίου pZA1003 του στελέχους NCIMB 11163. Για καλύτερη απόδοση στην PCR, το πλασμιδιακό πρότυπο του στελέχους υπέστη πέψη με BamHI, ώστε να γραμμικοποιηθεί το pZA1003 (μοναδική θέση πέψης). Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε και ένας μάρτυρας (χωρίς DNA) για να επαληθευθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και οι συνθήκες της PCR δίνονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 2-8: Ποσότητες αντιδραστηρίων στην PCR

δείγμα	Μάρτυρας
22,5 H ₂ O	27,5 H ₂ O
1,5 μl dNTPs 10mM (Kapa)	1,5 μl dNTPs 10mM (Kapa)
10 μl Buffer 5X (Kapa)	10 μl Buffer 5X (Kapa)
5 μl BamZAF (10 pmoles/μl)	5 μl BamZAF (10 pmoles/μl)
5 μl BamZAR (10 pmoles/μl)	5 μl BamZAR (10 pmoles/μl)
5 μl DNA	-

1 µl Kapa Hifi polymerase 1 u/µl	1 µl Kapa Hifi polymerase 1 u/µl
-------------------------------------	-------------------------------------

Πίνακας 2-9: Συνθήκες PCR

30 κυκλοι
5' hot start 95 °C
Ιροσθήκη 1 µl Hifi DNA πολυμεράση
1' αποδιάταξη στους 95 °C
20 sec annealing 53 °C
5' extension 72 °C
10' final extension 72 °C

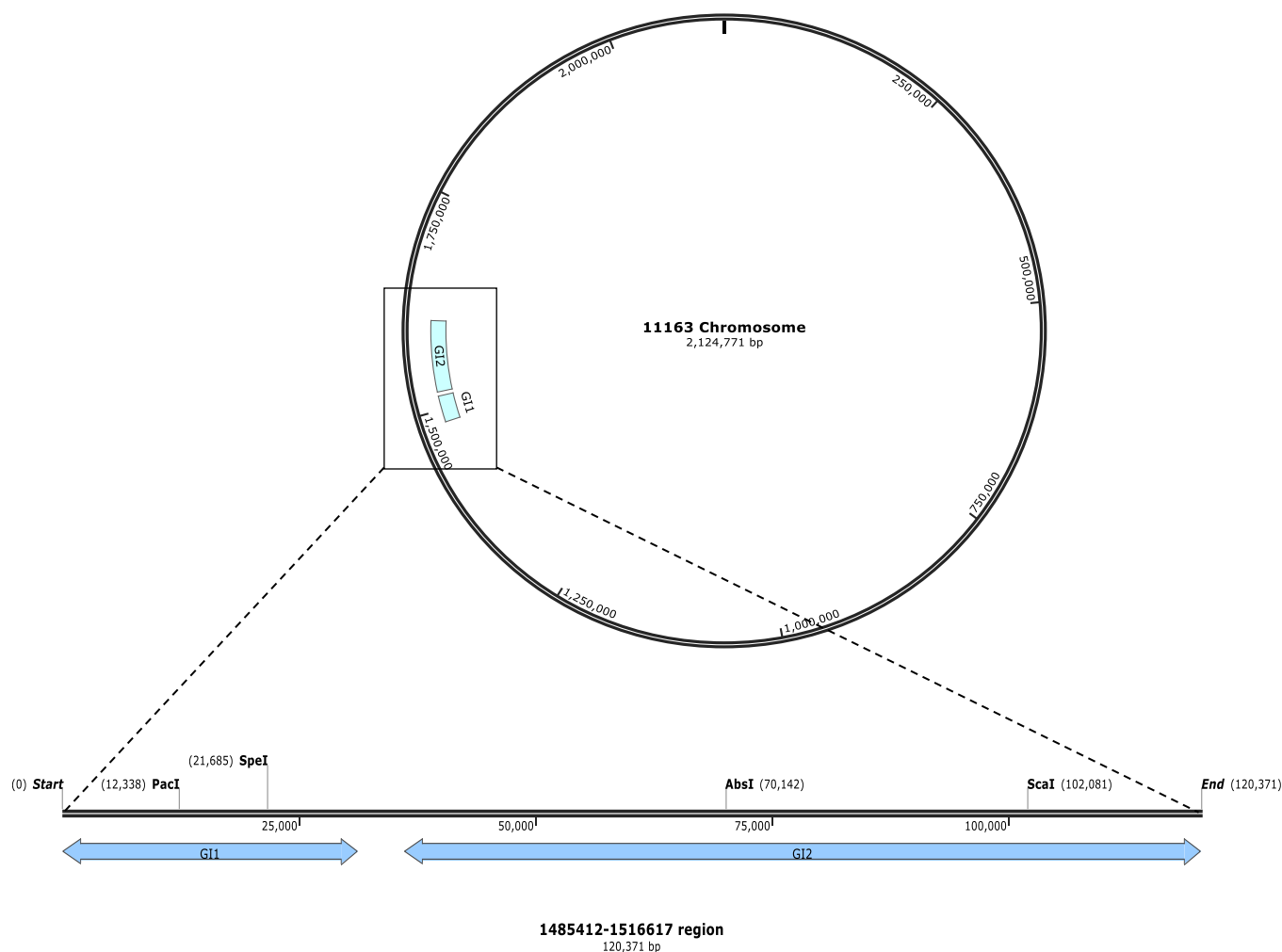
2.4 Προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για βιοπληροφορική ανάλυση

Για την διεκπεραίωση της βιοπληροφορικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα η βάση δεδομένων της genbank για την εύρεση των αλληλουχιών των οργανισμών. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα blastp και megablast και την εύρεση των ομολογιών μεμονωμένων γονιδίων ή ολόκληρων γονιδιακών τμημάτων αντίστοιχα, με άλλους οργανισμούς. Η δημιουργία των γονιδιωματικών χαρτών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα snapgene

3 Αποτελέσματα

3.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Στο συγκεκριμένο μέρος της διπλωματικής μελετήθηκαν εκτεταμένα οι δύο γονιδιωματικές νησίδες του χρωμοσώματος του στελέχους και αναζητήθηκαν γονίδια που θα μπορούσαν πιθανώς να εμπλέκονται στη συζευκτική διαδικασία. Χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα



Εικόνα 3-1: Οι γονιδιωματικές νησίδες του χρωμοσώματος του στελέχους *Z. mobilis* NCIMB 11163.

Blastp και megablast.

Η πρώτη γονιδιωματική νησίδα ξεκινά με το γονίδιο στη θέση 1.490.606 και εκτείνεται ως τη θέση 1.516.617. Η δεύτερη γονιδιωματική νησίδα ξεκινά στη θέση 1.526.742 και τελειώνει στη θέση 1.605.782. Αξίζει να αναφερθεί ότι και οι δύο νησίδες βρίσκονται κάτωθεν μία περιοχής με rRNA και tRNA γονίδια, κάτι που αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό των GEIs, και επιβεβαιώνει το γεγονός ότι τα δύο αυτά δακρυτά τμήματα DNA προήλθαν μέσω του φαινομένου της οριζόντιας γενετικής μεταφοράς. Επειδή μάλιστα περιέχουν συζευκτικά γονίδια και πολλά γονίδια τρανσποζασών, πιθανώς εντάσσονται στην κατηγορία των ICEs στοιχείων.

Όλα τα γονίδια των νησίδων αναλύθηκαν μέσω blastp έτσι ώστε να βρεθούν όλα τα πιθανά συζευκτικά γονίδια. Τελικά, τα γονίδια που βρέθηκαν στο χρωμόσωμα (βλ. **παράρτημα Ι**) και έχουν καταλυτικό ρόλο στην συζευκτική διαδικασία βρίσκονται και στις δύο γονιδιωματικές νησίδες με την εξής οργάνωση: στην νησίδα των 25 kb βρίσκονται τα πεπτιδάση S26 (πρόδρομος) – ORF – λυτική τρανσγλυκοζυλάση- υποθετική πρωτεΐνη VirD2 – 1 ORF – *trbI*, ενώ στη νησίδα των 79 kb βρίσκονται τα *traF* – 3ORFs – υποθετική πρωτεΐνη VirD2 – 1 ORF – λυτική τρανσγλυκοζυλάση- 1 ORF και ένα pseudo- *traG* – 1 ORF – ΑΤΡαση *trbB* - *trbC* – συζευκτική πρωτεΐνη *trbD*⁴ – *trbE* – *trbJ* – υποθετική πρωτεΐνη *trbK* – *trbL* – *trbF* – *trbG* – *trbI*.

Η πρωτεΐνη λυτική τρανσγλυκοζυλάση φαίνεται να σχετίζεται με τη σύζευξη όπως φάνηκε από μία επικρατεία της (στο *vir* σύστημα η B1 είναι λυτική τρανσγλυκοζυλάση (οπή στο τοίχωμα της πεπτιδογλυκάνης) η οποία αν λείπει δεν σταματά τη σύζευξη αλλά μειώνει τη συχνότητά της). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η γονιδιωματική νησίδα των 79 kb είναι η περιοχή που μας ενδιαφέρει καθώς περιέχει το σύνολο των ειδών των συζευκτικών γονιδίων που υπάρχουν στο χρωμόσωμα. Συγκεκριμένα, τα συζευκτικά γονίδια βρίσκονται μεταξύ των βάσεων 1562625 και 1582126 και επομένως χαρακτηρίζουν μία περιοχή μεγέθους 19,5 kb.

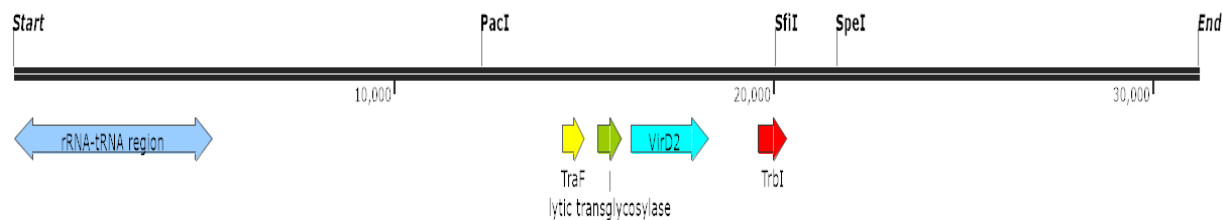
Τα παραπάνω γονίδια αποτελούν μέρος τόσο του Dtr όσο και του Mpf συστήματος. Συγκεκριμένα, στην πρώτη γονιδιωματική νησίδα, όλα τα γονίδια χαρακτηρίζονται ως Dtr, με εξαίρεση, πιθανότατα τη λυτική τρανσγλυκοζυλάση, και το *trbI*, το οποίο, ωστόσο, φαίνεται να μην είναι λειτουργικό λόγω του πολύ μικρού μεγέθους. Στην δεύτερη γονιδιωματική νησίδα τα γονίδια *traF* και υποθετική πρωτεΐνη VirD2 ανήκουν στο Dtr σύστημα, το *traG* είναι η CP στο Mpf. Επομένως, είναι προφανές ότι υπάρχουν όλα τα γονίδια που σχετίζονται με τη δημιουργία του συζευκτικού πόρου, εκτός από το *trbH*, και σχεδόν καθόλου γονίδια που σχετίζονται με την επεξεργασία του DNA. Η υποθετική πρωτεΐνη VirD2 μπορεί να έχει δραστηριότητα ριλαξάσης, καθώς περιλαμβάνει μία υπομονάδα χαρακτηρισμένη ως συστατικό της ριλαξάσης.

Άξια προσοχής είναι η ομοιότητα των συζευκτικών γονιδίων με τα *tra/trb* γονίδια του *A. tumefaciens* τόσο ως προς την αλληλουχία, όσο και ως προς την οργάνωση. Την μεγαλύτερη ομολογία με το σύστημα του *A. tumefaciens* εμφανίζουν τα *trb* γονίδια της δεύτερης γονιδιωματικής νησίδας, εφόσον το ποσοστό αμινοξικής ταύτισης κυμαίνεται μεταξύ 78 και 92% (με εξαίρεση του *trbK* με ποσοστό ταύτισης 65%).

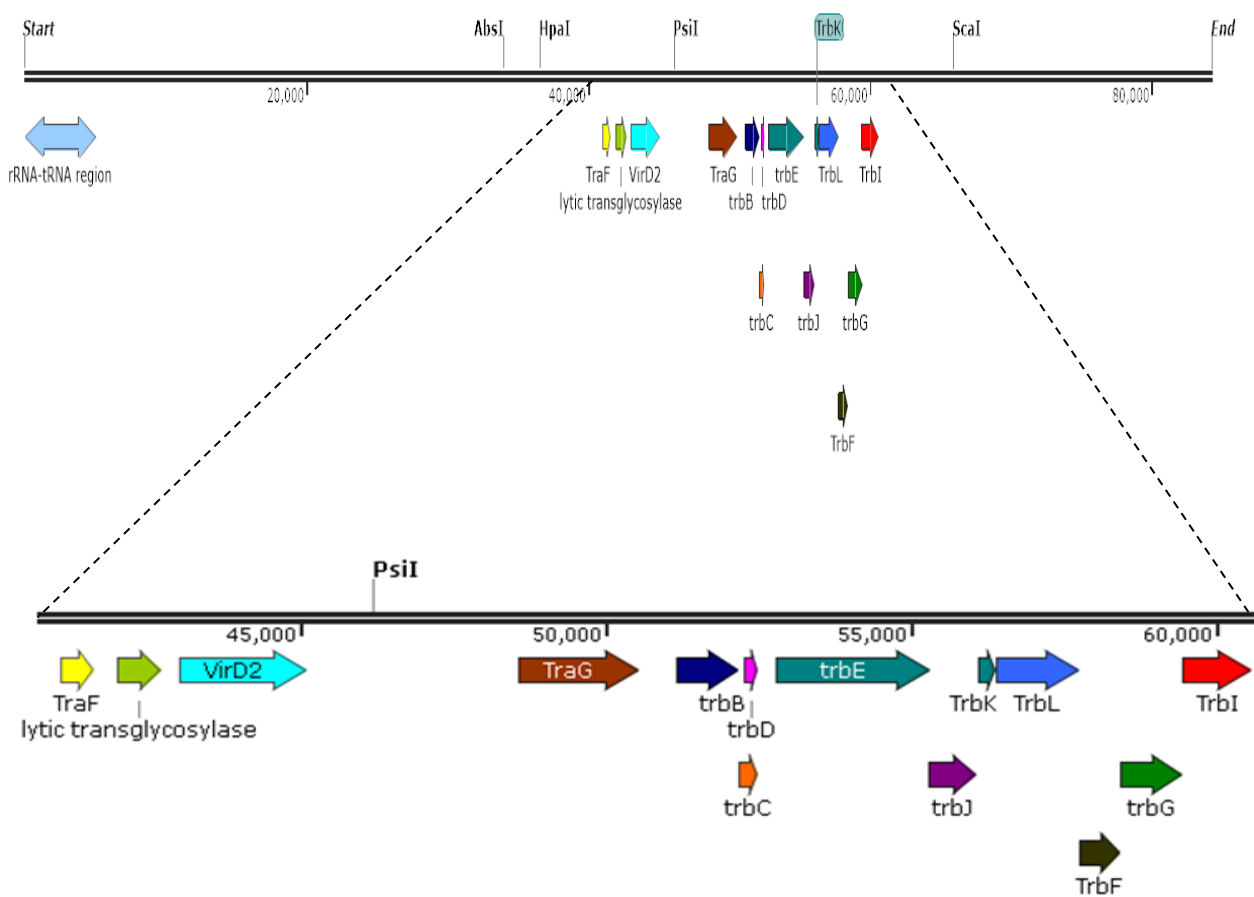
Εκτός από το χρωμόσωμα, έχουν βρεθεί συζευκτικά γονίδια και στα πλασμίδια του οργανισμού. Συγκεκριμένα, στο pZA1001 έχει βρεθεί ένα γονίδιο *traJ* συστατικό του ριλαξοσώματος (το οποίο υπάρχει και στο πλασμίδιο pZMOB04 του στελέχους ATCC 10988), ενώ στο pZA1003 έχει βρεθεί μία ριλαξάση και ένα γονίδιο ανάλογο του MobC (ικανότητες παρακίνησης) (βλ. **παράρτημα ΙΙ**).

⁴ Πρόκειται στην πραγματικότητα για το γονίδιο *trbD* που έχει χαρακτηριστεί εσφαλμένα ως *trbB*

Γονιδιωματική νησίδα 1 (25 kb)

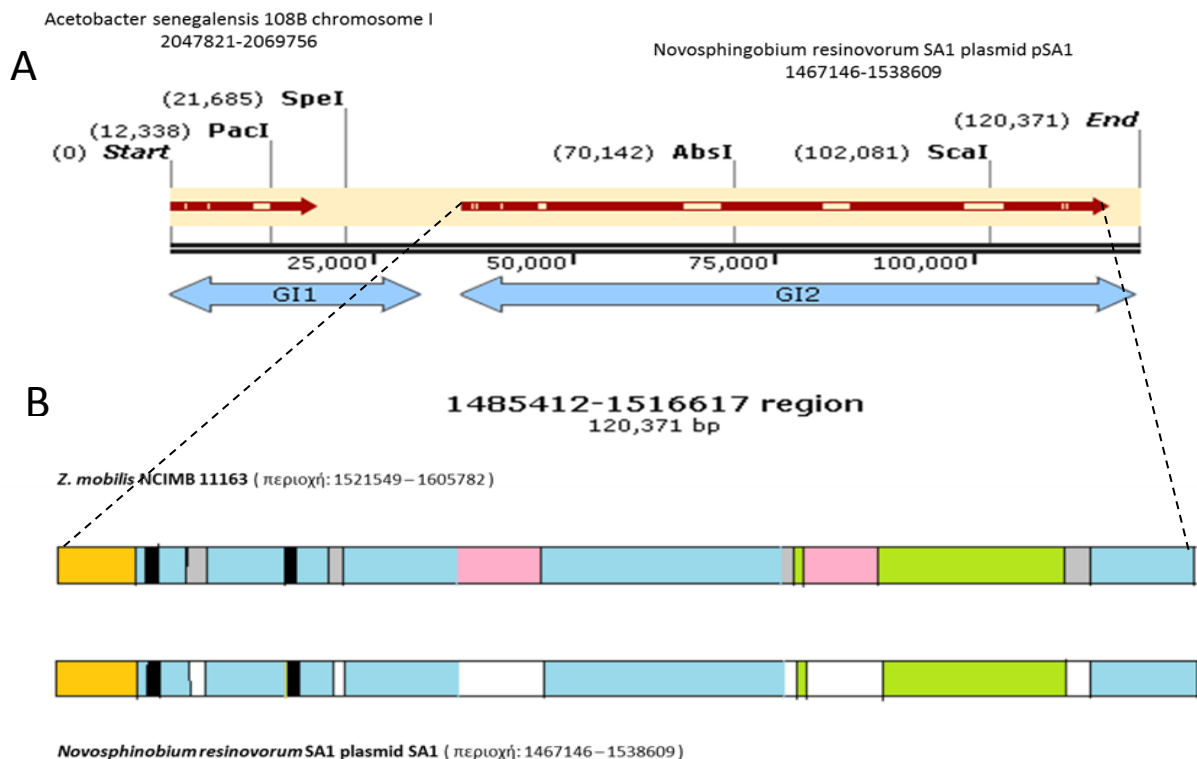


Γονιδιωματική νησίδα 2 (79 kb)



Εικόνα 3-2: Γραφική αναπαράσταση των συζευκτικών γονιδίων που βρίσκονται στις δύο γονιδιωματικές νησίδες

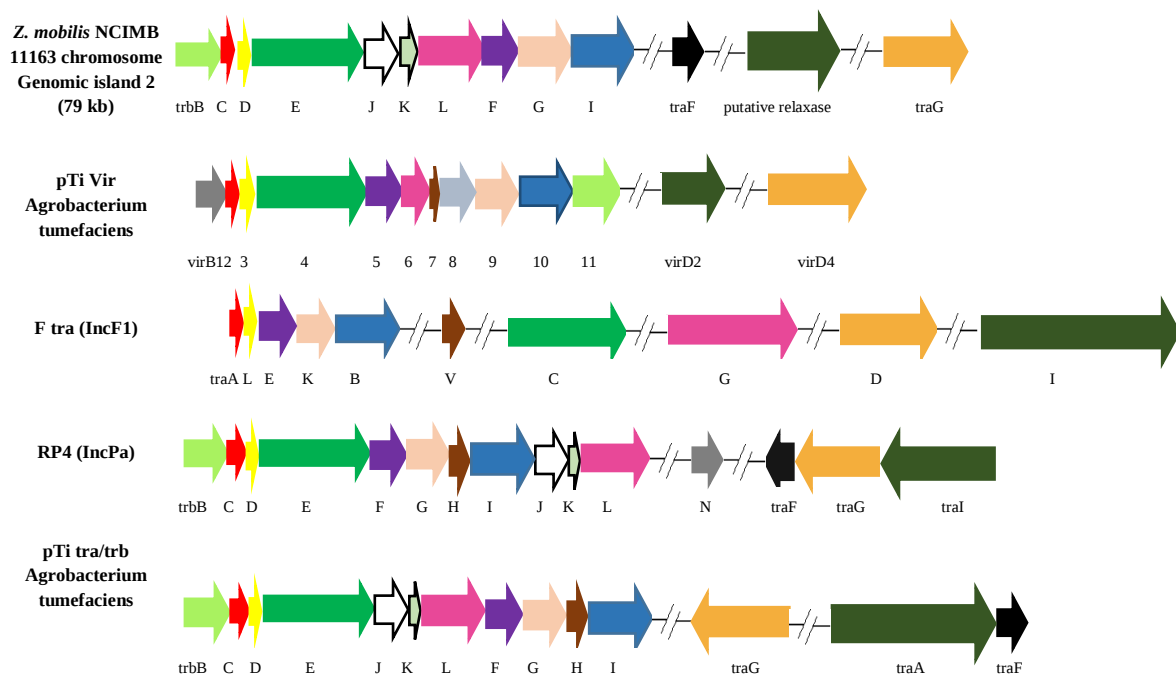
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε megablast όλου του τμήματος που περιλαμβάνει τις γονιδιωματικές νησίδες έτσι ώστε να αναζητηθεί η προέλευσή τους (βλ. παράρτημα ΙΙΙ). Οι περιοχές που εμφάνιζαν κενά στη στοίχιση ξαναπέρασαν μεμονομένα από megablast και βρέθηκε η προέλευσή τους σε μεγάλο βαθμό. Παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο τμήμα της 1ης γονιδιωματικής νησίδας αντιστοιχεί σε ομόλογο τμήμα του χρωμοσώματος του *Acetobacter senegalensis* 108B ενώ η δεύτερη γονιδιωματική νησίδα αντιστοιχείται εξ'ολοκλήρου σε τμήμα του πλασμιδίου pSA1 του *Novosphingobium resinovorum* SA1 (μέγεθος 1.756,808 kb.) Ελάχιστα μόνο τμήματα/γονίδια δεν εμφάνισαν ομολογία.



Εικόνα 3-3: Α. Σύγκριση των αλληλουχιών των γονιδιωματικών νησίδων με τις αλληλουχίες διαφορετικών οργανισμών. Η πρώτη γονιδιωματική νησίδα συγκρίνεται με την περιοχή 2047821-2069756 του χρωμοσώματος του *Acetobacter senegalensis* 108B, ενώ η δεύτερη με την περιοχή 1467146-1538609 του πλασμιδίου SA1 του *Novosphingobium resinovorum* SA1. Β. Λεπτομερής σύγκριση των αλληλουχιών μεταξύ του πλασμιδίου SA1 του *Novosphingobium resinovorum* SA1 και της δεύτερης γονιδιωματικής νησίδας του *Z. mobilis* NCIMB 11163. Οι περιοχές που συγκρίνονται είναι η 1521549-1605782 του 11163 με την 1467146-1538609 του *N. resinovorum*. Με πορτοκαλί φαίνονται οι περιοχές με όμοια rRNA και tRNA γονίδια, με γαλάζιο φαίνονται οι περιοχές με ομολογία (όλα τα υπόλοιπα γονίδια πλην τα συζευκτικά), με μαύρο φαίνονται γονίδια χωρίς ομολογία στους δύο οργανισμούς, με γκρι φαίνονται τα γονίδια που υπάρχουν στον έναν οργανισμό αλλά όχι στον άλλο (εμφανίζεται άσπρο/κενό εκεί που δεν υπάρχουν γονίδια), με ροζ αντιπροσωπεύονται τα γονίδια που υπάρχουν μόνο στον έναν οργανισμό μεταξύ των οποίων βρίσκονται γονίδια τρανσποζασών, και τέλος με πράσινο χαρακτηρίζονται τα ομόλογα συζευκτικά γονίδια

Στο *Acetobacter senegalensis* καλή στοίχιση πραγματοποιήθηκε μέχρι και το *virD2* ενώ μετά παρεμβάλεται μια περιοχή με τα συζευκτικά γονίδια του *Acetobacter* σαν αυτά που εμφανίζονται στη γονιδιωματική νησίδα 2 και η ομολογία επανέρχεται στο τέλος του *trbI* γονιδίου με 85% ταύτιση μεταξύ των αμινοξέων 21 με 240 του 11163 και των 167 με 385 του *Acetobacter*. Η στοίχιση με το *N. resinovorum* pSA1 είναι απόλυτη εκτός από περιοχές στο NCIMB 11163 που πριέχουν γονίδια τρानσποζάσης (ή πλαισιώνονται από αυτά ή τα έχουν στο ένα άκρο). Μη ομόλογα γονίδια που δεν σχετίζονται με τρानσποζάση συναντώνται σε 2 θέσεις και είναι το πολύ δύο στη σειρά. Οι συγκρίσεις έγιναν σε πίνακες για το κάθε γονίδιο ξεχωριστά (βλ. παράρτημα 4). Το NCIMB 11163 έχει περισσότερα γονίδια, ενώ παράλληλα, όλα τα γονίδια του εκτός από ένα υπάρχουν στο *Novosphingobium*. Το αντίθετο δεν ισχύει. Αξίζει να αναφερθεί ότι η στοίχιση των περιοχών ξεκινά από τα rRNA και tRNA γονίδια που βρίσκονται στην αρχή τους.

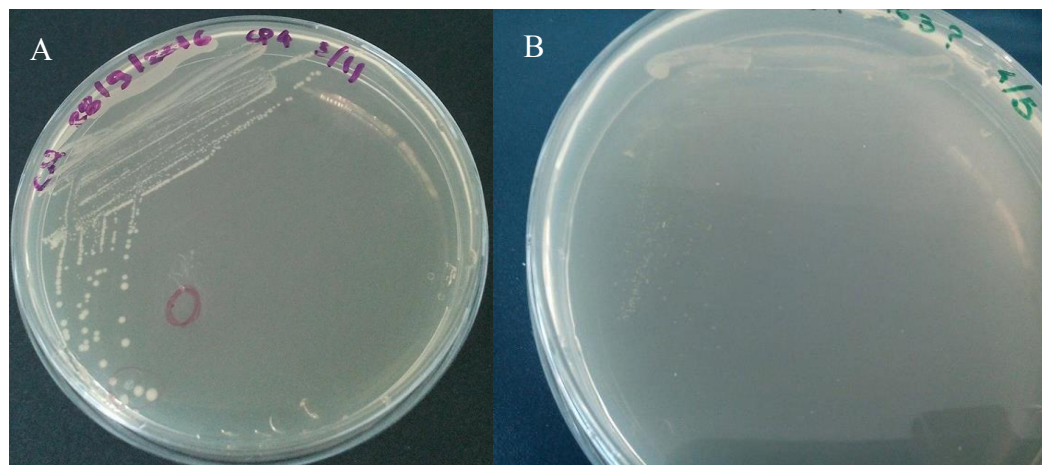
Τέλος, αναζητήθηκαν οι ομολογίες των συζευκτικών γονιδίων με τα αντίστοιχα άλλων συστημάτων (**παράρτημα IV**), με σκοπό την απόκτηση ολοκληρωμένης πληροφορίας για τις δυνατότητες του συζευκτικού συστήματος του NCIMB 11163.



