

## Πρόλογος

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με σκοπό την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, κατά το χρονικό διάστημα 2014-2016.

Η μελέτη εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Νουκλεϊκών Οξέων, του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, η οποία μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την Μεταπτυχιακή μου Διατριβή, καθώς και για την ουσιαστική βοήθειά της, τόσο στον σχεδιασμό της, όσο και στην πορεία σύνταξης και ολοκλήρωσής της.

Ευχαριστώ θερμά την Μεταδιδακτορική Συνεργάτη του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Νουκλεϊκών Οξέων κα. Ευγενία Καραμπίκα, η οποία ήταν δίπλα μου από την πρώτη μέρα που ξεκίνησα την Μεταπτυχιακή Διατριβή μου και με εκπαίδευσε. Την ευχαριστώ επίσης για την αμέριστη βοήθειά της και τις συμβουλές της σε κάθε στάδιο της εργασίας μου καθώς και για την άπογη συνεργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και μεταδιδακτορικούς συνεργάτες του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Νουκλεϊκών Οξέων, Ελπινίκη Βανδέρα, Μάνια Παραπούλη, Νώντας Τσαγκογιάννης, Ματίνα Ασημακούλα, οι οποίοι ήταν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα και δημιούργησαν ένα άριστο και φιλικό περιβάλλον στο οποίο με βοήθησαν να ενταχθώ από την πρώτη στιγμή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου Γλυκερία Βελιβάση, Στελίνα Παπαδάκη και Ηρακλή Μοσχονά, για την στήριξή τους σε όλες τις δύσκολες αλλά και ευχάριστες στιγμές που ζήσαμε καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, η οποία με στηρίζει τόσα χρόνια σε κάθε μου βήμα τόσο ηθικά όσο και οικονομικά.

## Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	1
<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες.....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Πηγές προέλευσης των PAHs.....	7
1.1.2 Φυσικές και Χημικές Ιδιότητες των PAHs.....	7
1.1.3 Τοξικότητα των PAHs.....	8
1.1.4 Βιοαποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών.....	9
1.1.5 Βιοαποδόμηση PAHs.....	11
1.1.6 Βιοαποκατάσταση.....	12
<b>1.2 Ακτινοβακτήρια.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 <i>Mycobacterium sp.</i>.....</b>	<b>15</b>
1.3.1 PAHs και <i>Mycobacterium sp.</i> .....	17
1.3.2 Απομόνωση και Χαρακτηρισμός του στελέχους Spvg1.....	20
<b>1.4 Οικογένεια Μεταφορέων Νιτρικών/Νιτρωδών (NNP).....</b>	<b>22</b>
1.4.1 Πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς.....	22
1.4.2 Συστήματα κυτταρικής πρόσληψης νιτρικών/νιτρωδών.....	23
1.4.3 Δομικά μοτίβα μεταφορέων της οικογένειας NNP.....	25
1.4.4 Ευκαρυωτικοί και Προκαρυωτικοί μεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών.....	26
1.4.5 Μεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών NarU και NarK και NirC.....	28
1.4.6 Κρυσταλλικές δομές των NarU και NarK.....	29
1.4.7 Μηχανισμός μεταφοράς.....	32
1.4.8 Αναγωγάσες νιτρικών – νιτρωδών στην <i>E.coli</i> .....	35
<b>1.5 Σκοπός.....</b>	<b>37</b>
<b>2. Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1 Βακτηριακά Στελέχη - Πλασμίδιο.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης.....</b>	<b>40</b>
<b>2.3 Παρασκευή αντιβιοτικών.....</b>	<b>43</b>
<b>2.4 Αποθήκευση καλλιέργειας μικροοργανισμών.....</b>	<b>44</b>
<b>2.5 Πριμοδοτικά μόρια.....</b>	<b>45</b>
<b>2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....</b>	<b>46</b>
2.6.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Δύο Σταδίων (Overlap extension PCR).....	50
<b>2.7 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) NucleoSpin® Tissue της Macherey Nagel.....</b>	<b>51</b>

2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation) .....	52
2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) NucleoSpin® Plasmid της Macherey Nagel.....	54
2.10 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της Macherey Nagel .....	55
2.11 Καθαρότητα και ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων .....	55
2.12 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	56
2.13 Κατασκευή ανασυνδιασμένου DNA – Κλωνοποίηση .....	59
2.14 Μετασχηματισμός του βακτηρίου <i>E.coli</i> με πλασμιδιακό DNA .....	61
2.15 Κατασκευή επιδεικτικών κυττάρων του βακτηρίου <i>E.coli</i> .....	62
2.16 Μετασχηματισμός με <i>E.coli</i> DH5a ή TOP10F' επιδεικτικά κύτταρα.....	63
2.17 Αναπλήρωση φαινότυπου-Κατασκευή καμπύλης ανάπτυξης.....	64
2.18 Πειράματα πρόσληψης νιτρικών (uptake) .....	65
2.19 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting) .....	66
2.20 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.....	73
2.21 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (BLAST).....	74
3. Αποτελέσματα.....	75
3.1 Μελέτη γονιδίων πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτροδών στο <i>Spyr1</i> .....	76
3.2 Ανάλυση νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας- Ομολογία .....	77
3.3 Φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων <i>rynar</i> και <i>rynir</i> και συγκριτική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών τους.....	81
3.4 Χαρακτηριστικά πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτροδών, <i>Rynar</i> και <i>Rynir</i> .....	82
3.4.1 Διαμεμβρανικά τμήματα .....	83
3.4.2 Στοίχιση πρωτεϊνών NNP.....	84
3.5 Κινητοποίηση των γονιδίων <i>rynar</i> , <i>rynir</i> από το γονιδίωμα του στελέχους <i>Spyr1</i> .....	89
3.5.1 Κλωνοποίηση γονιδίων μεταφορέων νιτρικών/νιτροδών στο πλασμίδιο <i>pt7-5</i> .....	91
3.6 Καμπύλες ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων JCB4518 (συμπλήρωση φαινότυπου).....	93
3.7 Ανοσοαποτύπωση πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτροδών, <i>Rynar</i> και <i>Rynir</i> .....	94
3.8 Πειράματα πρόσληψης νιτρικών.....	95
3.8.1 Μέτρηση νιτρικών.....	95
3.8.2 Μέτρηση νιτροδών .....	96
3.9 Κινητική ανάλυση της <i>Rynar</i> .....	98
3.10 Μοντέλα.....	99
3.11 Μεταλλαξιγένεση στην πρωτεΐνη <i>Rynar</i> .....	99

3.11.1 Κλωνοποίηση γονιδίων που φέρουν τις μεταλλάξεις στο πλασμίδιο pt7-5 .....	103
<b>3.12 Καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων JCB4518 που φέρουν τα γονίδια <i>rynar R67A</i>, <i>rynar R67H</i>, <i>rynar R67K</i> (συμπλήρωση φαινότυπου).....</b>	<b>104</b>
<b>3.13 Ανοσοαποτύπωση μεταλλάξεων .....</b>	<b>105</b>
<b>3.14 Πειράματα πρόσληψης νιτρικών .....</b>	<b>105</b>
3.14.1 Μέτρηση νιτρικών.....	105
3.14.2 Μέτρηση νιτρωδών .....	107
<b>4.Συζήτηση.....</b>	<b>109</b>
<b>Παράρτημα .....</b>	<b>113</b>
<b>5.Βιβλιογραφία .....</b>	<b>123</b>

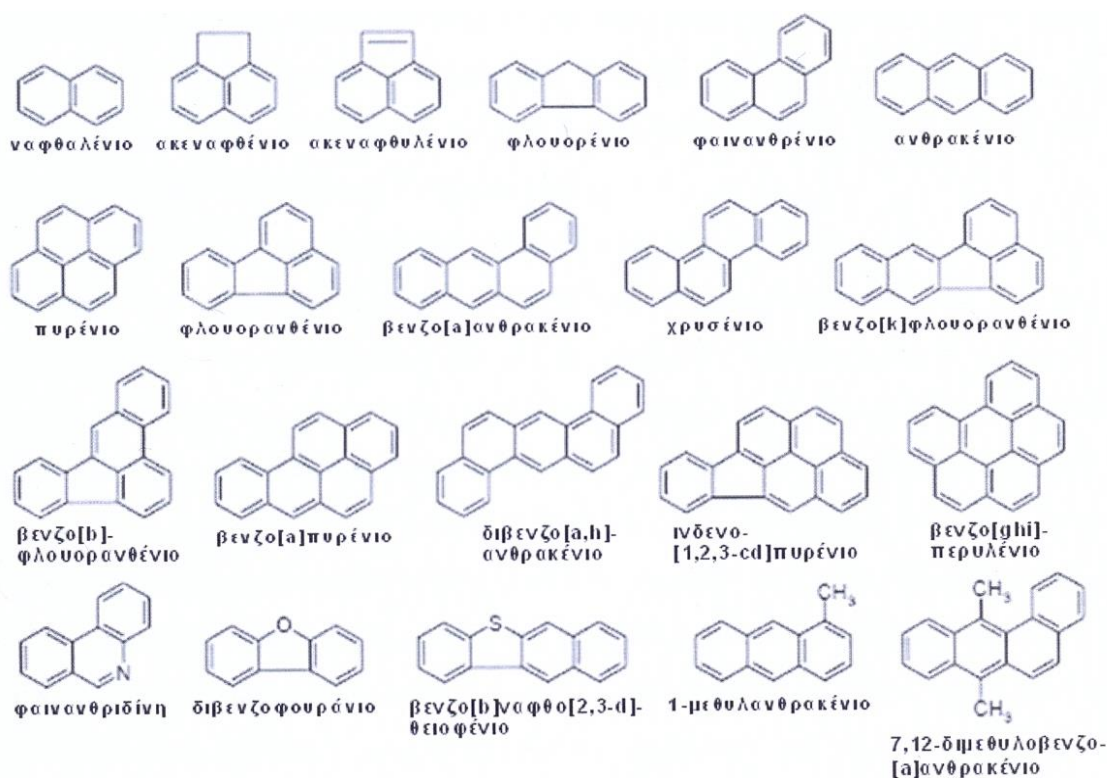
# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: PAHs)

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι οι πιο συνηθισμένοι ρυπαντές του περιβάλλοντος (Brezna et al., 2005, Dandie et al., 2004, Bumpus, 1989).

Αποτελούν μία ποικίλη ομάδα με πάνω από 100 οργανικές ενώσεις που περιέχουν δύο ή περισσότερους συντηγμένους αρωματικούς δακτυλίους σε διάφορες διαμορφώσεις: γραμμική, γωνιακή ή συμπλέγματα (Haritash and Kaushik, 2009, Seo et al., 2007, Doyle et al., 2008, Cerniglia, 1992) (Εικόνα 1.1).

Ο όρος “PAH” αναφέρεται στις ενώσεις που αποτελούνται αποκλειστικά από άτομα άνθρακα και υδρογόνου, ενώ ο ευρύτερος όρος “πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις” περιλαμβάνει τα υποκατεστημένα με αλκύλιο-παράγωγα, καθώς και τα ετεροκυκλικά ανάλογα, τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα ετερο-άτομα στην αρωματική δομή (Battersby, 2004, ATSDR, 1995).



Εικόνα 1.1: Δομές ορισμένων PAHs (Haritash and Kaushik, 2009).

Διακρίνονται σε υδρογονάνθρακες:

- 1) Μικρού Μοριακού Βάρους μέχρι 3 αρωματικούς δακτυλίους (Low Molecular Weight: LMW-PAHs)
- 2) Μεγάλου Μοριακού Βάρους με πάνω από 3 αρωματικούς δακτυλίους (High Molecular Weight: HMW-PAHs) (Doyle et al., 2008).

### 1.1.1 Πηγές προέλευσης των PAHs

Οι PAHs βρίσκονται στο έδαφος, το χώμα, το νερό, τον αέρα και τα φυτά (Doyle et al., 2008). Η προέλευσή τους διακρίνεται σε:

- Πετρογενή, όταν προέρχονται από το πετρέλαιο και προϊόντα σχετικά με αυτό
- Πυρογενή, όταν οφείλονται στην καύση οργανικής ύλης
- Βιογενή, όταν παράγονται σε βιολογικές διαδικασίες

Οι PAHs προέρχονται τόσο από φυσικές όσο και από ανθρωπογενείς πηγές (Blumer, 1976, Mueller et al., 1996). Αποτελούν φυσικά συστατικά ορυκτών καυσίμων, όπως το πετρέλαιο και μπορεί να εισέλθουν στο περιβάλλον ως αποτέλεσμα τυχαίας ή φυσικής διαρροής των προϊόντων, οι οποίοι ανήκουν στους πετρογενείς PAHs. Οι πυρογενείς αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ατελούς καύσης της οργανικής ύλης, κατά την ηφαιστειακή δραστηριότητα, στις πυρκαγιές σε δάση, καύση ορυκτών καυσίμων, αποτέφρωση αποβλήτων και σε μικρότερο βαθμό από το μαγείρεμα των τροφίμων (Maliszewska-Kordybach, 1999). Άλλες σημαντικές πηγές πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων συμπεριλαμβάνουν τη λιθανθρακόπισσα και το πισσέλαιο. Οι βιογενείς PAHs σχηματίζονται σε ορισμένες βιολογικές διαδικασίες. Οι βιογενείς PAHs σχηματίζονται σε ορισμένες βιολογικές διαδικασίες, (παραγωγή στεροειδών) μπορεί να προέρχονται από τα φυτά ως βιογενείς πρόδρομοι κατά την διάρκεια της διαγένεσης, παράγονται από ορισμένα βακτήρια και φυτά, μύκητες και έντομα. Ορισμένοι από αυτούς έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή φυτοφαρμάκων, εντομοκτόνων, απορρυπαντικών κ.α. (Kanaly and Harayama, 2000, Peng et al., 2008, Seo et al., 2009).

### 1.1.2 Φυσικές και Χημικές Ιδιότητες των PAHs

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι άχρωμες, λευκές ή κιτρινοπράσινες στερεές ουσίες. Το σημείο τήξης τους εξαρτάται από την ιδιαιτερότητα της ένωσης, αλλά γενικά είναι μεγαλύτερη από την θερμοκρασία δωματίου, ενώ το σημείο βρασμού είναι μεγαλύτερο από 100 βαθμούς κελσίου και αποτελούνται τουλάχιστον από δύο βενζολικούς δακτυλίους. Μερικοί PAHs εξατμίζονται εύκολα, ενώ οι περισσότεροι δεν διαλύονται εύκολα στο νερό και δεν καίγονται (Environmental Management Act, 1981). Είναι θερμοδυναμικά σταθεροί, εξαιτίας της αρνητικής ενέργειας συντονισμού τους και εμφανίζουν χαμηλή πίεση ατμών (WHO, 1998, Talley J.W., 2002). Οι PAHs μεγάλου μαριακού βάρους παραμένουν στο έδαφος για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Bianco, 2010).

Οι PAHs παρουσιάζουν ποικίλες ιδιότητες όπως:

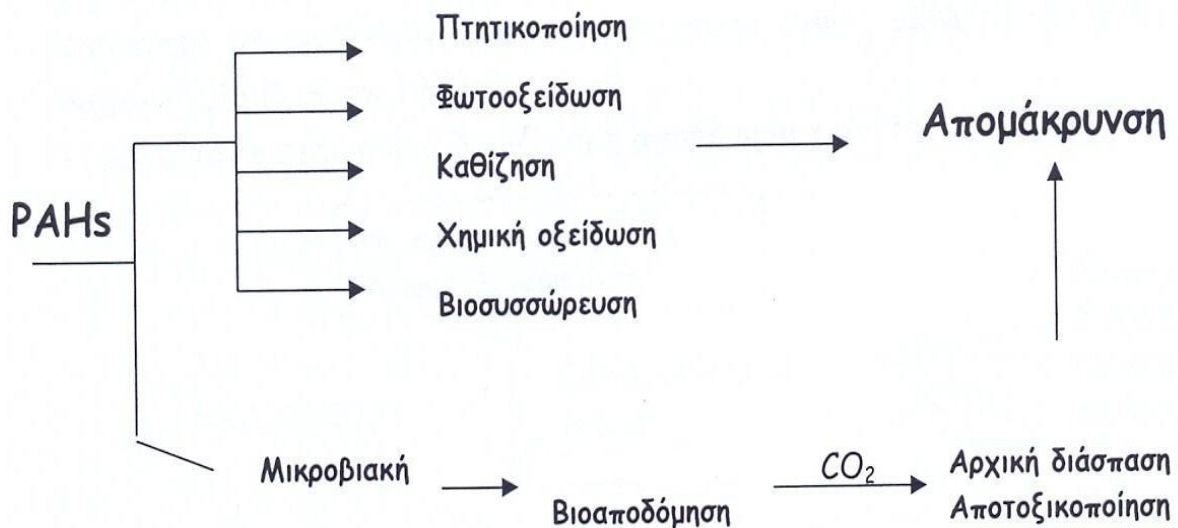
- Φωτοευαισθησία
- Αντίσταση στη θερμότητα
- Αγωγιμότητα
- Αντίσταση στη διάβρωση
- Αντίσταση στη βιολογική οξείδωση

Οι χημικές και περιβαλλοντικές ιδιότητες των PAHs εξαρτώνται από τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων και τη φύση σύνδεσης μεταξύ αυτών. Η υδροφοβικότητα και η τοξικότητά τους αυξάνεται με αύξηση του αριθμού των αρωματικών δακτυλίων (Cerniglia, 1992). Οι PAHs χαμηλού μοριακού βάρους τείνουν να είναι πιο διαλυτοί, πτητικοί και έχουν μικρότερη συγγένεια επιφάνειας από τους PAHs υψηλού μοριακού βάρους και επομένως έχουν μικρότερη τάση να συσσωρεύονται (WHO, 1998, Kanaly and Harayama, 2010).

### 1.1.3 Τοξικότητα των PAHs

Η έκθεση στους PAHs έχει από καιρό αναγνωριστεί ως σημαντικός κίνδυνος για την υγεία (Miller and Miller, 1981). Συγκεκριμένα 16 οργανικές ενώσεις (Εικόνα 1.1) καταγράφονται από την Αμερικανική Ένωση Περιβάλλοντος USEPA και την Ευρωπαϊκή Ένωση ως ρυπαντές προτεραιότητας εξαιτίας των μεταλλαξιογόνων και καρκινογόνων ιδιοτήτων τους (Keith and Telliard, 1979, ATSDR, 2005). Έχουν την τάση βιοσυσσώρευσης και βιομεγέθυνσης στην τροφική αλυσίδα (Heitkamp et al., 1988, Kanaly and Harayama 2000, 2010). Η έκθεση στους PAHs συμβαίνει μέσω εισπνοής, κατάποσης ή δερματικής επαφής. Επίσης έχει αναφερθεί ότι διαπερνά τον πλακούντα και προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στο έμβρυο (Collins et al., 1991, Srivastava et al., 1986, Doyle et al., 2008). Στον ανθρώπινο οργανισμό οι PAHs απορροφούνται γρήγορα από το γαστρεντερικό σωλήνα εξαιτίας της μεγάλης λιποφιλικής φύσης τους. Ο μεταβολισμός των PAHs στα θηλαστικά καταλήγει σε παραγωγή εποξειδίου και κίνησης μέσω της μονοοξυγονάσης του κυτοχρώματος P450 (Sutherland et al., 1995, Doyle et al., 2008). Αυτά τα ενδιάμεσα μπορούν να οξειδωθούν/υδρολυθούν και σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με το DNA, που μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις και τελικά σε καρκίνο (Bigger et al., 1983, Doyle et al., 2008). Έχουν συσχετισθεί με τους PAHs περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα, ήπατος, εντέρου, πάγκρεας και δέρματος (Samantha et al., 2002). Η τοξικότητα και η καρκινογένεση εξαρτώνται από το μοριακό βάρος των PAHs, με τους HMW-PAHs να είναι πιο επιβλαβείς. Από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι οι μόνοι μη μεταλλαξιογόνοι PAHs είναι το φλουορένιο, ανθρακένιο και το ναφθαλένιο (Bamford and Singleton, 2005, Cerniglia, 1992, Juhasz and Naidu, 2000). Για αυτό είναι απαραίτητη η απομάκρυνσή τους από το περιβάλλον, η οποία επιτυγχάνεται μέσω αβιοτικών ή/και βιοτικών πορειών διάσπασης (Σχήμα 1.1).





Σχήμα 1.1: Πορεία των PAHs στο περιβάλλον (Cerniglia, 1992).

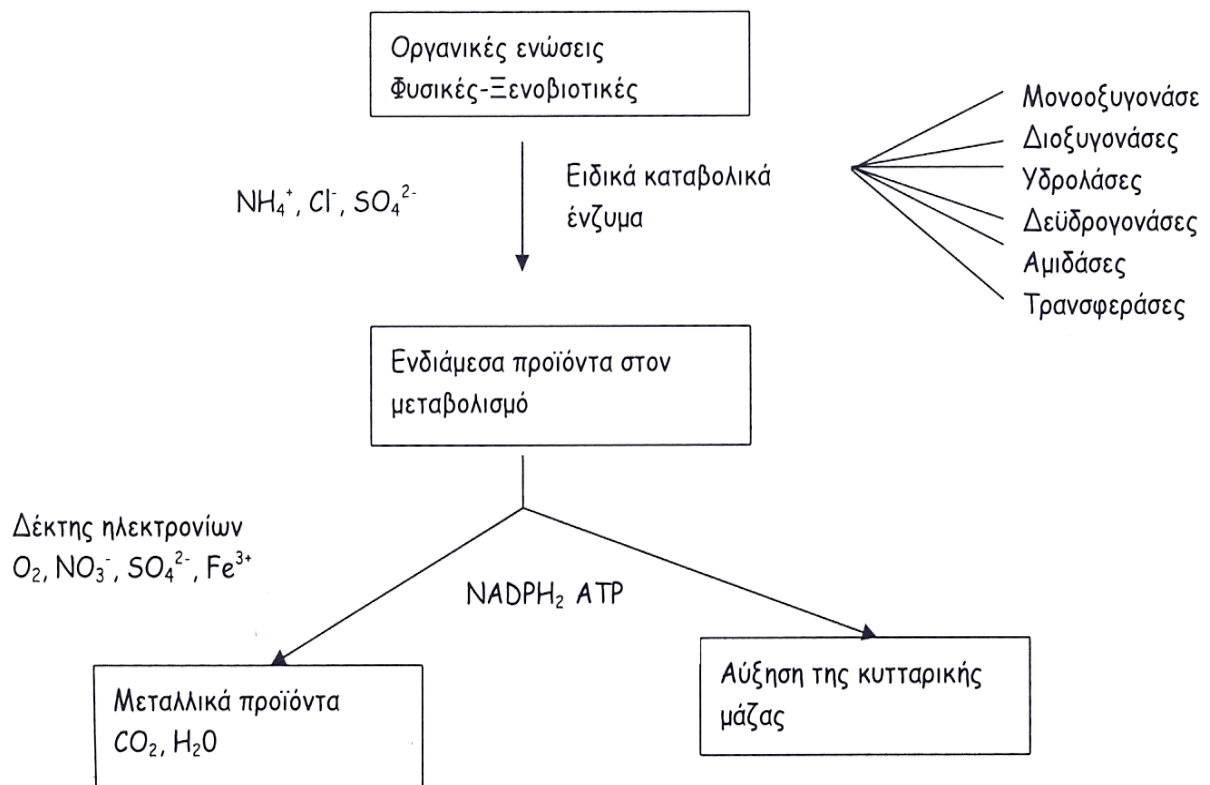
#### 1.1.4 Βιοαποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών

Με τον όρο βιοαποδόμηση καλούμε την βιολογικά καταλυτική διάσπαση διαφόρων χημικών ενώσεων σε απλούστερες δομές (Alexander, 1999).

Όσον αφορά τις οργανικές ενώσεις, σε αρκετές περιπτώσεις, η βιοαποδόμηση οδηγεί στην μετατροπή των στοιχείων του άνθρακα, του αζώτου, του φωσφόρου και του θείου των αρχικών οργανικών ενώσεων, σε αντίστοιχα ανόργανα προϊόντα αυτών.

Η λεγόμενη “απόλυτη βιοαποδόμηση” είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την πλήρη μετατροπή των οργανικών ενώσεων σε ανόργανα συστατικά όπως  $\text{CO}_2$  και ανόργανες ενώσεις του αζώτου, φωσφόρου και θείου που απελευθερώνονται από τους μικροοργανισμούς στο περιβάλλον. Στην πραγματικότητα οι μικροοργανισμοί είναι στην συντριπτική πλειοψηφία οι φορείς που μπορούν να διασπάσουν μία συνθετική οργανική ένωση σε ανόργανα συστατικά. Έτσι, βιοαποδομούνται σε λιγότερο σύνθετους μεταβολίτες,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  (αερόβια) ή  $\text{CH}_4$  (αναερόβια) (Scow, 1983, van Altegren, 1998, Singh et al., 2004, Haritash and Kaushik, 2009).

Οι αντιδράσεις που συμμετέχουν στη βιοαποδόμηση μπορούν να χαρακτηριστούν ως οξειδωτικές, αναγωγικές, υδρολυτικές ή/και συζευκτικές (Scow, 1983). Η βιοαποδόμηση των περισσότερων οργανικών ενώσεων επιτυγχάνεται υπό αερόβιες συνθήκες, όπου το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων. Στις αναερόβιες συνθήκες ως τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων χρησιμεύουν τα ιόντα  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  (van Agteren, 1998, Scow, 1983). Εκτός από βακτήρια έχει βρεθεί ότι έχουν την ικανότητα να αποδομούν διάφορες ρυπογόνες ουσίες μύκητες και φύκη (van Agteren, 1998, Scow, 1983). (Σχήμα 1.2).



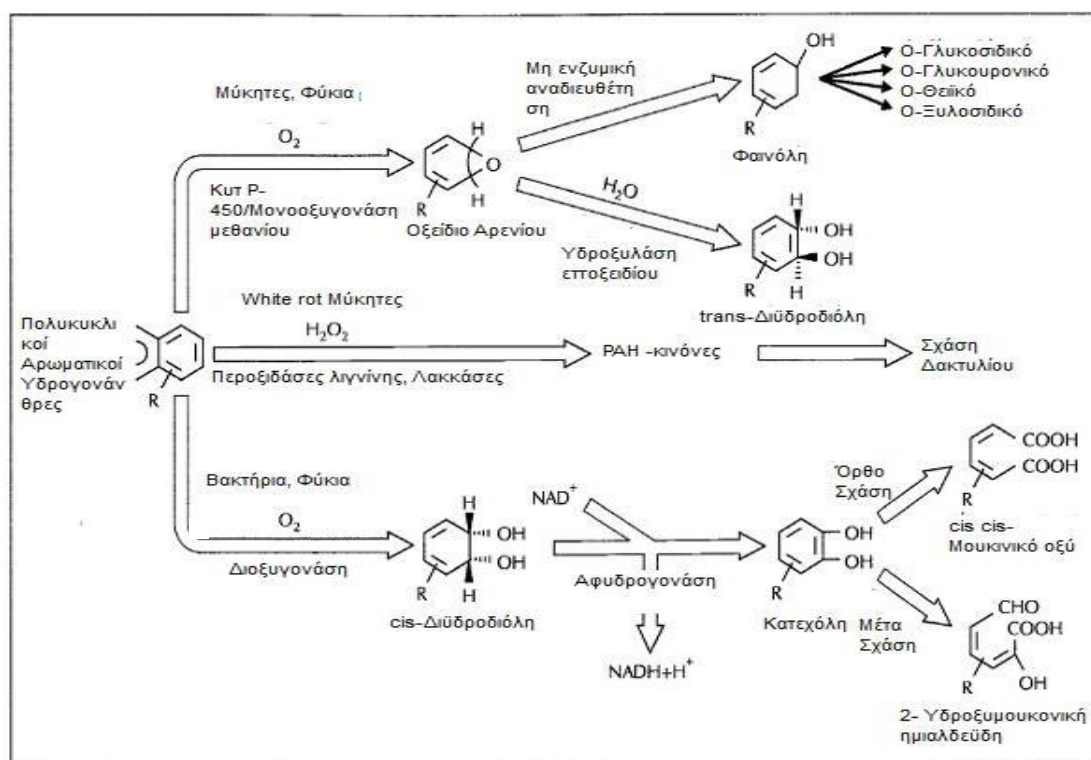
Σχήμα 1.2: Αρχή βιοαποδόμησης (van Agteren, 1998).

Η αποδόμηση μιας ένωσης εξαρτάται τόσο από βιοτικούς όσο και από αβιοτικούς παράγοντες (Doyle et al., 2008). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία βιοαποδόμησης μιας ένωσης είναι:

- ❖ Παράγοντες που σχετίζονται με το περιβάλλον: pH, θερμοκρασία, υγρασία, οξυγόνο, πορώδες εδάφους, θρεπτικά συστατικά.
- ❖ Παράγοντες που σχετίζονται με το υπόστρωμα: φυσικοχημικές ιδιότητες, συγκέντρωση, βιοδιαθεσιμότητα, τοξικότητα.
- ❖ Παράγοντες που σχετίζονται με τους μικροοργανισμούς: σύσταση των πληθυσμών, επιδράσεις μεταξύ όμοιων πληθυσμών, επιδράσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών, ποικιλομορφία, συγκέντρωση, ενζυμική δραστηριότητα (Doyle et al., 2008, Haritash and Kaushik, 2009).

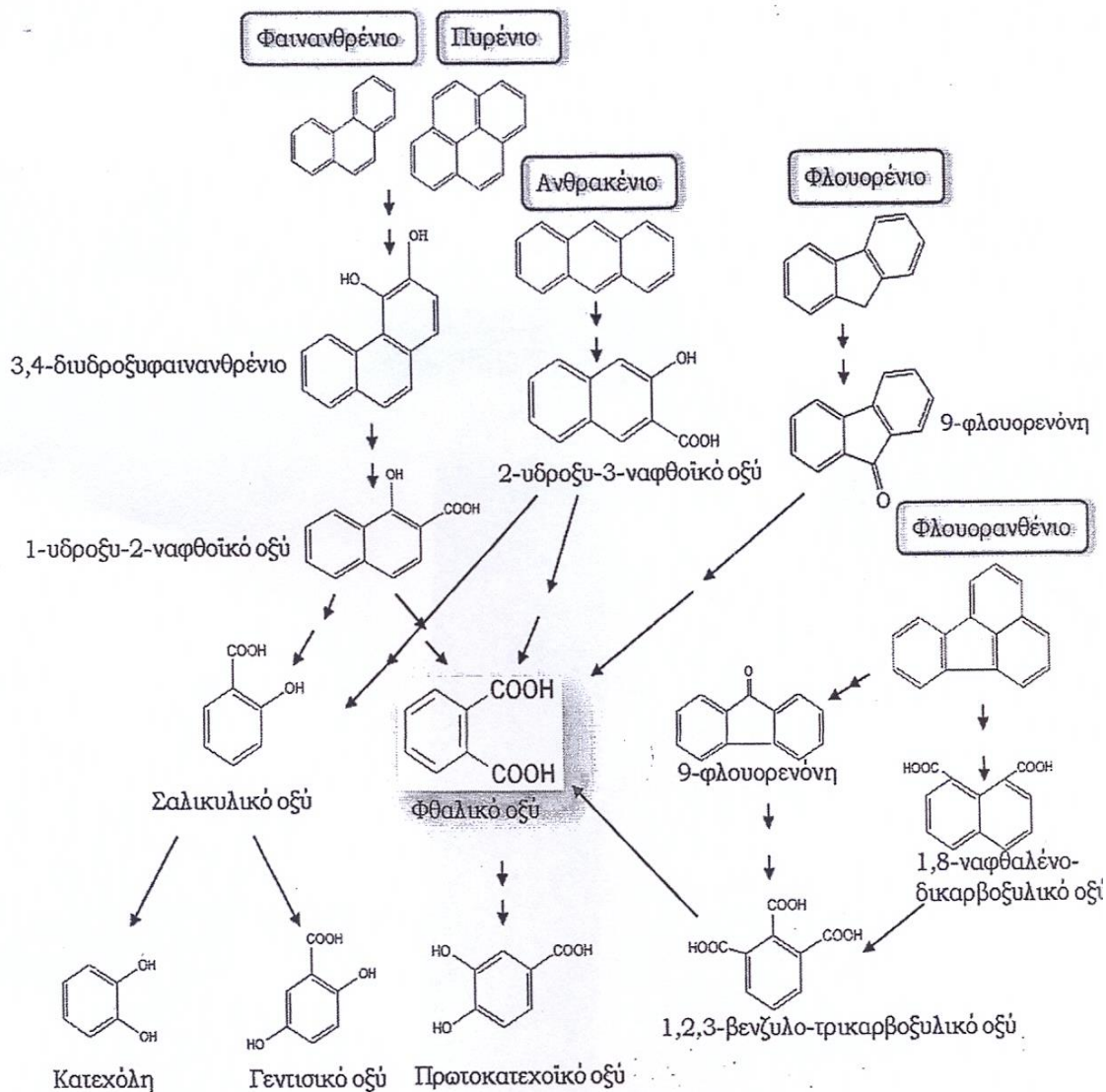
### 1.1.5 Βιοαποδόμηση PAHs

Η βιοαποδόμηση των PAHs αρχικά ξεκινάει με εισαγωγή δύο ατόμων μοριακού οξυγόνου στον αρωματικό πυρήνα. Η αντίδραση καταλύεται από μία πολυσύνθετη διοξυγονάση, η οποία αποτελείται από μία αναγωγάση, μία φερρεδοξίνη και μία πρωτεΐνη σιδήρου-θείου (Harayama et al., 1992) προς σχηματισμό της *cis*-διϋδροδιόλης. Πραγματοποιείται και οξείδωση των PAHs με τη βοήθεια του ενζύμου της μονοοξυγονάσης του κυτοχρώματος P450 προς *trans*-διϋδροδιόλες (Heitkamp et al., 1988, Kelley et al., 1991). Η ενδιάμεση μορφή της υδροξυλιωμένης *cis*-διϋδροδιόλης οξειδώνεται από ένζυμα που προκαλούν διάσπαση του δακτυλίου, τις λακκάσες. Περαιτέρω καταβολισμός παράγει ενδιάμεσα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος. Ένας από τους κύριους μηχανισμούς περιλαμβάνει τον σχηματισμό κατεχόλης μετά από οξείδωση των υδροξυλιωμένων παραγώγων της *cis*-διϋδροδιόλης, η οποία οξειδώνεται περαιτέρω μέσω δύο πορειών: στον *ortho*-μηχανισμό πραγματοποιείται σχάση του δακτυλίου μεταξύ των δύο ατόμων άνθρακα των δύο υδροξυλομάδων και δίνει *cis-cis* μουκινικό οξύ και στον *meta*-μηχανισμό πραγματοποιείται σχάση του δακτυλίου μεταξύ ενός ατόμου άνθρακα των υδροξυλομάδων και ενός διπλανού ατόμου άνθρακα που δίνει 2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη (Σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3: Πορείες μικροβιακής αποδόμησης των PAHs (Haritash and Kaushik, 2009).

Το πυρένιο είναι ένας PAH με 4 αρωματικούς δακτυλίους, βρέθηκε ότι είναι ρυπαντής στον αέρα, το νερό και το έδαφος (International Agency for Research on Cancer, 1986) και έχει χρησιμοποιηθεί ως ένωση πρότυπη στη μελέτη βιοαποδόμησης των HMW PAHs, εφόσον είναι δομικά όμοιο με αρκετούς καρκινογόνους PAHs (Kanaly and Harayama, 2000, Koukku and Vandera, 2011) (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4 : Προτεινόμενη πορεία αποδόμησης των PAHs (Koukkou and Vandera, 2011).

### 1.1.6 Βιοαποκατάσταση

Ο όρος της βιοαποκατάστασης χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αντιμετώπιση προβλημάτων ρύπανσης στο περιβάλλον, όπως π.χ. στο έδαφος, στον υδροφόρο ορίζοντα, σε υγρά απόβλητα, λάσπες, απόβλητα βιομηχανικών μονάδων και αέρια (Cerniglia C. E., 1992, Shuttleworth K. L., and C. E. Cerniglia, 1995, Henner et al., 1997, Alexander et al., 1999, Olson et al., 2003, Chadhain et al., 2006, Shrestha et al., 2009, Wick and Daniels, 2011).

Αφορά τη διάσπαση οργανικών και ανόργανων ρύπων με αντιδράσεις που καταλύονται από μικροοργανισμούς (Alexander, 1981 and 1994), χωρίς τη χρήση χημικών ενώσεων και με μικρότερο κόστος (Haritash and Kaushik, 2009) σε επίπεδα συγκεντρώσεων, τα οποία να είναι είτε μη ανιχνεύσιμα, είτε εφόσον είναι ανιχνεύσιμα, να είναι χαμηλότερα από τα όρια ασφάλειας ή τα αποδεκτά όρια που ορίζει η νομοθεσία κάθε κράτους.

Η βιοαποκατάσταση μπορεί να επιτευχθεί είτε με βιοδιέγερση (biostimulation) είτε με βιοενίσχυση (bioaugmentation) είτε με συνδιασμό αυτών (Silva et al., 2004, Dua et al., 2002, Trindale et al., 2005). Τόσο η βιοδιέγερση όσο και η βιοενίσχυση αποτελούν συμφέρουσες μεθόδους αποκατάστασης του εδάφους αφού εφαρμόζονται επί τόπου.

Η **βιοδιέγερση** βασίζεται στη χρήση των αυτόχθονων μικροοργανισμών του εδάφους μετά από προσθήκη θρεπτικών υλικών (Yu et al., 2005, Scow and Hicks, 2005, Silva et al., 2004, Widada et al., 2002, Bento et al., 2004, Seklemova et al., 2001, Liebeg and Cutright, 1999) με αποτέλεσμα την επιτυχή αποδόμηση των ρυπογόνων ουσιών (Mills and Frankenberger, 1994, Yu et al., 2005, Gallego et al., 2002, Leys et al., 2005). Υπάρχουν βέβαια περιπτώσεις όπου η βιοδιέγερση δεν έχει κανένα αποτέλεσμα και άλλες όπου η αποδόμηση είναι μικρότερη (Johnson and Scow, 1999, Ruberto et al., 2003, Major et al., 2002, Seklemova et al., 2001, Bento et al., 2004). Αυτό ίσως οφείλεται στην ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και όχι αυτών που αποδομούν την ένωση που ενδιαφέρει (Johnson and Scow, 1999, Swindoll, 1988), στην κατανάλωση άλλων πηγών άνθρακα (Johnson and Scow, 1999, Entry et al., 1993) καθώς και στο ποσοστό μεταβολής της οργανικής ένωσης σε ανόργανα συστατικά (ανοργανοποίηση) (Johnson and Scow, 1999, Leys et al., 2005, Yu et al., 2010).