Εικόνα 3-4: Οι ομολογίες των συζευκτικών γονιδίων του NCIMB 11163 με τα αντίστοιχα των καλά χαρακτηρισμένων συστημάτων

3.2 Μέθοδοι καλλιέργειας

Ξεκινώντας την πειραματική διαδικασία, αρχικά μελετήθηκε ο οργανισμός ως προς τον βέλτιστο τρόπο καλλιέργειας. Είναι γνωστό ότι το στέλεχος NCIMB 11163 δημιουργεί πολύ μικρές αποικίες όταν επιστρώνεται με κρίκο (streaking) σε σχέση με το στέλεχος CP4 (εικόνα 3-5)



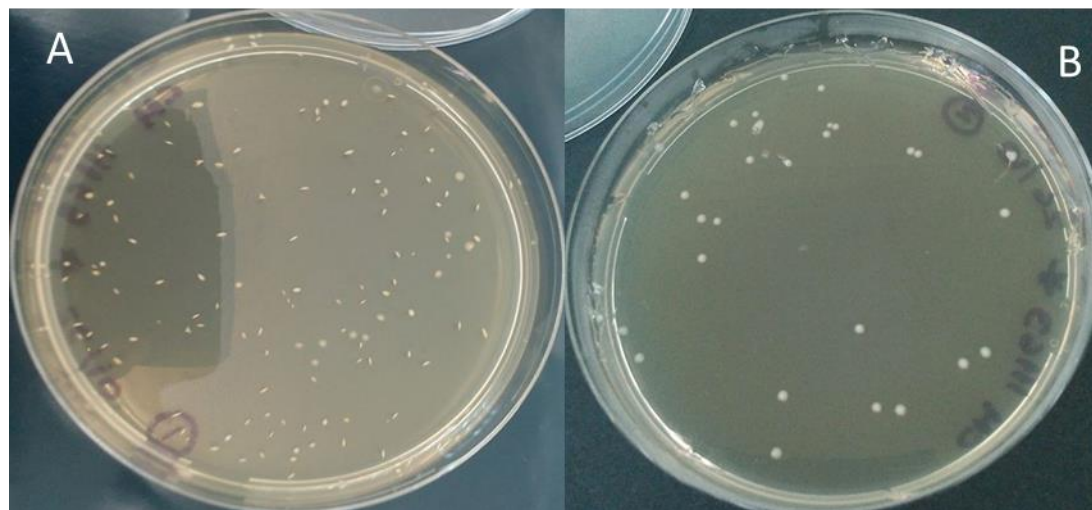
Εικόνα 3-5: Επίστρωση με κρίκο: A. CP4 B. NCIMB 11163

Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα για τυχόν διαφορές μεταξύ των μεθόδων επίστρωσης των κυττάρων με διανομέα και του εγκλεισμού τους στο ρευστό ακόμα άγαρ. Στα δύο αυτά πειράματα, καθώς και στα αποτελέσματα όλων των μελλοντικών πειραμάτων, στα οποία η μέτρηση των κυττάρων γινόταν με τις δύο αυτές μεθόδους (πχ μετασχηματισμός), φάνηκε ότι οι αποικίες ήταν μεγαλύτερες και στις δύο περιπτώσεις σε σχέση με το streaking, καθώς και ότι ο αριθμός των αποικιών στα τρυβλία του εγκλεισμού ήταν 4-5 φορές μεγαλύτερος απ' ό τι στην επίστρωση. Το φαινόμενο του διαφορετικού αριθμού κυττάρων ανάλογα με τη μέθοδο καλλιέργειας φάνηκε και στο CP4, αλλά σε μικρότερη κλίμακα (3 φορές μεγαλύτερος στον εγκλεισμό).

Πίνακας 3-1: Τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τις μεθόδους καλλιέργειας

Ημερομηνία πειράματος	Οργανισμός	Εκτιμώμενος αριθμός αποικιών ύστερα από κατάλληλη αραιώση	Αριθμός αποικιών στην επίστρωση	Αριθμός αποικιών στον εγκλεισμό	Αναλογία κυττάρων επίστρωση προς εγκλεισμός
26/10/2016	NCIMB 11163	~ 100	28	136	~ 1:5 (4,86)
16/11/2017	NCIMB 11163		32	137	~ 1:4 (4,28)
	CP4		30	86	~ 1:3 (2,87)

Επομένως, φαίνεται ότι η μέθοδος του εγκλεισμού είναι πλεονεκτικότερη από τη μέθοδο της επίστρωσης.

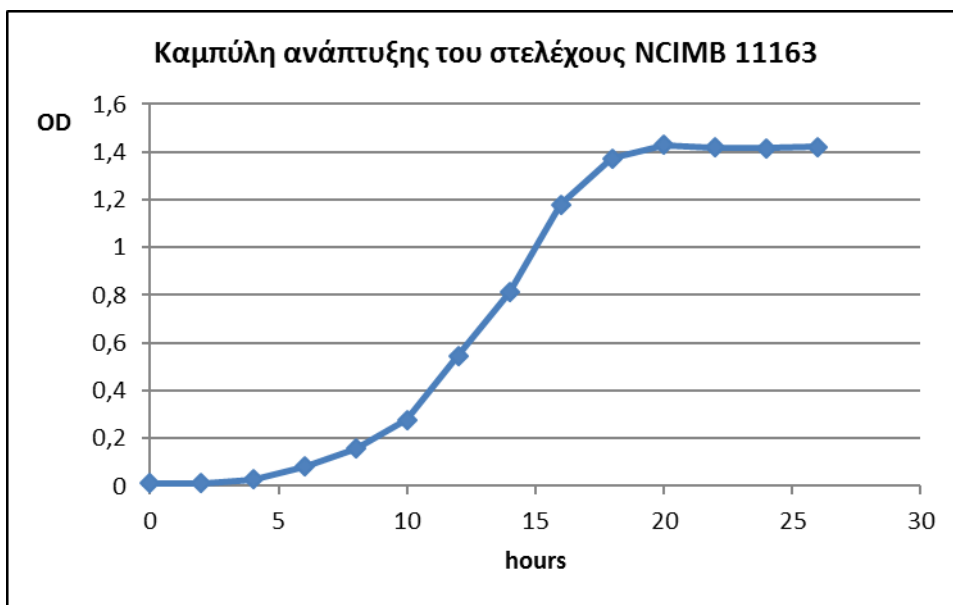


Εικόνα 3-6: Αποικίες του NCIMB 11163 με δύο διαφορετικές μεθόδους καλλιέργειας. *A.* εγκλεισμός *B.* επίστρωση με διανομέα

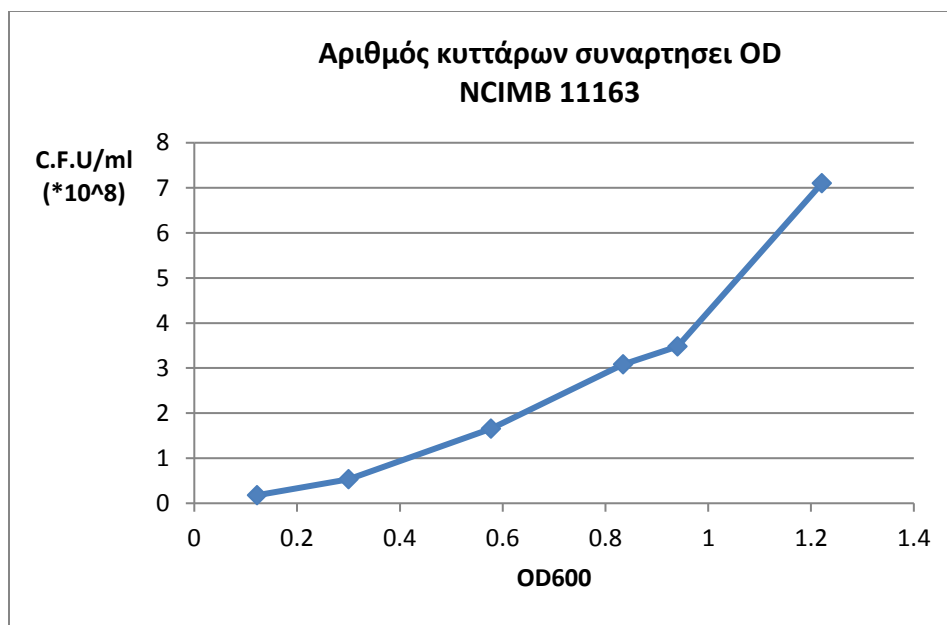
3.3 Καμπύλες ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών

3.3.1 *Z. mobilis* NCIMB 11163

Η κατασκευή καμπύλων ανάπτυξης του στελέχους υπήρξε πολύ σημαντική καθώς αποτέλεσαν πηγή πληροφορίας για την εύρεση του κατάλληλου σταδίου ανάπτυξης και του αριθμού κυττάρων ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος. Η καμπύλη που απεικονίζει την OD συναρτήσει χρόνου, έγινε σταδιακά και με πολλά επαναλαμβανόμενα πειράματα. Η αρχική φάση επώασης (ως και την αρχή της εκθετικής φάσης) και το τέλος εκθετικής-στατική φάσης βασίστηκαν σε μετρήσεις καλλιέργειών με εμβόλιο 0,1%, ενώ η ενδιάμεση εκθετική φάση σε καλλιέργειες διαφόρων τύπων εμβολίων, η γραφική παράσταση των οποίων προσαρμόστηκε κατάλληλα ώστε να συμπίπτει με τις αντίστοιχες του εμβολίου 0,1%. Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης πραγματοποιούνταν κάθε δύο ώρες. Οι καλλιέργειες επωάζονταν στατικά στους 30 °C, σε όσο το δυνατόν πιο αναερόβιες συνθήκες.



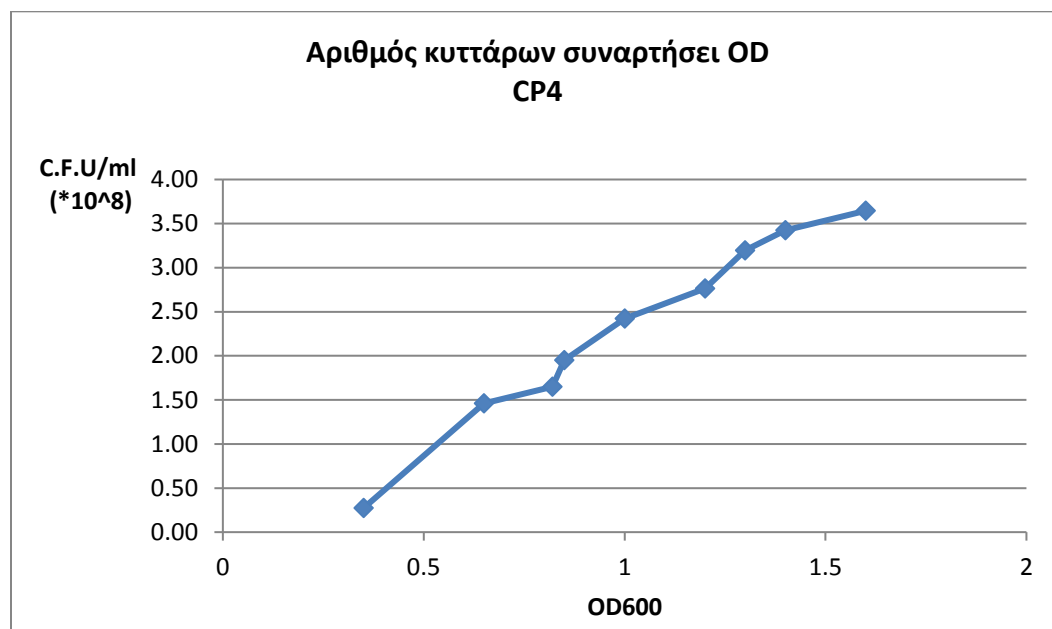
Εικόνα 3-7: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *Z. mobilis* NCIMB 11163 με αρχικό εμβόλιο 0,1%



Εικόνα 3-8: Καμπύλη του αριθμού των κυττάρων του *Z. mobilis* NCIMB 11163 συναρτήσει OD, με αρχικό εμβόλιο 0,1%

3.3.2 *Z. mobilis* CP4

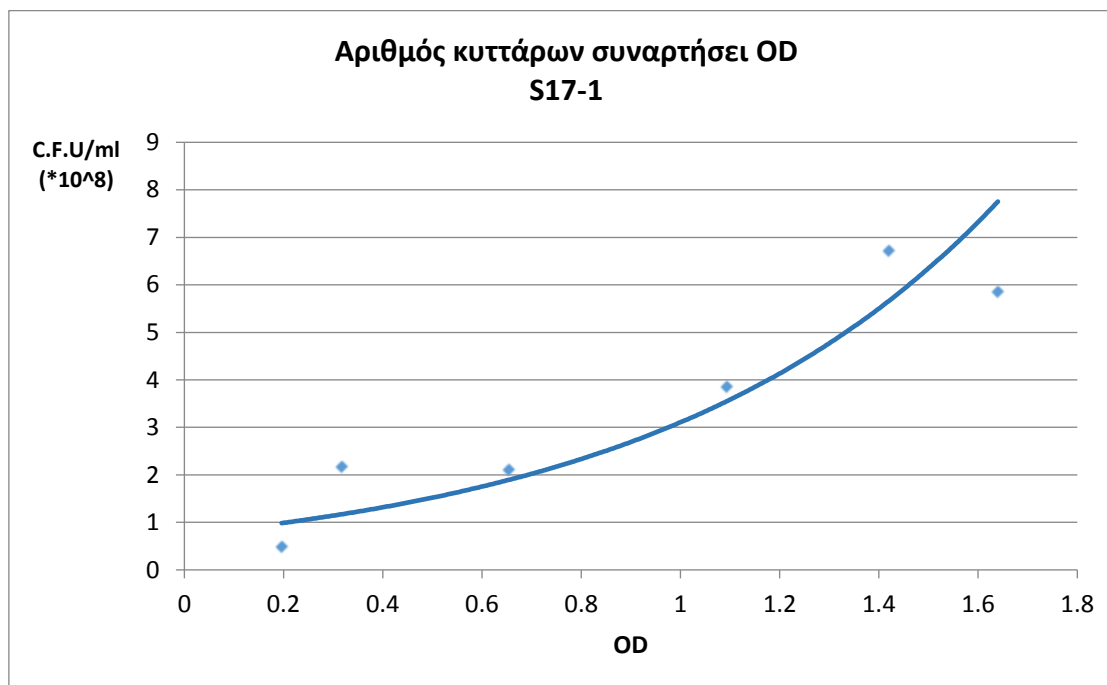
Για το στέλεχος CP4 πραγματοποιήθηκε μόνο καμπύλη αριθμού κυττάρων συναρτήσει OD, εφόσον πρόκειται για χρήσιμη πληροφορία για τα πειράματα σύζευξης. Η καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις προήλθε από αρχικό εμβόλιο 0,1 %, και η επώαση γινόταν στους 30 °C σε όσο τον δυνατόν πιο αναερόβιες συνθήκες.



Εικόνα 3-9: Καμπύλη του αριθμού των κυττάρων του *Z. mobilis* CP4 συναρτήσει OD, με αρχικό εμβόλιο 0,1%

3.3.3 *E. coli* S17.1

Για το στέλεχος S17.1 πραγματοποιήθηκε μόνο καμπύλη αριθμού κυττάρων συναρτήσει OD, καθώς πρόκειται για απαραίτητη πληροφορία στα πειράματα σύζευξης. Η καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις προήλθε από αρχικό εμβόλιο 1 %, και η επώαση γινόταν σε κωνικές φιάλες, υπό ανάδευση, στους 37 °C.



Εικόνα 3-10: Καμπύλη του αριθμού κυττάρων του στελέχους *E. coli* S17.1 συναρτήσει OD

3.4 Μελέτες ως προς την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα

Η μελέτη διακριτικών δεικτών ήταν απαραίτητη για την πραγματοποίηση των πειραμάτων σύζευξης και τον διαχωρισμό δότη-δέκτη

Όπως αναφέρθηκε, το στέλεχος NCIMB 11163 φέρει στο πλασμίδιο pZA1001 γονίδια που επιφέρουν ανθεκτικότητα στο αρσενικό (Kouvelis *et al.*, 2009), οπότε θεωρήθηκε υψίστης σημασίας η μελέτη του συγκεκριμένου δείκτη. Από βιοπληροφορική ανάλυση βρέθηκε ότι τα γονίδια αυτά συνιστούν οπερόνιο, και μαζί με τα ρυθμιστικά στοιχεία είναι τα *arsRDABC*. Βρέθηκε ότι τα γονίδια του στελέχους έχουν υψηλή ομοιότητα με τα αντίστοιχα των εντεροβακτηρίων.

Escherichia coli strain AR_0128 plasmid tig00000793, complete sequence

Sequence ID: [CP021720.1](#) Length: 216378 Number of Matches: 1

Range 1: 211664 to 215972 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
7952 bits(4306)	0.0	4308/4309(99%)	0/4309(0%)	Plus/Plus

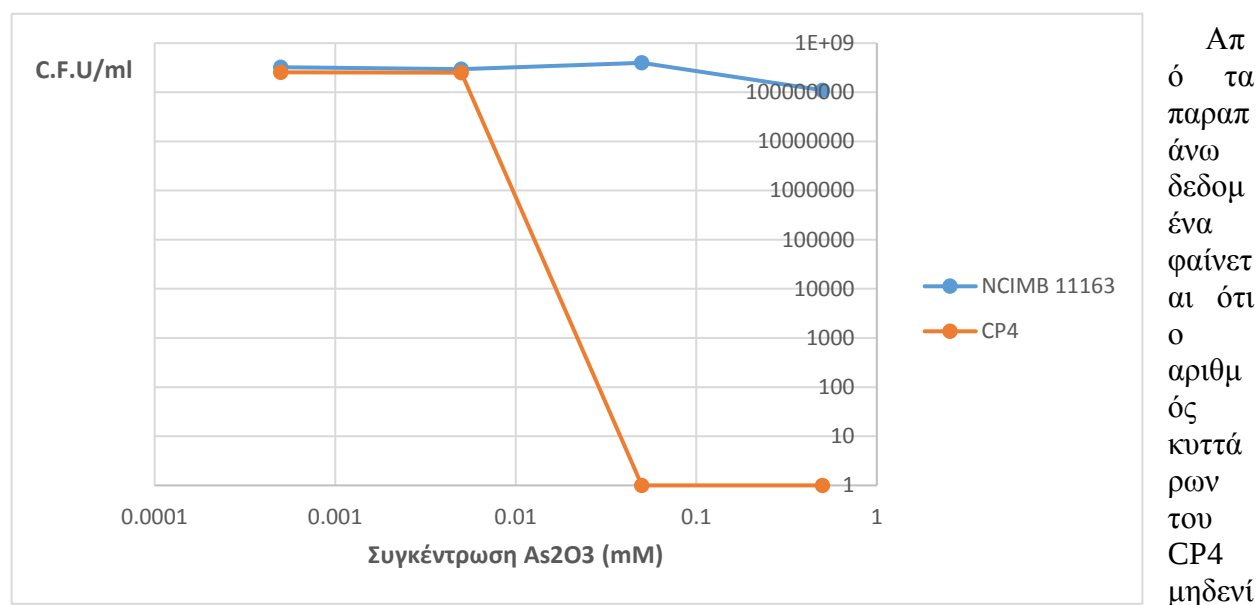
Εικόνα 3-11: Ανάλυση περιοχής γονιδίων *arsRDABC* με *megablast*. Η συγκεκριμένη περιοχή έχει την υψηλότερη ομολογία με αντίστοιχες περιοχές στην *Escherichia coli*

3.4.1 Συγκριτική μελέτη ανοχής στο αρσενικό μεταξύ των στελεχών NCIMB 11163 και CP4

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα, ξεκινώντας από ένα μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων αρσενικού στο θρεπτικό μέσο, και εξειδικεύοντας στη συνέχεια, ώστε να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση, η οποία αναστέλλει πλήρως το CP4 αλλά επιτρέπει πολύ καλή, αν όχι άριστη, επιβίωση του NCIMB 11163. Στο πρώτο πείραμα (15/11/2016) η κλίμακα συγκεντρώσεων βασίστηκε σε μελέτες πάνω στα εντεροβακτήρια (Joerger et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων 0 mM, 0,0005 mM, 0,005 mM, 0,05 mM και 0,5 mM. Τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα:

Πίνακας 3-2: Αποτελέσματα πρώτου πειράματος για την συγκριτική ανοχή στο αρσενικό μεταξύ των στελεχών NCIMB 11163 και CP4

Συγκέντρωση As_2O_3 (mM)	Οργανισμός	Αριθμός κυττάρων/ml
0	11163	$3,05 \cdot 10^8$
	CP4	$3,21 \cdot 10^8$
0,0005	11163	$3,25 \cdot 10^8$
	CP4	$2,55 \cdot 10^8$
0,005	11163	$2,96 \cdot 10^8$
	CP4	$2,52 \cdot 10^8$
0,05	11163	$3,97 \cdot 10^8$
	CP4	0
0,5	11163	$1,10 \cdot 10^8$
	CP4	0



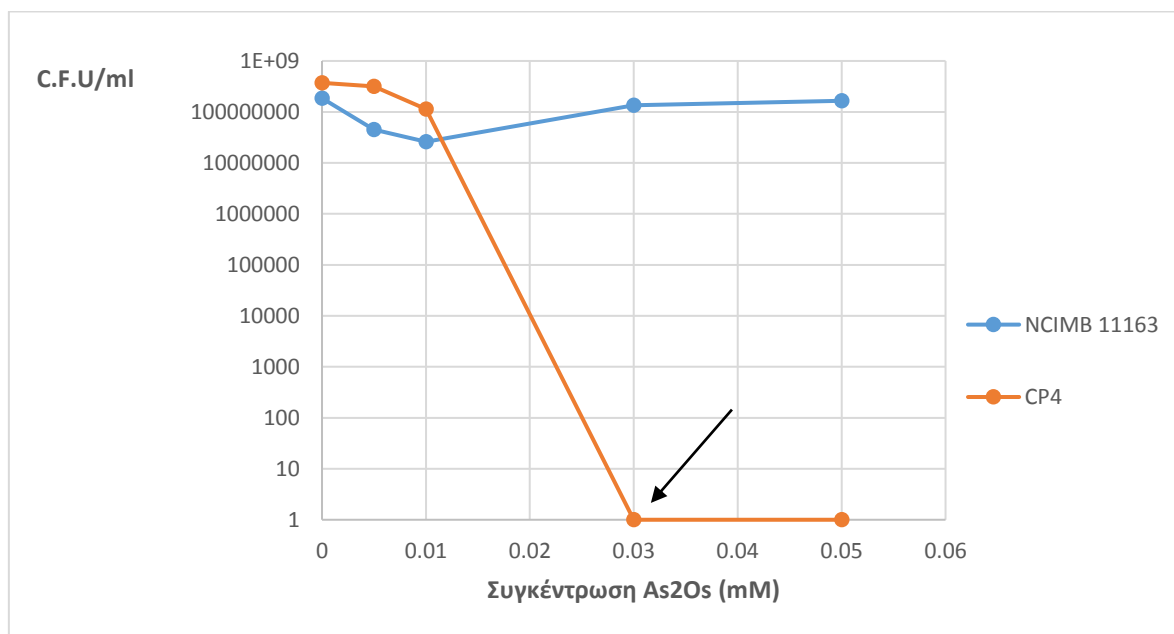
Εικόνα 3-12: Διαγραμματική απεικόνιση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων συναρτήσει της συγκέντρωσης του αρσενικού (1ο πείραμα)

ζεται κάπου μεταξύ των συγκεντρώσεων 0,005 mM και 0,05 mM. Σε επόμενη σειρά πειραμάτων (28/11/2017) επιχειρήθηκε η εύρεση της ελάχιστης συγκέντρωσης που αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξη του CP4. Για το σκοπό αυτό έγινε μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων στις συγκεντρώσεις 0 mM, 0,005 mM, 0,01 mM, 0,03 mM και 0,05 mM.

Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

Πίνακας 3-3: Αποτελέσματα δεύτερου πειράματος για την συγκριτική ανοχή στο αρσενικό μεταξύ των στελεχών NCIMB 11163 και CP4

Συγκέντρωση As_2O_3 (mM)	Οργανισμός	Αριθμός κυττάρων/ml
0	11163	$1.86 \cdot 10^8$
	CP4	$3.72 \cdot 10^8$
0,005	11163	$0.45 \cdot 10^8$
	CP4	$3.16 \cdot 10^8$
0,01	11163	$0.26 \cdot 10^8$
	CP4	$1.13 \cdot 10^8$
0,03	11163	$1.35 \cdot 10^8$
	CP4	0
0,05	11163	$1.66 \cdot 10^8$
	CP4	0



Εικόνα 3-13: Διαγραμματική απεικόνιση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων συναρτήσει της συγκέντρωσης του αρσενικού (2^ο πείραμα)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η βέλτιστη συγκέντρωση του As_2O_3 στο θεραπευτικό μέσο, που είναι ικανή να διαχωρίσει πλήρως τα δύο στελέχη, είναι 0,03 mM. Από τα διαγράμματα παρατηρείται στη συγκεκριμένη τιμή, μηδενισμός στους αριθμούς κυττάρων του CP4 και άριστη επιβίωση του 11163 (οι πτώσεις στον αριθμό κυττάρων σε μικρότερες συγκεντρώσεις μάλλον οφείλονται σε πειραματικό σφάλμα)

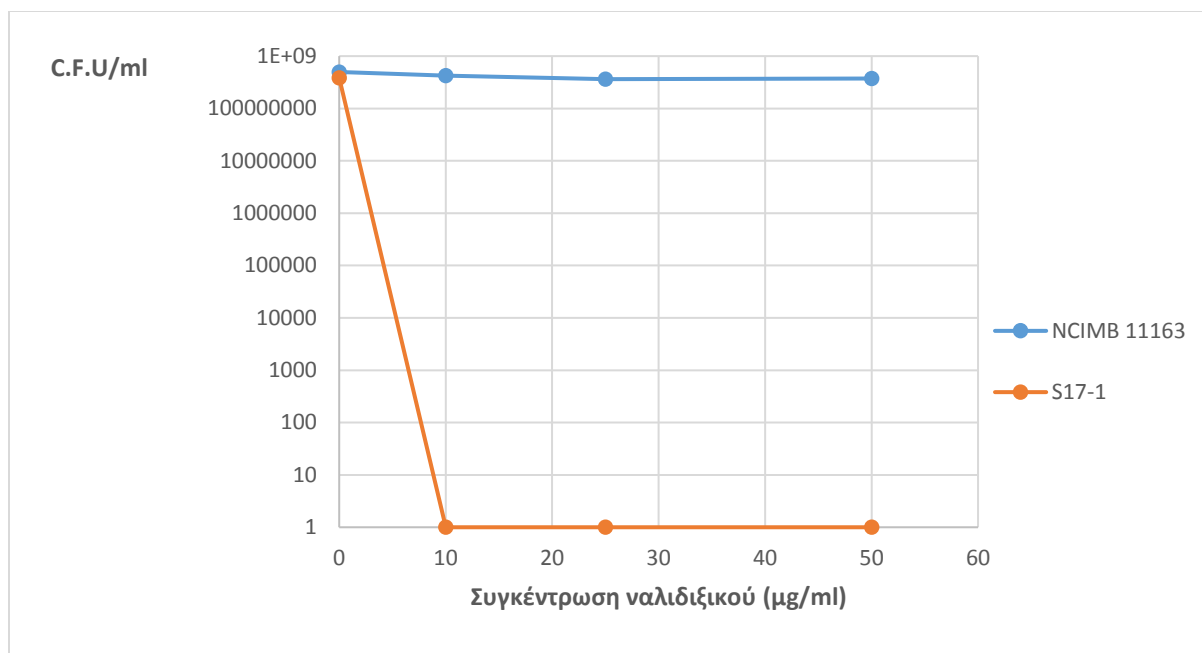
3.4.2 Συγκριτική μελέτη ανοχής σε αρσενικό και ναλιδιζικό οξύ μεταξύ των *Z. mobilis* NCIMB 11163 και *E. coli* S17.1

Όσον αφορά στη συγκριτική μελέτη ως προς την ανθεκτικότητα στο αρσενικό, το πείραμα που πραγματοποιήθηκε δεν έδειξε καμία διαφορά μεταξύ των δύο οργανισμών. Πράγματι, βρέθηκε ότι το στέλεχος S17.1 δημιουργήθηκε από το στέλεχος *E. coli* 294 (Simon *et al.*, 1983), το οποίο με τη σειρά του είναι τροποποιημένο στέλεχος της *E. coli* K12 ([294 \[GMBHK-12 294\] https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/31446.aspx#characteristics](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/31446.aspx#characteristics)), ένα βακτήριο που φέρει οπερόνιο ανθεκτικότητας στο αρσενικό (πάνω στο χρωμόσωμα), το *arsRBC*. Παρόμοιες ιδιότητες φέρει και το στέλεχος DH5a της *E. coli*. Επομένως, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός του στελέχους NCIMB 11163 από τα S17.1 και DH5a χρησιμοποιώντας ως δείκτη επιλογή το αρσενικό.