Η **βιοενίσχυση** βασίζεται στον εμβολιασμό μικροοργανισμών, οι οποίοι αποδομούν την ένωση που ενδιαφέρει (Yu et al., 2005, Silva et al., 2004, Top et al., 2002, Fantroussi and Agathos, 2005, Scow and Hicks, 2005, Bento et al., 2004). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να έχουν απομονωθεί από την ίδια ρυπασμένη περιοχή και εμβολιάζονται εκ νέου σε αυτήν, μπορεί να έχουν απομονωθεί από διαφορετική περιοχή ή να είναι γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί. Παρά τις αναφορές που αποδεικνύουν την χρησιμότητα της βιοενίσχυσης (Kastner et al., 1998, Major et al. 2002, Jouanneau et al., 2005) υπάρχουν περιπτώσεις που έχει αποτύχει (Goldstein et al., 1985, Thomassin-Lacroix et al., 2002, Bouchez et al., 2000) και αυτό οφείλεται σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες. Η ταχεία μείωση και ο θάνατος του πληθυσμού των εξωτερικά προστιθέμενων μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί σε εργαστηριακές συνθήκες, ο ανταγωνισμός τους με τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και αποδεκτών ηλεκτρονίων, η πρόσληψη άλλων πηγών άνθρακα εκτός της ρυπογόνου ουσίας και η χαμηλή συγκέντρωση αυτής καθώς και η παρουσία ριζών που απελευθερώνουν οργανικές ενώσεις επηρεάζουν δραστικά το αποτέλεσμα της βιοενίσχυσης (Juhasz and Naidu, 2000, Thomassin-Lacroix et al., 2002, Fantroussi and Agathos, 2005).

Υπάρχουν αναφορές όπου τα νιτρικά χρησιμοποιούνται ως τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων κατά την βιοαποδόμηση των PAHs, όπως στην περίπτωση ανοργανοποίησης του ναφθαλενίου (Al-Bashir et al., 1990) καθώς επίσης κατά την αποδόμηση του ακεναφθενίου υπό αναερόβιες συνθήκες (Mihelcic and Luthy, 1988). Παράλληλα, παρατηρήθηκε αποδόμηση των 2-μεθυλναφθαλενίου, φλουορενίου και του φαινανθρενίου κάτω από συνθήκες αναγωγής νιτρικών (Eriksson et al., 2003).

## 1.2 Ακτινοβακτήρια

Τα Ακτινοβακτηρία είναι μια ομάδα θετικών κατά Gram βακτηρίων με υψηλή περιεκτικότητα γουανίνης και κυτοσίνης (%G+C) στο DNA τους. Αν και είναι μονοκύτταρα όπως τα βακτήρια, δεν έχουν διακριτό κυτταρικό τοίχωμα, αλλά σχηματίζουν αερόβια μυκήλια, που είναι περισσότερο λεπτά, γνωστά ως υπόστρωμα και εναέρια. Συμπεριλαμβάνονται σε μερικούς από τους πιο κοινούς τύπους του εδάφους, του γλυκού νερού και των θαλασσών, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην αποσύνθεση των οργανικών υλικών, όπως την κυτταρίνη και τη χιτίνη, παίζοντας έτσι ένα σημαντικό ρόλο στη μετατροπή της οργανικής ύλης, στον κύκλο του άνθρακα και στην αναπλήρωση της ποσότητας των θρεπτικών ουσιών στο έδαφος. Τα Ακτινοβακτήρια παράγουν μια ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών με υψηλό φαρμακολογικό και εμπορικό ενδιαφέρον. Με την ανακάλυψη της ακτινομυκίνης, ένας αριθμός αντιβιοτικών ανακαλύφθηκε από τα Ακτινοβακτηρία, ιδιαίτερα από το γένος *Streptomyces*. Είναι ευρέως διαδεδομένα στο έδαφος με υψηλή ευαισθησία στα οξέα και το χαμηλό pH. Τα Ακτινοβακτήρια έχουν μια σειρά από σημαντικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων αποικοδόμησης/αποσύνθεσης όλων των ειδών των οργανικών ουσιών όπως κυτταρίνη, πολυσακχαρίτες, λιποπρωτεΐνες, οργανικά οξέα, όπως επίσης έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν ένα ευρύ φάσμα υδρογονανθράκων, φυτοφαρμάκων, καθώς και αλειφατικών και αρωματικών ενώσεων. Παράγουν έναν αριθμό αντιβιοτικών, όπως στρεπτομυκίνη, τετραμυκίνη, ορεομυκίνη. Αναπαράγονται με δυαδική σχάση ή με παραγωγή σπόρων. Η μορφολογία των Ακτινοβακτηρίων είναι συμπαγής, συχνά δερματώδης, δίνοντας μια κωνική όψη. Το μυκήλιο του υποστρώματος των Ακτινοβακτηρίων ποικίλει σε μέγεθος, σχήμα, και πάχος, ενώ το χρώμα του ποικίλει από λευκό ή σχεδόν άχρωμο έως κίτρινο, καφέ, κόκκινο, ροζ, πορτοκαλί, πράσινο ή μαύρο. Η μορφολογία των Ακτινοβακτηρίων παίζει σημαντικό ρόλο στην ταυτοποίησή τους, η οποία χρησιμοποιήθηκε στις πρώτες περιγραφές των ειδών *Streptomyces*. Διάφορες μορφολογικές παρατηρήσεις, συμπεριλαμβανομένων της βλάστησης των σπορίων, την επιμήκυνση και διακλάδωση του φυτικού μυκηλίου, το σχηματισμό εναέριου μυκηλίου, το χρώμα του εναέριου μυκηλίου και η παραγωγή χρωστικής έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση Ακτινοβακτηρίων. Η μικροσκοπία φωτός χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί ο σχηματισμός του εναέριου μυκηλίου και η μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των σπορίων, της επιφάνειας των σπορίων καθώς και της δομής τους (Holt JG. et al., 1994). Τα μεσόφιλα Ακτινοβακτηρία μπορούν να αναπτυχθούν σε βέλτιστη θερμοκρασία από 20°C έως 42°C, μεταξύ των οποίων υπάρχουν τα θερμοανθεκτικά είδη, τα οποία μπορούν να επιβιώσουν στους 50°C. Τα μέτρια θεμόφιλα Ακτινοβακτήρια έχουν βέλτιστη ανάπτυξη στους 45°C-55°C, ενώ τα αυστηρά θεμόφιλα Ακτινοβακτηρία αναπτύσσονται στους 37°C-65°C με βέλτιστη θερμοκρασία στους 55°C-60°C. Οι θερμοκρασίες επώασης 28°C, 37°C και 45°C θεωρούνται βέλτιστες για απομόνωση από το έδαφος μεσόφιλων, θερμοανθεκτικών και μέτρια θεμόφιλων Ακτινοβακτηρίων. Τα οξεοφιλικά Ακτινοβακτηρία, τα οποία είναι κοινά στα χερσαία περιβάλλοντα, όπως τα όξινα δάση, αναπτύσσονται στην περιοχή pH από περίπου 3.5 έως 6.5, με βέλτιστες τιμές pH 4.5 έως 5.5. Περίπου το 15% του παγκόσμιου άζωτο καθορίζεται φυσικά από τις συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ των διαφόρων ειδών *Frankia* που ανήκουν στην οικογένεια των Ακτινοβακτηρίων. Τα Ακτινοβακτήρια είναι καλά αναγνωρισμένα για την παραγωγή πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν σημαντικές εφαρμογές σε διάφορους τομείς.

Επίσης, είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή με ευρεία γκάμα σημαντικών ενζύμων, τα οποία παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα. Μεγάλος αριθμός αντιβιοτικών λαμβάνεται από τα Ακτινοβακτηρία. Παράγουν αναστολείς ενζύμων χρήσιμων για τη θεραπεία του καρκίνου, ενώ ενισχύουν την απόκριση του ανοσοποιητικού. Μέλη πολλών γενών Ακτινοβακτηρίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενδεχομένως στη βιομετατροπή γεωργικών και αστικών αποβλήτων σε χημικά προϊόντα υψηλής αξίας. Τα Ακτινοβακτήρια είναι επίσης σημαντικά στην βιοτεχνολογία των φυτών ως στελέχη με ανταγωνιστική δραστηριότητα έναντι παθογόνων φυτών. Το μεταβολικό δυναμικό τους προσφέρει μια ισχυρή περιοχή για έρευνα. Η βιταμίνη B<sub>12</sub> που υπάρχει στη φύση μπορεί να παραχθεί από βακτήρια ή Ακτινοβακτήρια. Κατέχουν πολλές ιδιότητες που τα καθιστούν καλούς υποψήφιους για εφαρμογή στη βιοαποκατάσταση εδαφών μολυσμένων με οργανικούς ρύπους. Σε ορισμένες μολυσμένες περιοχές, τα Ακτινοβακτήρια αντιπροσωπεύουν την κυρίαρχη ομάδα μεταξύ των αποικοδομητών. Ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση του οργανικού άνθρακα και είναι σε θέση να αποδομούν συμπλέγματα πολυμερών. Πολλά στελέχη Ακτινοβακτηρίων έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν τη λιγνίνη και να αποικοδομούν ενώσεις της λιγνίνης παράγοντας αποικοδομητικά ένζυμα κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και εξωκυττάριας υπεροξειδάσης. Τα Ακτινοβακτηρία έχουν τη δυνατότητα να ζούν σε ελαιώδες περιβάλλον και ως εκ τούτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιοαποκατάσταση με σκοπό τη μείωση των ρύπων του πετρελαίου (Anandan et al., 2016, Ventura et al., 2007).

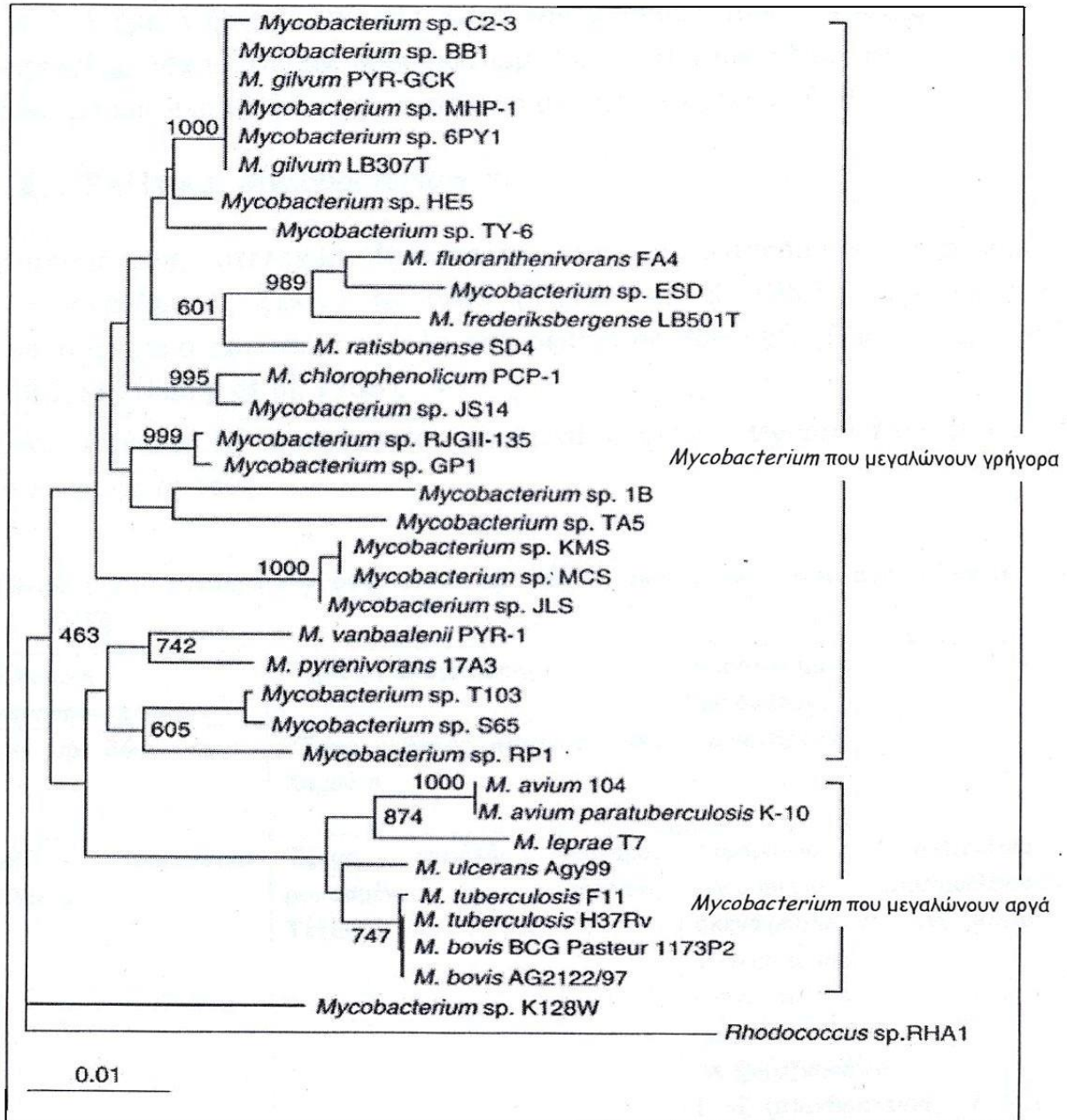
### 1.3 *Mycobacterium* sp.

Μικροοργανισμοί που αποδομούν PAHs έχουν ευρέως περιγραφεί (Juhasz and Naidu, 2000, Van Hamme et al., 2003, Koukkou and Vandera, 2011) συμπεριλαμβανομένου μελών του γένους *Mycobacterium*, το οποίο θεωρείται από τα πιο αντιπροσωπευτικά της κατηγορίας (Wick et al., 2003, Karabika et al., 2009). Πρόσφατες αναφορές στην φυσιολογία των Μυκοβακτηρίων που αποδομούν PAHs προτείνουν ότι στελέχη του γένους *Mycobacterium* πολλαπλασιάζονται στο ολιγότροφο περιβάλλον των εδαφών ρυπασμένων με PAHs. Επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποκατάσταση των εδαφών αυτών (Brezna et al., 2003, Uytterbroek et al., 2006).

Συγκεκριμένα, τα *Mycobacterium* sp. είναι ευβακτήρια ανήκουν στους Ακτινομύκητες, όπου συμπεριλαμβάνονται τα *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Gordonia*, *Corynebacterium* και *Dietzia* (Kim et al., 2010, Stackebrandt et al., 1997). Το γένος *Mycobacterium* αποτελείται από αερόβια, ραβδοειδή βακτήρια που είναι ανθεκτικά στον αποχρωματισμό από οξέα, δηλαδή αποχρωματίζονται δύσκολα με την επίδραση διαλύματος 1% υδροχλωρικού οξέος σε αιθανόλη, διότι είναι κύτταρα πλούσια σε μουκολικά οξέα (Primm et al., 2004). Αναφέρεται ως ένα από τα γένη που βρίσκεται σε αφθονία και αντιπροσωπεύει περίπου το 2.6% όλης της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (Floyd et al., 2005). Επίσης ανήκουν σε μία μεγάλη ομάδα Gram-θετικών βακτηρίων, έχουν υψηλή περιεκτικότητα γουανίνης + κυτοσίνης (G+C%) (Barton et al., 2007) και διακρίνονται σε στελέχη που αναπτύσσονται γρήγορα (σε λιγότερο από 7 μέρες – fast growing) και σε στελέχη που αναπτύσσονται αργά (σε χρόνο μεγαλύτερο από μία εβδομάδα – slow growing) (Stahl and Urbance, 1990, Hartmans et al., 2006, Kim et al., 2010).



Συνήθως, τα δεύτερα είναι παθογόνα όπως τα είδη *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. leprae* και *M. ulcerans* (Εικόνα 1.2). Τα μυκοβακτήρια που αναπτύσσονται γρήγορα και αποδομούν PAHs περιέχουν μία διατηρημένη μικρή έλικα στις θέσεις 451–482 (*E. coli* 16S rRNA numbering), ενώ αυτά που αναπτύσσονται αργά παρουσιάζουν μία εκτεταμένη ελικοειδή δομή (Kim et al., 2010).



**Εικόνα 1.2:** Φυλογενετικό δέντρο στελεχών *Mycobacterium* sp. με βάση την αλληλουχία 16S rRNA, το οποίο δείχνει τη σχέση στελεχών *Mycobacterium* που μεγαλώνουν γρήγορα με αυτά που μεγαλώνουν αργά (Kim et al., 2010).



Τα Μυκοβακτήρια έχουν σύνθετη και εξαιρετικά υδρόφοβη κυτταρική μεμβράνη, πλούσια σε μουκολικά οξέα, με εξαιρετικό πάχος (Hartmans et al., 2006). Η υδροφοβικότητά τους παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας της ικανότητάς τους να αποδομούν χαμηλές συγκεντρώσεις PAHs σε περιβαλλοντικά υποστρώματα. Το τοίχωμά τους αποτελείται από πεπτιδογλυκάνες και δρά ως επιφανειοδραστική ουσία που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των PAHs (Bastiaens et al., 2000, Wick et al., 2002a, 2003a). Το υδρόφοβο τοίχωμα ευνοεί την επαφή με εξαιρετικά λιπόφιλα μόρια PAHs, επομένως διευκολύνει την πρόσληψή τους και κυρίως των HMW-PAHs. Έχει αναφερθεί ότι τα Μυκοβακτήρια μεταβάλλουν την σύσταση του τοιχώματός τους ανάλογα με τη φύση της πηγής άνθρακα (Wick et al., 2003b). Τα *Mycobacterium sp.* που αναπτύχθηκαν σε υδρόφοβα υποστρώματα παράγουν μουκολικά οξέα με μεγαλύτερες ανθρακικές αλυσίδες αυξάνοντας μέχρι 70 φορές την προσκόλληση σε PAHs από ότι τα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε γλυκόζη (Wick et al., 2002 a,b). Ωστόσο έχουν αργό ρυθμό ανάπτυξης και σχηματίζουν συσσωματώματα (Kim et al., 2010).

### 1.3.1 PAHs και *Mycobacterium sp.*

Η απομόνωση στελεχών *Mycobacterium sp.* που αποδομούν PAHs ξεκίνησε από το 1965 (Traxler et al., 1965), αλλά σημαντική πρόοδος παρατηρήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '80 (Guerin and Jones, 1988, Heitkamp et al., 1988). Στον Πίνακα 1.1 αναφέρονται ορισμένα στελέχη *Mycobacterium* και τα υποστρώματά τους (Kim et al., 2010).

Πίνακας 1.1: Στελέχη *Mycobacterium sp.* και τα υποστρώματα που αποδομούν (Kim et al., 2010).

Στελέχη <i>Mycobacterium</i>	Περιοχή απομόνωσης	Υποστρώματα που αποδομούν	Αναφορά
<i>M. sp.</i> BG1	Ίζημα εκβολής ποταμού, Νέο Χαμσάιρ	φαινανθρένιο	Guerin and Jones (1988)
<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1 <sup>T</sup>	Ίζημα εκβολής ποταμού ρυπασμένου με πετρέλαιο, Τέξας	Διφαινύλιο, ναφθειλένιο, φλουορένιο, ακεναφθένιο, ακεναφθαλένιο, ανθρακένιο, 1-νιτροπυρένιο, φαινανθρένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο, βενζο(α)πυρένιο, βενζο(α)ανθρακένιο, 7-12-διμεθυλοβενζο(α)ανθρακένιο, διβενζοθειοφαίνιο, δωδεκάνιο, δεκαεξάνιο	Heitkamp and Cerniglia (1988), Khan et al. (2002), Kim et al. (2005)
<i>M. vaccae</i> JOB-5	Έδαφος	Τριχλωροαιθυλένιο, μακρίας αλυσίδας/ μονοαρωματικοί υδρογονάνθρακες	Wackett et al. (1989)
<i>M. sp.</i> RJGII-135	Εργοστάσιο επεξεργασίας κάρβουνου, Ιλλινόις	Ανθρακένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο,	Grosser et al. (1991)

		βενζο(α)πυρένιο, βενζο(α)ανθρακένιο, καρβαζόλιο	
<i>M. sp.</i> BB1	Εργοστάσιο επεξεργασίας κάρβουνου, Γερμανία	Φαινανθρένιο, φλουορένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο	Boldrin et al. (1993)
<i>M. chlorophenolicum</i> PCP-1 <sup>T</sup>	Έδαφος ρυπασμένο με χλωροφαινόλη, Φιλανδία	Πενταχλωροφαινόλη και άλλες πολυχλωριομένες φαινόλες	Häggbloom et al. (1994)
<i>M. gilvum</i> VF1	Ρυπασμένο έδαφος, Γερμανία	Ναφθαλένιο, φαινανθρένιο, ανθρακένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο	Kästner et al. (1994)
<i>M. hodleri</i> EM12 <sup>T</sup>	Έδαφος ρυπασμένο με φλουορανθένιο/βενζο(α)πυρένιο	Φλουορανθένιο	Kleespies et al. (1996)
<i>M. gilvum</i> PYR-GCK	Ίζημα ποταμού, Ιντιάνα	Φαινανθρένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο	Dean-Ross and Cerniglia (1996)
<i>M. sp.</i>	Έδαφος	Φαινανθρένιο, πυρένιο	Jimenez and Bartha (1996)
<i>M. sp.</i> HL 4-NT-1	Έδαφος, Γερμανία	Νιτροτολουόλιο, 6-αμινο-μ- κρεζόλη, νιτροβενζόλιο, νιτροφαινόλη	Spiess et al. (1998)
<i>M. sp.</i> KR2/KR20	Πρώην περιοχή εργοστασίου επεξεργασίας κάρβουνου	Πυρένιο, φλουορανθένιο	Rehmann et al. (1998, 2001)
<i>M. sp.</i> T103/T104	Χαντάκι αποχέυτσης, Μασσαχουσέτη	Τολουόλιο, ο-ξυλόλιο, μ- ξυλόλιο, π-ξυλόλιο	Tay et al. (1998)
<i>M. sp.</i> MR-1	Ρυπασμένο ίζημα ποταμού, Νέα Υόρκη	Φαινανθρένιο, πυρένιο	Molina et al. (1999)
<i>M. austroafricanum</i> IFP2173	Υπόγεια νερά ρυπασμένα με βενζίνη, Γαλλία	Τολουόλιο, μ-ξυλόλιο, π- ξυλόλιο, η-αλκάνια, μεθυλ- υποκατεστημένα αλκάνια	Solano-Serena et al. (2000)
<i>M. fortuitum</i> NF4/ <i>M. ratisbonense</i> SD4	Ενεργοποιημένη ίλη υπονόμων, Γερμανία	Πολυδιακλαδισμένοι υδρογονάνθρακες (Σκουαλένιο), <i>cis</i> -1,4- πολυισοπροπένιο (Καουτσούκ)	Berekaa and Steinbüchel (2000), Linos et al. (2000)
<i>M. gilvum</i> LB307T	Έδαφος και ίλη ρυπασμένα με PAHs, Βέλγιο	Ανθρακένιο, φαινανθρένιο	Bastiaens et al. (2000)
<i>M. frederiksbergense</i> LB501T	Έδαφος και ίλη ρυπασμένα με PAHs, Βέλγιο	Ανθρακένιο	Bastiaens et al. (2000)
<i>M. frederiksbergense</i> Fan9 <sup>T</sup>	Έδαφος ρυπασμένο με πίσσα, Δανία	Φαινανθρένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο	Willumsen et al. (2001)
<i>M. sp.</i> C2-3	Έδαφος ρυπασμένο με πετρέλαιο, Κορέα	Φαινανθρένιο, φλουορένιο, φλουορανθένιο, πυρένιο, η- αλκάνια	Lee et al. (2001)
<i>M. sp.</i> AP1	Άμμος ρυπασμένη με	Φαινανθρένιο, πυρένιο,	Vila et al.



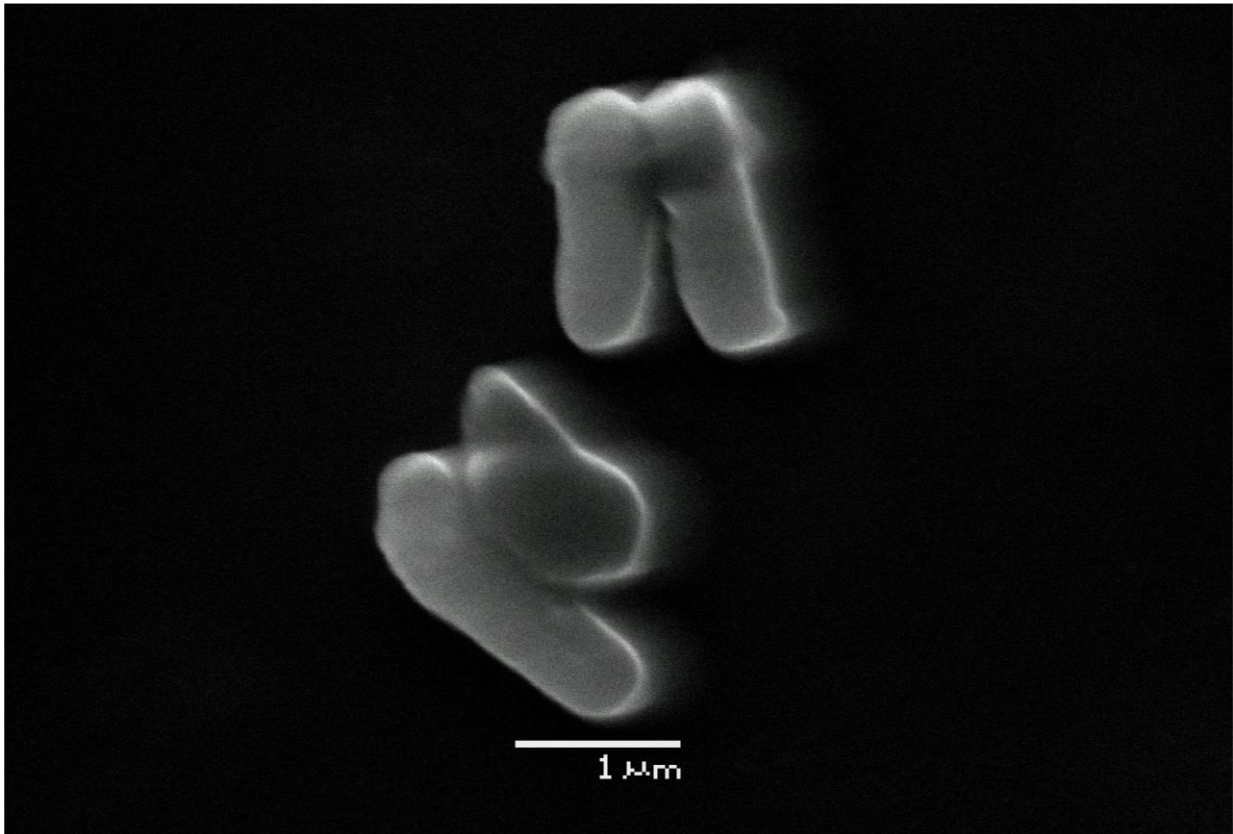
	ακατέργαστο πετρέλαιο, Ισπανία	φλουορανθένιο	(2001)
<i>M. phlei</i> WU-F1	Έδαφος και θαλάσσιο νερό, Ιαπωνία	Διβενζοθειοφαίνιο και τα παράγωγά του	Furuya et al. (2001)
<i>M. austroafricanum</i> GTI-23	Πρώην περιοχή εργοστασίου επεξεργασίας κάρβουνου, Αϊόβα	Φαινανθρένιο, φλουορένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο, βενζο(α)πυρένιο, δωδεκάνιο, δεκαεξάνιο	Bogan et al. (2003)
<i>M. gilvum</i> B1		Φαινανθρένιο, πυρένιο, χρυσένιο, βενζο(α)πυρένιο	Gauthier et al. (2003)
<i>M. sp.</i> 6PY1	Έδαφος ρυπασμένο με PAHs, Γαλλία	Φαινανθρένιο, πυρένιο	Krivobok et al. (2003)
<i>M. sp.</i> 1B	Έδαφος εργοστασίου επεξεργασίας κάρβουνου, Αυστραλία	Φαινανθρένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο	Dandie et al. (2004)
<i>M. pyrenivorans</i> 17A3 <sup>T</sup>	Έδαφος ρυπασμένο με PAHs, Γερμανία	Φαινανθρένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο	Derz et al. (2004)
<i>M. fluoranthenivorans</i> FA4 <sup>T</sup>	Έδαφος ρυπασμένο με PAHs, Γερμανία	Φλουορανθένιο	Hormisch et al. (2004)
<i>M. sp.</i> JLS/KMS/MCS	Έδαφος ρυπασμένο με PAHs, Μοντάνα	Πυρένιο	Miller et al. (2004)
<i>M. sp.</i> MHP-1	Έδαφος, Ιαπωνία	Πυρένιο	Habe et al. (2004)
<i>M. sp.</i> S65	Έδαφος ρυπασμένο με καύσιμα αεριωθούμενου, Κεμπέκ	Φαινανθρένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο	Sho et al. (2004)
<i>M. sp.</i> CP1/CP2/CF+2/CF+6	Έδαφος ρυπασμένο με κρεοζωτέλαιο, Ισπανία	Ναφθαλένιο, φαινανθρένιο, ανθρακένιο, ακεναφθένιο, διβενζοθειοφαίνιο, φλουορένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο, δεκαεξάνιο, πρις	López et al. (2005)
<i>M. sp.</i> DM-11	Περιοχή εργοστασίου επεξεργασίας κάρβουνου, Γερμανία	Μονοκυκλικές ετεροαρωματικές ενώσεις	Rappert et al. (2006)
<i>M. sp.</i> SNP11	Έδαφος εμπλουτισμένου με πυρένιο, Γαλλία	Φαινανθρένιο, φλουορένιο, πυρένιο, φλουορανθένιο	(Pagnout et al., 2006)
<i>M. sp.</i> TY-6	Έδαφος εμπλουτισμένου με προπάνιο, Ιαπωνία	<i>n</i> -Αλκάνια	Kotani et al. (2006)

Από τον παραπάνω πίνακα είναι σαφές ότι στελέχη *Mycobacterium sp.* έχουν απομονωθεί από διάφορες περιοχές με μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων. Τα περισσότερα στελέχη που αποδομούν PAHs θεωρείται ότι ανήκουν σε αυτά που αναπτύσσονται γρήγορα.

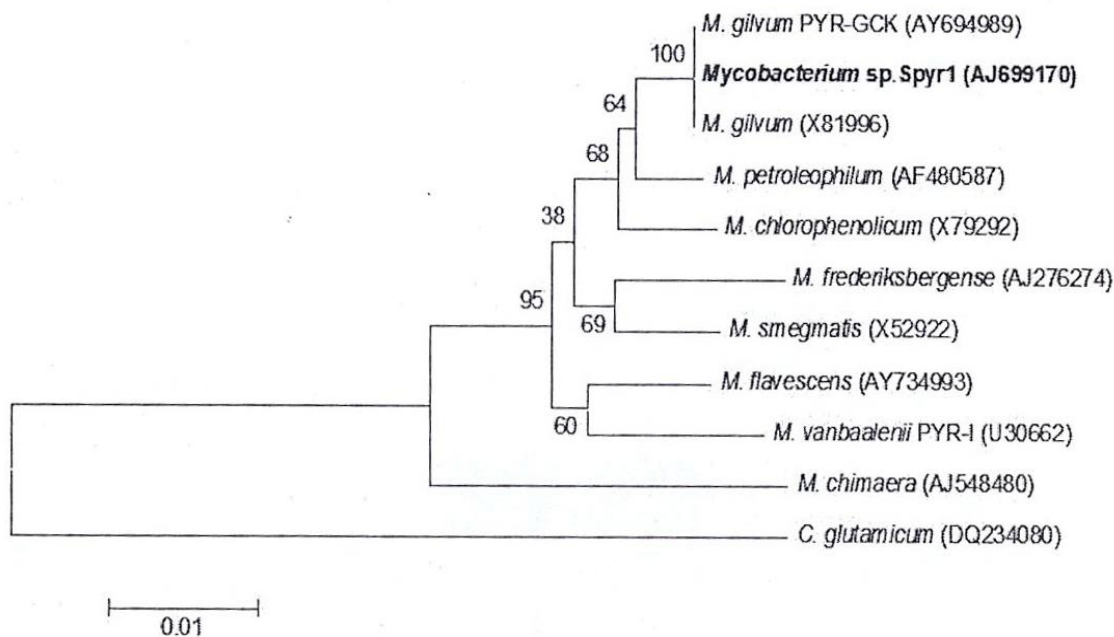
### 1.3.2 Απομόνωση και Χαρακτηρισμός του στελέχους Spyr1

Το *Mycobacterium sp.* Spyr1 απομονώθηκε σχετικά πρόσφατα από έδαφος περιοχής ρυπασμένης με κρεοζωτέλαιο. Συγκεκριμένα, απομονώθηκε στην Περίβλεπτο, Ήπειρος (12 km βόρεια της πόλης των Ιωαννίνων), όπου για πάνω από 30 χρόνια λειτουργούσε μία βιομηχανία ξυλείας (Karabika et al., 2009). Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο εμπλουτισμού όπου το πυρένιο χρησιμοποιήθηκε ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η μικροβιακή αποδόμηση αποτελεί μία φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο μέσω της οποίας οι PAHs μπορούν να απομακρυνθούν από το περιβάλλον. Η ολοκλήρωση της ανάλυσης του γονιδιώματος του Spyr1 από το JGI (Joint Genome Institute) έδειξε ότι το γονιδιώμα του αποτελείται από ένα χρωμόσωμα με μέγεθος 5.547.747 ζευγών βάσεων, 68% περιεκτικότητα GC και σε αυτό εντοπίζονται 5.185 γονίδια και δύο πλασμίδια pMSPRY101 και pMSPRY102, ένα μεγάλο και ένα μικρό με μεγέθη 211.864 ζεύγη βάσεων, 66% περιεκτικότητα GC που φέρει 223 γονίδια και 23.681 ζεύγη βάσεων, 64% περιεκτικότητα GC και περιέχει 23 γονίδια, αντίστοιχα (Kallimanis et al., 2011). Συνολικά έχουν προβλεφθεί 5.434 γονίδια από τα οποία τα 5.379 κωδικεύουν πρωτεΐνες. Στην πλειοψηφία των γονιδίων έχει αποδοθεί συγκεκριμένη λειτουργία (putative function), ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες είναι υποθετικές (hypothetical proteins) (Kallimanis et al. 2011). Το στέλεχος Spyr1 με βάση τα μορφολογικά και γενομικά χαρακτηριστικά του ανήκει στο γένος *Mycobacterium* (Karabika et al., 2009) (Εικόνα 1.4). Το Spyr1 είναι ικανό να αποδομεί ευρεία γκάμα υποστρωμάτων των PAHs συμπεριλαμβανομένων το πυρένιο, φλουορανθένιο, φλουορένιο, ανθρακένιο και ακεναφθένιο (Καλλιμάνης Α. Διδακτορική Διατριβή, 2004, Karabika et al., 2009, Kallimanis et al., 2011), ενώ μεταβολίζει το πυρένιο σε 1-υδρόξυ-2-ναφθοϊκό οξύ, το οποίο στη συνέχεια αποδομείται μέσω ortho-φθαλικού οξέος (Karabika et al., 2009) (Σχήμα 1.4). Ολική αποδόμηση πυρενίου σε συγκέντρωση 80mg/ml πραγματοποιείται σε περίπου 8 ημέρες επώασης στο σκοτάδι (Karabika et al., 2009), ενώ δεν απαιτείται προσθήκη βιταμινών ή αλάτων για την ανάπτυξη του στελέχους αυτού με οποιοδήποτε PAH σε αντίθεση με άλλα στελέχη *Mycobacterium* (Heitkamp et al., 1988, Kallimanis et al., 2011), αντίθετα στο *Mycobacterium tuberculosis* απαιτείται προσθήκη αλάτων στο θρεπτικό ανάπτυξης (Piddington et al., 2000). Οπτική και μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων έδειξε ότι πρόκειται για αερόβια, μη κινητήρια ραβδία με μέγεθος κυττάρων περίπου 1.5-2.0 x 3.5-5.0 μm (Εικόνα 1.3). Η ανάπτυξη αποικιών σε τρυβλία πλήρους θρεπτικού μέσου απαιτεί 2-3 ημέρες και οι αποικίες χρωματίζονται ελαφρώς κίτρινες. Η θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται στους 4-37°C με βέλτιστη στους 30-37°C, ενώ το pH κυμαίνεται από 6.5-8.5 με βέλτιστο στο 7.0-7.5. Ο μικροβιολογικός χαρακτηρισμός του στελέχους πραγματοποιήθηκε με χρώση κατά Gram όπου έδωσε ένα ασθενώς θετικό αποτέλεσμα. Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του στελέχους έδειξε ότι εμφανίζει δραστικότητα αναγωγής νιτρικών και καταλάσης, ενώ δεν εμφανίζει δραστικότητα ζελατινάσης, λιπάσης, οξειδάσης, λυσίνης, ουριάσης, αμυλάσης, υδρολάσης της αργινίνης, αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης, αφομοίωσης των κιτρικών, παραγωγής H<sub>2</sub>S και ικανότητα ζύμωσης των γλυκόζη, λακτόζη, σακχαρόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη, γλυκερόλη, ινοσιτόλη, μαλτόζη, μανιτόλη, ραφινόζη, σορβιτόλη, τρεχαλόζη και ξυλόζη.