Όσον αφορά στη διερεύνηση ως προς την ανθεκτικότητα στο ναλιδιζικό οξύ, μελετήθηκαν τα αποτελέσματα τριών συγκεντρώσεων: 10 µg/mL, 25 µg/mL και 50 µg/mL. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

Πίνακας 3-4: Αποτελέσματα για την συγκριτική ανοχή στο ναλιδιζικό μεταξύ των στελεχών NCIMB 11163 και S17.1

Συγκέντρωση ναλιδιζικού (µg/ml)	Οργανισμός	Αριθμός κυττάρων/ml
0	11163	$4,98 \cdot 10^8$
	S17.1	$3,85 \cdot 10^8$
10	11163	$4,22 \cdot 10^8$
	S17.1	0
25	11163	$3,63 \cdot 10^8$
	S17.1	0
50	11163	$3,73 \cdot 10^8$
	S17.1	0



Εικόνα 3-14: Διαγραμματική απεικόνιση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων συναρτήσει της συγκέντρωσης του αρσενικού

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι συγκέντρωση 10 μg/ml ναλιδιξικού οξέος στο θρεπτικό μέσο είναι αρκετή για πλήρη διαχωρισμό μεταξύ των δύο στελεχών.

3.5 Εισαγωγή των πλασμιδίων pBBR1MCS και pBBR1MCSK στα στελέχη NCIMB 11163 και CP4

Λόγω απουσίας κατάλληλων διακριτικών δεικτών σε θέση εντός ή πολύ κοντά της γονιδιωματικής νησίδας, η λειτουργία των συζευκτικών γονιδίων του χρωμοσώματος μελετήθηκε με τη χρήση παρακινούμενων φορέων, ευρέως φάσματος ξενιστών, και συγκεκριμένα του pBBR1MCS και του παρόμοιού του, pBBR1MCSK (κατασκευασμένο από Γιάννη Σαββάκη). Τα πλασμίδια αυτά έχουν αποδειχθεί ότι είναι σχετικά σταθερά στο *Z. mobilis* (αποτελέσματα Ματίνας Ρούσσου) και επομένως, θα μπορούσαν να παρακινηθούν, στην περίπτωση λειτουργίας των συζευκτικών γονιδίων του χρωμοσώματος. Το pBBR1MCSK χρησιμοποιήθηκε λόγω του ότι φέρει επιπρόσθετα τον δείκτη ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, ένα επιπλέον χαρακτηριστικό πολύ χρήσιμο την στιγμή που οι περισσότεροι φορείς που κατασκευάζονται για το *Z. mobilis* προσδίδουν ανθεκτικότητα στη χλωραμφαινικόλη. Το pBBR1MCS εισάχθηκε με τη μέθοδο του μετασχηματισμού (ηλεκτροδιάτρηση) σε δεκτικά κύτταρα NCIMB 11163 και CP4 (ως control, για να σιγουρευτεί η σωστή διαδικασία σε περίπτωση αποτυχίας του μετασχηματισμού του NCIMB 11163), ενώ το pBBR1MCSK με τη μέθοδο της σύζευξης, χρησιμοποιώντας ως δότη το στέλεχος S17.1 (pBBR1MCSK) και ως δέκτη το NCIMB 11163.

3.5.1 Μετασχηματισμός

Επειδή το στέλεχος NCIMB 11163 δύσκολα μετασχηματίζεται (διπλωματική Ελένης Νταβίντοβα) πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα με διαφορετικές συνθήκες, έως ότου επιτευχθεί ο μετασχηματισμός. Στα δύο πρώτα πειράματα επιχειρήθηκε η δημιουργία δεκτικών κυττάρων NCIMB 11163 σε διαφορετικές τιμές OD για να διαπιστωθεί τυχόν διαφορά στο ποσοστό πρόσληψης DNA σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξης. Για λόγους ευκολίας, και επειδή δεν υπάρχει κάποια ουσιαστική διαφορά στα αποτελέσματα, απεικονίζεται η μία μόνο OD σε κάθε πείραμα. Επειδή το pBBR1MCS έχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφαινικόλη, η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων γινόταν σε τρυβλία CM με χλωραμφαινικόλη 120 $\mu\text{g/ml}$. Παράλληλα, σε κάθε πείραμα μετασχηματισμού και σε κάθε οργανισμό χρησιμοποιούνταν δείγματα που περνούσαν όλη τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης, δίχως όμως την προσθήκη DNA, λειτουργώντας έτσι ως μάρτυρες. Τα δείγματα αυτά επιστρώθηκαν στα ίδια επιλεκτικά τρυβλία, και σε κάθε περίπτωση, δεν εμφανίζονταν αποικίες.

Πίνακας 3-5: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πειραμάτων μετασχηματισμού του *Z. mobilis* NCIMB 11163

Ημερομηνία πειράματος	Στέλεχος	Συνθήκες	Αριθμός κυττάρων/40 μl πριν τον μετασχηματισμό	Αριθμός κυττάρων/ml 3 h μετά τον μετασχηματισμό	Αριθμός μετασχηματισμ. κυττάρων/ml	Συχνότητα μετασχηματισμού (μετασχηματισμ./ολικά των 3h)	Απόδοση μετασχηματισμού (αριθμός μετασχηματισμ. / μg πλασμιδίου)
14/12/2016	NCIMB 11163	Συμπύκνωσθ: 500X 125 ng pBBR1MCS	$7,45 \cdot 10^6$	$2,06 \cdot 10^8$	0	0	0
	CP4	125 ng pBBR1MCS	-	$2,08 \cdot 10^7$	$2,74 \cdot 10^3$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	$2,19 \cdot 10^4$
13/1/2017	NCIMB 11163	Συμπύκνωσθ: 500X 500 ng pBBR1MCS	$8,56 \cdot 10^7$	$1,84 \cdot 10^8$	0	0	0
	CP4	500 ng pBBR1MCS	$1,27 \cdot 10^8$	$8,57 \cdot 10^8$	$3,93 \cdot 10^4$	$4,59 \cdot 10^{-5}$	$7,86 \cdot 10^4$
1/3/2017	NCIMB 11163	Συμπύκνωσθ: 1000X 500 ng pBBR1MCS	$1,36 \cdot 10^8$	$3,56 \cdot 10^9$	Επίστρωση: 14,58 Εγκλεισμός: 52,08	Επίστρωση: $4,1 \cdot 10^{-9}$ Εγκλεισμός: $1,46 \cdot 10^{-8}$	Επίστρωση: 29,16 Εγκλεισμός: $1,04 \cdot 10^2$
	CP4	500 ng pBBR1MCS	$8,36 \cdot 10^7$	$4,1 \cdot 10^9$	Επίστρωση: $8,9 \cdot 10^3$ Εγκλεισμός: $3,02 \cdot 10^4$	Επίστρωση: $2,17 \cdot 10^{-6}$ Εγκλεισμός: $7,37 \cdot 10^{-6}$	Επίστρωση: $1,78 \cdot 10^4$ Εγκλεισμός: $6,04 \cdot 10^4$

Από τον παραπάνω πίνακα, φαίνεται ότι μόνο στο τρίτο πείραμα πραγματοποιήθηκε με επιτυχία ο μετασχηματισμός του στελέχους NCIMB 11163, έστω και με μικρή απόδοση. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η επιτυχία του πειράματος βασίστηκε στην μεγάλη συμπύκνωση των δεκτικών κυττάρων και στη μεγάλη ποσότητα του πλασμιδιακού DNA.

3.5.2 Σύζευξη

Για την εισαγωγή του πλασμιδίου pBBR1MCSK από το S17.1 στο NCIMB 11163 πραγματοποιήθηκαν 2 ταυτόχρονα πειράματα με διαφορετικές αναλογίες δότη-δέκτη, με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών. Το συζευκτικό μείγμα τοποθετήθηκε σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης σε τρυβλίο CM και αφέθηκε στους 30 °C για 4 ώρες. Τόσο πριν όσο και μετά τη σύζευξη, η μέτρηση των κυττάρων του δότη γινόταν σε τρυβλία LB με στρεπτομυκίνη (50 µg/ml), χλωραμφαινικόλη (30 µg/ml) και καναμυκίνη (50 µg/ml), ενώ η μέτρηση των κυττάρων του δέκτη σε τρυβλία CM με ναλιδιξικό (10 µg/ml). Τέλος, η επιλογή των μετασυσζευγμένων κυττάρων έγινε σε τρυβλία CM με ναλιδιξικό (10 µg/ml) και χλωραμφαινικόλη (120 µg/ml). Λόγω υψηλής πτώσης της βιωσιμότητας του S17.1 κατά τη διάρκεια της σύζευξης (διότι το *Z. mobilis* εκκρίνει τοξίνες έναντι της *E. coli*) ελέγχθηκε ίση ποσότητα δέκτη με την αντίστοιχη του συζευκτικού μείγματος της αναλογίας 1:1 (όπου ο αριθμός των κυττάρων του *Z. mobilis* ήταν ο μεγαλύτερος) για να διαπιστωθούν διαφορές μεταξύ, ως μάρτυρας για την ικανότητα ανάπτυξης στο τρυβλίο επιλογής των μετασυσζευγμένων.

Πίνακας 3-6: Συζευκτική μεταφορά του πλασμιδίου pBBR1MCSK στο *Z. mobilis* NCIMB 11163 με δότη το S17.1

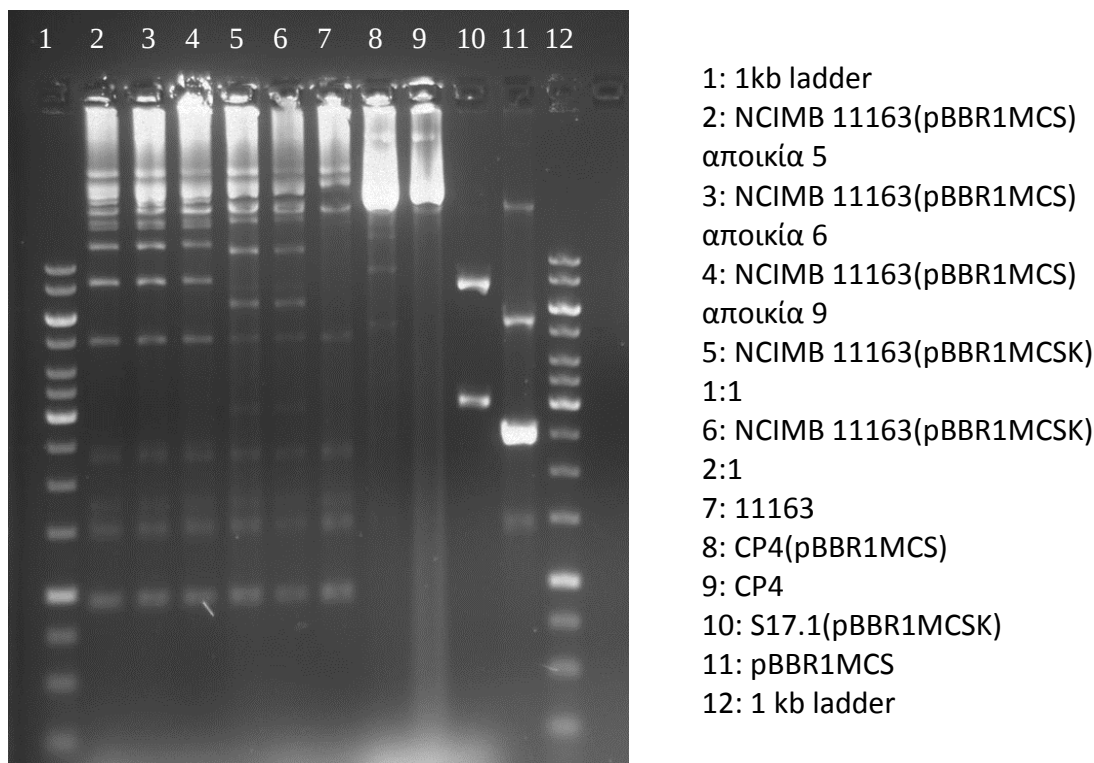
Αναλογία (δότη:δέκτη)	Στέλεχος	Αριθμός κυττάρων στο φίλτρο	Αριθμός κυττάρων μετά τη σύζευξη	Αριθμός μετασυσζευγμένων αποικιών	Απόδοση Σύζευξης (μετασυσζευγμένα κύτταρα/ κύτταρα δέκτη)
1:1	NCIMB 11163	4,18*10 ⁸	3,03*10 ⁸	1,59*10 ⁵	5,25*10 ⁻⁴
	DH5a (pBBR1MCSK)	3,71*10 ⁸	5,4*10 ⁶		
	DH5a (pBBR1MCSK) control		5,33*10 ⁸		
2:1	NCIMB 11163	4,18*10 ⁸	2,97*10 ⁸	4,42*10 ⁵	1,49*10 ⁻³
	DH5a (pBBR1MCSK)	7,42*10 ⁸	2*10 ⁶		

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι με την διπλάσια ποσότητα δέκτη εμφανίζεται και ο διπλάσιος αριθμός μετασυσζευγμένων αποικιών. Υπο φυσιολικές συνθήκες, στα πειράματα σύζευξης η ποσότητα του δότη ήθειςται να είναι αρκετά λιγότερη από του δέκτη, ώστε να μη θανατώνεται ο δεύτερος από ανεξέλεγκτες οπές στο κύτταρο του. Ωστόσο, επειδή το *Z. mobilis* εκκρίνει τοξικές ουσίες και θανατώνει σε μεγάλο βαθμό την *E. coli*, δηλαδή τον δότη (όπως φαίνεται και από τις διαφορές στον αριθμό κυττάρων του S17.1, όταν αυτό βρίσκεται στο συζευκτικό μείγμα ή σε ανεξάρτητο φίλτρο), και επομένως ο αριθμός των κυττάρων του μειώνεται κατά πολύ, αλλάζοντας τελείως τις αναλογίες δότη-δέκτη.

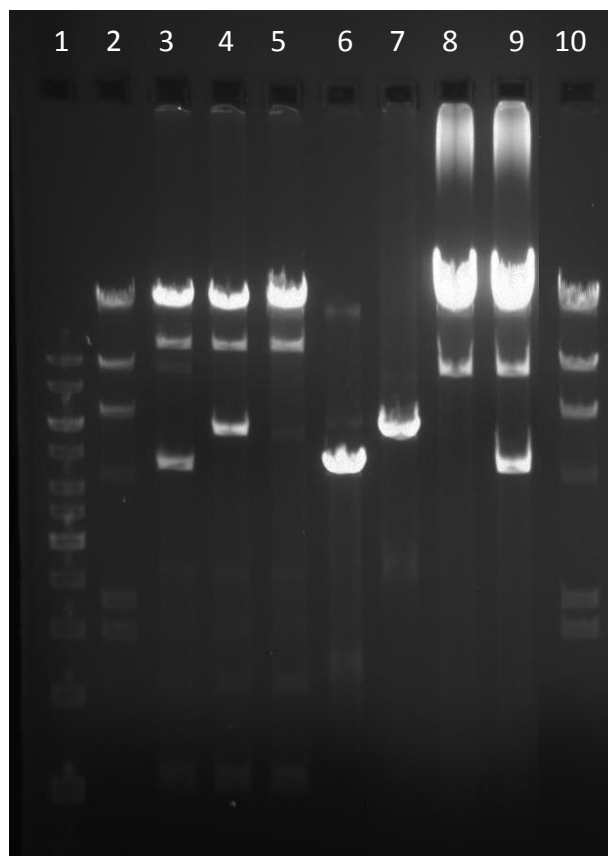
3.5.3 Έλεγχος μετασχηματισμένων και μετασυζευγμένων αποικιών

Ορισμένες από τις αποικίες που εμφανίστηκαν στα τρυβλία CM με χλωραμφαινικόλη των πειραμάτων του μετασχηματισμού και της σύζευξης υποβλήθηκαν σε απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψη με *ApaI* προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη και η ακεραιότητα των εισαγόμενων πλασμιδίων στο NCIMB 11163.

Στην εικόνα το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του άκοπου πλασμιδιακού DNA των NCIMB 11163(pBBR1MCS) και (pBBR1MCSK) σε σχέση με το αρχικό στέλεχος, καθώς και του CP4(pBBR1MCS) σε σχέση με το μη μετασχηματισμένο CP4. Η ύπαρξη επιπλέον ζωνών στα μετασχηματισμένα και μετασυζευγμένα στελέχη είναι ξεκάθαρη, υποδεικνύοντας την επιτυχή μεταφορά και αντιγραφή των pBBR1MCS pBBR1MCSK. Ομοίως, στην **εικόνα 3-15** φαίνεται το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του κομμένου με *ApaI* πλασμιδιακού DNA. Η *ApaI* κόβει τα pBBR1MCS και pBBR1MCSK σε ένα μόνο σημείο, οπότε αναμένεται η ύπαρξη ξακάθαρης επιπλέον ζώνης, σε σχέση με τα πατρικά στελέχη. Επομένως, στα μετασχηματισμένο NCIMB 11163 και CP4 με το pBBR1MCS φαίνεται μία επιπλέον ζώνη που τρέχει στα 4,707 kb, ενώ στο μετασυζευγμένο NCIMB 11163 με pBBR1MCSK φαίνεται μία επιπλέον ζώνη που τρέχει στα 6,389 kb



Εικόνα 3-15: Ηλεκτροφορητικά πρότυπα των μετασχηματισμένων και μετασυζευγμένων αποικιών του NCIMB 11163 (άκοπο DNA)



- 1: 1 kb ladder
- 2: λ/HindII ladder
- 3: NCIMB 11163 (pBBR1MCS)
- 4: NCIMB 11163 (pBBR1MCSK)
- 5: NCIMB 11163
- 6: pBBR1MCS
- 7: pBBR1MCSK
- 8: CP4
- 9: CP4 (pBBR1MCS)
- 10: λ/HindII ladder

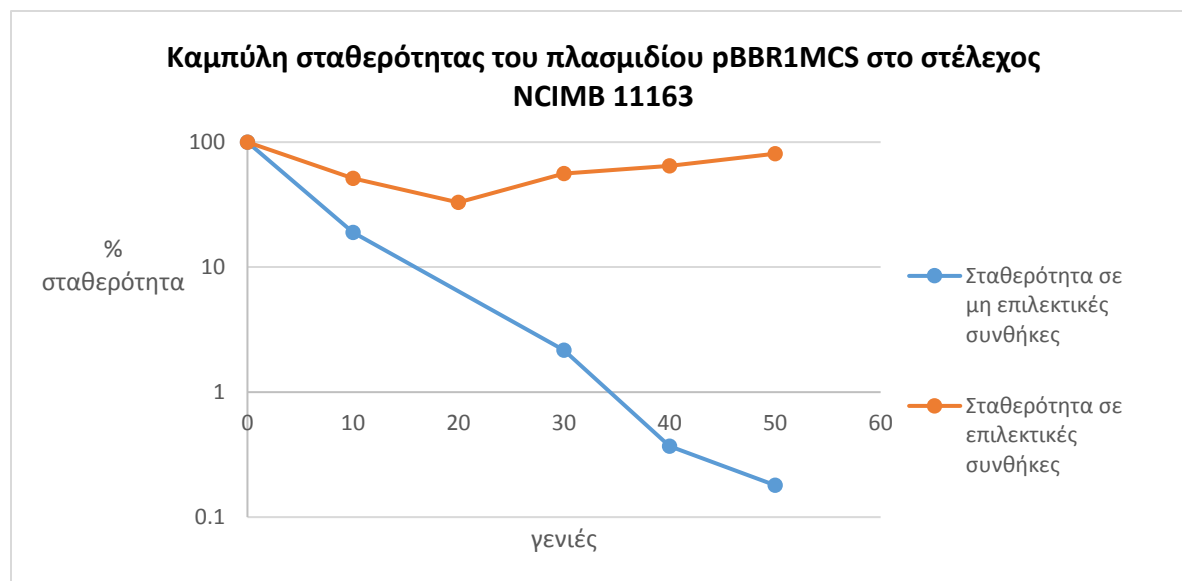
*Εικόνα 3-16: Ηλεκτροφορητικά πρότυπα των μετασχηματισμένων και μετασυζευγμένων αποικιών του NCIMB 11163 (κομμένο DNA με *ApaI*)*

3.5.4 Ελέγχος σταθερότητας των πλασμιδίων *pBBR1MCS* και *pBBR1MCSK* στο στέλεχος NCIMB 11163

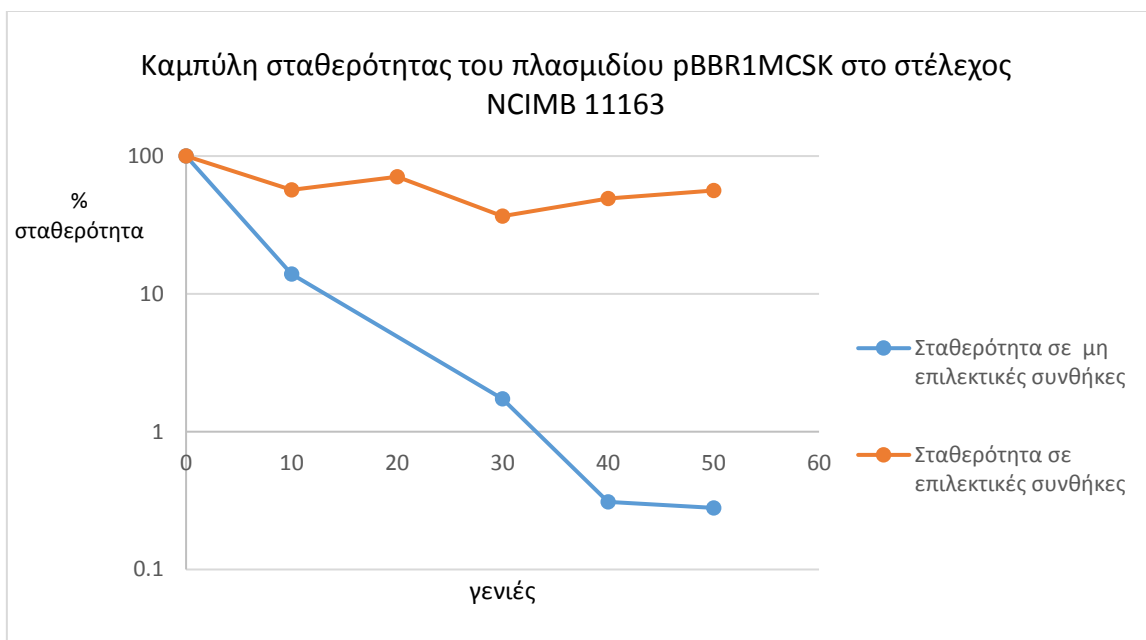
Στο επόμενο στάδιο και αφού επιβεβαιώθηκαν τα νέα στελέχη, μελετήθηκε η σταθερότητα των πλασμιδίων *pBBR1MCS* και *pBBR1MCSK* στο NCIMB 11163, τόσο σε επιλεκτικές όσο και σε μη επιλεκτικές συνθήκες. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι και τα δύο στελέχη εμφανίζουν υστέρηση στην ανάπτυξη όταν τοποθετούνται σε επιλεκτικό μέσο καλλιέργειας. Για σύγχρονη ανάπτυξη των στελεχών αυτών με τα φυσικά στελέχη, απαιτείται η χρήση εμβολίου 1%, έναντι του φυσιολογικού 0,1%. Ωστόσο, η σταθερότητα πραγματοποιήθηκε με την χρήση εμβολίου 0,1%, οπότε η μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων των καλλιεργειών σε μη επιλεκτικό μέσο γινόταν κάθε μέρα, ενώ η μέτρηση των καλλιεργειών σε επιλεκτικό μέσο γινόταν κάθε δύο μέρες. Η μελέτη της σταθερότητας των πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε μέχρι τις 50 γενιές.

Πίνακας 3-7: % σταθερότητα των πλασμιδίων *pBBR1MCS* και *pBBR1MCSK* στο στέλεχος *NCIMB 11163*

	Γενιές	% Σταθερότητα σε μη επιλεκτικές συνθήκες	% Σταθερότητα σε επιλεκτικές συνθήκες
11163 (pBBR1MCS)	10	18,99	51,21
	20	-	32,94
	30	2,17	56,00
	40	0,37	64,77
	50	0,18	80,81
11163 (pBBR1MCSK)	10	13,92	56,93
	20	-	70,93
	30	1,73	36,63
	40	0,31	49,13
	50	0,28	56,25



Εικόνα 3-17: καμπύλη σταθερότητας του πλασμιδίου *pBBR1MCS* στο στέλεχος *NCIMB 11163*



Εικόνα 3-18: καμπύλη σταθερότητας του πλασμιδίου pBBR1MCS στο στέλεχος NCIMB 11163

3.5.5 Συζεύξεις με δότη το NCIMB 11163

Μετά την απόκτηση και τον έλεγχο ενός αριθμού αποικιών ως προς την εισδοχή των πλασμιδίων pBBR1MCS και pBBR1MCSK πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων για να διαπιστωθεί η ικανότητα του συζευκτικού συστήματος του χρωμοσώματος του NCIMB 11163 να παρακινήσει τα δύο αυτά πλασμίδια.

3.5.5.1 Συζεύξεις με στόχο την παρακίνηση του pBBR1MCS και pBBR1MCSK από το NCIMB 11163 στο DH5a

Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε 4 ανεξάρτητες φορές χρησιμοποιώντας ως δότη δύο διαφορετικές αποικίες NCIMB 11163(pBBR1MCS) (8 & 9) και NCIMB 11163(pBBR1MCSK) (1:1 & 2:1) και ως δέκτη το στέλεχος DH5a. Τόσο πριν όσο και μετά τη σύζευξη, η μέτρηση των κυττάρων του δότη γινόταν σε τρυβλία CM με χλωραμφαινικόλη (120 µg/ml), ενώ η μέτρηση των κυττάρων του δέκτη σε τρυβλία LB. Η επιλογή των μετασυζευγμένων κυττάρων έγινε σε τρυβλία LB με χλωραμφαινικόλη (30 µg/ml).

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της σύζευξης:

Πίνακας 3-8: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα συζεύξεων με δότη το NCIMB 11163(pBBR1MCS) και δέκτη το DH5a

Ημερομηνία πειράματος	Δότης	Στέλεχος	Αριθμός κυττάρων στο φίλτρο	Αριθμός κυττάρων μετά τη σύζευξη	Αριθμός μετασυζευγμένων αποικιών
31/3/2017	Αποικία 9 11163 (pBBR1MCS)	11163 (pBBR1MCS) συζευκτικό μείγμα	7.05*10 ⁸	0	0
		11163 (pBBR1MCS) control		5.23*10 ⁴	
		DH5a συζ. μείγμα	1.07*10 ⁹	2.7*10 ⁹	
		DH5a control		2.8*10 ⁹	
4/4/2017*	Αποικία 8 11163 (pBBR1MCS)	11163(pBBR1MCSK) συζ. μείγμα	2,34*10 ⁸	4,33*10 ²	0
		11163(pBBR1MCSK) control		5,28*10 ⁷	
		DH5a σύζ. μείγμα	2,62*10 ⁸	3,4*10 ⁹	
		DH5a control		2,75*10 ⁹	
	11163 (pBBR1MCSK) 1:1	11163 (pBBR1MCSK) σύζ. μείγμα	1,53*10 ⁸	0	0
		11163 (pBBR1MCSK) control		1,12*10 ⁷	
		DH5a σύζ. μείγμα	2,62*10 ⁸	3,07*10 ⁹	
		DH5a control		1,82*10 ⁹	
	11163 (pBBR1MCSK) 2:1	11163(pBBR1MCSK) σύζ. μείγμα	1,22*10 ⁸	1,18*10 ⁴	0
		11163(pBBR1MCSK) control		5,8*10 ⁷	
		DH5a σύζ. μείγμα	3,93*10 ⁷	2,65*10 ⁹	
		DH5a control		2,42*10 ⁹	

* λόγω της υψηλής θνησιμότητας των κυττάρων του 11163(pBBR1MCS) που φάνηκε από το πείραμα της 31/3/2017, σ' αυτή τη σειρά πειραμάτων η αναδιάλυση των κυττάρων πριν τοποθετηθούν στο φίλτρο έγινε σε CM και όχι σε φυσικό ορό (NaCl 0,9%)

Και στα τέσσερα πειράματα δεν παρατηρήθηκαν μετασυζευγμένες αποικίες και επομένως δεν έγινε δυνατή η παρακίνηση των pBBR1MCS και pBBR1MCSK

3.5.5.2 Συζεύξεις με στόχο την παρακίνηση του pBBR1MCS από το NCIMB 11163 στο CP4

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (κεφάλαιο 1.1.1.1.2), μόνο ορισμένα από τα Dtr γονίδια ενός συζευκτικού συστήματος είναι απολύτως απαραίτητα για τις ενδοειδικές βακτηριακές συζεύξεις, ενώ τα υπόλοιπα λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία των διαειδικών συζεύξεων. Λόγω

της μεγάλης έλλειψης των Dtr γονιδίων στο χρωμόσωμα του NCIMB 11163 είναι λογικό να υποθέσουμε ότι αν όντως είναι λειτουργικό το συζευκτικό σύστημα, είναι πιο πιθανό να μπορούν να πραγματοποιηθούν ενδοειδικές συζεύξεις παρά διαειδικές

Το πρώτο βήμα για τη μελέτη της ικανότητας παρακίνησης του pBBR1MCS από το NCIMB 11163 στο CP4 ήταν η εύρεση διακριτικών δεικτών, με σκοπό τον διαχωρισμό των δύο οργανισμών από το συζευκτικό μείγμα. Η διάκριση του NCIMB 11163 από το CP4 ήταν εύκολη λόγω της ανθεκτικότητας του πρώτου στο αρσενικό. Για τον διαχωρισμό του CP4 από το NCIMB 11163 έπρεπε να βρεθεί ένας καινούργιος δείκτης μέσω μεταλλαξογένεσης του στελέχους. Συγκεκριμένα, απομονώθηκε αποικία ανθεκτική στη ριφαμπικίνη, ύστερα από επίστροψη μεγάλης ποσότητας κυττάρων CP4 σε τρυβλίο με ριφαμπικίνη 25 µg/ml. Η αποικία (CP4 rif^r) αυτή ελέγχθηκε ως προς την ανάπτυξη τόσο σε υγρό όσο και σε στερεό μέσο και κατόπιν χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα της σύζευξης ως δέκτης.

Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο ανεξάρτητες φορές χωρίς επιτυχία. Σε κάθε περίπτωση η αναλογία δότη:δέκτη ήταν περίπου 1:1. Τόσο πριν όσο και μετά τη σύζευξη, η μέτρηση των κυττάρων του δότη γινόταν σε τρυβλία CM με χλωραμφαινικόλη (120 µg/ml) και As₂O₃ (0,03 mM), ενώ η μέτρηση των κυττάρων του δέκτη σε τρυβλία CM με ριφαμπικίνη (25 µg/ml). Η επιλογή των μετασυζευγμένων κυττάρων έγινε σε τρυβλία CM με ριφαμπικίνη (25 µg/ml) και χλωραμφαινικόλη (120 µg/ml).

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των συζεύξεων:

Πίνακας 3-9:Συγκεντρωτικά αποτελέσματα συζεύξεων με δότη το NCIMB 11163(pBBR1MCS) και δέκτη το CP4 rif^r

Ημερομηνία πειράματος	Στέλεχος	Αριθμός κυττάρων στο φίλτρο	Αριθμός κυττάρων μετά τη σύζευξη	Αριθμός μετασυζευγμένων αποικιών
18/5/2017	NCIMB	1,39*10 ⁹	1,04*10 ⁸	0
	11163(pBBR1MCS)			
	CP4 rif ^r	1,7*10 ⁹	1,29*10 ⁸	
6/6/2017	NCIMB	5,65*10 ⁸	6,7*10 ⁷	0
	11163(pBBR1MCS)			
	CP4 rif ^r	7,98*10 ⁸	7,33*10 ⁸	

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται η αδυναμία της ενδοειδικής παρακίνησης του pBBR1MCS από τα συζευκτικά γονίδια του χρωμοσώματος

3.5.5.3 Τριγονεϊκή σύζευξη με δότες τα DH5a (pRK2013) NCIMB 11163 (pBBR1MCS) και δέκτη το CP4 rif^r

Λόγω αδυναμίας παρακίνησης του pBBR1MCS από το NCIMB 11163 προς οποιοδήποτε δέκτη, έπρεπε να ελεγχθεί αν το πλασμίδιο μπορούσε γενικότερα να παρακινηθεί από το εσωτερικό του NCIMB 11163 υπό την επίδραση οποιουδήποτε συζευκτικού συστήματος. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε το πείραμα της επιβοηθούμενης σύζευξης (6/6/2017). Σκοπός του

πειράματος ήταν η είσοδος του συζευκτικού πλασμιδίου pRK2013 από το DH5a στο NCIMB 11163 (pBBR1MCS) ώστε να παρακινήσει το pBBR1MCS στο CP4 rif^r. Το pRK2013 είναι ένας φορέας με ικανότητα αυτόνομης σύζευξης που ανήκει στην ομάδα ασυμβατότητας IncP (Figurski and Helinski 1979). Τόσο πριν όσο και μετά τη σύζευξη, η μέτρηση των κυττάρων του DH5a(pRK2013) γινόταν σε τρυβλία LB με καναμυκίνη (25 µg/ml), του NCIMB 11163(pBBR1MCS) σε τρυβλία CM με χλωραμφαινικόλη (120 µg/ml), As₂O₃ (0,03 mM, έναντι του CP4) και στρεπτομυκίνη (50 µg/ml, έναντι του DH5a) ενώ του CP4 rif^r σε τρυβλία CM με ριφαμπικίνη (25 µg/ml). Όσον αφορά τα μετασυζευγμένα κύτταρα έγιναν οι εξής επιλογές:

- απομόνωση του στελέχους DH5a (pRK2013, pBBR1MCS) με επιλογή σε τρυβλίο LB με καναμυκίνη (25 µg/ml) και χλωραμφαινικόλη (30 µg/ml)
- απομόνωση στελέχους NCIMB 11163 (pBBR1MCS, pRK2013) με επιλογή σε τρυβλίο CM με χλωραμφαινικόλη (120 µg/ml), As₂O₃ (0,03 mM), στρεπτομυκίνη (50 µg/ml) και καναμυκίνη (150 µg/ml)
- απομόνωση στελέχους CP4 rif^r (pRK2013) με επιλογή σε τρυβλίο CM με ριφαμπικίνη (25 µg/ml) και καναμυκίνη (150 µg/ml)
- απομόνωση στελέχους CP4 rif^r (pBBR1MCS) με επιλογή σε τρυβλίο CM με ριφαμπικίνη (25 µg/ml) και χλωραμφαινικόλη (120 µg/ml) και τέλος,
- απομόνωση στελέχους CP4 rif^r (pBBR1MCS, pRK2013) με επιλογή σε τρυβλίο CM με ριφαμπικίνη (25 µg/ml), χλωραμφαινικόλη (120 µg/ml) και καναμυκίνη (150 µg/ml)

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα αποτελέσματα της σύζευξης:

Πίνακας 3-10: Αποτελέσματα *triparental* σύζευξης

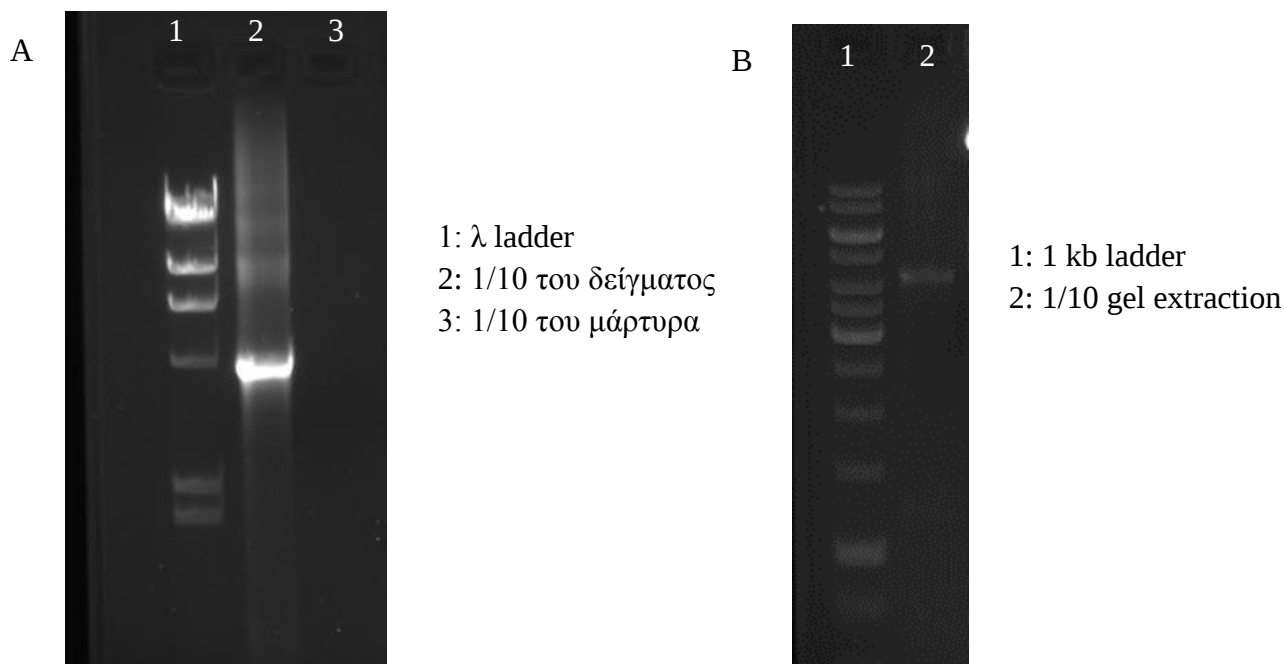
Στέλεχος	Αριθμός κυττάρων στο φίλτρο	Αριθμός κυττάρων μετά τη σύζευξη	Αριθμός αποικιών DH5a (pRK2013, pBBR1MCS)	Αριθμός αποικιών NCIMB 11163(pBBR1MCS, pRK2013)	Αριθμός αποικιών CP4 rif ^r (pRK2013)	Αριθμός αποικιών CP4 rif ^r (pBBR1MCS)	Αριθμός αποικιών CP4 rif ^r (pBBR1MCS, pRK2013)
NCIMB 11163 (pBBR1MCS)	5,09*10 ⁸	4,83*10 ⁷					
DH5a (pRK2013)	3,06*10 ⁹	1,67*10 ⁹	0	0	1,2*10 ⁵	0	0
CP4 rif ^r	7,25*10 ⁸	2,15*10 ⁸					

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι, ενώ προέκυψαν αποικίες του CP4 ανθεκτικές στην καναμυκίνη, γεγονός που επιδεικνύει την επιτυχή μεταφορά και αντιγραφή του pRK2013 στο εσωτερικό στελέχους, δεν βρέθηκαν αντίστοιχα ανθεκτικές αποικίες του NCIMB 11163. Παράλληλα, δεν φαίνεται να πραγματοποιήθηκε παρακίνηση του pBBR1MCS στο CP4. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην πολύ μεγάλη αστάθεια του pRK2013 στο εσωτερικό του NCIMB 11163, είτε στην ασυμβατότητα των δύο πλασμιδίων ώστε να μην μπορούν να αντιγραφούν ταυτόχρονα στο εσωτερικό του κυττάρου (μάλλον απίθανο από τη στιγμή που το pBBR1MCS δεν ανήκει στην ομάδα IncP), ή τέλος στην παρεμπόδιση της

συζευκτικής ικανότητας του pRK2013 λόγω κάποιου μηχανισμού στο εσωτερικού του στελέχους.

3.5.5.4 Συζεύξεις με στόχο την παρακίνηση του pJC1 από το NCIMB 11163 στο CP4

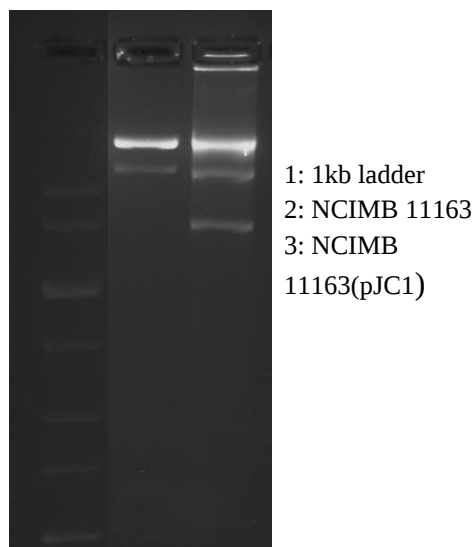
Λόγω αδυναμίας παρακίνησης του pBBR1MCS αρχικά επιχειρήθηκε η κατασκευή ενός παρακινούμενου φορέα, βασισμένου στο ενδογενές παρακινούμενο πλασμίδιο pZA1003 του NCIMB 11163 (μεγέθους 4,5 kb), με δείκτη το γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφαινικόλη. Για το σκοπό αυτό, αρχικά έγινε προσπάθεια για απομόνωση μεγάλη ποσότητας του πλασμιδίου pZA1003 μέσω της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), όπως περιγράφεται στο **κεφάλαιο 2.3.2**. Μετά το πέρας της PCR, το δείγμα υποβλήθηκε σε καθαρισμό με απομόνωση ζώνης από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction), με σκοπό την απομάκρυνση των παραπροϊόντων. Το αποτέλεσμα ήταν η απώλεια της μεγαλύτερης ποσότητας του δείγματος, με συνέπεια αυτό να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αντίδραση συγκόλλησης.



Εικόνα 3-19: Α. Ηλεκτροφορητικό πρότυπο των προϊόντων της PCR Β. Ηλεκτροφορητικό πρότυπο του δείγματος ύστερα από gel extraction

Ωστόσο, η λύση δόθηκε με την κατασκευή του πλασμιδίου pJC1 από τον Ιάσωνα Χαραμή, την ίδια περίοδο. Πρόκειται για έναν δυαδικό φορέα (περιέχει δηλαδή δύο *oriV*),

κατασκευασμένο από τμήμα του pBLUESCRIPT και τμήμα του pZA1003 (διπλωματική Ιάσωνα Χαραμή), ενώ παράλληλα περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφαινικόλη. Λόγω του ότι πρόκειται εν μέρει για το ενδογενές πλασμίδιο του οργανισμού, υποθέτουμε ότι υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να παρακινηθεί σε σχέση με κάποιο εξωγενές πλασμίδιο. Επομένως, ο φορέας εισήλθε με μετασχηματισμό στο NCIMB 11163, και το μετασχηματισμένο στέλεχος αφού ελέγχθηκε (εικόνα 3-19), χρησιμοποιήθηκε ως δότης σε νέο πείραμα σύζευξης. Ως δέκτης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος CP4 rif^r, λόγω της μεγαλύτερης πιθανότητας διεκπεραίωσης ενδοειδικών έναντι διαειδικών συζεύξεων



Εικόνα 3-20: Ηλεκτροφορητικό πρότυπο της μετασχηματισμένης αποικίας του στελέχους NCIMB 11163 με το πλασμίδιο pJC1 (κομμένο με *ApaI*) (διπλωματική Ιάσωνα Χαραμή)

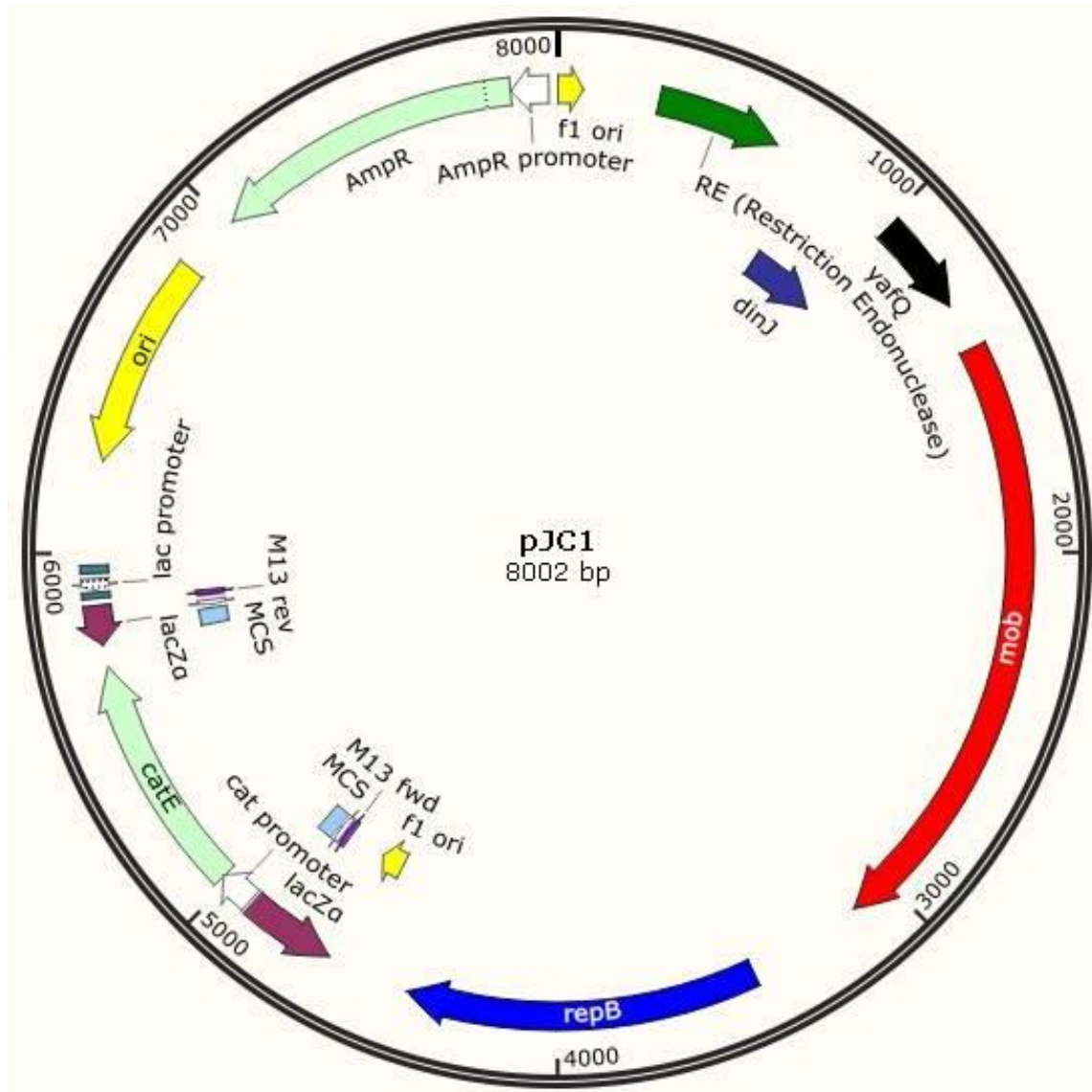
Τόσο πριν όσο και μετά τη σύζευξη, η μέτρηση των κυττάρων του δότη γινόταν σε τρυβλία CM με χλωραμφαινικόλη (120 µg/ml) και As₂O₃ (0,03 mM), ενώ η μέτρηση των κυττάρων του δέκτη σε τρυβλία CM με ριφαμπικίνη (25 µg/ml). Η επιλογή των μετασυσζευγμένων κυττάρων έγινε σε τρυβλία CM με ριφαμπικίνη (25 µg/ml) και χλωραμφαινικόλη (120 µg/ml).

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα αποτελέσματα της σύζευξης:

Πίνακας 3-11: Αποτελέσματα σύζευξης με δότη το NCIMB 11163(pJC1) και δέκτη το CP4 rif^r

Στέλεχος	Αριθμός κυττάρων στο φίλτρο	Αριθμός κυττάρων μετά τη σύζευξη	Αριθμός μετασυσζευγμένων αποικιών
NCIMB 11163 (pJC1)	1,36*10 ⁹	4,7*10 ⁸	0
CP4 rif ^r	8,7*10 ⁸	1,15*10 ⁹	

Το αρνητικό αποτέλεσμα και σε αυτήν την σύζευξη υποδεικνύει είτε την αδυναμία παρακίνησης των συγκεκριμένων επιλεγμένων φορέων, είτε την πλήρη απουσία της ικανότητας παρακίνησης από το χρωμόσωμα



Εικόνα 3-21: Αναλυτικός χάρτης του φορέα pJC1

4 Συζήτηση

Το βακτήριο *Zymomonas mobilis*, που έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την παραγωγή αλοολούχων ποτών, φαίνεται να έχει αυξημένες δυνατότητες για την βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης. Ωστόσο, η αδυναμία ανάπτυξης υπό φθηνών και άφθονων υποστρωμάτων, εμποδίζει την αποδοτική χρήση του σε μεγάλης κλίμακας αλκοολικές ζυμώσεις έναντι των ζυμομυκήτων. Για το λόγο αυτό, έχει εξεταστεί ένα μεγάλο εύρος μεθόδων γενετικής τροποποίησης του οργανισμού, με κυρίαρχα εργαλεία τον μετασχηματισμό και τη σύζευξη. Ως τώρα, το *Z. mobilis* έχει αναφερθεί εκτεταμένα ως δέκτης σε διαδικασίες σύζευξης, ενώ παράλληλα έχει χαρακτηριστεί η ύπαρξη ενδογενούς συζευκτικής ικανότητας στο στέλεχος ATCC 10988 (διδαστορική διατριβή Κ. Μ. Παππά). Ακόμα, έχει αναφερθεί η μεταφορά των δεικτών καναμυκίνης, στρεπτομυκίνης και γενταμυκίνης μέσω συζευκτικής μεταφοράς του αυτό-συζευκτικού πλασμιδίου pRUT41 του CP4 (Walia *et al.*, 1984). Ωστόσο, με την δημοσίευση των αλληλουχιών των γονιδιωμάτων των δύο οργανισμών (Kouvelis *et al.*, 2014; Pappas *et al.*, 2011), δεν φαίνεται να υπάρχουν τυπικά γονίδια που εμπλέκονται με την σύζευξη, γεγονός που ωστόσο δεν αποκλείει την ύπαρξη άλλου τύπου, μη χαρακτηρισμένου συζευκτικού συστήματος ή κάποιου δεύτερου μηχανισμού έκκρισης νουκλεϊκών οξέων.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, το στέλεχος NCIMB 11163 φέρει στο χρωμόσωμά του, τυπικά χαρακτηρισμένα συζευκτικά γονίδια, εντός δύο περιοχών που διαφέρουν από το υπόλοιπο χρωμόσωμα. Οι περιοχές αυτές φαίνεται να προήλθαν από οριζόντια γενετική μεταφορά και χαρακτηρίζονται ως γονιδιωματικές νησίδες, αφού 1. έχουν διαφορετικό GC περιεχόμενο από το υπόλοιπο χρωμόσωμα 2. είναι ενσωματωμένες στο τέλος μίας περιοχής με rRNA και tRNA γονίδια, και συγκεκριμένα στο τέλος του γονιδίου tRNA-Met. Συγκεκριμένα φαίνεται να ανήκουν στην κατηγορία των ICEs στοιχείων λόγω της ύπαρξης συζευκτικών γονιδίων ή ακόμα στην κατηγορία των συζευκτικών μεταθετών στοιχείων, λόγω της ύπαρξης πολλαπλών γονιδίων τρανσποζασών. Η μελέτη των συγκεκριμένων συζευκτικών γονιδίων πραγματοποιήθηκε:

- **για λόγους βασικής έρευνας**, δηλαδή για τη μελέτη καινούργιων συζευκτικών συστημάτων με σκοπό την απόκτηση περισσότερων πληροφοριών για τα διαδεδομένα T4SS και τον τρόπο της λειτουργίας τους σε διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Άλλωστε, τα συζευκτικά συστήματα των Αλφαπρωτεοβακτηρίων εμφανίζουν μοναδικές ιδιότητες, με αποκορύφωμα το συζευκτικό σύστημα του *Agrobacterium tumefaciens*. Λόγω του ότι τα γονίδια της νησίδας των 79 kb παρουσιάζουν ομοιότητα με το σύστημα του *A. tumefaciens* (Kouvelis *et al.*, 2009), η μελέτη τους είναι σημαντική για την αναζήτηση άλλων σημαντικών, παρόμοιων ιδιοτήτων.
- **ως εργαλείο γενετικής τροποποίησης**, καθώς πολλοί μικροοργανισμοί παρουσιάζουν δυσκολία στην τροποποίηση του γενετικού τους υλικού. Έτσι, υπό την λειτουργία ενός συζευκτικού συστήματος σε στέλεχος του *Z. mobilis*, θα μπορούσαν να μεταφερθούν συζευκτικά πλασμιδιακοί φορείς μεταξύ του ίδιου ή και διαφορετικών συγγενικών ειδών

4.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Η βιοπληροφορική ανάλυση των συζευκτικών γονιδίων του χρωμοσώματος ήταν υψίστης σημασίας για τον μελλοντικό πειραματικό σχεδιασμό. Τα συζευκτικά γονίδια είναι κατανεμημένα στις δύο γονιδιωματικές νησίδες του χρωμοσώματος ως εξής: στην νησίδα των 25

kb βρίσκονται τα: πεπτιδάση S26 (πρόδρομος) – ORF– λυτική τρανσγλυκοζυλάση- υποθετική πρωτεΐνη VirD2 – 1 ORF – *trbI*, ενώ στη νησίδα των 79 kb βρίσκονται τα: *traF* – 3ORFs– υποθετική πρωτεΐνη VirD2 – 1 ORF- λυτική τρανσγλυκοζυλάση- 1 ORF και ένα pseudo– *traG* – 1 ORF – ΑΤΡαση *trbB* - *trbC*– *trbD*⁵ – *trbE* – *trbJ* – υποθετική πρωτεΐνη *trbK* – *trbL*– *trbF* – *trbG* – *trbI*.

Το γονίδιο της λυτικής τρανσγλυκοζυλάσης αναφέρθηκε ως πιθανά εμπλεκόμενο στη συζευκτική διαδικασία λόγω του ότι στο *vir* σύστημα του *A. tumefaciens*, η VirB1 είναι λυτική τρανσγλυκοζυλάση, ο ρόλος της οποίας συνίσταται στην δημιουργία οπής στο τοίχωμα της πεπτιδογλυκάνης (βλ. κεφάλαιο 1.1.1.1.2.1).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η γονιδιωματική νησίδα των 79 kb είναι η περιοχή που μας ενδιαφέρει καθώς περιέχει το σύνολο των ειδών των συζευκτικών γονιδίων που υπάρχουν στο χρωμόσωμα (οριοθετούν μία περιοχή 19,5 kb). Παρατηρούμε ότι, η πλειονότητα των συζευκτικών γονιδίων εμπλέκεται στον σχηματισμό του συζευκτικού πόρου (Mpf σύστημα), ενώ υπάρχει αξιοσημείωτη έλλειψη των Dtr γονιδίων, με την σημαντικότερη να αποτελεί η απουσία μίας καλά χαρακτηρισμένης ριλαξάσης.

Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή ομολογία των συζευκτικών γονιδίων του χρωμοσώματος με το *tra/trb* σύστημα του *A. tumefaciens* (μεταξύ 78 και 92%), μπορούμε να συγκρίνουμε την διάταξη των γονιδίων στα δύο συστήματα (βλ. εικόνα 3-4), παρατηρούμε την ίδια διαδοχή στα δύο συζευκτικά συστήματα. Όλα τα γονίδια είναι παρόντα, με εξαίρεση το *trbH*, και βρίσκονται στην ίδια σειρά. Δυστυχώς, δεν μπορούμε ακριβώς να συγκρίνουμε τη διαδοχή των γονιδίων στην περίπτωση του Dtr συστήματος, καθώς τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια φαίνεται να λείπουν από το NCIMB 11163. Τα *tra* γονίδια στο *A. tumefaciens* βρίσκονται αρκετά απομακρυσμένα από τα *trb* γονίδια, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στην περίπτωση του *Z. mobilis* NCIMB 11163. Θεωρώντας τα γονίδια *traF* και υποθετική πρωτεΐνη VirD2 (πιθανά αντίστοιχο με το *traA*) ως τα μόνα γονίδια που πιθανά αντιπροσωπεύουν το Dtr σύστημα και το *traG* ως την CP, μπορούμε να συγκρίνουμε την οργάνωση αυτών των γονιδίων του NCIMB 11163 με την *tra* περιοχή του *A. tumefaciens*. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι στο πλασμίδιο pZA1001 έχει βρεθεί ένα γονίδιο *traJ* συστατικό του ριλαξοσώματος που θα μπορούσε να δράσει *in trans* υπόβοηθώντας τον σχηματισμό του ριλαξοσώματος στο χρωμόσωμα.