Η λιπιδική ανάλυση έδειξε ότι τα κυριότερα φωσφολίπια είναι η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) και η διφωσφατιδυλογλυκερόλη (DPG) σε ποσοστό 80.4, 4.7 και 15.0%, αντίστοιχα (Καλλιμάνης Α. Διδακτορική Διατριβή, 2004, Karabika et al., 2009, Kallimanis et al., 2011). Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που ανιχνεύθηκαν ήταν το ακόρεστο 16:1, το κορεσμένο 16:0, το ακόρεστο 18:1, το κορεσμένο 18:0 και το κορεσμένο 19:0 σε ποσοστό 16.7, 32.9, 47.5, 1.0, 1.1% ,αντίστοιχα (Καλλιμάνης Διδακτορική Διατριβή, 2004, Karabika et al., 2009, Kallimanis et al., 2011). Το στελέχος *Spyr1* βρέθηκε ευαίσθητο σε ποικίλα αντιβιοτικά και εμφάνισε ανθεκτικότητα σε 10 mg/L χλωραμφαινικόλης, 10 mg/L ερυθρομυκίνης, 10 mg/L ριφαμπικίνης και 10 mg/L τετρακυκλίνης (Καλλιμάνης Α. Διδακτορική Διατριβή, 2004, Karabika et al., 2009, Kallimanis et al., 2011). Το % περιεχόμενο G+C του γονιδιωματικού DNA του στελέχους *Spyr1* ήταν 67%. Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA έδειξε ότι έχει ομολογία 99% με στελέχη του γένους *Mycobacterium sp.* με πλησιέστερο το *Mycobacterium gilvum* (Καλλιμάνης Α. Διδακτορική Διατριβή, 2004, Karabika et al., 2009, Kallimanis et al., 2011) (Εικόνα 1.4).



**Εικόνα 1.3:** Μικροσκοπική ανάλυση *Mycobacterium gilvum* στελέχος *Spyr1* (Kallimanis et al., 2011).



**Εικόνα 1.4:** Φυλογενετικό δένδρο χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την αλληλουχία των 16S r DNA γονιδίων (Kallimanis et al., 2011).

Η αλληλουχία κατατέθηκε στο Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (EBI) με αριθμό πρόσβασης στην τράπεζα EMBL για το Spyr1: AJ699170 (Καλλιμάνης Α. Διδακτορική Διατριβή, 2004, Karabika et al., 2009, Kallimanis et al., 2011).

## 1.4 Οικογένεια Μεταφορέων Νιτρικών/Νιτρωδών (NNP)

### 1.4.1 Πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς

Η διαμεμβρανική μεταφορά αποτελεί μια από τις θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες που συνδέεται τόσο με τη φυσιολογία και τις οικολογικές προσαρμογές των μικροοργανισμών όσο και με τη διατήρηση της ομοιοστασίας και την εμφάνιση και εξέλιξη παθολογιών του ανθρώπινου οργανισμού, παρ'όλα αυτά όμως δεν έχει κατανοηθεί πλήρως ως προς τους μηχανισμούς της σε μοριακό επίπεδο. Το γεγονός αυτό οφείλεται στον υψηλά υδρόφοβο και αμφιπαθικό χαρακτήρα των πρωτεϊνών διαμεμβρανικής μεταφοράς, όπως επίσης και τα χαμηλά επίπεδα έκφρασής τους (Daws, 2009, Tavourari et al., 2009). Κεντρικό ρόλο στη λειτουργία του δικτύου κυτταρικής επικοινωνίας διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες διαμεμβρανικής μεταφοράς που μετάγουν περιβαλλοντικά ή ενδογενή σήματα από και προς τα κύτταρα, προωθώντας με κατάλληλο τρόπο τη μεταφορά πηγών θρέψης, ιόντων, ρυθμιστικών μηνυμάτων, μεταβολιτών ή τοξικών ουσιών (Gouaux, 2009, Rudnick, 2006). Η οικογένεια των μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών NNP (nitrate/nitrite porters) ανήκει στην γνωστού δομικού προτύπου Μείζονος Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης Μεταφοράς (Major Facilitator Superfamily - MFS) (Yan N., 2013), η οποία αποτελεί μια κατηγορία διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (Saier et al., 2009, 1999, Pao et al., 1998).

Πρόκειται για οικογένειες μεταφορέων δευτερογενούς τύπου, δηλαδή εξαρτώμενων από διαβαθμίσεις ιόντων, μεταφορέων με μοντέλα δομής που προβλέπουν έντονες αλλαγές διαμόρφωσης και εμφανίζουν έντονο ενδιαφέρον περιβαλλοντικής σημασίας. Η MFS υπεροικογένεια αποτελείται από μεταφορείς που βρίσκονται σε όλα τα είδη ζωής (Pao et al., 1998). Η οικογένεια 8 αυτής της υπεροικογένειας αποτελείται από τις NNP πρωτεΐνες. Φυλογενετική ανάλυση των NNP βακτηρίων ταυτοποίησε δύο υπο-ομάδες (Ramirez et al., 2000, Moir and Wood, 2001). Οι πρωτεΐνες τύπου I προτάθηκαν ως συμμεταφορείς  $H^+/NO_3^-$ , όπου απαιτείται μία βαθμίδωση της συγκέντρωσης πρωτονίου. Οι πρωτεΐνες τύπου II χαρακτηρίστηκαν ως αντιμεταφορείς νιτρικών/νιτρώδων, οι οποίοι έχουν μειωμένη δραστηριότητα απουσία νιτρώδων (Wood et al., 2002). Πρωτεΐνες που λειτουργούν με μηχανισμό ενεργού μεταφοράς “δευτερογενούς” τύπου, δηλαδή προσλαμβάνουν ενέργεια από ηλεκτροχημικές διαβαθμίσεις ιόντων για να ωθήσουν τη συσσώρευση των υποστρωμάτων τους αντίθετα προς τη διαβάθμιση συγκεντρώσεων εκατέρωθεν της μεμβράνης. Από το 2003 και μετά ξεκίνησε η μελέτη επίλυσης των αντιπροσωπευτικών κρυσταλλικών δομών τους (Abramson et al., 2003, Yan N., 2013). Πρόκειται για τις πρωτεΐνες-μεταφορείς που έχουν την πιο ενδελεχή σχέση με τη μεμβράνη, εφόσον δημιουργούν δυναμικά ρυθμιζόμενα κέντρα δέσμωσης και όχι απλές διόδους για τα υδρόφιλα υποστρώματά τους και δεν ενεργοποιούνται μέσω δομικών περιοχών εκτός της μεμβράνης. Εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς τα υποστρώματα που χρησιμοποιούν και ως προς την πρωτοταγή δομή τους καθώς κατατάσσονται σε 200 τουλάχιστον διακριτές γονιδιακές οικογένειες, ενώ ο αριθμός των πιθανών ομολόγων αυξάνεται καθημερινά από τις αναλύσεις γονιδιωμάτων που ολοκληρώνονται (Markowitz et al., 2008). Συνδιασμός κρυσταλλογραφικών και λειτουργικών δεδομένων μπορεί να επιτρέψει την κατανόηση των μηχανισμών ενεργού διαμεμβρανικής μεταφοράς σε μοριακό επίπεδο. Οι δυναμικοί μεταφορείς νιτρικών που εντοπίστηκαν σε αρκετά γονιδιώματα είναι μέλη της οικογένειας NNP, η οποία αποτελεί διακριτή ταξινομική ομάδα που ανήκει στην υπεροικογένεια MFS (Wang et al., 2008).

#### **1.4.2 Συστήματα κυτταρικής πρόσληψης νιτρικών/νιτρώδων**

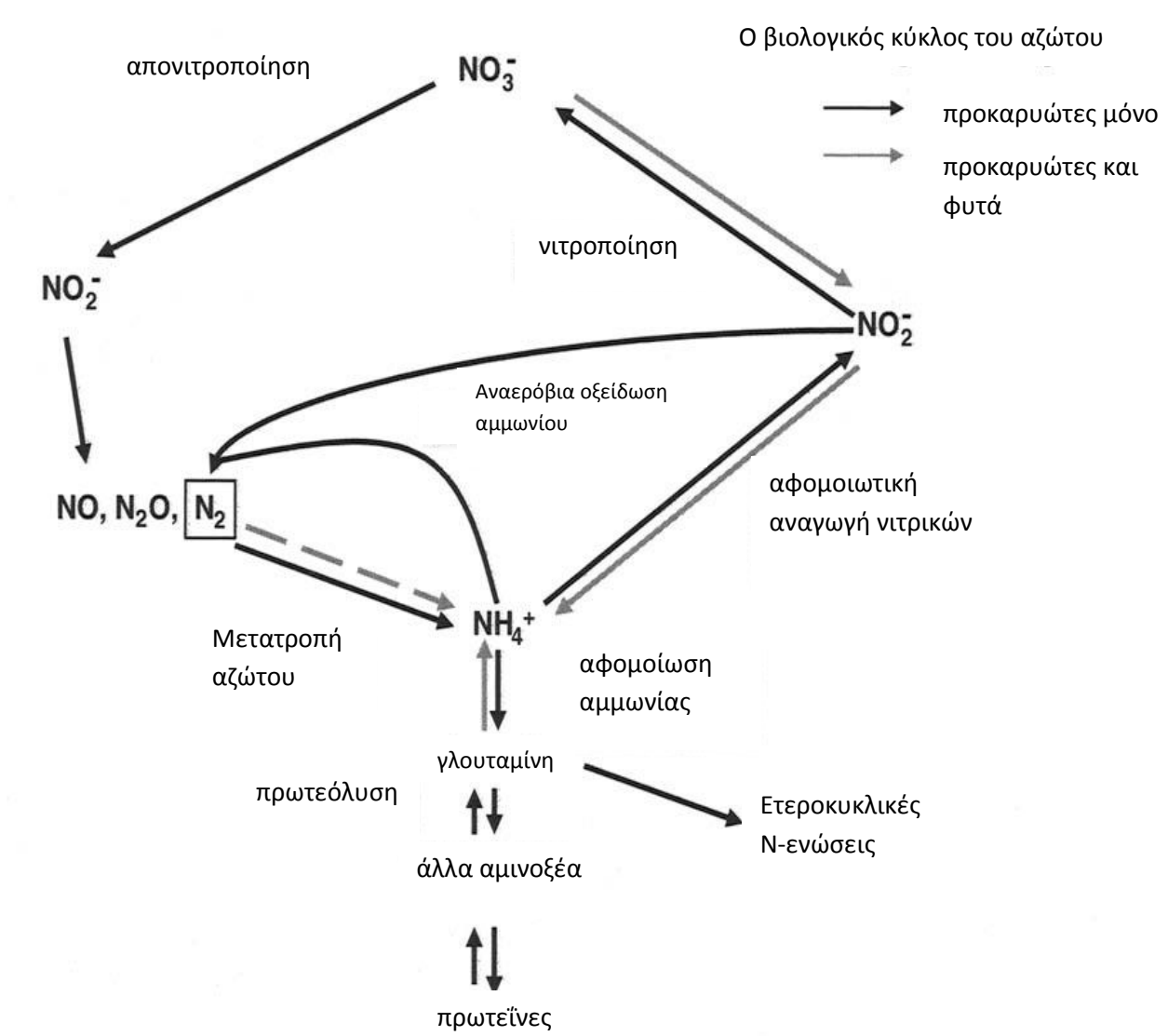
Το περιβαλλοντικό άζωτο είναι σημαντικό στοιχείο για όλους τους οργανισμούς και αποτελεί το 6.25% της ξηρής μάζας τους κατά μέσο όρο. Στην βιολογία το άζωτο υπόκειται σε μία ποικιλία οξειδώσεων και αναγωγών που παράγουν ενώσεις με οξειδωτικές καταστάσεις που ποικίλουν από +5 (όπως το νιτρικό) έως -3 (όπως η αμμωνία) (Bothe et al., 2007). Παρόλο που βρίσκεται σε αφθονία στην ατμόσφαιρα παρουσιάζεται περισσότερο σε αέρια μορφή (Fukuda et al., 2015, Martinez-Espinosa et al., 2011, Dixon, 2004). Το άζωτο είναι απαραίτητο στοιχείο για όλους τους οργανισμούς και παρουσιάζεται σε πολλά βιολογικά μόρια συμπεριλαμβανομένων των DNA, RNA και πρωτεϊνών. Οι περισσότεροι οργανισμοί χρησιμοποιούν τα ιόντα νιτρικό ( $NO_3^-$ ) και νιτρώδες ( $NO_2^-$ ) καθώς και το ιόν αμμωνίου ( $NH_4^+$ ) ως ανόργανες πηγές αζώτου. Το περιβαλλοντικό άζωτο παρέχεται στα μικρόβια και τα φυτά κυρίως με τη μορφή νιτρικού, νιτρώδους και ιόντος αμμωνίου (Zheng et al., 2013). Τα νιτρικά και νιτρώδη ιόντα μειώνονται για μετατροπή σε ιόν αμμωνίου, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σύνθεση αμινοξέων και τη ρύθμιση βιολογικών μονοπατιών.



Στα βακτήρια τα νιτρικά χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την αναερόβια αναπνοή νιτρικών (Stewart et al., 1988, Wang et al., 2008, Lee, 1979, Kielland, 1994), ενώ αποτελεί το θρεπτικό που πιο συχνά περιορίζει την ανάπτυξή τους. Αν και το κόστος ενέργειας που απαιτείται για την αφομοίωση του ιόντος αμμωνίου είναι χαμηλότερο από εκείνο του νιτρικού ιόντος, το νιτρικό προτιμάται ως πηγή αζώτου εξαιτίας της αφθονίας που εμφανίζει. Οι οργανισμοί διαθέτουν γονίδια που είναι ειδικά για την εξασφάλιση της αποτελεσματικής αφομοίωσης νιτρικών. Ακόμα και τα φυτά χρησιμοποιούν το νιτρικό ιόν ως την προτιμώμενη μορφή αζώτου για ανάπτυξη αφού επιπλέον, το νιτρικό παρέχει ένα αποτελεσματικό σήμα για τη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διαδικασιών (Fernandez and Galvan, 2008, Dechorgnat et al., 2011). Τα βακτήρια προσλαμβάνουν νιτρικά ιόντα, τα οποία στη συνέχεια ανάγονται σε νιτρώδη ιόντα (Einsle and Kroneck, 2004, Martinez-Espinosa, 2011, Zheng et al., 2013) και έπειτα σε αμμωνία ώστε να αφομοιωθούν σε κυτταρικά οργανικά υλικά (Lin and Stewart, 1998, Moir and Wood, 2001). Η αφομοιωτική (assimilatory) αναγωγή νιτρικών μπορεί να συμβεί είτε υπό αερόβιες είτε υπό αναερόβιες συνθήκες. Στη διαδικασία αυτή τα νιτρικά ανάγονται σε νιτρώδη και τελικά σε ιόν αμμωνίου, το οποίο στη συνέχεια ενσωματώνεται στη βιομάζα. Αντίθετα, η ανομοιωτική (dissimilatory) αναγωγή νιτρικών συμβαίνει σε βακτήρια μόνο υπό συνθήκες μειωμένου οξυγόνου και τα τελικά προϊόντα αποβάλλονται στο περιβάλλον (Rowe et al., 1994), στην περίπτωση αυτή το νιτρικό χρησιμοποιείται ως αποδέκτης ηλεκτρονίων αντί για το οξυγόνο. Στο πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και κατόπιν τα νιτρώδη ανάγονται σε μονοξειδίο του αζώτου (NO), υποξειδίο του αζώτου (N<sub>2</sub>O) και τελικά σε N<sub>2</sub>, το οποίο αποβάλλεται ως αέριο (Moreno-Vivian and Ferguson, 1998). Κομβικής σημασίας ενδιάμεσα στον κύκλο του αζώτου που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως δέκτες ηλεκτρονίων σε αναερόβιες συνθήκες απονίτρωσης είναι τόσο το νιτρικό (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) όσο και το νιτρώδες ιόν (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Σχήμα 1.5). Το νιτρικό ιόν προτιμάται ως πηγή ανόργανου αζώτου από πολλούς μικροοργανισμούς και φυτά και λειτουργεί ως αποδέκτης ηλεκτρονίων, ενώ αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την αύξηση των οργανισμών αυτών, εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται για την αφομοίωσή του (Wray and Kingorn, 1989, Crawford and Glass, 1998, Daniel-Vedele et al., 1998, Forde, 2000). Επίσης, λειτουργεί ως σήμα για τον έλεγχο πολλών μεταβολικών και μορφολογικών διαδικασιών, όπως η ανάπτυξη και ισορροπία ριζών, το άνοιγμα στομάτων (Scheible et al., 1997, Zhang and Forde, 1998). Οι συγκεντρώσεις του νιτρικού ιόντος στα φυσικά περιβάλλοντα ποικίλουν έως και κατά 5 τάξεις μεγέθους (0.2mM – 100μM) (Vidmar et al., 2000) λόγω της συνισταμένης παραγόντων όπως νιτροποίηση από μικροοργανισμούς, βροχόπτωση ή επιρροές της ανθρώπινης δραστηριότητας. Το νιτρώδες ιόν σχηματίζεται στο έδαφος από τους μικροοργανισμούς ως ενδιάμεσο τόσο αερόβιων (νιτροποίηση) όσο και αναερόβιων διεργασιών (απονιτροποίηση), αυτό είναι λιγότερο ευσταθές από το νιτρικό ιόν και μπορεί να συσσωρευθεί σε εδάφη υπό συνθήκες π.χ αλκαλικού pH και να λειτουργήσει ως εναλλακτική πηγή ανόργανου αζώτου για μικροοργανισμούς ή φυτά, η οποία είναι πολλή σημαντική από περιβαλλοντική και γεωργική άποψη (Madigan et al., 2003). Η συσσώρευση νιτρωδών μπορεί να είναι επιβλαβής, επειδή αυτά στη συνέχεια μπορούν να αναχθούν στο κυτοτοξικό μονοξειδίο του αζώτου (NO). Για τον λόγο αυτό απομακρύνονται γρήγορα από το κύτταρο με τη βοήθεια μεταφορέων ή ανάγονται σε αμμώνιο ή N<sub>2</sub> μέσω της δράσης αφομοιωτικών ενζύμων (Einsle and Kroneck, 2004, Zheng et al., 2013).



Οι μηχανισμοί πρόσληψης νιτρικών/νιτρωδών δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς στα πιθανά συστήματα διαμεμβρανικής μεταφοράς νιτρικών/νιτρωδών σε εδαφοβακτήρια.



Σχήμα 1.5: Οι αντιδράσεις του βιολογικού κύκλου του αζώτου (Bothe et al., 2007).

### 1.4.3 Δομικά μοτίβα μεταφορέων της οικογένειας NNP

Η οικογένεια NNP ανήκει στη Μείζονα Υπεροικογένεια Διευκολυνόμενης Μεταφοράς τη μεγαλύτερη και φυλογενετικά ευρύτερη ταξινομική ομάδα μεταφορέων ενεργού μεταφοράς “δευτερογενούς” τύπου (Saier et al., 2009) παρά την ετερογένειά της εμφανίζει ένα πολύ συντηρημένο δομικό-μηχανιστικό πρότυπο.