Συγκρίνοντας τα δύο συστήματα και κάνοντας την παραδοχή ότι το εν δυνάμει συζευκτικό σύστημα του NCIMB 11163 έχει τις ίδιες ιδιότητες και την ίδια δομή με το αντίστοιχο του *A. tumefaciens* σε όλο του το μήκος, υποθέτουμε ότι στην Dtr περιοχή, και κυρίως κάπου μεταξύ των γονιδίων *traF* και *traG*, και ειδικότερα μεταξύ του γονιδίου της υποθετικής πρωτεΐνης VirD2 (αν μπορούμε να θεωρήσουμε το γονίδιο ως μία πιθανή ριλαξάση) και του *traG* βρίσκεται το *oriT*. Αντίστοιχα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι στην περίπτωση λειτουργίας του συζευκτικού συστήματος ο προσανατολισμός του κλώνου που θα περάσει θα είναι από το *oriT* προς το *traG* και τα υπόλοιπα *trb* γονίδια (με κατεύθυνση 5'-3')

Όσον αφορά στην πιθανότητα της λειτουργίας του συζευκτικού συστήματος, φαίνεται πως υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα το σύστημα να μπορεί να παρακινήσει κάποιο παρακινούμενο πλασμίδιο, παρά να συζευχθεί ή να παρακινηθεί το ίδιο. Πράγματι, στην γονιδιωματική νησίδα είναι αρκετά αξιοπρόσεκτη η μειωμένη παρουσία των Dtr γονιδίων που κωδικοποιούν το ριλαξόσωμα, ωστόσο δεν αποκλείεται η επάρκεια αυτών για την συζευκτική μεταφορά ή η ύπαρξη άλλων μη χαρακτηρισμένων γονιδίων που μπορεί να υποβοηθούν τη διαδικασία (καθώς

⁵ Πρόκειται στην πραγματικότητα για το γονίδιο *trbD* που έχει χαρακτηριστεί εσφαλμένα ως *trbB*

υπάρχουν πολλά γονίδια υποθετικών πρωτεϊνών). Η υποθετική πρωτεΐνη VirD2 θα μπορούσε να έχει δραστηριότητα ριλαξάσης και να πραγματοποιεί το κόψιμο του *oriT*, όπως υποδεικνύεται από μία υπομονάδα της, αλλά και από το σχετικά μεγάλο της μέγεθος (όλες οι ριλαξάσες έχουν μεγάλο μέγεθος όσον αφορά στην αμινοξική τους αλληλουχία). Μία τέτοια υπόθεση θέλει όμως πειραματική επιβεβαίωση, ενώ επιπλέον η ύπαρξη ενός πλήρως λειτουργικού γονιδίου ριλαξάσης (**WP_019367732.1**) στο *Novosphingobium resinovorum*⁶ στη θέση 898217-900994 υποδεικνύει ότι μάλλον εκείνη λειτουργεί για την αναγνώριση και την τομή του DNA στη θέση του *oriT*, και όχι η υποθετική πρωτεΐνη

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (βλ. **εικόνα 4-1**) το *trbH* γονίδιο είναι ομόλογο με το *virB7* του *VirB/VirD4* συστήματος και με το *traV* του F συστήματος, και επομένως πρέπει να διαδραματίζουν παρόμοιο, αν όχι ίδιο, ρόλο. Είναι αλήθεια ότι στα συγκεκριμένα συστήματα φαίνεται να είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του συζευκτικού πόρου. Συγκεκριμένα, στο *Agrobacterium tumefaciens*, το προϊόν του γονιδίου *virB7* είναι μία λιποπρωτεΐνη που συμμετέχει στο σύμπλοκο πυρήνα (μαζί με VirB9 και VirB10) και μαζί με την VirB9 παίζει κρίσιμο ρόλο στην σταθεροποίηση άλλων VirB πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της βιογένεσης του συμπλόκου μεταφοράς του T-DNA (Fernandez *et al.* 1996). Αντίστοιχα, στο F συζευκτικό σύστημα έχει βρεθεί ότι η TraV είναι επίσης μία λιποπρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης, με ρόλο αντίστοιχο με εκείνο της VirB7. Πράγματι, η TraV μαζί με τις TraK και TraB (ανάλογες των VirB9 και VirB10 αντίστοιχα) σχηματίζουν ένα σύμπλοκο που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη της *Escherichia coli*, από την εξωτερική μεμβράνη (TraV), μέσω του περιπλάσματος (TraK), στην εσωτερική μεμβράνη (TraB), και επόμενως παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό του F τριχιδίου (Harris *et al.*, 2001).

Ωστόσο, οι πρωτεΐνες που είναι ανάλογες με την VirB7 φαίνεται να παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία στα διάφορα συζευκτικά συστήματα. Για παραδειγμα, όσον αφορά στην τοπολογία της, στην πλειονότητα των συζευκτικών βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη, αλλά πολλές φορές έχει εντοπιστεί στην εσωτερική μεμβράνη, στο συζευκτικό τριχίδιο αλλά και στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Επιπλέον, οι VirB7 υπομονάδες φαίνεται να βρίσκονται μόνο σε ένα μικρό ποσοστό των συζευκτικών συστημάτων των Gram αρνητικών βακτηρίων. Σε ορισμένα T4SS (πχ στο *Helicobacter pylori* HP0532) υπάρχουν λιποπρωτεΐνες με μικρή ομοιότητα με την VirB7 που θα μπορούσαν να έχουν ανάλογο ρόλο, ενώ σε άλλα (πχ στο *Brucella abortus*) δεν είναι απαραίτητες για την επιτυχημένη λειτουργία του συστήματος μεταφοράς (Alvarez-Martinez and Christie, 2009).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω θεωρήσαμε ότι υπάρχει πιθανότητα να επαρκούν τα συζευκτικά γονίδια του χρωμοσώματος του NCIMB 11163 για μία επιτυχημένη παρακίνηση ενός εξωχρωμοσωμικού γενετικού υλικού, αν όχι για αυτό-μεταφορά.

Παράλληλα, οι γονιδιωματικές νησίδες του NCIMB 11163 φαίνεται να ανήκουν στην κατηγορία των ICEs, καθώς περιέχουν συζευκτικά γονίδια. Λόγω του ότι έχουν υψηλή ομοιότητα με το *Novosphingobium*, ότι αυτό περιέχει επιπλέον γονίδιο ριλαξάσης (θέση 898217 – 900994) και ότι το NCIMB 11163 είναι το μοναδικό στέλεχος του είδους *Z. mobilis* που φέρει αυτού του τύπου τη γονιδιωματική νησίδα, είναι ασφαλές να υποθέσουμε ότι η νησίδα προήλθε εξελικτικά

⁶ Όπως έχει αναφερθεί στα αποτελέσματα, η δεύτερη γονιδιωματική νησίδα έχει πολύ υψηλή ομοιότητα (ως και 100% στα περισσότερα γονίδια) και την διαδοχή των γονιδίων με την περιοχή 1467146-1538609 του *Novosphingobium resinovorum* SA1

από το πλασμίδιο SA1 και ότι η μεταφορά της μέσω σύζευξης ήταν επιτυχημένη παρά την έλλειψη του γονιδίου *trbH*. Ακόμα και αν η γονιδιωματική νησίδα δεν μεταφέρθηκε από το *N. resinovorum* SA1 στο NCIMB 11163, αλλά από κάποιον άλλον οργανισμό στους δύο αυτούς, και πάλι η συζευκτική μεταφορά φαίνεται να συνέβη παρά την έλλειψη του *trbH*, καθώς είναι σχετικά απίθανο να συμβεί έλλειψη του ίδιου γονιδίου δύο ανεξάρτητες φορές σε διαφορετικά είδη.

Για τον λόγο αυτό, εφαρμόστηκε μία σειρά πειραμάτων με στόχο την διερεύνηση της λειτουργίας των συζευκτικών γονιδίων του χρωμοσώματος υπο φυσιολογικές συνθήκες

4.2 Καλλιέργεια και χαρακτηριστικά του στελέχους NCIMB 11163 σε σχέση με άλλους οργανισμούς

Στο πρώτο στάδιο της διπλωματικής, επιχειρήθηκε η εις βάθος μελέτη του στελέχους, ως απαραίτητη προϋπόθεση για την διεκπεραίωση των μελλοντικών πειραμάτων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη ως προς τις βέλτιστες μεθόδους καλλιέργειας του οργανισμού. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι οι μέθοδοι της επίστρωσης με διανομέα και του εγκλεισμού δίνουν, σε σημαντικό βαθμό, μεγαλύτερου μεγέθους αποικίες σε σχέση με την επίστρωση με κρίκο ή τις σταγόνες στα viable counts. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην αναστολή της ανάπτυξης των αποικιών όταν αυτές βρίσκονται σε πολύ κοντινή απόσταση. Άλλωστε έχει αναφερθεί, για διαφορετικούς μικροοργανισμούς, ότι το μέγεθος των αποικιών εξαρτάται από την συγκέντρωση των κυττάρων, και ότι οι αποστάσεις μεταξύ των αποικιών μεγαλώνουν όσο μεγαλύτερη και πιο ενεργή είναι μία αποικία (Jeanson *et al.*, 2015). Είναι λογικό επομένως να υποθέσουμε ότι μικρότερες αποστάσεις μεταξύ των κυττάρων επιτρέπουν την ανάπτυξη μικρότερου μεγέθους αποικιών. Επιπλέον, φαίνεται ότι το στέλεχος NCIMB 11163 χαρακτηρίζεται πιο αναερόβιο από το CP4, εφόσον παρατηρήθηκε 4-5 φορές μεγαλύτερος αριθμός αποικιών (έναντι του τριπλάσιου στο CP4) με τη μέθοδο του εγκλεισμού, σε σχέση με τη μέθοδο της επίστρωσης με διανομέα. Επομένως, προτείνεται η μέθοδος του εγκλεισμού ως πλεονεκτική για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της γενετικής τροποποίησης του στελέχους.

Η συγκριτική μελέτη ανόχης στο αρσενικό μεταξύ των στελεχών NCIMB 11163, CP4, και S17.1, η οποία πραγματοποιήθηκε για την εύρεση δεικτών με σκοπό τον διαχωρισμό δότη-δέκτη στα πειράματα της σύζευξης, έδειξε τα αναμενόμενα αποτελέσματα και για τα τρία στελέχη. Το NCIMB 11163 εμφάνισε υψηλή ανθεκτικότητα στο αρσενικό σ' όλο το εύρος συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε (0,0005-0,5 mM), με μία μικρή πτώση στον αριθμό των κυττάρων στη συγκέντρωση 0,5 mM. Η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται στην ύπαρξη ενός οπερονίου ανθεκτικότητας στο αρσενικό, *arsRDABC*, υψηλής ομολογίας με τα αντίστοιχα γονίδια των εντεροβακτηρίων, στο πλασμίδιο pZA1001. Αντίθετα, το CP4 εμφάνισε μεγάλη πτώση βιωσιμότητας και πλήρη θνησιμότητα στην συγκέντρωση 0,03 mM. Επομένως, η συγκέντρωση αυτή χρησιμοποιήθηκε ως διαχωριστικό των δύο στελεχών. Τα αποτελέσματα αυτά συμπίπτουν με τις βιβλιογραφικές αναφορές (Typas and Galani, 1992).

Το S17.1 προέρχεται από την τροποποίηση του στελέχους *E. coli* K12 (Simon *et al.*, 1983), το οποίο διαθέτει οπερόνιο ανθεκτικότητας στο αρσενικό και επομένως δεν μπορεί να

διαχωριστεί από το NCIMB 11163 βάσει αυτού του δείκτη. Εναλλακτικά, για την αναστολή του S17.1 έγινε χρήση του ναλιδιξικού οξέος συγκέντρωσης 10 µg/ml (όπως προσδιορίστηκε από συγκριτικά πειράματα βλ. κεφάλαιο **Error! Reference source not found.**), ενώ για την αναστολή του DH5a χρησιμοποιήθηκε στρεπτομυκίνη συγκέντρωσης 50 µg/ml.

4.3 Εισαγωγή των πλασμιδίων pBBR1MCS και pBBR1MCSK στα στελέχη NCIMB 11163 και CP4

Λόγω της απουσίας κατάλληλων δεικτών στο χρωμόσωμα σε θέση παρακείμενη ως προς το υποθετικό *oriT*, δεν είναι δυνατή η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε περίπτωση συζευκτικής μεταφοράς ή παρακίνησης τμήματος του χρωμοσώματος. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η ικανότητα παρακίνησης άλλων παρακινούμενων φορέων από το χρωμόσωμα για να διαπιστωθεί αν τα γονίδια που υπάρχουν είναι ικανά να πραγματοποιήσουν τη σύζευξη. Το πρώτο βήμα ήταν η εισαγωγή τέτοιων φορέων στο εσωτερικό του NCIMB 11163. Αυτό πραγματοποιήθηκε με 2 μεθόδους: τον μετασχηματισμό του στελέχους με το πλασμίδιο pBBR1MCS και την συζευκτική μεταφορά του pBBR1MCSK με δότη το S.17.1. Τα πλασμίδια αυτά επιλέχθηκαν λόγω των σχετικά υψηλών αποδόσεων εισόδου και σταθερότητας στο *Z. mobilis*.

Ο μετασχηματισμός του *Z. mobilis* έχει γενικά χαμηλή απόδοση σε σχέση με άλλους χρησιμοποιούμενους μικροοργανισμούς, πιθανότατα λόγω του περιβλήματός του ή της αυξημένης δράσης ενδονουκλεασών, με συνέπεια την αποικοδόμηση του νεοεισερχόμενου πλασμιδιακού DNA. Ιδιαίτερα, για αγνώστους λόγους, το στέλεχος NCIMB 11163 παρουσιάζει αυξημένη δυσκολία στο μετασχηματισμό του, όπως έχει αναφερθεί και παλαιότερα (διπλωματική Ελένη Νταβίντοβα), σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Η λύση δόθηκε με αύξηση της συμπύκνωσης των δεκτικών κυττάρων (1000X) σε σχέση με το πρωτόκολλο, και με χρήση μεγάλης ποσότητας DNA (0,5 µg) στην διαδικασία του μετασχηματισμού. Στα πειράματα του μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το CP4 για τον έλεγχο της σωστής πορείας της διαδικασίας.

Αντίστοιχα, η σύζευξη με τη χρήση του *Z. mobilis* ως δέκτη έχει επίσης χαμηλή απόδοση για τους προαναφερθέντες λόγους, αλλά και εξαιτίας της έκκριση τοξικών ουσιών από το *Z. mobilis*, με αποτέλεσμα την θανάτωση των κυττάρων της *E. coli* (Khachatourians *et al.*, 1985). Η πτώση της βιωσιμότητας των κυττάρων του δότη (κατά δύο τάξεις μεγέθους) επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα διπλωματική. Για το λόγο αυτό, οι αναλογίες δότη-δέκτη τροποποιήθηκαν έτσι ώστε να μην υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα δέκτη. όπως συνηθίζεται, αλλά ίση ή μεγαλύτερη ποσότητα δότη. Αύξηση της ποσότητας του δότη οδήγησε σε ανάλογη αύξηση στον αριθμό των μετασυσζευγμένων αποικιών.

Στη συνέχεια, οι μετασχηματισμένες και μετασυσζευγμένες αποικίες ελέγχθηκαν ως προς τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα και την αναπτυξιακή τους πορεία. Βρέθηκε ότι τα NCIMB 11163 (pBBR1MCS) και NCIMB 11163 (pBBR1MCSK) εμφάνιζαν υστέρηση στην ανάπτυξη σε σχέση με τα φυσικά στελέχη, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στο CP4 (pBBR1MCS). Εξαίρεση αποτέλεσε μία αποικία που απομονώθηκε από την σύζευξη με αναλογία 2:1, η οποία αναπτυσσόταν το ίδιο γρήγορα με το φυσικό στέλεχος.

Η σταθερότητα των πλασμιδίων pBBR1MCS και pBBR1MCSK στο εσωτερικό του NCIMB 11163 ήταν χαμηλή. Σε επιλεκτικές συνθήκες, Σε μη επιλεκτικές συνθήκες, το pBBR1MCS εμφάνισε 0,18 % σταθερότητα στις 50 γενιές, ενώ το pBBR1MCSK 0,28%.

4.3.1 Συζεύξεις με δότη το NCIMB 11163

Η μελέτη της ικανότητας παρακίνησης του pBBR1MCS και pBBR1MCSK από το χρωμόσωμα του NCIMB 11163 ξεκίνησε με την πραγματοποίηση πειράματος σύζευξης, με δότες τα NCIMB 11163 (pBBR1MCS) και NCIMB 11163 (pBBR1MCSK) και δέκτη το στέλεχος *E. coli* DH5a. Το DH5a χρησιμοποιήθηκε ως δέκτης λόγω των γενικά υψηλών αποδόσεων μετασυζευγμένων κυττάρων στο συγκεκριμένο στέλεχος.

Αρχικά, τα πειράματα έδειξαν ότι υπό αυτές τις συνθήκες δεν πραγματοποιήθηκε παρακίνηση του pBBR1MCS και pBBR1MCSK από το συζευκτικό σύστημα του NCIMB 11163. Ωστόσο, η αποτυχία ανάκτησης μετασυζευγμένων αποικιών μπορεί πιθανότατα να οφείλεται στην κατακόρυφη πτώση του αριθμού των κυττάρων του *Z. mobilis*. Στο **κεφάλαιο 4.3** αναφέρθηκε μεγάλη πτώση της *E. coli* στα πειράματα σύζευξης λόγω εξωκυττάρων τοξικών προϊόντων από το *Z. mobilis*. Στην περίπτωση επώασης των φίλτρων νιτροκυτταρίνης σε θρεπτικό LB, το φαινόμενο αντιστρέφεται, και παρατηρείται μεγάλη θνησιμότητα στα κύτταρα του *Z. mobilis* έναντι της *E. coli*, πιθανότατα λόγω της έλλειψης γλυκόζης ως πηγή άνθρακα. Ιδιαίτερα στο συζευκτικό μείγμα φάνηκε μηδενική επιβίωση του NCIMB 11163, εν αντιθέση με τα control. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ανταγωνισμό μεταξύ των δύο οργανισμών αποτρέποντας την επιβίωση των ελάχιστων βιώσιμων κυττάρων. Για την αύξηση της επιβίωσης του στελέχους, στα επόμενα πειράματα, το κυτταρικό ίζημα που τοποθετήθηκε στο φίλτρο, αναδιαλύθηκε σε CM έναντι του φυσικού ορού. Ως αποτέλεσμα, φάνηκε αύξηση της βιωσιμότητας κατά 3 τάξεις μεγέθους στην περίπτωση των controls, αλλά δεν φάνηκε να βελτιώνει την κατάσταση στην περίπτωση του συζευκτικού μείγματος.

Εκτός από την πτώση της βιωσιμότητας του δότη, η αδυναμία παρακίνησης των πλασμιδίων μπορεί να οφείλεται στην απουσία ικανότητας διεκπεραίωσης διαειδικής σύζευξης. Πράγματι, όπως αναφέρθηκε στο **κεφάλαιο 1.1.1.1.2**, μόνο ορισμένα από τα Dtr γονίδια ενός συζευκτικού συστήματος είναι απολύτως απαραίτητα για τις ενδοειδικές βακτηριακές συζεύξεις, ενώ τα υπόλοιπα λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία των διαειδικών συζεύξεων. Λόγω της μεγάλης έλλειψης των Dtr γονιδίων στο χρωμόσωμα του NCIMB 11163 είναι λογικό να υποθέσουμε ότι αν όντως είναι λειτουργικό το συζευκτικό σύστημα, είναι πιο πιθανό να μπορούν να πραγματοποιηθούν ενδοειδικές συζεύξεις παρά διαειδικές. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε νέα σειρά πειραμάτων χρησιμοποιώντας ως δέκτη το CP4, με ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη. Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά, καθώς δεν επιτεύχθηκε η απομόνωση αποικιών του CP4 με ανθεκτικότητα στην χλωραμφαινικόλη.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι από πειράματα των Hamilton *et al.* το *tra/trb* σύστημα του *A. tumefaciens* μπορεί επιτυχημένα να παρακινήσει ένα πλασμίδιο με το *oriT* και το Dtr σύστημα των IncP πλασμιδίων (RP4), αλλά όχι ένα πλασμίδιο που ανήκει στην IncQ ομάδα (πείραμα με RSF1010), λόγω αδυναμίας σύνδεσης του Dtr συστήματος του RSF1010 με το Mpf σύστημα του *A. tumefaciens* από την coupling protein (CP) (Hamilton *et al.*, 2000). Αυτό

έρχεται σε αντίθεση με την ικανότητα παρακίνησης του RSF1010 από το VirB/VirD4 σύστημα (Li et al., 1998). Οι Rudy Antoine και Camille Locht έδειξαν το 1992 ότι το πλασμίδιο pBBR1 (σ' αυτό βασίζεται ο φορέας pBBR1MCS) δεν ανήκει στις ομάδες IncP, IncQ και IncW, ωστόσο, βρήκαν υψηλή ομολογία της καρβοξυ-τελικής περιοχής της μίας Mob πρωτεΐνης με την MobA του πλασμιδίου RSF1010 (Antoine and Locht, 1992). Υπό αυτά τα δεδομένα, η παρακίνηση του pBBR1MCS από το NCIMB 11163 μπορεί να μην είναι δυνατή λόγω αδυναμίας γεφύρωσης του Dtr από το Mpf σύστημα από την CP και όχι λόγω δυσλειτουργίας του συζευκτικού συστήματος

Λόγω αδυναμίας παρακίνησης του pBBR1MCS από το NCIMB 11163 προς οποιοδήποτε δέκτη, έπρεπε να ελεγχθεί αν το πλασμίδιο μπορούσε γενικότερα να παρακινηθεί από το εσωτερικό του NCIMB 1163 υπό την επίδραση οποιουδήποτε συζευκτικού συστήματος. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε το πείραμα της επιβοηθούμενης σύζευξης. Σκοπός του πειράματος ήταν η είσοδος του συζευκτικού πλασμιδίου pRK2013 από το DH5a στο NCIMB 11163 (pBBR1MCS) ώστε να παρακινήσει το pBBR1MCS στο CP4 *rif^r*. Το pRK2013 είναι ένας φορέας με ικανότητα αυτόνομης σύζευξης που ανήκει στην ομάδα ασυμβατότητας IncP (Figurski and Helinski 1979). Έχει αποδειχθεί στο παρελθόν ότι το *Z. mobilis* μπορεί να λειτουργήσει τόσο ως δέκτης, όσο και ως δότης για αρκετά IncPa πλασμίδια (Skotnicki et al., 1980).

Από την τριγωνική σύζευξη προέκυψαν αποικίες του CP4 ανθεκτικές στην καναμυκίνη, γεγονός που επιδεικνύει την επιτυχή μεταφορά και αντιγραφή του pRK2013 στο εσωτερικό στελέχους, αλλά δεν βρέθηκαν αντίστοιχα ανθεκτικές αποικίες του NCIMB 11163. Παράλληλα, δεν φαίνεται να πραγματοποιήθηκε παρακίνηση του pBBR1MCS στο CP4. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην πολύ μεγάλη αστάθεια του pRK2013 στο εσωτερικό του NCIMB 11163, είτε στην ασυμβατότητα των δύο πλασμιδίων ώστε να μην μπορούν να αντιγραφούν ταυτόχρονα στο εσωτερικό του κυττάρου (μάλλον απίθανο από τη στιγμή που το pBBR1MCS δεν ανήκει στην ομάδα IncP), ή τέλος στην παρεμπόδιση της συζευκτικής ικανότητας του pRK2013 λόγω κάποιου μηχανισμού στο εσωτερικού του στελέχους. Ωστόσο, αδυναμία παρακίνησης πλασμιδίων από βοηθητικά-συζευκτικά πλασμίδια της ομάδας IncP έχει παρατηρηθεί και παλαιότερα σε άλλα στελέχη *Z. mobilis* (Brestic-Goachet et al., 1987)

Λόγω αδυναμίας παρακίνησης του pBBR1MCS αναζητήθηκε άλλος παρακινούμενος φορέας, που θα μπορούσε να έχει μεγαλύτερη συμβατότητα με το συζευκτικό σύστημα του χρωμοσώματος. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pJC1 (διπλωματική Ιάσωνα Χαραμή), που βασίζεται στο ενδογενές πλασμίδιο του NCIMB 11163, pZA1003. Αν και δεν πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον έλεγχο της ικανότητας παρακίνησης του φορέα, έχει αποδειχθεί ότι οι *mob* περιοχές του pZA1003 μπορούν να παρακινηθούν. Το πείραμα της σύζευξης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως δότη το NCIMB 11163(pJC1) και ως δέκτη το CP4 *rif^r*. Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά, καθώς δεν ανακτήθηκαν αποικίες του CP4 ανθεκτικές στην χλωραμφαινικόλη. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει είτε την αδυναμία παρακίνησης των συγκεκριμένων επιλεγμένων φορέων λόγω ασυμβατότητας με τα γονίδια του χρωμοσώματος, είτε την πλήρη απουσία της ικανότητας παρακίνησης από το χρωμόσωμα

Τελικά, τα αποτελέσματα των πειραμάτων σύζευξης δείχνουν ότι πιθανότατα τα γονίδια του χρωμοσώματος δεν είναι ικανά να παρακινήσουν τους συγκεκριμένους χρησιμοποιούμενους φορείς. Δεδομένου ότι τα γονίδια που είναι απαραίτητα για την συζευκτική παρακίνηση των

φορέων υπάρχουν στο χρωμόσωμα, με εξαίρεση το *trbH* που όμως μπορεί και να μην είναι κρίσιμης σημασίας, μπορούμε να υποθέσουμε ότι δεν είναι δυνατή η γεφύρωση του Mpf συστήματος του NCIMB 11163 με το Dtr των φορέων pBBR1MCS, pBBR1MCSK και pJC1.

4.4 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής αποτελούν ένα πρώτο βήμα για τη μελέτη των μοναδικών ιδιοτήτων του χρωμοσώματος του στελέχους *Z. mobilis* NCIMB 11163. Η βιοπληροφορική ανάλυση των συζευκτικών γονιδίων υποδεικνύει ότι υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να μπορεί το χρωμόσωμα να παρακινήσει κάποιον άλλο φορέα, απ'το να παρακινηθεί ή να συζευχθεί το ίδιο, λόγω της αξιοσημείωτης απουσίας Dtr γονιδίων. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί πιθανότητα επάρκειας των Dtr γονιδίων για την συζευκτική μεταφορά ή ύπαρξης άλλων μη χαρακτηρισμένων γονιδίων που πραγματοποιούν την ίδια διαδικασία (καθώς υπάρχουν πολλά γονίδια υποθετικών πρωτεϊνών στο χρωμόσωμα).

Ακόμα, η απουσία του *trbH* γονιδίου θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για την αδυναμία συγκρότησης του συζευκτικού τριγίδιου, και συνεπώς για την αδυναμία παρακίνησης των φορέων.

Επιπλέον, η αδυναμία μεταφοράς των χρησιμοποιούμενων φορέων μπορεί να οφείλεται στην απουσία κατάλληλων μεταγραφικών παραγόντων. Πράγματι, το σύστημα του *A. tumefaciens* που είναι υπεύθυνο για την βακτηριακή σύζευξη, ενεργοποιείται μόνο όταν οι κατάλληλοι μεταγραφικοί παράγοντες (προϊόντα των γονιδίων *traR* και *traI*) προσδεθούν στον υποκινητή των *tra/trb* οπερονίων (βλ. κεφάλαιο 1.1.1.1.2.2). Λόγω της αξιοσημείωτης ομοιότητας του συστήματος του NCIMB 11163 με το *A. tumefaciens*, και της απουσίας τέτοιων μεταγραφικών παραγόντων στο χρωμόσωμα του πρώτου, μπορούμε να υποθέσουμε ότι συμβαίνει έλλειψη μεταγραφικής ενεργοποίησης του συζευκτικού οπερονίου.

Τέλος, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 1.1.2.3, η μεταφορά των γονιδιωματικών νησίδων και η ενεργοποίηση των συζευκτικών τους γονιδίων, επάγεται κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, που μπορεί να σχετίζονται με στρεσογόνους ή άλλους άγνωστους παράγοντες. Επομένως, η ενεργοποίηση του συζευκτικού οπερονίου μπορεί να μην πραγματοποιείται υπό την έλλειψη των κατάλληλων επαγωγικών συνθηκών.

Από τα παραπάνω, φαίνεται να υπάρχει πλήθος δοκιμασιών και πειραμάτων που μπορούν να πραγματοποιηθούν μελλοντικά, για την καλύτερη κατανόηση του τρόπου λειτουργίας του συζευκτικού συστήματος του χρωμοσώματος. Αυτά είναι:

- εύρεση του *oriT*: η μελέτη για την ύπαρξη του *oriT* μπορεί να πραγματοποιηθεί απομονώνοντας με PCR την κατάλληλη περιοχή, κλωνοποιώντας την σε φορέα και ελέγχοντας την ικανότητα παρακίνησης του φορέα από κάποιο συζευκτικό σύστημα
- προσδιορισμός λειτουργικότητας του *trb* οπερονίου: με απομόνωση της περιοχής των *trb* γονιδίων, ενσωμάτωσή τους σε παρακινούμενο φορέα και έλεγχος της ικανότητας σύζευξης. Αν δεν πραγματοποιείται η σύζευξη, θα μπορούσε να εισαχθεί το *trbH* γονίδιο, αφού απομονωθεί από το *A. tumefaciens* και να ελεγχθεί εκ νέου η ικανότητα

σύζευξης. Η ίδια περιοχή θα μπορούσε επίσης να εισαχθεί σ'ένα τροποποιημένο Ti πλασμίδιο, που εμφανίζει έλλειψη των ενδογενών trb γονιδίων.

- Μελέτη της ικανότητας παρακίνησης άλλων φορέων: με χρήση παρακινούμενων φορέων που μεταφέρονται επιτυχώς από το σύστημα του *A. tumefaciens*
- Χρήση δεικτών του χρωμοσώματος (πχ μπλεομυκίνη) ή εισαγωγή νέων με τεχνικές ομολογου γενετικού ανασυνδυασμού ή μεταλλαξογένεσης με μεταθετά στοιχεία: για την οπτικοποίηση φαινομένων οριζόντιας μεταφοράς της γονιδιωματικής νησίδας ή τμήματος του χρωμοσώματος, είναι αναγκαία η εισαγωγή κάποιου γενετικού δείκτη σε συγκεκριμένη θέση στο χρωμόσωμα, όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο *oriT*.
- Εισαγωγή Dtr γονιδίων σε περίπτωση αδυναμίας αυτόνομης σύζευξης του χρωμοσώματος
- Μελέτη της ικανότητας μεταφοράς της ανθεκτικότητας στο αρσενικό σε άλλους οργανισμούς. Ενδιαφέρον θα ήταν να μελετήσουμε αν ο δείκτης ανθεκτικότητας στο αρσενικό μεταφέρεται σε άλλα στελέχη και αν ναι, να δούμε αν ο μηχανισμός μεταφοράς είναι συζευκτικός

5 Βιβλιογραφία

- Afendra, A. S., and C. Drinas. 'Expression and Stability of a Recombinant Plasmid in *Zymomonas mobilis* and *Escherichia coli*', *Journal of General Microbiology*, 133 (1987), 127–34.
- Alt-Mörbe, J., J. L., Stryker, C. Fuqua, P. L. Li, S. K. Farrand, and S. C. Winans. 'The Conjugal Transfer System of *Agrobacterium Tumefaciens* Octopine-Type Ti Plasmids Is Closely Related to the Transfer System of an IncP Plasmid and Distantly Related to Ti Plasmid Vir Genes', *Journal of Bacteriology*, 178 (1996), 4248–57
- Alvarez-Martinez, C. E., and P. J. Christie. 'Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73 (2009), 775–808
- Bates, S., A. M. Cashmore, and B. M. Wilkins. 'IncP Plasmids Are Unusually Effective in Mediating Conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces Cerevisiae*: Involvement of the Tra2 Mating System', *Journal of Bacteriology*, 180 (1998), 6538–43
- Bellanger, X., S. Payot, N. Leblond-Bourget, and G. Guédon. 'Conjugative and Mobilizable Genomic Islands in Bacteria: Evolution and Diversity', *FEMS Microbiology Reviews*, 38 (2014), 720–60
- Brestic-Goachet, N., P. Gunasekaran, B. Cami, and J. Baratti. "Transfer and expression of broad host range plasmids in *Zymomonas mobilis*." *Biotechnology Letters* 9(1) (1987), 13-18.
- Buchholz, S. E., and D. E. Eveleigh. 'Transfer of Plasmids to an Antibiotic-Sensitive Mutant of *Zymomonas Mobilis*', *Applied and Environmental Microbiology*, 52 (1986), 366–70.
- Carey, V. C., S. K. Walia, and L. O. Ingram. 'Expression of a Lactose Transposon (Tn951) in *Zymomonas Mobilis*', *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (1983), 1163–68.
- Cato, A., and W.R. Guild. 'Transformation and DNA Size', *Journal of Molecular Biology*, 37 (1968), 157–78.
- Chen, L., Y. Chen, D. W. Wood, and E. W. Nester. 'A New Type IV Secretion System Promotes Conjugal Transfer in *Agrobacterium Tumefaciens*', *Journal of Bacteriology*, 184 (2002), 4838–45.
- Chen, X., K. Schreiber, J. Appel, A. Makowka, B. Fährnich, M. Roettger, M. R. Hajirezaei, F. D. Sönnichsen, P. Schönheit, W. F. Martin, and K. Gutekunst. 'The Entner–Doudoroff Pathway Is an Overlooked Glycolytic Route in Cyanobacteria and Plants'. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (2016), 5441–46.
- Christie, P. J., and E. Cascales. 'Structural and Dynamic Properties of Bacterial Type IV Secretion Systems (Review).', *Molecular Membrane Biology*, 22 (2005), 51–61.

Conway, T, M. O. Byun, and L. O. Ingram. 'Expression Vector for *Zymomonas Mobilis*.', *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (1987), 235–41.

Conway, T. 'The Entner-Doudoroff Pathway: History, Physiology and Molecular Biology.', *FEMS Microbiology Reviews*, 1992, 1–27.

Cook, D. M., P. L. Li, F. Ruchaud, S. Padden, and S. K. Farrand. 'Ti Plasmid Conjugation Is Independent of Vir: Reconstitution of the Tra Functions from pTiC58 as a Binary System', *Journal of Bacteriology*, 179 (1997), 1291–97.

Darmon, E., and D. R. F. Leach. 'Bacterial Genome Instability', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78 (2014), 1–39.

De Ley, J., and J. Swings, 'Phenotypic Description, Numerical Analysis, and Proposal for an Improved Taxonomy and Nomenclature of the Genus *Zymomonas* Kluyver and van Niel 1936', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26 (1976), 146–57.

Desiniotis, A., V. N. Kouvelis, K. Davenport, D. Bruce, C. Detter, R. Tapia, C. Han, L. A. Goodwin, T. Woyke, N. C. Kyrpides, M. A. Typas and K. M. Pappas, 'Complete Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas*: *Mobilis* Subsp. *Mobilis* Centrotype ATCC 29191', *Journal of Bacteriology*, 194 (2012) 5966–67.

Farrand, S. K., I. Hwang, and D. M. Cook. 'The Tra Region of the Nopaline-Type Ti Plasmid Is a Chimera with Elements Related to the Transfer Systems of RSF1010, RP4, and F', *Journal of Bacteriology*, 178 (1996), 4233–47.

Fernandez, D., G. M. Spudich, X. R. Zhou, and P. J. Christie. 'The *Agrobacterium Tumefaciens* VirB7 Lipoprotein Is Required for Stabilization of VirB Proteins during Assembly of the T-Complex Transport Apparatus', *Journal of Bacteriology*, 178 (1996), 3168–76.

Figurski, D. H., and D. R. Helinski. 'Replication of an Origin-Containing Derivative of Plasmid RK2 Dependent on a Plasmid Function Provided *in trans*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76 (1979), 1648–52.

Firth, N., K. Ippen-Ihler, and R. Skurray. 'Structure and Function of the F Factor and Mechanism of Conjugation', *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, 1996, 2377–2401.

Flamholz, A., E. Noor, A. Bar-Even, W. Liebermeister, and R. Milo. 'Glycolytic Strategy as a Tradeoff between Energy Yield and Protein Cost.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (2013), 10039–44.

Galani, I., C. Drainas, and M. A. Typas. 'Growth Requirements and the Establishment of a Chemically Defined Minimal Medium in *Zymomonas Mobilis*', *Biotechnology Letters*, 7 (1985), 673–78.

Greub, G., F. Collyn, L. Guy, and C.-A. Roten. ‘A Genomic Island Present along the Bacterial Chromosome of the Parachlamydiaceae UWE25 , an Obligate Amoebal Endosymbiont , System’, 12 (2004), 1–12.

Haase, J., R. Lurz, A. M. Grahn, D. H. Bamford, and E. Lanka. ‘Bacterial Conjugation Mediated by Plasmid RP4: RSF1010 Mobilization, Donor-Specific Phage Propagation, and Pilus Production Require the Same Tra2 Core Components of a Proposed DNA Transport Complex’, *Journal of Bacteriology*, 177 (1995), 4779–91.

Hamilton, C. M., H. Lee, P. L. Li, D. M. Cook, K. R. Piper, S. B. Von Bodman, E. Lanka, W. Ream and S. K. Farrand. ‘TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti Plasmids Confer Relaxosome Specificity to the Conjugal Transfer System of pTiC58’, *Journal of Bacteriology*, 182 (2000), 1541–48.

Harris, R. L., V. Hombs, and P. M. Silverman. ‘Evidence That F-Plasmid Proteins TraV, TraK and TraB Assemble into an Envelope-Spanning Structure in Escherichia Coli’, *Molecular Microbiology*, 42 (2001), 757–66.

He, M., B. Wu, H. Qin, Z. Ruan, F. Tan, J. L. Wang, Z. X. Shui, L. C. Dai, Q. L. Zhu, K. Pan, X. Y. Tang, W. G. Wang, and Q. C. Hu. ‘Zymomonas Mobilis: A Novel Platform for Future Biorefineries’, *Biotechnology for Biofuels*, 7 (2014), 101.

Jeanson S., J. Floury, V. Gagnaire, S. Lortal and A. Thierry. Bacterial Colonies in Solid Media and Foods: A Review on Their Growth and Interactions with the Micro-Environment. *Frontiers in Microbiology*, 6(2015), 1284.

Joerger, R. D., I. B. Hanning, and S. C. Ricke. ‘Presence of Arsenic Resistance in Salmonella Enterica Serovar Kentucky and Other Serovars Isolated from Poultry’, *Avian Diseases*, 54 (2010), 1178–82.

Johnston, C., B. Martin, G. Fichant, P. Polard, and J.-P. Claverys. ‘Bacterial Transformation: Distribution, Shared Mechanisms and Divergent Control.’, *Nature Reviews Microbiology*, 12 (2014), 181–96.

Juhas, M., J. R. van der Meer, M. Gaillard, R. M. Harding, D. W. Hood, and D. W. Crook. ‘Genomic Islands: Tools of Bacterial Horizontal Gene Transfer and Evolution’, *FEMS Microbiology Reviews*, 33 (2009), 376–93.

Kalnenieks, U. ‘Physiology of Zymomonas Mobilis: Some Unanswered Questions’, *Advances in Microbial Physiology*, 51 (2006), 73-117.

Kalnenieks, U., A. Pentjuss, R. Rutkis, E. Stalidzans, and D. A. Fell. ‘Modeling of Zymomonas Mobilis Central Metabolism for Novel Metabolic Engineering Strategies’, *Frontiers in Microbiology*, 5 (2014), 1–7.

Kerstens, K., and J. De Ley. The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Journal of Microbiological Serology*. 34 (1968), 393-408.

Khachatourians, G. G., T. L. Haffie, and P. W. Louie. 'Isolation of Noninhibitory Strains of *Zymomonas Mobilis*', 49 (1985), 1007-9.

Kim, J. H., D. E. Block, and D. A. Mills. 'Simultaneous Consumption of Pentose and Hexose Sugars: An Optimal Microbial Phenotype for Efficient Fermentation of Lignocellulosic Biomass', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88 (2010), 1077-85.

Kouvelis V. N., H. Teshima, D. Bruce, C. Detter, R. Tapia, C. Han, V-O. Tampakopoulou, T. Goodwin, T. Woyke, N. Kyrpides, M. A. Typas and K. M. Pappas. Finished genome of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* strain CP4, an applied ethanol producer. *Journal of Bacteriology*, 2(1), (2014), e00845-13.

Kouvelis, V. N., E. Saunders, T. S. Brettin, D. Bruce, C. Detter, C. Han, M. A. Typas and K. M. Pappas. 'Complete Genome Sequence of the Ethanol Producer *Zymomonas Mobilis* NCIMB 11163', *Journal of Bacteriology*, 191 (2009), 7140-41.

Kouvelis, V. N., K. W. Davenport, T. S. Brettin, D. Bruce, C. Detter, C. S. Han, M. Nolan, R. Tapia, A. Damoulaki, N. C. Kyrpides, M. A. Typas and K. M. Pappas. 'Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas Mobilis* Subsp. *Pomaceae* Lectotype Strain ATCC 29192', *Journal of Bacteriology*, 2011, 5049-50.

Kremer, T., B. LaSarre, A. Posto and J. McKinlay. N₂ gas is an effective fertilizer for bioethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 12 (2015), 2222-2226.

Lawley, T. D., W. A. Klimke, M. J. Gubbins, and L. S. Frost. 'F Factor Conjugation Is a True Type IV Secretion System', *FEMS Microbiology Letters*, 224 (2003), 1-15.

Lederberg, J. 'The Transformation of Genetics by DNA: An Anniversary Celebration of Avery, MacLeod and McCarty (1944)', *Genetics*, 136 (1994), 423-26.

Li, P. L., D. M. Everhart, and S. K. Farrand. 'Genetic and Sequence Analysis of the pTiC58 Trb Locus, Encoding a Mating-Pair Formation System Related to Members of the Type IV Secretion Family', *Journal of Bacteriology*, 180 (1998), 6164-72.

Li, P. L., I. Hwang, H. Miyagi, H. True, and S. K. Farrand. 'Essential Components of the Ti Plasmid Trb System, a Type IV Macromolecular Transporter', *Journal of Bacteriology*, 181 (1999), 5033-41.

Liang, C. C., and W. C. Lee. 'Characteristics and Transformation of *Zymomonas mobilis* with Plasmid pKT230 by Electroporation', *Bioprocess Engineering*, 19 (1998), 81-85.

Małgorzata, A. and G. Jagura-Burdzy. 'Spread and Survival of Promiscuous IncP-1 Plasmids', *Acta Biochimica Polonica*, 50 (2003), 425–53.

Osorio, C. R., J. Marrero, R., A. F. Wozniak, M. L. Lemos, V. Burrus, and M. K. Waldor. 'Genomic and Functional Analysis of ICEPdaSpa1, a Fish-Pathogen-Derived SXT-Related Integrating Conjugative Element That Can Mobilize a Virulence Plasmid', *Journal of Bacteriology*, 190 (2008), 3353–61.

Panesar, P. S., S. S. Marwaha, and J. F. Kennedy. 'Zymomonas Mobilis: An Alternative Ethanol Producer', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81 (2006), 623–35.

Pappas, K. M., I. Galani, and M. A. Typas. 'Transposon Mutagenesis and Strain Construction in Zymomonas Mobilis.', *Journal of Applied Microbiology*, 82 (1997), 379–88.

Pappas, K. M., V. N. Kouvelis, E. Saunders, T. S. Brettin, D. Bruce, C. Detter, M. Balakireva, C. S. Han, G. Savvakis, N. C. Kyrpides, and M. A. Typas. 'Genome Sequence of the Ethanol-Producing Zymomonas Mobilis Subsp. Mobilis Lectotype Strain ATCC 10988', *Journal of Bacteriology*, 193 (2011), 5051–52.

Puymège, A., S. Bertin, S. Chuzeville, G. Guédon, and S. Payot. 'Conjugative Transfer and Cis-Mobilization of a Genomic Island by an Integrative and Conjugative Element of Streptococcus Agalactiae', *Journal of Bacteriology*, 195 (2013), 1142–51.

Rawlings, D. E., and E. Tietze. 'Comparative Biology of IncQ and IncQ-like Plasmids', *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 65 (2001), 481–496.

Rogers, P. L., Y. J. Jeon, K. J. Lee, and H. G. Lawford. 'Zymomonas Mobilis for Fuel Ethanol and Higher Value Products', *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108 (2007), 263–88.

Rudy, A., and C. Locht. 'Isolation and Molecular Characterization of a Novel Broad-host-range Plasmid from Bordetella Bronchiseptica with Sequence Similarities to Plasmids from Gram-positive Organisms', *Molecular Microbiology*, 6 (1992), 1785–99

Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, A. M. Stevens, and L. Y. Li. 'Conjugative Transposons: An Unusual and Diverse Set of Integrated Gene Transfer Elements.', *Microbiological Reviews*, 59 (1995), 579–90.

Schröder, G., and E. Lanka. 'The Mating Pair Formation System of Conjugative Plasmids - A Versatile Secretion Machinery for Transfer of Proteins and DNA', *Plasmid*, 54 (2005), 1-25.

Seo, J. S., H. Chong, H. S. Park, K. O. Yoon, C. Jung, J. J. Kim, J. H. Hong, H. Kim, J. H. Kim, J. I. Kil, C. J. Park, H. M. Oh, J. S. Lee, S. J. Jin, H. W. Um, H. J. Lee, S. J. Oh, J. Y. Kim, H. L. Kang, S. Y. Lee, K. J. Lee, H. S. Kang. 'The Genome Sequence of the Ethanologenic Bacterium Zymomonas Mobilis ZM4', *Nature Biotechnology*, 23 (2005), 63–68.

- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 'A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria', *Bio/Technology*, 1 (1983), 784–91.
- Skotnicki, M. L., D. E. Tribe, and P. L. Rogers. 'R-Plasmid Transfer in *Zymomonas Mobilis*', 40 (1980), 7–12.
- Smillie, C., M. P. Garcilla, M. V. Francia, E. P. Rocha, and F. De Cruz. 'Mobility of Plasmids', 74 (2010), 434–52.
- So, L. Y., W.-Y. Chen, D. C. Lacap-Bugler, M. Seemann, and R. M. Watt. 'pZMO7-Derived Shuttle Vectors for Heterologous Protein Expression and Proteomic Applications in the Ethanol-Producing Bacterium *Zymomonas Mobilis*.', *BMC Microbiology*, 14 (2014), 68.
- Sprenger, G. A. 'Approaches to Broaden the Substrate and Product Range of the Ethanologenic Bacterium *Zymomonas Mobilis* by Genetic Engineering', *Journal of Biotechnology*, 27 (1993), 225–37.
- Su, P., and A. E. Goodman. 'High Frequency Transformation of *Zymomonas Mobilis* by Plasmid DNA', *Journal of Biotechnology*, 6 (1987), 247–58.
- Swings, J., and J. DeLey. 'The Biology of *Zymomonas*', *Bacteriological Reviews*, 41 (1977), 1–46.
- Thomas, C. M. 'Plasmid Incompatibility', *Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference*, Springer New York (2014).
- Tribble, G. D., G. J. Lamont, A. Progulsk-Fox, and R. J. Lamont. 'Conjugal Transfer of Chromosomal DNA Contributes to Genetic Variation in the Oral Pathogen *Porphyromonas Gingivalis*', *Journal of Bacteriology*, 189 (2007), 6382–88.
- Typas, M. A., and I. Galani. 'Chemical and UV Mutagenesis in *Zymomonas Mobilis*', *Genetica*, 87 (1992), 37–45.
- Waldor, M. K. 'Mobilizable Genomic Islands: Going Mobile with *oriT* Mimicry', *Molecular Microbiology*, 78 (2010), 537–40.
- Walia, S. K., V. C. Carey, B. P. All, 3rd, and L. O. Ingram. 'Self-Transmissible Plasmid in *Zymomonas Mobilis* Carrying Antibiotic Resistance', *Applied and Environmental Microbiology*, 47 (1984), 198–200.
- Weir, P. M. 'The Ecology of *Zymomonas*: A Review', *Folia Microbiologica*, 61 (2016), 385–92.
- Wetzel, M. E., G. J. Olsen, V. Chakravartty, and S. K. Farrand. 'The repABC Plasmids with Quorum-Regulated Transfer Systems in Members of the Rhizobiales Divide into Two

Structurally and Separately Evolving Groups’, *Genome Biology and Evolution*, 7 (2015), 3337–57.

Yanase, H., T. Kotani, and K. Tonomura. ‘Transformation of *Zymomonas mobilis* with Plasmid DNA’, 50 (1986), 3139–44.

Yang, S., Q. Fei, Y. Zhang, L. M. Contreras, S. M. Utturkar, S. D. Brown, and others, ‘*Zymomonas Mobilis* as a Model System for Production of Biofuels and Biochemicals’, *Microbial Biotechnology*, 9 (2016), 699–717.

Zechner, E. L., S. Lang, and J. F. Schildbach. ‘Assembly and Mechanisms of Bacterial Type IV Secretion Machines.’, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367 (2012), 1073–87.

Zhao, N., Y. Bai, X.-Q. Zhao, Z.-Y. Yang, and F.-W. Bai. ‘Draft Genome Sequence of the Flocculating *Zymomonas Mobilis* Strain ZM401 (ATCC 31822)’, *Journal of Bacteriology*, 194 (2012), 7008–9.

6 Παραρτήματα

Παράρτημα Ι

Πίνακας 6-1: Αναλυτικά αποτελέσματα *blastp* των συζευκτικών γονιδίων του χρωμοσώματος

ΘΕΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ - ΟΝΟΜΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΕΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ	ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	ΠΟΣΟΣΤΑ ΕΠΙΚΑΛΥΨΗΣ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ	SEQUENCE ID	ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ
1499858.. 1500463 <u>conjugal</u> <u>transfer protein</u> <u>precursor</u>	GENOMIC ADRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 70.59 LENGTH= 201 aa MW: 21,874.59	TraF Type IV secretory pathway, protease TraF PRK13884 conjugal transfer peptidase TraF Peptidase_S26 Signal peptidase, peptidase S26 TraF_Ti conjugative transfer signal peptidase TraF	1.peptidase S26 [Gluconacetobacter diazotrophicus PA1 5]	Query cover 100% Length: 201 aa 1 to 201 vs 1 to 201	Positive:92% Identities: 89% E: 2e-124 Gap:0%	WP_01255386 7.1	sig_peptide 1499858..14999 20 2 regions 1) name="Peptidas e S24 S26" /note="The S24, S26 LexA/signal peptidase superfamily contains LexA- related and type I signal peptidase families. The S24 LexA protein domains include: the lambda repressor CI/C2 family and related bacterial prophage repressor proteins; LexA 2) name="Peptidas e S26"
			2. S26 family signal peptidase [Acetobacter senegalensis]	Query cover 100% Length: 201 aa 1 to 201 vs 1 to 201	Positive:91% Identities: 88% E: 9e-123 Gap:0%	WP_05898801 9.1	
			3. conjugal transfer protein [Gluconobacter thailandicus]	Query cover 100% Length: 201 aa 1 to 201 vs 1 to 201	Positive:91% Identities: 88% E: 2e-122 Gap:0%	WP_00728393 2.1	
			4. S26 family signal peptidase [Acetobacter aceti]	Query cover 100% Length: 201 aa 1 to 201 vs 1 to 201	Positive:90% Identities: 87% E: 8e-121 Gap:0%	WP_07781355 4.1	
			5. S26 family signal peptidase [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 87% Length: 181 aa 1 to 176 vs 1 to 176	Positive:75% Identities: 64% E: 2e-74 Gap:0%	WP_06565463 8.1	
1500787.. 1501440 <u>Lytic</u> <u>transglycosylase</u> <u>catalytic</u>	GENOMIC ADRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 70.63 LENGTH= 217 aa	LT_GEWL Lytic Transglycosylase (LT) and Goose Egg White Lysozyme (GEWL) domain Interval: 50-152 E: 4.53e-28 SLT Transglycosylase SLT	1. murein transglycosylase [Gluconobacter thailandicus]	Query cover 100% Length: 217 aa 1 to 217 vs 1 to 217 vs	Positive:91% Identities: 87% E: 1e-132 Gap:0%	WP_00728393 4.1	2 regions 1) name="MltE" /note="Soluble lytic murein transglycosylase and related regulatory proteins (some contain LysM/invasin domain [Cell wall/membrane/en
			2. Soluble lytic murein transglycosylase precursor [Komagataeibacter xylinus]	Query cover 100% Length: 217 aa 1 to 217 vs 1 to 217 vs	Positive:90% Identities: 88% E: 2e-132 Gap:0%	CUW48583.1	

	MW: 23,137.64	domain Interval: 37-129 E: 1.69e-24	3.lytic transglycosylase [Komagataeibacter europaeus]	Query cover 100% Length: 217 aa 1 to 217 vs 1 to 217 vs	Positive:89% Identities: 86% E: 2e-129 Gap:0%	WP_01908623 3.1	elope biogenesis]; COG0741
		SLT SLT domain protein [Mobilome: phages, transposons]; Interval: 61-177 E: 1.23e-03	4. lytic transglycosylase [Acetobacter ghanensis]	Query cover 100% Length: 217 aa 1 to 217 vs 1 to 217 vs	Positive:93% Identities: 90% E: 2e-129 Gap:0%	WP_05902456 9.1	2) name="SLT" /note="Transgly cosylase SLT domain; pfam01464"
		MltE Soluble lytic murein transglycosylase and related regulatory proteins Interval: 21-152 E: 3.83e-22	5. lytic transglycosylase [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 97% Length: 250 aa 6 to 217 vs 11 to 250 vs	Positive:65% Identities: 53% E: 9e-74 Gap:11%	WP_03522734 4.1	2 sites 1) type="other" /note="N-acetyl- D-glucosamine binding site [chemical binding]" 2) type="active" /note="catalytic residue [active]"
1501679.. 1503730 <u>hypothetical protein</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 70.67 LENGTH =683 aa MW: 75,223.36	DUF3363 Protein of unknown function (DUF3363 Interval: 301-682 E: 1.98e-163 VirD2 Type IV secretory pathway, VirD2 components (relaxase) Interval: 96-403 E: 7.71e-57	1. hypothetical protein [Acetobacter senegalensis]	Query cover 100% Length: 683 aa 1 to 683 vs 1 to 683	Positive:94% Identities: 91% E: 0.0 Gap:0%	WP_05898802 1.1	2 Regions 1) <u>name</u> ="VirD2" Type IV secretory pathway, VirD2 components (relaxase) [Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport 2) <u>name</u> ="DUF336 3" Protein of unknown function (DUF3363);
			2. hypothetical protein [Komagataeibacter europaeus]	Query cover 100% Length: 683 aa 1 to 683 vs 1 to 683	Positive:93% Identities: 90% E: 0.0 Gap:0%	WP_03573053 8.1	
			3. hypothetical protein [Gluconobacter thailandicus]	Query cover 99% Length: 683 aa 1 to 683 vs 1 to 683	Positive:93% Identities: 91% E: 0.0 Gap:0%	WP_01908623 2.1	
			4. hypothetical protein [Gluconobacter thailandicus]	Query cover 100% Length: 683 aa 1 to 683 vs 1 to 683	Positive:94% Identities: 91% E: 0.0 Gap:0%	WP_06151000 3.1	
			5. MULTISPECIES: hypothetical protein [Agrobacterium]	Query cover 100% Length: 686 aa 1 to 683 vs 1 to 686	Positive:83% Identities: 72% E: 0.0 Gap:3/686	WP_02001151 2.1	
			6. type IV secretion system T-DNA border endonuclease VirD2 [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 4% Length: 424 aa 191 to 221 vs 116 to 146	Positive:67% Identities: 42% E: 1.6 Gap:0%	KJX85262.1	
1505033..	GENOMIC	TrbI Bacterial conjugation	1. conjugal transfer protein TrbI	Query cover 100% Length: 398 aa	Positive:95% Identities:	WP_05902266 8.1	2 regions 1)