Πρόκειται για το πρότυπο δομικής οργάνωσης σε δύο “επικράτειες” (domains) των έξι διαμεμβρανικών ελίκων (Bibi and Kaback, 1990), προϋπάρχοντα εξέλιξης αναδιπλασιασμού εξωνίων (Poolman et al., 2007, Pao et al., 1998), τα οποία εμφανίζουν ψευδοσυμμετρία ως προς έναν κεντρικό άξονα κάθετο στο επίπεδο της μεμβράνης (Abramson et al., 2003) και διαχωρίζονται με μία εκτεταμένη ενδιάμεση υδρόφιλη περιοχή (central loop) που προσδίδει διαμορφωτική και ρυθμιστική ευελιξία (Weinglass and Kaback, 2000) (N6-loop-C6 motif). Η οικογένεια NNP αποτελεί μία οικογένεια μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών που απαντώνται σε βακτήρια, πρώτιστα, μύκητες και φυτά (MacGregor et al., 2013, Pao et al., 1998), αλλά δεν έχουν αναλυθεί ιδιαίτερα ως προς τις σχέσεις δομής-λειτουργίας τους, ενώ έχει μελετηθεί το γενικό μοτίβο δομής και μηχανισμού (Unkles et al., 2004, 2001, 1991). Εμφανίζει δύο συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνης (Arg) στο κέντρο των διαμεμβρανικών ελίκων TM2 και TM8 (Unkles et al., 2004, Kinghorn et al., 2005). Η βακτηριακή οικογένεια μεταφορέων NNP παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη νιτρικών ως τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων στην αναερόβια αναπνοή και την αποβολή των κυτοτοξικών νιτρωδών που παράγονται από αυτήν (Rowe et al., 1994). Παράλληλα, οι μεταφορείς της οικογένειας NNP φέρουν δύο μοτίβα «υπογραφής» νιτρικών AAGxGNxGG (“nitrate signature”), τα οποία συμβολίζονται ως NS1 και NS2 και επαναλαμβάνονται με μικρές διαφορές στις διαμεμβρανικές έλικες TM5 και TM11 (Forde, 2000, Trueman et al., 1996). Ενώ ταυτόχρονα οι NNP διαθέτουν εννέα συντηρημένα κατάλοιπα γλυκίνης, τα οποία συμμετέχουν στην ευελιξία/δυναμική του κέντρου δέσμευσης (Weinglass and Kaback, 1999, Guan et al., 2007).

#### 1.4.4 Ευκαρυωτικοί και Προκαρυωτικοί μεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 500 προκαρυωτικοί και 173 ευκαρυωτικοί μεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών (Unkles et al., 2012, Katoh and Toh, 2008), ενώ έχουν προταθεί τουλάχιστον 25 γονίδια που κωδικοποιούν μεταφορείς νιτρικών, κυρίως στα φυτά (Galvan and Fernandez, 2001) (Πίνακας 1.2). Σύμφωνα με την ανάλυση της αλληλουχίας αυτών των γονιδίων, τα γονίδια των μεταφορέων νιτρικών μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο οικογένειες: *Nrt1* και *Nrt2*, όπου ο διαχωρισμός των γονιδίων βασίζεται στο αν είναι μεταφορείς νιτρικών υψηλής συγγένειας (HANT) ή χαμηλής συγγένειας (LANT) (Crawford and Glass, 1998, Forde et al., 2000, von Wittgenstein et al., 2014). Στο *Mycobacterium tuberculosis* ταυτοποιήθηκε η πρωτεΐνη NarK2, η οποία λειτουργεί ως συµμεταφορέας  $H^+/NO_3^-$  (Giffin et al., 2012). Ένα πολύ-χαρακτηρισμένο προκαρυωτικό μέλος της NNP οικογένειας είναι οι πρωτεΐνες NarK και NarU του βακτηρίου *E.coli*, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως αντιμεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών (Forde, 2000). Το πρώτο ευκαρυωτικό μέλος που κλωνοποιήθηκε ήταν το γονίδιο *crnA* του *Aspergillus (Emericella) nidulans*, που αποτελείται από ένα μεταφορέα νιτρικών/νιτρωδών (Brownlee and Arst, 1983, Unkles et al. 1991, 1995), επίσης έχουν ταυτοποιηθεί δύο μεταφορείς υψηλής συγγένειας νιτρικών/νιτρωδών *NrtA* και *NrtB* του *Aspergillus nidulans* (Unkles et al., 2012). Στη συνέχεια ανακαλύφθηκαν 3 γονίδια συγγενικά του *crnA* που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια στην πρόσληψη νιτρικών/νιτρωδών στα φύκη *Chlamydomonas reinhardtii*, που ονομάζονται *CrNRT2.1*, *CrNRT2.2*, *CrNRT2.3* (Quesada et al., 1994, 1998, Galvan et al., 1996).

**Πίνακας 1.2:** Γονίδια ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών (Galvan and Fernandez, 2001, Forde, 2000).

Όνομα Γονιδίου	Εναλλακτικό Όνομα	Είδος	Αριθμός Πρόσβασης	Ιδιότητα Μεταφοράς	Αναφορά
<i>Nrt1</i> οικογένεια					
<i>AtNRT1.1</i>	CHL1	<i>A. thaliana</i>	L10357	NO <sub>3</sub> /ClO <sub>3</sub> μεταφορέας (χαμηλής συγγένειας)	Tsay et al. 1993; Huang et al. 1996; Touraine et al. 1997; Krapp et al. 2014
<i>AtNRT1.2</i>	NTL1	<i>A. thaliana</i>	AF073361	NO <sub>3</sub> μεταφορέας (χαμηλής συγγένειας)	Huang et al. 1996; Lui et al. 1999
<i>AtNTP2</i>		<i>A. thaliana</i>	AJ011604	-/-	Hatzfeld and Saito 1999
<i>AtNTP3</i>		<i>A. thaliana</i>	AJ131464	-/-	Hatzfeld and Saito 1999
<i>BnNRT1.2</i>	RCH2	<i>B. napus</i>	U17987	NO <sub>3</sub> μεταφορέας (χαμηλής συγγένειας)	Muldin and Ingemarsson 1995; Zhou et al. 1998
<i>LeNRT1.1</i>	NIT1	<i>L. esculentum</i>	X92853	-/-	Lauter et al. 1996
<i>LeNRT1.2</i>	NIT2	<i>L. esculentum</i>	X92852	-/-	Lauter et al. 1996
<i>Nrt2</i> οικογένεια					
<i>AtNRT2.1</i>	ACH1	<i>A. thaliana</i>	Z97058	NO <sub>3</sub> μεταφορέας (υψηλής συγγένειας)	Filleur and Daniel-Vedele 1999; Zhuo et al. 1999
<i>AtNRT2.2</i>	ACH2	<i>A. thaliana</i>	AF019749	-/-	Filleur and Daniel-Vedele 1999; Zhuo et al. 1999
<i>AtNRT2.3</i>		<i>A. thaliana</i>	AB015472	-/-	Zhuo et al. 1999
<i>AtNRT2.4</i>		<i>A. thaliana</i>	AB015472	-/-	Zhuo et al. 1999
<i>NpNRT2</i>		<i>N.plumbaginifolia</i>	Y08210	-/-	Quesada et al. 1997; Krapp et al. 1998
<i>GmNRT2</i>		<i>G. max</i>	AF047718	-/-	Amarasinghe et al. 1998
<i>HvNRT2.1</i>	BCH1	<i>H. vulgare</i>	U34198	-/-	Trueman et al. 1996
<i>HvNRT2.2</i>	BCH2	<i>H. vulgare</i>	U34290	-/-	Trueman et al. 1996

<i>HvNRT2.3</i>	BCH3	<i>H. vulgare</i>	AF091115	-/-	Trueman et al. 1996
<i>HvNRT2.4</i>	BCH4	<i>H. vulgare</i>	AF091116	-/-	Trueman et al. 1996
<i>OsNRT2</i>		<i>O. sativa</i>	AB008519	-/-	Yan et al. 2013
<i>CrNRT2.1</i>	Nar3	<i>C. reinhardtii</i>	Z25438	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> μεταφορέας (υψηλής συγγένειας)	Galvan et al. 1996; Quesada et al. 1994, 1998
<i>CrNRT2.2</i>	Nar4	<i>C. reinhardtii</i>	Z25439	NO <sub>3</sub> μεταφορέας (υψηλής συγγένειας)	Galvan et al. 1996; Quesada et al. 1994, 1998
<i>CrNRT2.3</i>		<i>C. reinhardtii</i>	AJ223296	NO <sub>2</sub> μεταφορέας (υψηλής συγγένειας)	Galvan et al. 1996; Quesada et al. 1998
<i>crnA</i>		<i>A. nidulans</i>	U34382	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> μεταφορέας (υψηλής συγγένειας)	Unkles et al. 1991
<i>YNT1</i>		<i>H. polymorpha</i>	Z69783	NO <sub>3</sub> μεταφορέας (υψηλής συγγένειας)	Perez et al. 1996
<i>NarK</i>		<i>E. coli</i>	X15996	NO <sub>2</sub> σύστημα αποβολής	Noji et al. 1989; Rowe et al. 1994

#### 1.4.5 Μεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών NarU και NarK και NirC

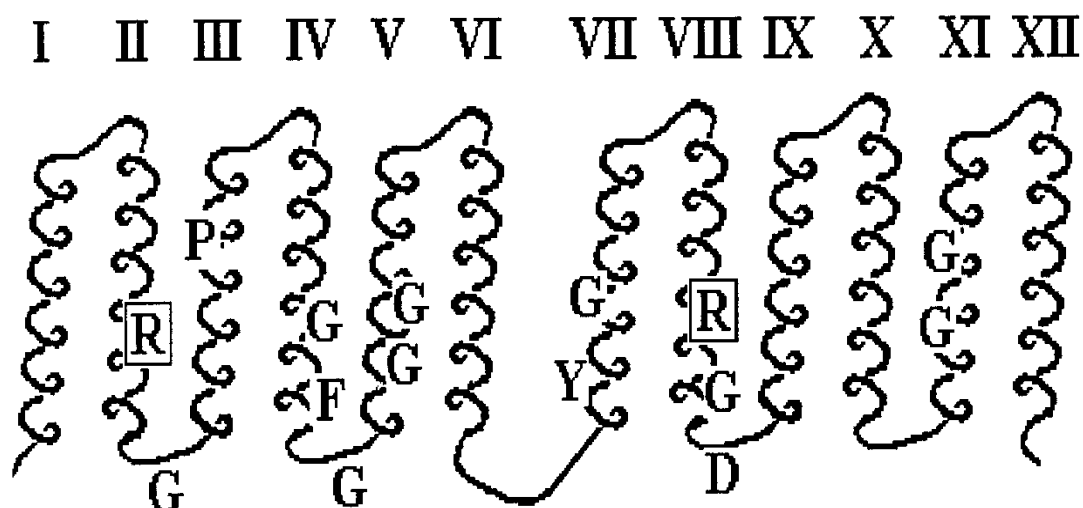
Οι μεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών NarK και NarU του βακτηρίου *E.coli* παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του αζώτου στα βακτήρια (Giffin et al., 2012, Pao et al., 1998, Jia and Cole, 2005, DeMoss and Hsu, 1991, Rowe et al., 1994, Moir and Wood, 2001, Jia et al., 2009). Οι δύο αυτές πολυτοπικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, εμφανίζουν ομολογία 76%, ενώ εμπλέκονται στην πρόσληψη νιτρικών και νιτρωδών και στην εξαγωγή νιτρωδών στην κυτοπλασματική μεμβράνη της *E.coli*. Μία τρίτη πολυτοπική μεμβρανική πρωτεΐνη, NirC λειτουργεί μόνο στη μεταφορά νιτρωδών (Noji et al., 1989, DeMoss and Hsu, 1991, Clegg et al., 2002, 2006). Το NarU διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, ενώ το NarK εκφράζεται κατά την αναερόβια ανάπτυξη παρουσία νιτρικών και αποτελεί μία λιγότερο αποτελεσματική πρωτεΐνη σε σχέση με το NarU στη μεταφορά νιτρικών (Clegg et al., 2006). Οι Clegg et al. έδειξαν ότι τουλάχιστον τρεις πολυτοπικές μεμβρανικές πρωτεΐνες εμπλέκονται στη μεταφορά νιτρικών και νιτρωδών, οι NarK, NarU, NirC (Clegg et al., 2002).

Πιο συγκεκριμένα:

- ♦ Η πρωτεΐνη NarK συμμετέχει στην πρόσληψη νιτρικών, αποβολή νιτρωδών και πρόσληψη νιτρωδών και λειτουργεί ως αντιμεταφορέας νιτρικών/νιτρωδών (Clegg et al., 2002, Noji et al., 1989, DeMoss et al., 1991, Zheng et al., 2013).
- ♦ Η πρωτεΐνη NarU είναι ικανή να προσλαμβάνει νιτρικά και να αποβάλλει νιτρώδη. Δεν είναι ακόμη γνωστός ο μηχανισμός μεταφοράς νιτρικών/νιτρωδών, πιστεύεται πως λειτουργεί είτε ως αντιμεταφορέας νιτρικών/νιτρωδών είτε ως συμεταφορέας πρόσληψης νιτρικών και αποβολής νιτρωδών (Clegg et al., 2002, Bonnefoy et al., 1997).
- ♦ Η πρωτεΐνη NirC είναι ένας μεταφορέας νιτρωδών συμμετέχει στην πρόσληψη νιτρωδών με σύζευξη πρωτονίου  $H^+$  (Clegg et al., 2002, 2006, Jia et al., 2009).

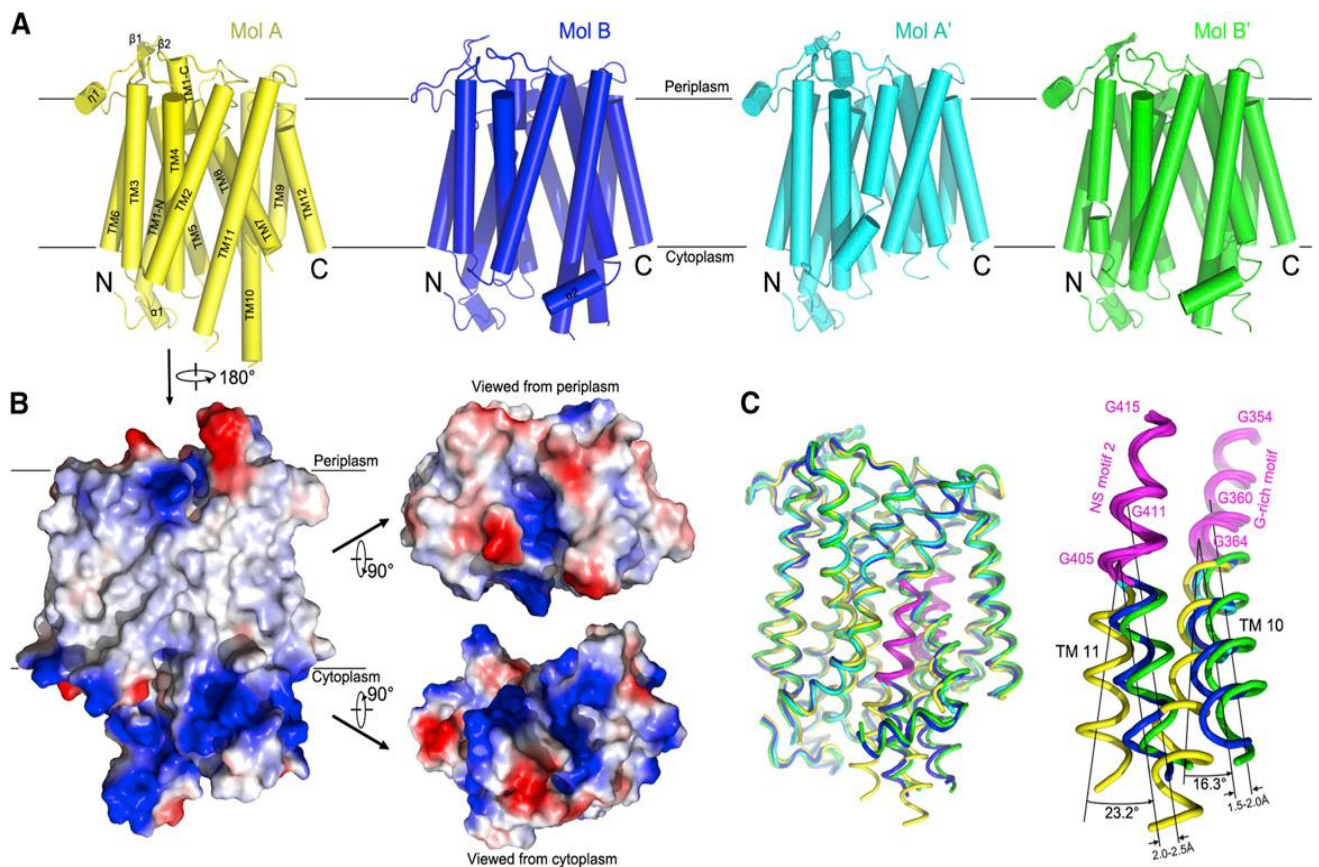
#### 1.4.6 Κρυσταλλικές δομές των NarU και NarK

Όλοι οι NNP μεταφορείς, συμπεριλαμβανομένων των NarU και NarK μοιράζονται δύο χαρακτηριστικές περιοχές πλούσιες σε γλυκίνη (Trueman et al., 1996, Unkles et al., 2012, Unkles et al., 2004). Αυτά τα χαρακτηριστικά μοτίβα δεν έχουν βρεθεί σε άλλους μεταφορείς της οικογένειας MFS και σχετίζονται με την εξειδίκευση και τον μηχανισμό μεταφοράς του υποστρώματος (Trueman et al., 1996, Unkles et al., 2012, Unkles et al., 2004). Ομοίως με τους υπόλοιπους MFS μεταφορείς (Abramson et al., 2003, Huang et al., 2003) το NarU αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες, TM 1-6 και TM 7-12 που είναι η N-τελική και C-τελική περιοχή, αντίστοιχα, καθώς επίσης και το NarK αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες εφόσον ανήκει στην MFS υπεροικογένεια (Wood et al., 2002, Marger and Saier, 1993), ενώ το NirC αποτελείται από 6 διαμεμβρανικές έλικες διότι δεν ανήκει στους NNP μεταφορείς (Peakman et al., 1990, Radestock et al., 2011, Zheng et al., 2013, Jia et al., 2009) (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5: Οι διαμεμβρανικές έλικες και τα συντηρημένα κατάλοιπα στην πρωτεΐνη NarK (Moir and Wood, 2001).

Στην εικόνα 1.5 παρουσιάζονται οι 12 διαμεμβρανικές έλικες του NarK. Οι έλικες 2 και 8 είναι υδρόφοβες και αυτό οφείλεται στα συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνης που είναι τοποθετημένα μέσα στο προβλεπόμενο άνοιγμα της μεμβράνης. Υπάρχουν συνολικά 15 συντηρημένα κατάλοιπα: 2 αργινίνες , 9 γλυκίνες , προλίνη , φαινυλαλανίνη , τυροσίνη , ασπαρτικό οξύ Asp (Arg (A), Gly (G), Pro (P), Phe (F), Tyr (Y), Asp (D)) . Οι 2 Arg και το Asp είναι τοποθετημένα έξω από την προβλεπόμενη μεμβρανική περιοχή, προβλέπεται ότι είναι τοποθετημένα στο κυτόπλασμα, επίσης το Asp είναι τοποθετημένο στην θηλιά μεταξύ των ελίκων 8 και 9. Πρόσφατα έγιναν γνωστές οι κρυσταλλικές δομές των NarK και NarU από την *E.coli* στα 2.6 – 2.8 και 3.0 – 3.1 Å, αντίστοιχα μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X (Yan et al., 2013, Zheng et al., 2013), οι οποίες παρατίθενται παρακάτω (Εικόνα 1.6 και 1.7).