1505773 <u>conjugation</u> <u>TrbI family</u> <u>protein"</u>	ADRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 70.83 LENGTH =246 aa MW : 26,208.59	TrbI-like protein; not essential for conjugation VirB10 Type IV secretory pathway, VirB10 components PRK13831 conjugal transfer protein TrbI; Provisional	[Acetobacter ghanensis]	1 to 246 vs 153 to 398	93% E: 3e-162 Gap:0%		name="VirB10 Type IV secretory pathway, VirB10 components[Intr acellular trafficking, secretion, and vesicular transport
			2. conjugal transfer protein TrbI [Gluconobacter albidus]	Query cover 100% Length: 398 aa 1 to 246 vs 153 to 398	Positive:93% Identities: 90% E: 6e-155 Gap:0%	WP_06210623 3.1	
			3. conjugal transfer protein TrbI [Acetobacter pasteurianus]	Query cover 100% Length: 389 aa 1 to 246 vs 145 to 389	Positive:93% Identities: 89% E: 3e-154 Gap:0%	WP_01445749 0.1	
			4. MULTISPECIES: conjugation TrbI- like protein [Agrobacterium tumefaciens complex]	Query cover 95% Length: 403 aa 6 to 239 vs 159 to 396	Positive:68% Identities: 51% E: 2e-77 Gap:1%	WP_00352300 5.1	2) name="TrbI" Bacterial conjugation TrbI-like protein
			5.conjugal transfer protein TraI [Agrobacterium vitis]	Query cover 89% Length: 406 aa 20 to 239 vs 179 to 399	Positive:70% Identities: 52% E: 3e-76 Gap:1%	WP_06071842 1.1	Όσο μικραίνει η ομολογία των πρωτεϊνών εμφανίζεται ως ομόλογη και η traI
1562625.. 1563170 <u>TraF peptidase,</u> <u>serine peptidase</u> <u>MEROPS</u> <u>family S26C</u>	GENOMIC ADRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 73.54 LENGTH =181 aa MW = 19,940.07	TraF Type IV secretory pathway, protease TraF PRK13838 conjugal transfer pilin processing protease TraF; Provisional Peptidase_S26 Signal peptidase, peptidase S26 TraF_Ti conjugative transfer signal peptidase TraF; This protein is found in apparent operons	1. S26 family signal peptidase (plasmid) [Novosphingobium resinovorum]	Query cover 100% Length: 181 aa 1 to 181 vs 1 to 181	Positive:100 % Identities: 100% E: 4e-127 Gap:0%	WP_01574015 5.1	sig_peptide 1562625..15626 96 The S24, S26
			2. peptidase S26 [Thioclava atlantica]	Query cover 100% Length: 181 aa 1 to 181 vs 1 to 181	Positive:96% Identities: 95% E: 2e-120 Gap:0%	WP_03814634 6.1	2 regions 1) name= "Peptidase_S24 S26 LexA/signal peptidase superfamily contains LexA- related and type I signal peptidase families. The S24 LexA protein domains include: the lambda repressor CI/C2 family and related bacterial prophage repressor proteins; LexA 2) name="Peptidas e_S26
			3. S26 family signal peptidase [Sphingobium amiense]	Query cover 100% Length: 181 aa 1 to 181 vs 1 to 181	Positive:97% Identities: 95% E: 4e-120 Gap:0%	WP_06670061 7.1	
			4. S26 family signal peptidase [Agrobacterium genomosp. 1]	Query cover 100% Length: 181 aa 1 to 181 vs 1 to 181	Positive:95% Identities: 92% E: 6e-119 Gap:0%	WP_08080164 1.1	
			5. conjugative transfer signal peptidase TraF [Agrobacterium tumefaciens F2]	Query cover 99% Length: 180 aa 1 to 181 vs 1 to 180	Positive:81% Identities: 72% E: 3e-154 Gap:1/181	EGP54468.1	
1563546.. 1564256	Genomic Address Clockwise Minute or	LT_GEWL Lytic Transglycosylase (LT) and Goose Egg White Lysozyme (GEWL)	1. lytic transglycosylase [Sphingopyxis macrogoltabida]	Query cover 100% Length: 235 aa 1 to 236 vs 1 to 235	Positive:86% Identities: 83% E: 4e-132 Gap:1/236%	WP_05458959 1.1	

<u>Lytic transglycosylase catalytic</u>	Centisome (%) = 73.59 LENGTH=236 aa MW: 24,764.1	domain Interval: 50-152 E: 4.53e-28 SLT Transglycosylase SLT domain Interval: 37-129 E: 1.69e-24 MltE Soluble lytic murein transglycosylase and related regulatory proteins Interval: 21-152 E: 3.83e-22 mltC murein transglycosylase C; Provisional	2. lytic transglycosylase [Martella sp. AD-3]	Query cover 100% Length: 236 aa 1 to 236 vs 1 to 236	Positive:86% Identities: 83% E: 4e-127 Gap:0%	AMM86082.1	
			3. lytic transglycosylase [Ochrobactrum rhizosphaerae]	Query cover 100% Length: 236 aa 1 to 236 vs 1 to 236	Positive:86% Identities: 83% E: 1e-125 Gap:0%	WP_02489915.1	
			4. lytic transglycosylase [Paracoccus halophilus]	Query cover 100% Length: 236 aa 1 to 236 vs 1 to 236	Positive:86% Identities: 83% E: 2e-125 Gap:0%	WP_03674310.1	
			5. lytic transglycosylase [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 97% Length: 250 aa 6 to 236 vs 14 to 250	Positive:69% Identities: 57% E: 1e-77 Gap:5%	WP_03522734.1	
1564570.. 1566642 <u>conserved hypothetical protein</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 73.63 LENGTH=690 aa MW: 76,248.26	pfam11843 Protein of unknown function (DUF3363) Interval: 308-689 E: 3.06e-177 COG3843 Type IV secretory pathway, VirD2 components (relaxase) Interval: 97-409 E: 7.03e-54	1. Type IV secretory pathway, VirD2 components (relaxase) [Gemmobacter megaterium]	Query cover 100% Length: 690 aa 1 to 690 vs 1 to 690	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	WP_07652848.1	2 regions 1) name="VirD2 Type IV secretory pathway, VirD2 components (relaxase) [Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport 2) name="DUF3363" "Protein of unknown function
			2. hypothetical protein [Sphingobium amienze]	Query cover 100% Length: 690 aa 1 to 690 vs 1 to 690	Positive:98% Identities: 98% E: 0.0 Gap:0%	WP_06670061.1	
			3. hypothetical protein [Sphingobium yanoikuyae]	Query cover 100% Length: 690 aa 1 to 690 vs 1 to 690	Positive:97% Identities: 97% E: 0.0 Gap:0%	WP_01033615.1	
			4. Type IV secretory pathway, VirD2 components (relaxase) [Nitratireductor indicus]	Query cover 100% Length: 690 aa 1 to 690 vs 1 to 690	Positive:96% Identities: 96% E: 0.0 Gap:0%	SFQ60534.1	
			5. type VI secretion protein [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 87% Length: 580 aa 1 to 429 vs 1 to 400	Positive:58% Identities: 43% E: 7e-89 Gap:8%	WP_03814633.1	
1570117.. 1572105 <u>conjugal transfer</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%)	TraG_VirD4 The TraG/TraD/VirD4 family are bacterial conjugation proteins involved in type IV secretion	1. conjugal transfer protein TraG (plasmid) [Novosphingobium resinovorum]	Query cover 100% Length: 662 aa 1 to 662 vs 1 to 662	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	AOR79821.1	2 regions 1) name="PRK13876" conjugal transfer coupling protein TraG;
			2. conjugal transfer	Query cover 100%	Positive:98%	WP_07652847	

<u>coupling protein</u> <u>TraG</u>	= 73.90 LENGTH =662 aa MW = 73,439.90	SXT_TraD conjugative coupling factor TraD, SXT/TOL subfamily	protein TraG [Gemmobacter megaterium]	Length: 662 aa 1 to 662 vs 1 to 662	Identities: 98% E: 0.0 Gap:0%	8.1	Provisional 2) <u>name="TraG_Vi</u> <u>rD4</u> The TraG/TraD/VirD4 family are bacterial conjugation proteins involved in type IV secretion. These proteins aid the transfer of DNA from the plasmid into the host bacterial chromosome. They contain an ATP binding domain. VirD4 is involved in DNA transfer...; 3 sites 1) Walker A motif 2) ATP binding site [chemical binding] 3) Walker B motif
		PRK13876 conjugal transfer coupling protein TraG	3. conjugal transfer coupling protein TraG [Thioclava atlantica]	Query cover 100% Length: 662 aa 1 to 662 vs 1 to 662	Positive:98% Identities: 98% E: 0.0 Gap:0%	WP_03814633.0.1	
		VirD4 Type IV secretory pathway, VirD4 component, TraG/TraD family ATPase	4. conjugal transfer protein TraG [Agrobacterium genomosp. 5]	Query cover 100% Length: 661 aa 1 to 662 vs 1 to 661	Positive:96% Identities: 95% E: 0.0 Gap:1/662	WP_08218444.0.1	
		T4SS-DNA_transf Type IV secretory system Conjugative DNA transfer TraG-Ti Ti-type conjugative transfer system protein TraG;	5conjugal transfer coupling protein TraG [Agrobacterium tumefaciens str. Cherry 2E-2-2]	Query cover 100% Length: 672 aa 1 to 662 vs 1 to 672	Positive:81% Identities: 73% E: 0.0 Gap:2%	EMS96342.1	
1572713.. 1573720 <u>P-type</u> <u>conjugative</u> <u>transfer ATPase</u> <u>TrbB</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 74.02 LENGTH = 335 aa MW : 35,352.55	TrbB_P P-type conjugative transfer ATPase TrbB	1. MULTISPECIES: P-type conjugative transfer ATPase TrbB [Alphaproteobacteria]	Query cover 100% Length: 335 aa 1 to 335 vs 1 to 335	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	SCW83300.1	1 region name="P-loop_NTPase" P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases 3 sites 1) Walker A motif 2) ATP binding site [chemical binding] 3) Walker B motif PFAM: type II secretion system protein
		CpaF Pilus assembly protein, ATPase of CpaF family	2. conjugal transfer protein TrbB [Haematobacter missouriensis]	Query cover 98% Length: 330 aa 6 to 335 vs 1 to 330	Positive:100% Identities: 100% E: 0.0 Gap:0%	WP_03574632.8.1	
		T2SSE Type II/IV secretion system protein	3P-type conjugative transfer ATPase TrbB (plasmid) [Novosphingobium resinovorum]	Query cover 98% Length: 330 aa 6 to 335 vs 1 to 330	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	AOR80162.1	
		PRK13833 conjugal transfer protein TrbB VirB11-like_ATPase Type IV secretory pathway component VirB11, and related ATPases	4. type IV secretion system protein VirB11 [Gemmobacter]	Query cover 100% Length: 335 aa 1 to 335 vs 1 to 335	Positive:98% Identities: 98% E: 0.0	WP_02081856.6.1	

		PuIE Type II secretory pathway ATPase GspE/PuIE or T4P pilus assembly pathway ATPase PilB type_II_gspE type II secretion system protein E PRK10436 hypothetical protein ; TrwB_AAD_bind Type IV secretion-system coupling protein DNA-binding AAA ATPases associated with a variety of cellular activities	megaterium]		Gap:0%		
			5. P-type conjugative transfer ATPase TrbB [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 97% Length: 326 aa 6 to 333 vs 1 to 324	Positive:92% Identities: 87% E: 0.0 Gap:1%	WP 03522459 8.1	
1573717.. 1574049 <u>conjugal transfer protein</u> <u>Trbc</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 74.07 LENGTH=110 aa MW: 11,305.42	VirB2 Type IV secretory pathway, VirB2 components (pilins) TrbC TrbC/VIRB2 family PRK13871 conjugal transfer protein TrbC; Provisional	1. MULTISPECIES: conjugal transfer protein TrbC [Alphaproteobacteria]	Query cover 100% Length: 110 aa 1 to 110 vs 1 to 110	Positive:100% Identities: 100% E: 2e-68 Gap:0%	WP 00945053 9.1	sig_peptide 1573717..1573812 1 region name="VirB2 Type IV secretory pathway, VirB2 components (pilins) [Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
			2. conjugal transfer protein TrbC (plasmid) [Novosphingobium resinovorum]	Query cover 100% Length: 110 aa 1 to 110 vs 1 to 110	Positive:100% Identities: 99% E: 4e-68 Gap:0%	AOR79823.1	
			3. conjugal transfer protein TrbC [Pseudochrobactrum sp. B5]	Query cover 100% Length: 110 aa 1 to 110 vs 1 to 110	Positive:99% Identities: 99% E: 8e-68 Gap:0%	WP 07565752 4.1	
			4. type IV secretion system protein VirB2 [Gemmobacter megaterium]	Query cover 100% Length: 110 aa 1 to 110 vs 1 to 110	Positive:100% Identities: 99% E: 1e-67 Gap:0%	SIS63340.1	
			5. conjugal transfer protein TrbC [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 81% Length: 110 aa 1 to 90 vs 1 to 90	Positive:86% Identities: 79% E: 7e-34 Gap:0%	WP 06565463 1.1	
1574049.. 1574330 <u>conjugal</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%)	TrbD Type IV secretory pathway, TrbD component PRK13823 conjugal transfer	1. conjugal transfer protein [Ochrobactrum pseudogrignonense]	Query cover 100% Length: 93 aa 1 to 93 vs 1 to 93	Positive:100% Identities: 99% E: 1e-56 Gap:0%	WP 06432274 0.1	1 region name="VirB3" Type IV secretory pathway, VirB3-like protein
			2. conjugal transfer	Query cover 100%	Positive:100%	WP 01336841	

<u>transfer protein</u> <u>TrbB*</u>	= 74.08 LENGTH =93 aa MW : 9,827.65	protein TrbD; Provisional VirB3 Type IV secretory pathway, VirB3-like protein	protein (trbB) [Ketogulonicigeniu m vulgare]	Length: 93 aa 1 to 93 vs 1 to 93	% Identities: 99% E: 2e-56 Gap:0%	<u>0.1</u>	
			3. MULTISPECIES: conjugal transfer protein [Alphaproteobacteri a]	Query cover 100% Length: 93 aa 1 to 93 vs 1 to 93	Positive:99% Identities: 99% E: 2e-56 Gap:0%	<u>WP 00945053</u> <u>7.1</u>	
			4. type IV secretion system protein VirB3 [Rhizobium sp. NFIX02]	Query cover 100% Length: 93 aa 1 to 93 vs 1 to 93	Positive:99% Identities: 99% E: 4e-56 Gap:0%	<u>SDB69655.1</u>	
			5. conjugal transfer protein [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 100% Length: 93 aa 1 to 93 vs 1 to 93	Positive:93% Identities: 85% E: 5e-52 Gap:0%	<u>WP 03522460</u> <u>1.1</u>	
1574341.. 1576848 <u>conjugal</u> <u>transfer ATPase</u> <u>TrbE</u>	GENOMIC ADRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 74.09 LENGTH =835 aa MW : 91,666.41	CagE_TrbE_VirB CagE, TrbE, VirB family, component of type IV transporter system	1. conjugal transfer protein TrbE [Gemmobacter megaterium]	Query cover 100% Length: 835 aa 1 to 835 vs 1 to 835	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	<u>WP 07652847</u> <u>1.1</u>	4 regions 1) name=PRK1387 3" conjugal transfer ATPase TrbE; Provisional 2) name= CagE_TrbE_Vir B" CagE, TrbE, VirB family, component of type IV transporter system 3) name="P- loop_NTase" P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases 4) name="P- 3 sites 1) Walker A/P- loop 2) Walker B 3) D-loop 4) H-loop
		TraG-D_C TraM recognition site of TraD and TraG	2. conjugal transfer protein TrbE [Haematobacter missouriensis]	Query cover 100% Length: 835 aa 1 to 835 vs 1 to 835	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	<u>WP 03574632</u> <u>4.1</u>	
		ABC_KpsT_Wzt ATP-binding cassette component of polysaccharide transport system	3. conjugal transfer protein TrbE [Thioclava atlantica]	Query cover 100% Length: 835 aa 1 to 835 vs 1 to 835	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	<u>WP 03814884</u> <u>0.1</u>	
		ABC_ThiQ_thiamine _transporter ATP-binding cassette domain of the thiamine transport system	4. conjugal transfer protein TrbE (plasmid) [Novosphingobium resinovorum]	Query cover 100% Length: 835 aa 1 to 835 vs 1 to 835	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	<u>AOR79825.1</u>	
		SXT_TraD conjugative coupling factor TraD, SXT/TOL subfamily PRK13873 conjugal transfer ATPase TrbE VirB4 Type IV secretory pathway, VirB4 component VirB4_CagE	5. conjugal transfer protein TrbE [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 97% Length: 818 aa 1 to 813 vs 1 to 813	Positive:92% Identities: 87% E: 0.0 Gap:0%	<u>WP 03522735</u> <u>9.1</u>	

		type IV secretion/conjugal transfer ATPase, VirB4 family; AAA_10 AAA-like domain AAA ATPases associated with a variety of cellular activities					type IV secretion system VirB4 family
<u>1576845..1577627</u> <u>P-type conjugative transfer protein TrbJ</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 74.21 LENGTH=260 aa MW: 28,058.67	PRK13 conjugal transfer protein TrbJ; Provisional 874 COG5314 Conjugal transfer/entry exclusion protein [Mobilome: prophages, transposons]; TrbJ_Ti P-type conjugative transfer protein TrbJ SH3_and_anchor SH3 domain protein	1. MULTISPECIES: conjugal transfer protein TrbJ [Alphaproteobacteria] { [Nitratireductor indicus C115], [Haematobacter missouriensis], [Gemmobacter megaterium] }	Query cover 100% Length: 260 aa 1 to 260 vs 1 to 260	Positive:100% Identities: 100% E: 0.0 Gap:0%	WP_00945053 5.1	sig_peptide 1576845..1576952 1 region name="PRK13874" conjugal transfer protein TrbJ; Provisional
			2. P-type conjugative transfer protein TrbJ [Sphingobium faniae]	Query cover 100% Length: 260 aa 1 to 260 vs 1 to 260	Positive:100% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	SCW83333.1	
			3. P-type conjugative transfer protein TrbJ [Agrobacterium genomsp. 5 str. CFBP 6626]	Query cover 100% Length: 260 aa 1 to 260 vs 1 to 260	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	CUX21594.1	
			4. conjugal transfer protein TrbJ [Novosphingobium resinovorum]	Query cover 100% Length: 260 aa 1 to 260 vs 1 to 260	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	WP_06970952 0.1	
			5. conjugal transfer protein TrbJ [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 97% Length: 255 aa 11 to 259 vs 9 to 255	Positive:89% Identities: 80% E: 2e-129 Gap:2%	WP_03522460 7.1	
1577648..1577935 <u>hypothetical protein</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 74.25 LENGTH=95 aa	other_trbK conjugative transfer region protein TrbK;	1. MULTISPECIES: conjugal transfer protein TrbK [Rhodobacteraceae] { [Haematobacter missouriensis], [Gemmobacter megaterium] }	Query cover 100% Length: 95 aa 1 to 95 vs 1 to 95	Positive:100% Identities: 99% E: 6e-62 Gap:0%	WP_03574632 1.1	1 region name="other_trbK" conjugative transfer region protein TrbK
			2. hypothetical protein [Sphingobium yanoikuyae]	Query cover 100% Length: 95 aa 1 to 95 vs 1 to 95	Positive:98% Identities: 98% E: 2e-61	WP_01033616 4.1	

	MW: 10,125.57		3. conjugative transfer region protein TrbK [Sphingobium faniae]	Query cover 100% Length: 95 aa 1 to 95 vs 1 to 95	Positive:98% Identities: 98% E: 4e-61 Gap:0%	SCW83342.1	
			4. conserved hypothetical protein [Agrobacterium genomosp. 5 str. CFBP 6626]	Query cover 100% Length: 95 aa 1 to 95 vs 1 to 95	Positive:98% Identities: 98% E: 6e-61 Gap:0%	CUX21587.1	
			5. Entry exclusion protein TrbK [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 97% Length: 95 aa 1 to 93 vs 1 to 93	Positive:77% Identities: 65% E: 0.0 Gap:4%	CDN95842.1	
<u>1577939..</u> <u>1579300</u> <u>P-type conjugative transfer protein TrbL</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 74.26 LENGTH= 453 aa MW: 44,470.11	PRK13874 conjugal transfer protein TrbJ; Provisional COG5314 Conjugal transfer/entry exclusion protein [Mobilome: prophages, transposons]; TrbJ_Ti P-type conjugative transfer protein TrbJ SH3_and_anchor SH3 domain protein	1. conjugal transfer protein TrbL [Haematobacter missouriensis]	Query cover 100% Length: 453 aa 1 to 453 vs 1 to 453	Positive:100% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	WP_03574631.1	type IV secretion VirB6 family 2 regions 1name="PRK13875" conjugal transfer protein TrbL; Provisional" " 2) name="TrbL" TrbL/VirB6 plasmid conjugal transfer protein; cl01503"
			2. conjugal transfer protein TrbL [Ochrobactrum rhizosphaerae]	Query cover 100% Length: 453 aa 1 to 453 vs 1 to 453	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	WP_02489916.1	
			3.P-type conjugative transfer protein TrbL (plasmid) [Novosphingobium resinovorum]	Query cover 100% Length: 453 aa 1 to 453 vs 1 to 453	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	AOR79828.1	
			4. conjugal transfer protein TrbL [Martella sp. AD-3]	Query cover 100% Length: 453 aa 1 to 453 vs 1 to 453	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	WP_06144981.1	
			5. conjugal transfer protein TrbL [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 100% Length: 453 aa 1 to 453 vs 1 to 453	Positive:89% Identities: 80% E: 0.0 Gap:0%	WP_03522461.1	
<u>1579297..</u> <u>1579986</u> <u>conjugal transfer protein TrbF</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 74.33 LENGTH= 229 aa MW: 25,823.11	PRK13872 conjugal transfer protein TrbF; Provisional TrbF Type IV secretory pathway, TrbF components VirB8 VirB8 protein; VirB8 is a bacterial virulence protein	1. conjugal transfer protein TrbF [Rhizobiales bacterium 63-7]	Query cover 100% Length: 229 aa 1 to 229 vs 1 to 229	Positive:99% Identities: 99% E: 2e-165 Gap:0%	OJU70431.1	1 region name="PRK13872" conjugal transfer protein TrbF; Provisional"
			2. conjugal transfer protein TrbF [Martella sp. AD-3]	Query cover 100% Length: 229 aa 1 to 229 vs 1 to 229	Positive:99% Identities: 99% E: 2e-164 Gap:0%	WP_02470690.1	
			3. MULTISPECIES: conjugal transfer protein TrbF [Sphingobium]	Query cover 100% Length: 229 aa 1 to 229 vs 1 to 229	Positive:99% Identities: 99% E: 8e-164 Gap:0%	WP_02081857.1	

			4. MULTISPECIES: conjugal transfer protein TrbF [Alphaproteobacteri a] { [Gemmobacter megaterium], [Agrobacterium genomosp. 5 str. CFBP 6626]}	Query cover 100% Length: 229 aa 1 to 229 vs 1 to 229	Positive:98% Identities: 98% E: 1e-163 Gap:0%	WP_07652846 7.1	
			5. Conjugal transfer protein TrbF [Agrobacterium tumefaciens]]	Query cover 100% Length: 229 aa 1 to 229 vs 1 to 229	Positive:96% Identities: 92% E: 5e-156 Gap:0%	CDN95844.1	
1579983.. 1580996 <u>P-type conjugative transfer protein</u> <u>TrbG</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 74.36 LENGTH=337 aa MW: 36,479.58	TrbG_Ti P-type conjugative transfer protein TrbG CagX Conjugal transfer protein; type IV secretion VirB9 Type IV secretory pathway, VirB9 components PRK13885 conjugal transfer protein TrbG; Provisional VirB9_CagX_TrG VirB9/CagX/TrbG, a component of the type IV secretion system	1. MULTISPECIES: P-type conjugative transfer protein TrbG [Alphaproteobacteri a] { [Haematobacter missouriensis], [Novosphingobium resinovororum]}	Query cover 100% Length: 337 aa 1 to 337 vs 1 to 337	Positive:100 % Identities:100 % E: 0.0 Gap:0%	WP_01574017 0.1	sig_peptide 1579983..15800 90 1 region name="VirB9_C agX_TrG" VirB9/CagX/Trb G, a component of the type IV secretion system; / 1 site VirB7 interaction site
			2. P-type conjugative transfer protein TrbG [Nitratireductor indicus]	Query cover 100% Length: 337 aa 1 to 337 vs 1 to 337	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	WP_00945053 1.1	
			3. P-type conjugative transfer protein TrbG [Gemmobacter megaterium]	Query cover 100% Length: 337 aa 1 to 337 vs 1 to 337	Positive:97% Identities: 96% E: 0.0 Gap:0%	WP_07652846 5.1	
			4. P-type conjugative transfer protein TrbG [Agrobacterium genomosp. 5]	Query cover 100% Length: 337 aa 1 to 337 vs 1 to 337	Positive:97% Identities: 96% E: 0.0 Gap:0%	WP_08218443 3.1	
			5. P-type conjugative transfer protein TrbG [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 93% Length: 318 aa 12 to 227 vs 3 to 318	Positive:87% Identities: 80% E: 0.0 Gap:0%	WP_03522736 9.1	
1580993.. 1582126 <u>conjugation</u> <u>TrbI family</u> <u>protein</u>	GENOMIC ADDRESS Clockwise Minute or Centisome (%) = 74.41 LENGTH=37 7 aa	TrbI Bacterial conjugation TrbI-like protein; not essential for conjugation VirB10 Type IV secretory pathway, VirB10 components PRK13831 conjugal transfer	1. conjugal transfer protein TraI (plasmid) [Novosphingobium resinovororum]	Query cover 100% Length: 377 aa 1 to 377 vs 1 to 377	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	AOR79831.1	2 regions 1) name="VirB10" "Type IV secretory pathway, VirB10 components [Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport];
			2. conjugal transfer protein TraI [Sphingobium yanoikuyae]	Query cover 100% Length: 377 aa 1 to 377 vs 1 to 377	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0 Gap:0%	WP_02954748 6.1	
			3. conjugal transfer protein TraI [Pseudochrobactrum]	Query cover 100% Length: 377 aa 1 to 377 vs	Positive:100 % Identities:	WP_07565753 0.1	

	MW: 40,192.68	protein TrbI; Provisional	sp. B5]	1 to 377	99% E: 0.0 Gap:0%		2) name="TrbI" Bacterial conjugation TrbI-like protein
			4. conjugal transfer protein TraI [Agrobacterium genomosp. 5]	Query cover 100% Length: 377 aa 1 to 377 vs 1 to 377	Positive:98% Identities: 98% E: 0.0 Gap:0%	<u>WP_08218443</u> <u>2.1</u>	
			5. conjugal transfer protein TraI (TrbI family protein) [Agrobacterium tumefaciens]	Query cover 100% Length: 385 aa 1 to 377 vs 1 to 385	Positive:84% Identities: 78% E: 0.0 Gap:2%	<u>WP_03522461</u> <u>8.1</u>	