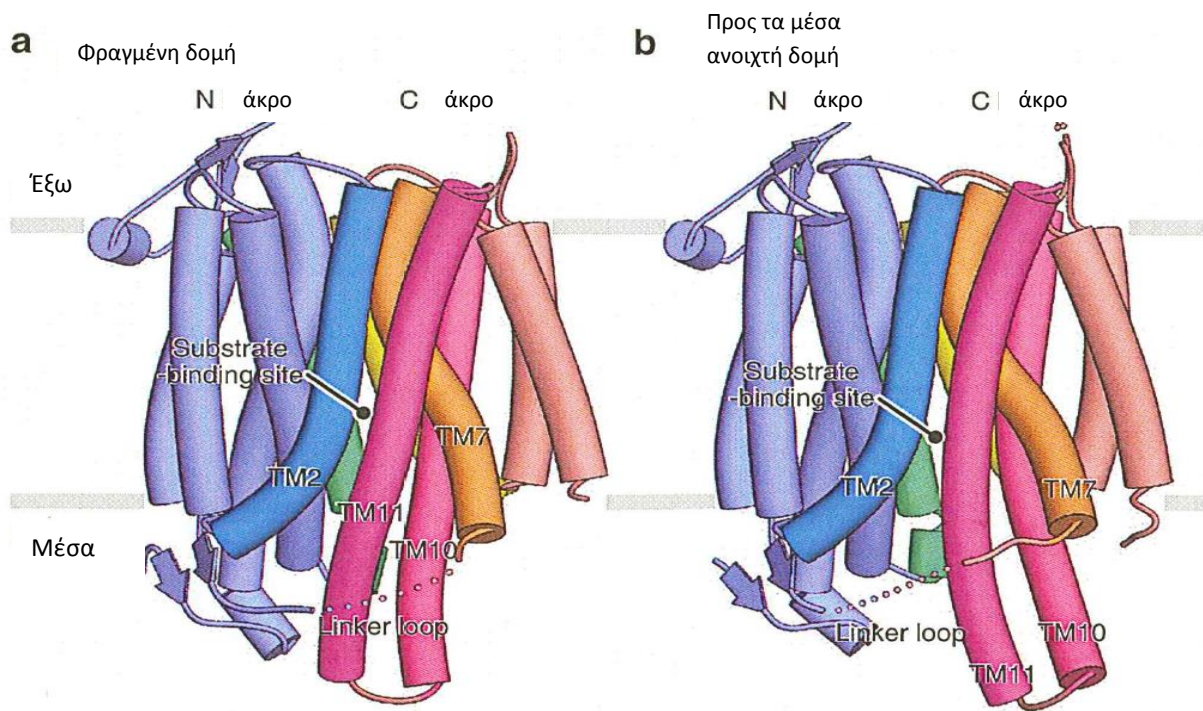


**Εικόνα 1.6:** Συνολική δομή του NarU (Yan et al., 2013).

(A) Η δομή του NarU σε δύο διακριτές διαμορφώσεις. Υπάρχουν δύο μόρια NarU στην ασύμμετρη δομή. Το μόριο A (κίτρινο) υιοθετεί μία φραγμένη διαμόρφωση, τα μόρια B (μπλε) και B' (πράσινο) έχουν μία μερικώς ανοιχτή στο εσωτερικό διαμόρφωση. Κάθε μόριο NarU αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες (TM).

(B) Το ηλεκτροστατικό δυναμικό της επιφάνειας του NarU. Η επιφάνεια της μεμβράνης είναι υδρόφοβη, οι πλευρές του περιπλάσματος και κυτοπλάσματος του NarU εμπλουτίζονται με υδρόφιλα και φορτισμένα αμινοξέα.

(C) Μία δομική επικάλυψη των μορίων του NarU αποκαλύπτει μία δομική μετατόπιση στις TM 10 και TM 11. Το μισό του C-τελικού άκρου της TM 10 και το μισό του N-τελικού άκρου της TM 11 στο μόριο B εμφανίζουν κάμψη 16° και 23°, αντίστοιχα, σε σχέση με το μόριο A.



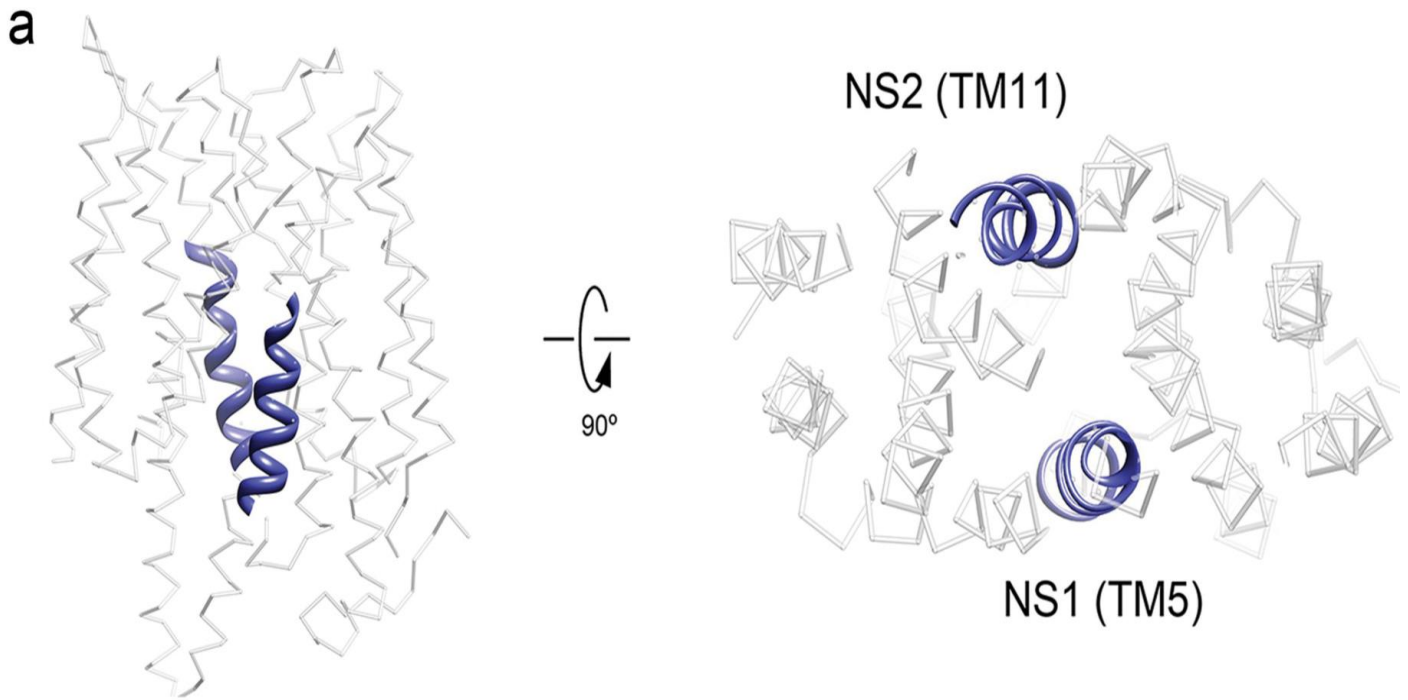
**Εικόνα 1.7:** Συνολική δομή του NarK στην *E.coli* (Fukuda et al., 2015).

(a) Φραγμένη δομή

(b) Ανοιχτή προς τα μέσα δομή

Κάθε μόριο αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες, οι οποίες σχηματίζουν ένα N άκρο (TM 1-6) και ένα C άκρο (TM 7-12). Οι δύο αυτές περιοχές είναι συνδεδεμένες με μία μακριά θηλιά μεταξύ των TM 6 και TM 7 και πιστεύεται ότι το μονοπάτι μεταφοράς του υποστρώματος είναι τοποθετημένο στη διεπαφή μεταξύ των δύο αυτών περιοχών. Οι TM2, TM5, TM7, TM8, TM10 και TM11 είναι χρωματισμένες ανοιχτό μπλε, πράσινο, πορτοκαλί, κίτρινο, ροζ και μωβ, αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες διαμεμβρανικές έλικες στην N και C δέσμη αντίστοιχα είναι χρωματισμένες με ανοιχτό μπλε και ανοιχτό ροζ. Οι γκρι γραμμές υποδεικνύουν κατά προσέγγιση την θέση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Όλα τα μέλη της NNP οικογένειας περιέχουν δύο εκτάσεις συντηρημένων καταλοίπων που ονομάζονται μοτίβα υπογραφής νιτρικών (NS) (Εικόνα 1.8). Αυτά τα μοτίβα δεν υπάρχουν στα υπόλοιπα μέλη της MFS, αλλά αποτελούν μοναδικό χαρακτηριστικό της NNP οικογένειας (Zheng et al., 2013, Trueman et al., 1996).





**Εικόνα 1.8:** Θέση πρόσδεσης υποστρώματος στην πρωτεΐνη NarK (Zheng et al., 2013).

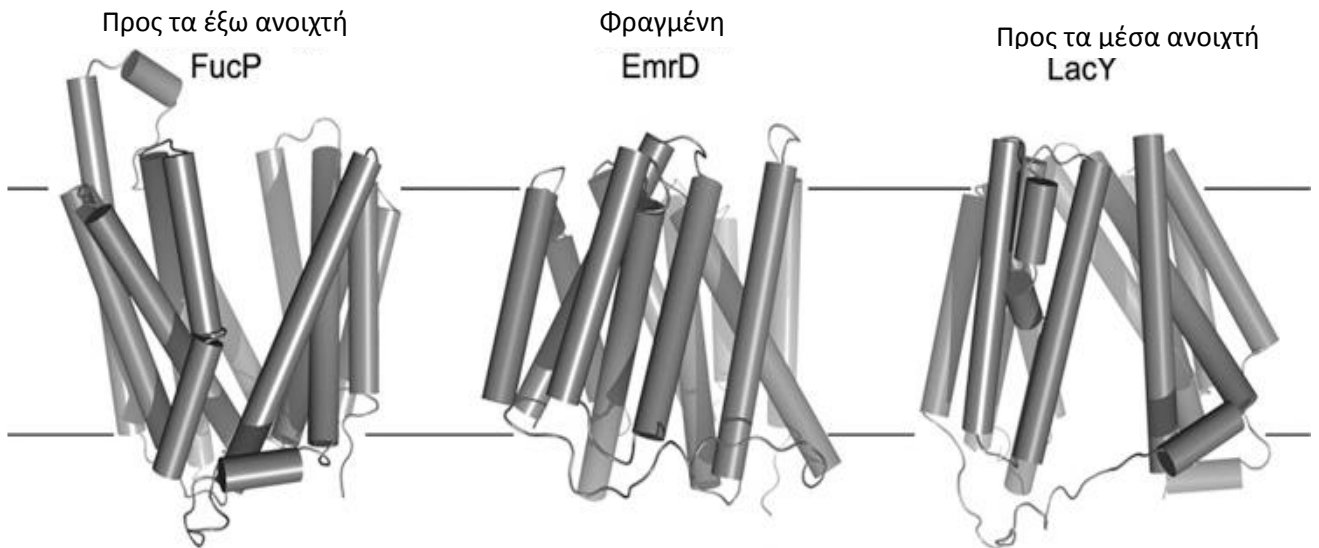
**a)** Τα δύο υψηλά συντηρημένα NS μοτίβα στις TM 5 και TM 11 (μπλε έλικες) στο κέντρο του NarK που σχηματίζουν το μονοπάτι μεταφοράς νιτρικών/νιτρωδών.

Στην πρωτεΐνη NarK το NS1 σχηματίζεται από τα κατάλοιπα 164 – 175 που είναι τοποθετημένα στην TM 5 και το NS2 που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα 408 – 420 που είναι τοποθετημένα στην TM 11. Οι δύο NS περιοχές είναι πλούσιες σε γλυκίνη, η οποία προσδίδει μία πιο σφιχτή δομή με τις γύρω έλικες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας σημαντικά πιο σταθερής δομής της NarK πρωτεΐνης όταν αυτή συγκρίνεται με τις άλλες γνωστές δομές των μελών της MFS υπεροικογένειας (Εικόνα 1.8).

#### 1.4.7 Μηχανισμός μεταφοράς

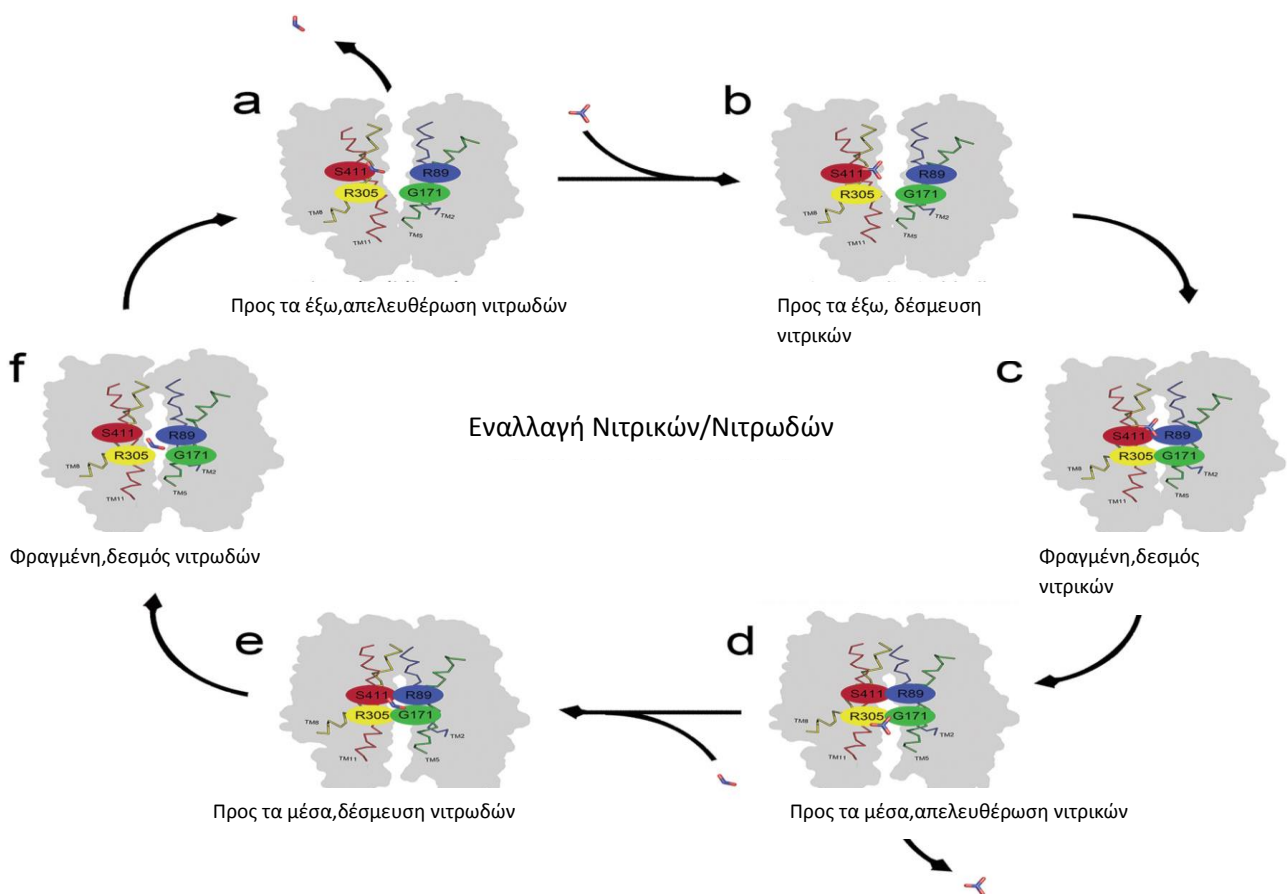
Οι MFS πρωτεΐνες μεταφέρουν το υπόστρωμα μέσω ενός αξονικού μονοπατιού ανάμεσα στις N-τελικές και C-τελικές περιοχές (Law et al., 2008). Ο μηχανισμός μεταφοράς των MFS μεταφορέων πιστεύεται ότι ακολουθεί το μοντέλο της εναλλαγής διαμορφώσεων (Forrest et al., 2011, Law et al., 2008), στο οποίο η εναλλακτική πρόσβαση στο περίπλασμα και στο κυττόπλασμα επιτυγχάνεται με μία άκαμπτη περιστροφή της N-τελικής περιοχής σε σχέση με την C-τελική περιοχή. Το μοντέλο αυτό προβλέπει τρεις βασικές διαμορφώσεις: προς τα έξω ανοιχτή, φραγμένη και προς τα μέσα ανοιχτή (Εικόνα 1.9).





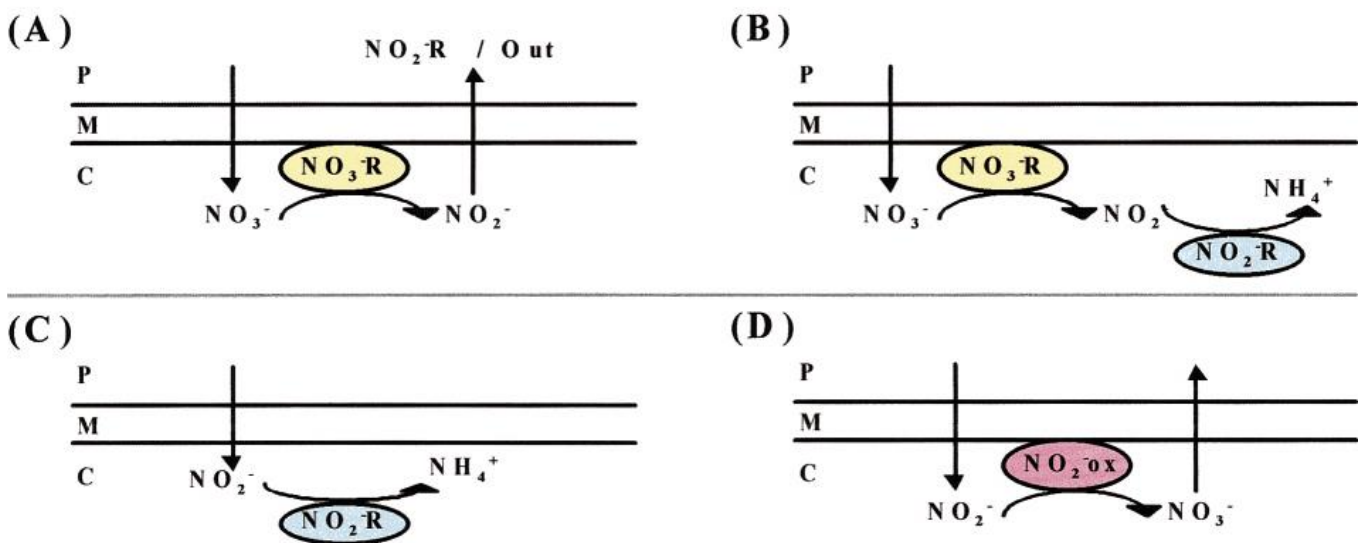
**Εικόνα 1.9:** Οι τρεις απαραίτητες διαμορφώσεις των MFS μεταφορέων (Yan et al., 2013).

Εναλλακτική πρόσβαση θεωρείται ότι μπορεί να επιτευχθεί με το μοντέλο του διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσεων (rocker switch), συμπεριλαμβάνοντας αυτές τις τρεις διαμορφώσεις για τους MFS μεταφορείς (Zheng et al., 2013, Forrest et al., 2011, Law et al., 2008) (Εικόνα 1.10).



**Εικόνα 1.10:** Προτεινόμενος μηχανισμός για την εναλλαγή νιτρικών/νιτρωδών για την οικογένεια μεταφορέων NNP (Zheng et al., 2013).