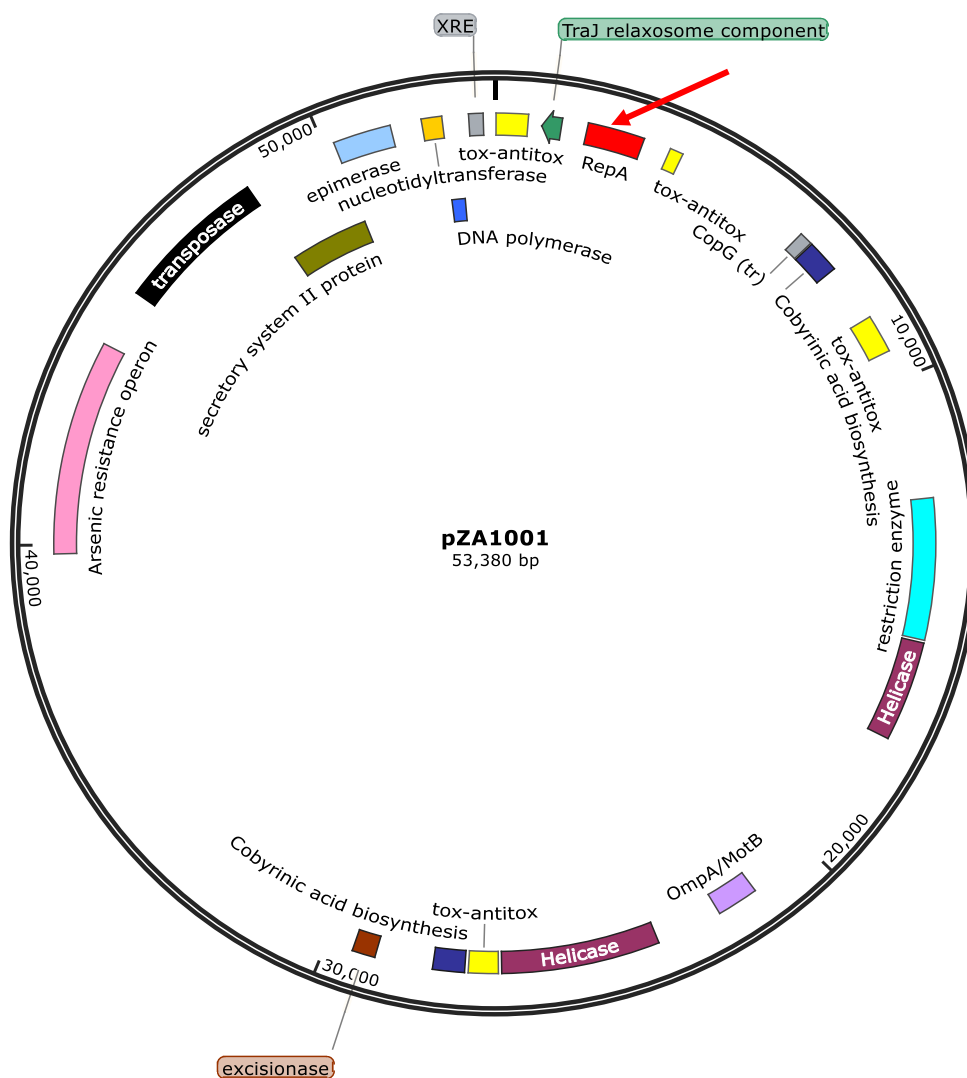
Παράρτημα II

Στο συγκεκριμένο παράρτημα δίνονται πληροφορίες για τα συζευκτικά γονίδια που εδράζονται στα πλασμίδια του στελέχους NCIMB 11163

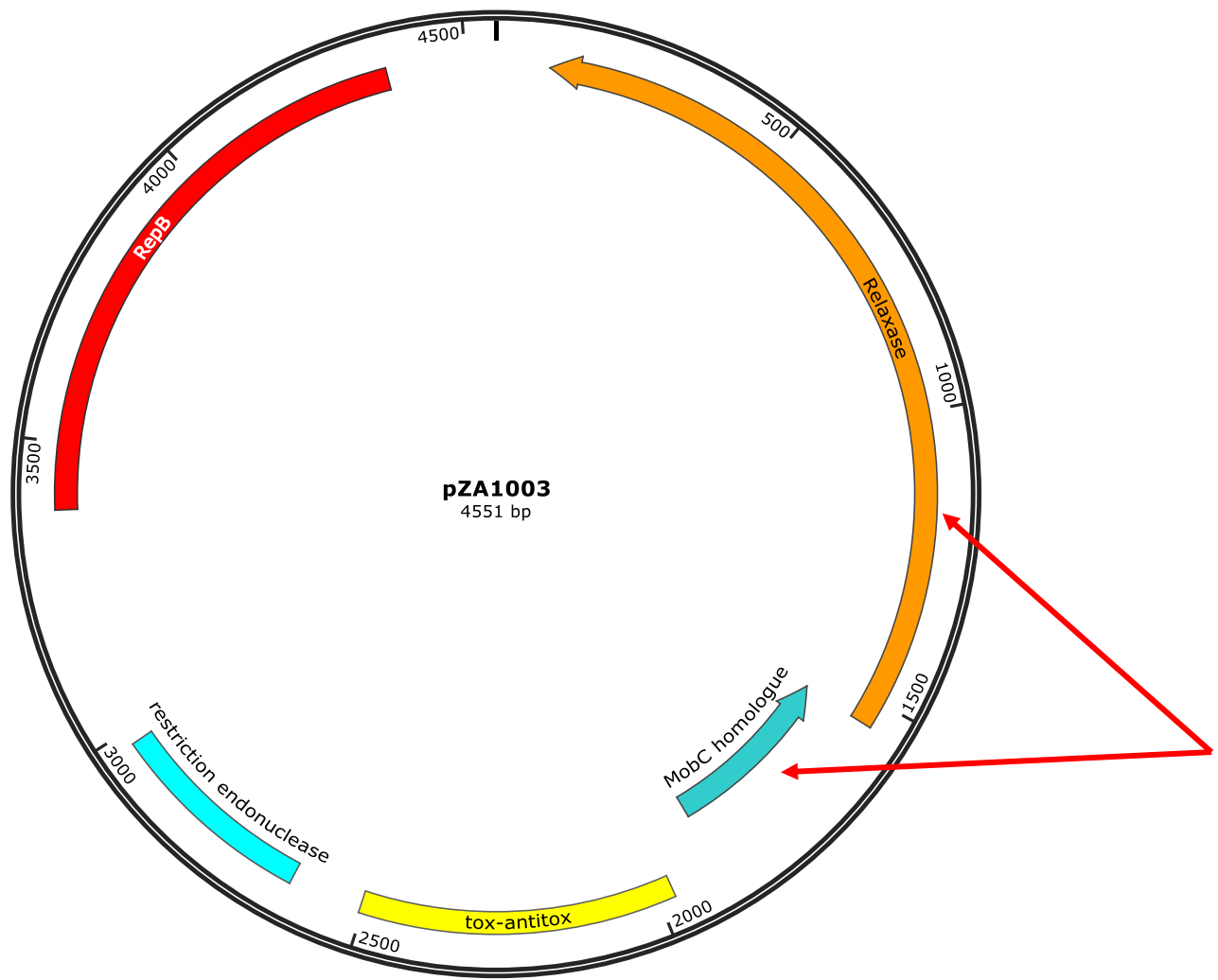
Πίνακας 6-2: Αναλυτικά αποτελέσματα blastp των συζευκτικών γονιδίων των πλασμιδίων

ΘΕΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ - ΟΝΟΜΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΕΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ	ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	ΤΜΗΜΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΠΡΟΣ ΤΜΗΜΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	ΘΕΤΙΚΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ {ΤΑΥΤΟΣΗΜΑ}	SEQUENCE ID	ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ
928..1314 <u>conjugal transfer relaxosome component TraJ</u> <u>Plasmid pZA1001</u>	GENOMIC ADDRESS Counterclockwise Minute or Centisome (%) = 1.74 LENGTH=128 aa MW: 14,591.08	PRK13877 conjugal transfer relaxosome component TraJ; Provisional	1. conjugal transfer relaxosome component TraJ (plasmid) [Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988]	Query cover 100% Length: 150 aa 1 to 128 vs 23 to 150	Positive:96% Identities: 93% E: 2e-67 Gap:0%	AEH63652.1	1 region name="PRK13877" "conjugal transfer relaxosome component TraJ; Provisional"
			2. conjugal transfer protein TraJ [Komagataeibacter hansenii]	Query cover 88% Length: 126 aa 4 to 116 vs 5 to 117	Positive:76% Identities: 59% E: 1e-41 Gap:0%	WP_07562412.8.1	
			3. conjugal transfer protein TraJ [Acetobacter persici]	Query cover 95% Length: 126 aa 2 to 123 vs 3 to 124	Positive:77% Identities: 55% E: 1e-41 Gap:0%	WP_08665463.4.1	
92..1543 <u>Relaxase/mobilization nuclease family protein</u> <u>Plasmid pZA1003</u>	GENOMIC ADDRESS Counterclockwise Minute or Centisome (%) = 2.02 LENGTH=483 aa MW: 55,889.87	Relaxase Relaxase/Mobilization nuclease domain	1. relaxase/mobilization protein [Candidatus Hamiltonella defensa]	Query cover 56% Length: 360 aa 36 to 307 vs 3 to 274	Positive:76% Identities: 56% E: 1e-107 Gap:0%	ACQ67749.1	1 region name="Relaxase" "Relaxase/Mobilization nuclease domain"
			2. MobA protein (plasmid) [Rahnella sp. WMR104]	Query cover 86% Length: 482 aa 46 to 464 vs 1 to 431	Positive:55% Identities: 41% E: 7e-103 Gap:13%	YP_006960810.1	
			3. Relaxase/Mobilization nuclease domain-containing protein [Desulfovibrio ferrireducens]	Query cover 62% Length: 483 aa 1 to 300 vs 1 to 291	Positive:58% Identities: 40% E: 1e-63 Gap:6%	SDL53918.1	
1540..1887 <u>conserved hypothetical protein</u>	GENOMIC ADDRESS Counterclockwise Minute or	PRK10841 hybrid sensory kinase in two-component regulatory system with RcsB and YojN; Provisional	1. MobC protein (plasmid) [Rahnella sp. WMR104]	Query cover 62% Length: 107 aa 22 to 115 vs 12 to 105	Positive:70% Identities: 50% E: 4e-25 Gap:0%	YP_006960812.1	function=plasmid mobilization 1 region στο Zymomonas mobilis name="PRK10841"
			2. MULTISPECIE S: hypothetical	Query cover 62% Length: 99 aa 22 to 115 vs	Positive:68% Identities: 50% E: 2e-24	WP_04959576.9.1	

<u>Plasmid</u> pZA1003	Centisome (%) = 33.84 LENGTH =115 aa MW : 13,122.23		protein [Enterobacteriac eae]	4 to 97	Gap:0%		hybrid sensory kinase in two- component regulatory system with RcsB and YojN; Provisional"
			3. plasmid mobilization relaxosome protein MobC, partial [Desulfovibrio frigidus]	Query cover 62% Length: 96 aa 16 to 112 vs 1 to 96	Positive:58% Identities: 33% E: 2e-08 Gap:1%		



Εικόνα 6-1: Σχηματικός χάρτης που απεικονίζει την θέση του γονιδίου *traJ* στο πλασμίδιο pZA1001

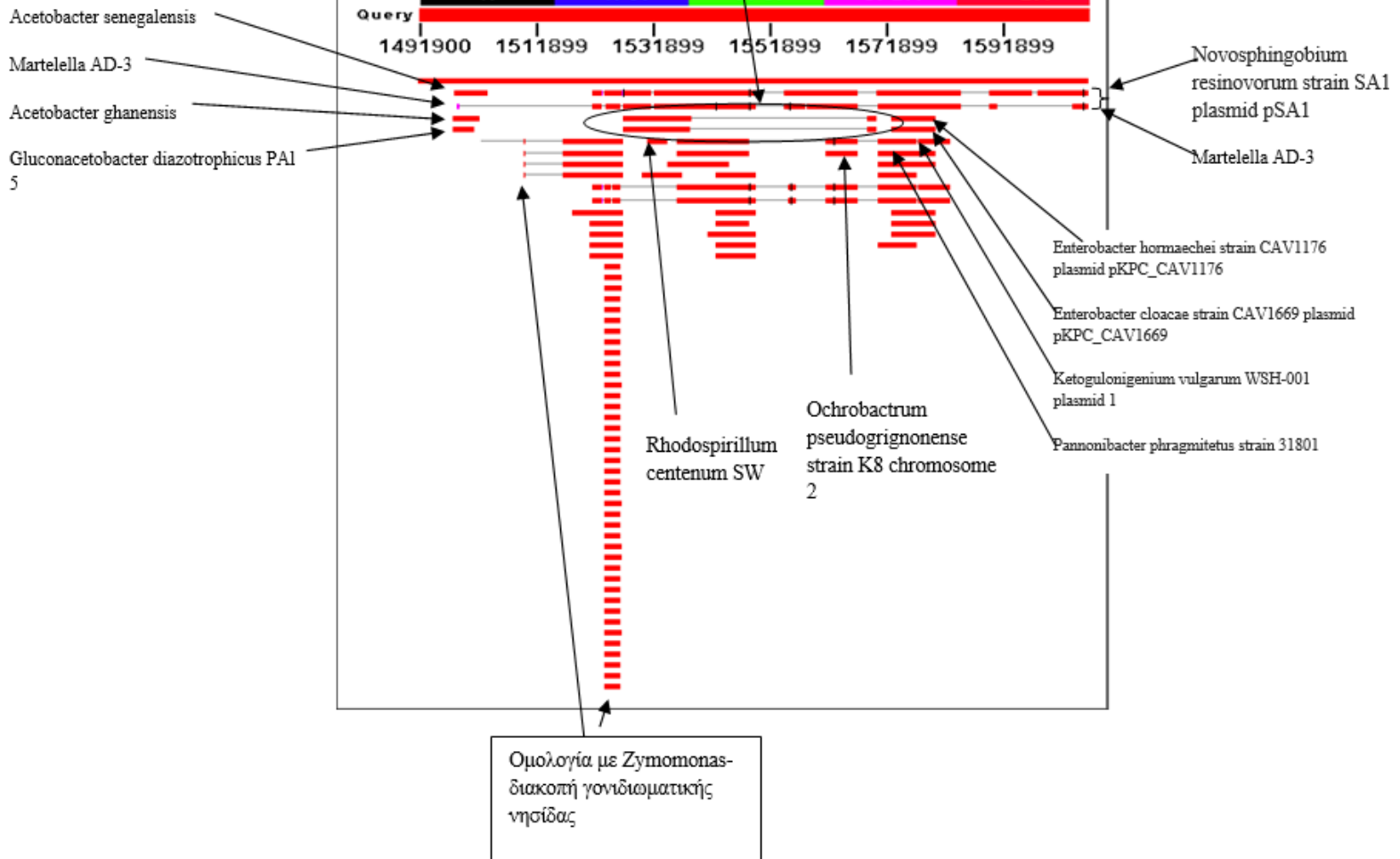


Εικόνα 6-2: Σχηματικός χάρτης που απεικονίζει την θέση των mob γονιδίων στο πλασμίδιο pZA1003

Παράρτημα III

1491900-1605900

uncultured



Εικόνα 6-3: Αποτελέσματα megablast της περιοχής των γονιδιωματικών νησίδων

Παρακάτω εμφανίζονται τα αποτελέσματα του megablast για ολόκληρη την περιοχή που περιλαμβάνει τις δύο γονιδιωματικές νησίδες

Παράρτημα IV

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται λεπτομερώς οι πληροφορίες για την θέση, την λειτουργία και την ομολογία με άλλα συστήματα των συζευκτικών γονιδίων του χρωμοσώματος του στελέχους NCIMB 11163.

Πίνακας 6-3: Ομολογία των συζευκτικών γονιδίων του χρωμοσώματος με τα άλλα μελετημένα συστήματα

Z.mobilis 11163 genes	Vir homologues	IncP homologues	IncF homologues	λειτουργία	Μοτίβα	Τοποθεσία- Μέγεθος	Signal sequence
conjugal transfer protein precursor	-	TraF	TrhP	Mpf TraF:Καταλύει την κυκλοποίηση του TrbC TrhP: πεπτιδάση μεταφοράς	peptidase	IM 150-368	OXI
Hypothetical protein	VirD2 components (relaxase)	TraI	TraI	Ριλαξάση			
conjugation TrbI family protein	VirB10	TrbI	traB	Mpf pore	Σπειρομένο σπείραμα	IM/P 429-475* Vs 201 aa	OXI
TraF peptidase, serine peptidase MEROPS family S26C	-	TraF	TrhP Transfer peptidase	Mpf TraF:Καταλύει την κυκλοποίηση του TrbC TrhP: πεπτιδάση μεταφοράς	peptidase	IM 150-368	OXI
conserved hypothetical protein	VirD2 components (relaxase)	TraI	TraI	Ριλαξάση			
conjugal transfer coupling protein TraG	VirD4	TraG	TraD	Coupling protein: σύνδεση mpf με dtr σύστημα			
P-type conjugative transfer ATPase TrbB	VirB11	TrbB	-	Mpf Δραστικότητα ΑΤΡάσης και κινάσης Μπορεί να έχει ρόλο συνοδού πρωτεΐνης κατά τη δημιουργία	Walker A Walker B Ασπαρτικού Ιστιδίνης		

				της συζευκτικής συσκευής			
conjugal transfer protein TrbC	VirB2	TrbC	TraA	Mpf Συστατικό συζευκτικού σωλήνα		IM, E 112-128* Vs 110	NAI
conjugal transfer protein TrbB*	VirB3	TrbD	TraL pore	Mpf Απαιράιτη για τη μεταφορά του υποστρώματος		IM 93-105	OXI
conjugal transfer ATPase TrbE	VirB4	TrbE	TraC	Mpf Υδρολύει ATP συμμετέχει στη δημιουργία εκκριτικού καναλιού	ATPase Walker A	IM 799-893	OXI
P-type conjugative transfer protein TrbJ	VirB8?	TrbJ	-	Mpf Σχηματισμός πόρου/ <u>VirB5</u> : Δευτερεύον συστατικό συζυκτικού σωλήνα		IM/P 130-261?	NAI
hypothetical protein		TrbK	TraS/TraT?	Επιφανειακός αποκλεισμός			
P-type conjugative transfer protein TrbL	VirB6	TrbL	traG	Mpf Σταθεροποίηση συζυκτικού πόρου/ αποτελεσματική έκφραση VirB γονιδίων		IM/P 912-1329* vs 453 aa	OXI
conjugal transfer protein TrbF	VirB5 minor component of the T-pilus	TrbF	TraE pore	Mpf			
P-type conjugative transfer protein TrbG	VirB9	TrbG	TraK pore	Mpf Δημιουργεί ένα σταθεροποιητικό σύμπλοκο του πόρου στην εξωτερική μεμβράνη	σεκρετίνη	P/OM 299-410	NAI
conjugation	VirB10	TrbI	traB	Mpf Σχηματισμός	Σπειρομένο σπείραμα	IM/P 429-475*	OXI

TrbI family protein				πόρου		Vs 377 aa	
------------------------	--	--	--	-------	--	--------------	--

Παράρτημα V

Πίνακας 6-4: Λεπτομερής σύγκριση των γονιδίων της νησίδας των 79 kb του χρωμοσώματος του *Z. mobilis* NCIMB 11163 με τμήμα του πλασιδίου SA1 του *N. resinovorum* SA1

Novosphinobium resinovorum SA1 plasmid SA1	Zymomonas mobilis subsp. mobilis NCIMB 11163		Ποσοστά ομολογίας
1467146..1468640 16S ribosomal RNA	1521549..1523025 16S ribosomal RNA		
1468818..1468894 tRNA-Ile	1523182..1523258 tRNA-Ile		
1468918..1468993 tRNA-Ala	1523282..1523357 tRNA-Ala		
1469280..1472079 23S ribosomal RNA	1523630..1526423 23S ribosomal RNA		
1472218..1472332 5S ribosomal RNA	1526527..1526641 5S ribosomal RNA		
1472529..1472605 tRNA-Met	1526709..1526785 tRNA-Met		
<1472595..1474214 resolvase	1526742..1528397 Resolvase domain	Pseudo, incomplete σύμφωνα με το <i>Novosphingobium</i>	
1474234..1474458 hypothetical protein	1528394..1528804 hypothetical protein	Δεν έχουν ομολογία	
1474728..1475027 hypothetical protein	1528911..1529210 Protein of unknown function DUF1778	Query cover: 100%	Positive:97% Identities: 97%
1475032..1475541 GNAT family N-acetyltransferase"	1529215..1529724 GCN5-related N-acetyltransferase	Query cover: 100%	Positive:97% Identities: 96% E: 5e-118
-	1529787..1529999 hypothetical protein		
1475827..1476723 DNA polymerase III subunit epsilon	1530000..1530893 Exonuclease RNase T and DNA polymerase III	Query cover: 99%	Positive:98% Identities: 96% E: 0.0
1476707..1478731 ATPase	1530880..1532910 ATPase-like protein	Query cover: 100% 8 Gaps	Positive:86% Identities: 80% E: 0.0
1478728..1480050 Hypothetical protein	1532907..1534229 Hypothetical protein	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0
1480074..1481090 Hypothetical protein	1534253..1535269 Domain of unknown	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 99%

	function DUF1814		E: 0.0
1481083..1481676 Hypothetical protein	1535262..1535855 Hypothetical protein	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 99% E: 3e-140
1481912..1482874 antirepressor	1536077..1537039 domain of unknown function DUF1738 - antirestriction protein ArdC	Query cover: 100%	Positive:98% Identities: 97% E: 0.0
1482871..1483266 single-stranded DNA endonuclease	1537036..1537431 pseudo		
1483391..1485529 DNA-binding protein	1537556..1539694 ParB domain protein nuclease;	Query cover: 100%	Positive:97% Identities: 95% E: 0.0
1485627..1485932 Hypothetical protein	1539791..1540096 Hypothetical protein	Query cover: 100%	Positive:93% Identities: 82% E: 9e-61
-	1540514..1540678 Hypothetical protein		
1486713..1487261 Hypothetical protein	1540877..1541425 Hypothetical protein	Query cover: 100%	Positive:95% Identities: 92% E: 8e-112
1487327..1487743 Hypothetical protein	1541491..1541907 Hypothetical protein	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 97% E: 2e-100
1487736..1488380 antitoxin of toxin- antitoxin stability system	1541900..1542544 Hypothetical protein	Query cover: 100%	Positive:95% Identities: 93% E: 6e-151
1488539..1492861 methylase	1542693..1547015 putative methylase/helicase	Query cover: 100%	Positive:97% Identities: 63% E: 0.0
1492861..1493898 DNA primase	1547015..1548052 hypothetical	Query cover: 99%	Positive:95% Identities: 95% E: 0.0
1494206..1495132 hypothetical	1548397..1549323 hypothetical	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 98% E: 0.0
-	1549354..1550508 transposase IS4 family protein		
-	1550581..1550820 hypothetical		
-	1551078..1552553 Catalase domain protein		
-	1552860..1554053 transposase IS4 family protein		
1495156..1495656	1554103..1554603	Query cover: 100%	Positive:97% Identities: 96%

hypothetical	hypothetical		E: 6e-87
1495886..1496326 hypothetical	1554836..1555276 hypothetical	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 96% E: 9e-122
1496894..1497220 hypothetical	1555843..1556169 Protein of unknown function DUF736	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 98% E: 7e-77
1497316..1498557 toxin HipA	1556264..1557505 HipA N-terminal domain protein	Query cover: 99%	Positive:99% Identities: 98% E: 0.0
1498535..1498855 transcriptional regulator	1557483..1557803 XRE family transcriptional regulator	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 100% E: 2e-74
1499185..1499451 XRE family transcriptional regulator	1558133..1558399 XRE family transcriptional regulator	Query cover: 98%	Positive:100% Identities: 100% E: 2e-58
1499512..1499787 Hypothetical protein	1558460..1558735 Hypothetical	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 100% E: 2e-65
1499898..1500179 hypothetical	1558846..1559127 hypothetical	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 100% E: 5e-66
1500178..1500681 hypothetical	1559132..1559629 hypothetical	3 to 167 του Novosphingobium Query cover: 98%	Positive:98% Identities: 98% E: 3e-118
1500818..1501099 DNA binding protein	1559766..1560047 hypothetical	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 100% E: 1e-64
1501215..1502264 Replication protein	1560067..1561212 Replication protein A	33 to 381 του 11163 Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 99% E: 0.0
1502261..1502914 cobyrinic acid a,c-diamide synthase	1561209..1561862 cobyrinic acid a,c-diamide synthase	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 99% E: 8e-154
1502911..1503165 hypothetical	1561859..1562113 hypothetical	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 99% E: 9e-57
1503162..1503680 hypothetical	1562110..1562628 hypothetical	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 100% E: 6e-129
1503677..1504222 peptidase S26	1562625..1563170 TraF peptidase, serine peptidase MEROPS family	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 100% E: 6e-132
1504258..1504593 hypothetical	1563206..1563541 protein of unknown function DUF736	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 100% E: 1e-80
1504598..1505308 lytic transglycosylase	1563546..1564256 lytic transglycosylase catalytic	Query cover: 100%	Positive:86% Identities: 82% E: 1e-136

-	1564253..1564573 hypothetical		
1505622..1507694 hypothetical	1564570..1566642 hypothetical	Query cover: 100% (VirD2 relaxase)	Positive:97% Identities: 96% E: 0.0
-	1566672..1566791 pseudo		
-	1566985..1567689 protein of unknown function DUF125 transmembrane		
-	1568147..1568533 hypothetical		
-	1568524..1569879 transposase IS4 family protein		
1507870..1509858 conjugal transfer protein TraG	1570117..1572105 TraG family protein	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0
1509873..1510334 CopG family transcriptional regulator	1572120..1572581 CopG domain protein DNA-binding domain protein	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 99% E: 3e-110
1510481..1511473 P-type conjugative transfer ATPase TrbB	1572713..1573720 P-type conjugative transfer ATPase TrbB	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0
1511470..1511802 conjugal transfer protein TrbC	1573717..1574049 conjugal transfer protein TrbC	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 99% E: 7e-73
1511802..1512083 conjugal transfer protein	1574049..1574330 conjugal transfer protein TrbB*(TrbD)	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 99% E: 4e-61
1512094..1514601 conjugal transfer protein TrbE	1574341..1576848 conjugal transfer ATPase TrbE	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0
1514598..1515380 P-type conjugative transfer protein TrbJ	1576845..1577627 P-type conjugative transfer protein TrbJ	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0
1515401..1515688 conjugal transfer protein TrbK	1577648..1577935 Hypothetical (trbK)	Query cover: 100%	Positive:97% Identities: 97% E: 6e-65
1515692..1517053 P-type conjugative transfer protein TrbL	1577939..1579300 P-type conjugative transfer protein TrbL	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0
1517050..1517739 conjugal transfer protein TrbF	1579297..1579986 Conjugal transfer protein	Query cover: 100%	Positive:98% Identities: 99% E: 4e-167
1517736..1518749 P-type conjugative	1579983..1580996 P-type conjugative	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 100%

transfer protein TrbG	transfer protein TrbG		E: 0.0
1518746..1519879 conjugal transfer protein TraI	1580993..1582126 conjugation TrbI family protein	Query cover: 100%	Positive:99% Identities: 99% E: 0.0
1519882..1520103 hypothetical	1582129..1582350 conserved hypothetical protein	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 100% E: 6e-49
1520098..1520727 TetR family transcriptional regulator	1582345..1582974 TetR family transcriptional regulator	Query cover: 100%	Positive:100% Identities: 99% E: 4e-158
1520935..1521906 LysR family transcriptional regulator	1583182..1584159 transcriptional regulator, LysR family	Query cover: 98%	Positive:99% Identities: 98% E: 0.0
-	1584198..1587908 SMC domain protein		
-	1587926..1589146 nuclease SbcCD, D subunit		
1522173..1523075 transcriptional regulator	1589256..1590158 conserved hypothetical protein	Query cover: 100%	Positive:95% Identities: 90% E: 0.0
1523072..1523674 hypothetical	1590155..1590757 hypothetical	Query cover: 100%	Positive:94% Identities: 91% E: 4e-135
1523674..1524279 hypothetical	1590760..1591362 Domain of unknown function DUF1788	4 to 201 Novosphinobium 3 to 200 11163 Query cover: 98%	Positive:100% Identities: 98% E: 3e-145
1524283..1527822 hypothetical	1591366..1594905 hypothetical	Query cover: 100%	Positive:95% Identities: 93% E: 0.0
1527822..1531349 type II restriction endonuclease	1594905..1598384 Hypothetical (SAM-dependent methyltransferase)	Query cover: 100%	Positive:82% Identities: 75% E: 0.0
1531342..1533849 TIGR02687 family protein	1598377..1600884 PglZ domain protein (alkaline phosphatase)	Query cover: 100%	Positive:98% Identities: 96% E: 0.0
1533857..1535938 TIGR02688 family protein	1600892..1602973 conserved hypothetical protein (ATP-dependent Lon protease)	Query cover: 100%	Positive:95% Identities: 94% E: 0.0
1536063..1538609 hypothetical	1603098..1605782 helicase domain protein	1 to 608 11163 Query cover: 71%	Positive:98% Identities: 98% E: 0.0
1538606..1541812 exodeoxyribonuclease V	-	-	-

subunit beta			
--------------	--	--	--