Αρχικά, το NarK βρίσκεται σε προς τα έξω διαμόρφωση, όπου το μονοπάτι μετατόπισης υποστρώματος είναι ανοιχτό στο περίπλασμα (Εικόνα 1.10 a). Το θετικά φορτισμένο μονοπάτι μετατόπισης υποστρώματος μπορεί να δεσμεύσει ένα μόριο νιτρικού ιόντος, το οποίο μπορεί να εισέλθει στον πόρο και να συνδεθεί απ'ευθείας πάνω από τις δύο αργινίνες στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος (Εικόνα 1.10 b). Εκεί τα νιτρικά ιόντα σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα R305 και N175 (Εικόνα 1.10 b). Το γεγονός σύνδεσης μπορεί να πυροδοτήσει έπειτα μία διαμορφωτική αλλαγή στο NarK στις παροδικά φραγμένες δομές όπου ο πόρος είναι κλειστός τόσο στο περίπλασμα όσο και στο κυτόπλασμα (Εικόνα 1.10 c). Η διαμορφωτική αλλαγή μπορεί να ωθήσει τα νιτρικά ιόντα από το R 89 και R 305 απ'ευθείας προς τα κάτω και καθώς ο μεταφορέας υιοθετεί την προς τα μέσα διαμόρφωση, το μονοπάτι μετατόπισης υποστρώματος ανοίγει στο κυτόπλασμα και τα νιτρικά ιόντα μπορούν μετά να απελευθερωθούν (Εικόνα 1.10 d). Καθώς τα νιτρικά ιόντα απελευθερώνονται εναλλάσσονται με νιτρώδη. Τα νιτρώδη ιόντα εισέρχονται στο μονοπάτι μετατόπισης υποστρώματος και προσδένονται με τα R 89 και R 305 αμινοξέα (Εικόνα 1.10 e). Η δέσμευση των νιτρώδων ιόντων στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος πυροδοτεί τη διαμορφωτική αλλαγή του NarK από την προς τα μέσα στην προς τα έξω διαμόρφωση μέσω της παροδικά φραγμένης δομής (Εικόνα 1.10 e). Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα νιτρώδη ιόντα ωθούνται απ'ευθείας πάνω στα R 89 και R 305 και όταν το NarK είναι προσανατολισμένο στην προς τα έξω διαμόρφωση τα νιτρώδη ιόντα απελευθερώνονται στο περίπλασμα (Εικόνα 1.10 a). Έτσι, ο κύκλος εναλλαγής μπορεί να συνεχιστεί. Σε αντίθεση με το μοντέλο του διακόπτη εναλλαγής διαμορφώσης, ο συνολικός σχετικός προσανατολισμός των N-τελικών και C-τελικών περιοχών παραμένει μη φορτισμένος κατά τη διάρκεια μεταφοράς του υποστρώματος. Η δέσμευση και απελευθέρωση του υποστρώματος συνοδεύεται κυρίως από κάμψη τμημάτων των διαμεμβρανικών ελίκων, η οποία διευκολύνεται από τις αλληλουχίες που είναι πλούσιες σε γλυκίνη (Abramson et al., 2003, Guan et al., 2007, Mirza et al., 2006, Sun et al., 2012, Solcan et al., 2012). Οι NNP μεταφορείς διακρίνονται από τις υπόλοιπες MFS πρωτεΐνες εξαιτίας της παρουσίας των μοτίβων πλούσιων σε γλυκίνη στις διαμεμβρανικές έλικες 5 και 11. Αυτά τα κατάλοιπα γλυκίνης επιτρέπουν μία μεγαλύτερη ευκαμψία.



**Εικόνα 1.11:** Τοπολογικές διευθετήσεις για τη μεταφορά νιτρικών και νιτρώδων (Moir and Wood, 2001).

(A) Αναγωγή νιτρικών στο κυτόπλασμα που συνοδεύεται από αποβολή νιτρώδων στο περίπλασμα (αντιμεταφορείς νιτρικών/νιτρώδων)

(B) Αναγωγή νιτρικών στο κυτόπλασμα, δεν αποβάλλονται νιτρώδη ίσως ανάγονται περαιτέρω σε αμμώνιο στο κυτόπλασμα (συμμεταφορά νιτρικών/πρωτονίου)

(C) Πρόσληψη νιτρώδων στο κυτόπλασμα για αναγωγή σε αμμώνιο

(D) Πρόσληψη νιτρώδων στο κυτόπλασμα που ακολουθείτε από οξειδωση και αναγωγή νιτρικών

**P** : περίπλασμα

**M**: μεμβράνη

**C**: κυτόπλασμα

**R**: ρεδουκτάσες

**Ox**: οξειδάσες

#### 1.4.8 Αναγωγάσες νιτρικών – νιτρώδων στην *E.coli*

Κάτω από διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης η *E.coli* εκφράζει τρεις διαφορετικές αναγωγάσες νιτρικών, τις A και Z με ενεργές περιοχές στο κυτόπλασμα (Nar) και την Nar στο περίπλασμα. Υπάρχουν επίσης δύο Nir ρεδουκτάσες νιτρώδων, η Nir εξαρτώμενη από NADH στο κυτόπλασμα και η Nirf στο περίπλασμα. Η περιπλασματική αναγωγάση νιτρικών Nar εκφράζεται αρχικά κατά τη διάρκεια της αναερόβιας ανάπτυξης υπό την παρουσία πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων νιτρικών. Οι Nar αναγωγάσες εμπλέκονται στην εξισορρόπηση του οξειδοαναγωγικού φορτίου του κυττάρου κατά την διαδικασία της απονιτροποίησης (denitrification). Τα περισσότερα από τα οπερόνια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της περιπλασματικής αναγωγάσης νιτρικών αποτελούνται από *narABCD* γονίδια. Τα *narABC* γονίδια κωδικοποιούν τις δομικές μονάδες και το *narD* γονίδιο έχει ένα ρόλο μεταφορέα της Nar πρωτεΐνης στη σωστή θέση. Τα *nar* οπερόνια ίσως περιέχουν ένα ή περισσότερα συμπλέγματα *narKEFGH*, αλλά η παρουσία και η θέση τους στα οπερόνια διαφέρει στα διάφορα είδη (Choe and Reznikoff, 1993, Rabin and Stewart, 1993, Grove et al., 1996, Potter and Cole, 1999, Wang et al., 1999). Οι ενεργές περιοχές των άλλων δύο αναγωγασών νιτρικών A και Z είναι τοποθετημένες στο κυτόπλασμα (Showe and DeMoss, 1968, MacGregor and Christopher, 1978, Graham et al., 1981), έτσι τα νιτρικά πρέπει να μεταφερθούν διαμέσου της κυτοπλασματικής μεμβράνης για να αναχθούν σε νιτρώδη από αυτά τα ένζυμα. Η νιτρική αναγωγάση A που κωδικοποιείται από το οπερόνιο *narGHJ* καταστέλλεται κατά την διάρκεια της αερόβιας ανάπτυξης, αλλά επάγεται κατά την αναερόβια ανάπτυξη υπό την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νιτρικών (Stewart, 1988, Berks et al., 1995, Potter et al., 1999, Wang et al., 1999). Υπό αυτές τις συνθήκες ανάπτυξης η νιτρική αναγωγάση A είναι η πιο ενεργή από τις τρεις. Τα γονίδια *narGHI* κωδικοποιούν τις δομικές υπομονάδες και το *narJ* κωδικοποιεί ένα ειδικό σαπερόνιο, που απαιτείται για κατάλληλη ωρίμανση και μεμβρανική εισαγωγή της πρωτεΐνης Nar.

Σε πολλά είδη το γονίδιο *nark*, το οποίο προηγείται του *narGHJI* κωδικοποιεί ένα μεταφορέα νιτρικών/νιτρωδών παρόμοιο με αυτόν των μυκήτων και των φυτών *narC*, άλλα γονίδια που ταυτοποιήθηκαν στην *E.coli* είναι το *narG*, το *narXL*, που ρυθμίζει την έκφραση της Nar πρωτεΐνης σε απόκριση της συγκέντρωσης νιτρικών/νιτρωδών, το *narL*, *narH* και το *narI* (Unden et al., 1995, van Spanning, Richardson and Ferguson, 2007). Η νιτρική αναγωγή Z κωδικοποιείται από το οπερόνιο *narZYWV* και είναι πολλή όμοια με τη νιτρική αναγωγή A, η οποία όπως αναφέρθηκε ανωτέρω κωδικοποιείται από το οπερόνιο *narGHJI*, αφού τα δύο αυτά οπερόνια εμφανίζουν μεταξύ τους ομολογία 73% (Blasco et al., 1990, Bonnefoy et al., 1997). Όμως, η δεύτερη νιτρική αναγωγή της *E.coli*, NRZ εκφράζεται πολύ αδύναμα κατά τη διάρκεια της αερόβιας και αναερόβιας ανάπτυξης (Iobbi et al., 1987). Αν και η έκφρασή της πραγματοποιείται κατά την είσοδο στην στατική φάση ανάπτυξης, η δραστηριότητάς της είναι σε χαμηλά επίπεδα ανίχνευσης από τις περισσότερες βιοχημικές αναλύσεις (Iobbi – Nivol et al., 1990, Bonnefoy et al., 1997, Chang et al., 1999, Potter et al., 1999). Συνεπώς, η νιτρική αναγωγή Z συνεισφέρει ελάχιστα στο συνολικό ποσοστό αναγωγής νιτρικών από την *E.coli* και υποστηρίζει ένα πολύ χαμηλό ποσοστό της αναερόβιας ανάπτυξης εξαρτώμενης από νιτρικά με γλυκερόλη ως μη ζυμώσιμη πηγή άνθρακα (Potter et al., 1999). Κατά την αναερόβια ανάπτυξη παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων νιτρικών η *E.coli* συνθέτει μία πολλή δραστική αναγωγή νιτρωδών Nir εξαρτώμενη από NADH, η οποία καταλύει την αναγωγή νιτρωδών σε αμμωνία και αποτελείται από τα γονίδια *nirS*, το οποίο κωδικοποιεί το δομικό μονομερές cd<sub>1</sub>-τύπου και το γονίδιο *nirK* που κωδικοποιεί την Cu-τύπου νιτρική αναγωγή, το οποίο σε ορισμένα είδη μαζί με το *nirV* γονίδιο κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας (van Spanning, Richardson and Ferguson, 2007). Μία δεύτερη αναγωγή νιτρωδών Nrf, η οποία συμμετέχει στην αναγωγή νιτρωδών από φορμικό, βρίσκεται στο περίπλασμα και η σύνθεσή της καταστέλλεται κατά την ανάπτυξη παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων νιτρικών (Cole, 1996).

## 1.5 Σκοπός

Στις διεργασίες βιοαποκατάστασης ρυπασμένων περιοχών σημαντικό ρόλο παίζουν τα εδαφοβακτήρια με την ικανότητα αποδόμησης των ρύπων όπως οι κυκλικοί πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το εδαφοβακτήριο *Mycobacterium gilvum* Sryg1 έχει την ικανότητα αποδόμησης των PAHs (πυρένιο, φλουορανθένιο, φλουορένιο, ανθρακένιο και ακεναφθένιο). Τα νιτρικά που αποτελούν άφθονη πηγή αζώτου για πολλούς μικροοργανισμούς λειτουργούν και ως τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων υπό αναερόβιες συνθήκες και συμμετέχουν στην βιοαποδόμηση των PAHs υπό αυτές τις συνθήκες. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των συστημάτων πρόσληψης των νιτρικών από το στέλεχος Sryg1. Η *in silico* μελέτη του εδαφοβακτηρίου *Mycobacterium gilvum* Sryg1 έδειξε ότι υπάρχουν τρία γονίδια πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα δύο από τα γονίδια αυτά, τα οποία ονομάστηκαν *rynar* και *rynir*. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση των γονιδίων αυτών σε κύτταρα *E.coli* και ακολούθησε ο λειτουργικός χαρακτηρισμός τους. Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη προσπάθεια μελέτης από εδαφοβακτήριο.

## **2.Υλικά και Μέθοδοι**

## 2.1 Βακτηριακά Στελέχη - Πλασμίδιο

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα εξής :

- *Mycobacterium gilvum* Spyr1
- *Escherichia coli* TOP10F'
- *Escherichia coli* JCB4518, ( $\Delta narK \Delta narU::kan \Delta nirC::chl$ ). Στο στέλεχος αυτό έχουν αντικατασταθεί οι μεταφορείς νιτρικών/νιτροδών

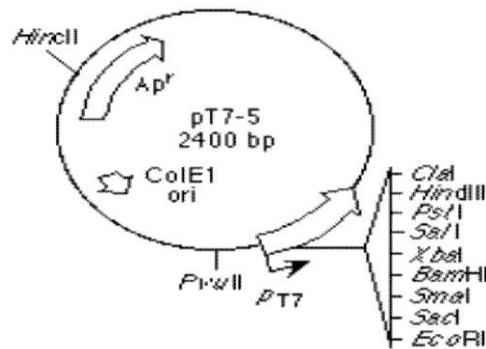
Τα πλασμιδιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα ακόλουθα (Πίνακας 2.1):

**Πίνακας 2.1:** Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πλασμίδια	
pT7-5 - BAD	High copy number, Amp <sup>R</sup> vector, <i>LacZ</i> promoter, biotin-acceptor domain (Frilligos S. Lab)
pT7-pynar	<i>M. gilvum pynar</i> gene in pT7-5 (στο εργαστήριό μας)
pT7-pynir	<i>M. gilvum pynir</i> gene in pT7-5 ( -/- )
pT7-narK	<i>E. coli narK</i> gene in pT7-5 ( -/- )
pT7-narU	<i>E. coli narU</i> gene in pT7-5 ( -/- )
pEHISTEVNarK	High copy number, Km <sup>R</sup> vector carrying <i>narK</i> (Cole J.A. Lab)
pTTQ18NarU	High copy number, Amp <sup>R</sup> vector carrying <i>narU</i> (Cole J. A. Lab)

- Πλασμίδιο pt7-5

Ενώ το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε είναι το pt7-5 με ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη. Διαθέτει έναν T7 υποκινητή και χρησιμοποιείται για να εκφράζει γονίδια χρησιμοποιώντας την T7 RNA πολυμεράση, ενώ δεν διαθέτει θέση δέσμησης ριβοσώματος.



Σχήμα 2.1: Χάρτης πλασμιδίου pT7-5 (Tabor and Richardson, 1985).

- Πλασμίδιο pEHISTEV
- Πλασμίδιο pTTQ18

Τα πλασμίδια pEHISTEV και pTTQ18 παραχωρήθηκαν στο εργαστήριό μας από την εξωτερική συνεργάτιδα Dr. Unkles Shiela.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια:

- *nark* με αριθμό πρόσβασης X15996.1
- και
- *narv* με αριθμό πρόσβασης X94992.1

Τα γονίδια αυτά παραχωρήθηκαν από την εξωτερική συνεργάτιδα Dr. Unkles Shiela.

## 2.2 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης, καθώς και τα διαλύματα που απαιτούνται για την παρασκευή τους αποστειρώνονται για 15-20 min στους 121 °C υπό πίεση 1.2 atm. Εξάιρεση αποτελούν τα θερμοευαίσθητα διαλύματα, όπως αυτά των αντιβιοτικών και των ιχνοστοιχείων, τα οποία αποστειρώνονται μέσω φιλτραρίσματος από ειδικό φίλτρο διαμέτρου 0.45 μm. Τα οργανικά υποστρώματα διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες, όπως το πυρένιο το οποίο διαλύεται σε διαιθυλαιθέρα.



\* Πλήρες υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Luria Broth (LB)

Τρυπτόνη 1% w/v

NaCl 1% w/v

Εκχύλισμα ζύμης 0.5% w/v

NaOH 1N 0.15% v/v

Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7.5 με την προσθήκη του NaOH 1N.

Το πλήρες στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Luria Agar (LA), παρασκευάζεται με την προσθήκη 1.6% w/v άγαρ στο υγρό θρεπτικό μέσο LB.

\* Ελάχιστο υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης M9 (MM M9)

Αποστειρώνονται 75 - 78 ml απιονισμένου H<sub>2</sub>O και όταν η θερμοκρασία του μειωθεί στους 50°C, προστίθενται τα παρακάτω συστατικά, τα οποία έχουν ήδη αποστειρωθεί ξεχωριστά:

Διάλυμα αλάτων 5 X M9 20% v/v

Διάλυμα MgSO<sub>4</sub> 0.1 M 2% v/v

Διάλυμα CaCl<sub>2</sub> 0.01 M 1% v/v

Διάλυμα ιχνοστοιχείων 100 X TE 1% v/v

Διάλυμα πηγής άνθρακα-γλυκόζη 40% v/v 0.2% v/v

Το ελάχιστο στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης M9 παρασκευάζεται με προσθήκη 1.6% w/v άγαρ στα 75 – 78 ml νερού, τα οποία αποστειρώνονται και αφού κρυώσει το μίγμα (50 °C), προστίθενται τα υπόλοιπα διαλύματα.

\* Διάλυμα αλάτων 5 X M9 (1L):

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 42.5 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 g

NaCl 2.5 g

NH<sub>4</sub>Cl 5 g

\* Διάλυμα ιχνοστοιχείων 100 X TE (100 ml):

CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	6.25 mg
KI	10 mg
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	40 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	40 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50 mg
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	16 mg
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	20 mg

Όλα τα παραπάνω συστατικά προστίθενται σε 100 ml αποστειρωμένου νερού. Κατόπιν, το διάλυμα ιχνοστοιχείων αποστειρώνεται με φίλτρο 0.45 μm.

\* Ελάχιστο υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αλάτων (MM) ( 1L ) (Jia et al. 2009):

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
MgCl <sub>2</sub>	0.05 g
Nutrient Broth	2.5 g

Τα παραπάνω συστατικά προστίθενται σε 1000 ml απιονισμένου νερού και αποστειρώνονται.

Στο παραπάνω θρεπτικό μέσο προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά (100ml):

NaNO <sub>3</sub> 5M	400 μl
Γλυκόζη 40% w/v	1ml
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	100μl
Μολυβδαινικό νάτριο 0.01M	100μl
Σεληνιακό νάτριο 0.01M	100μl
Αμπικιλίνη 100mg/ml	100μl
Καναμυκίνη 50mg/ml	100μl

Τα παραπάνω συστατικά προστείνονται σε 100 ml πλήρους θρεπτικού μέσου ανάπτυξης σε αποστειρωμένη κωνική.

Τα διαλύματα  $\text{NaNO}_3$ , γλυκόζη και μολυβδαινικό νάτριο έχουν ήδη αποστειρωθεί ξεχωριστά.

Το διάλυμα ιχνοστοιχείων, καθώς και τα σεληνιακό νάτριο, αμπικιλίνη, καναμικίνη έχουν αποστειρωθεί με φίλτρο 0.45  $\mu\text{m}$ .

\* Διάλυμα ιχνοστοιχείων (100 ml):

$\text{MgCl}_2 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  8.2 g

$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$  1 g

$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  0.4 g

$\text{CaCl}_2$  0.1 g

π.  $\text{HCl}$  2 ml

Το διάλυμα ιχνοστοιχείων αποστειρώνεται με φίλτρο 0.45  $\mu\text{m}$ .

### 2.3 Παρασκευή αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι η αμπικιλίνη και η καναμικίνη. Η αποστείρωση των υδατικών διαλυμάτων αποθήκευσης έγινε με φιλτράρισμα με φίλτρο μεγέθους πόρων 0.45 $\mu\text{m}$ . Τα διαλύματα αποθήκευσης φυλάσσονται στους  $-20^\circ\text{C}$ . Τα διαλύματα αποθήκευσης, οι τελικές συγκεντρώσεις, ο τρόπος δράσης και ο μηχανισμός ανθεκτικότητας των αντιβιοτικών αυτών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (2.2).

**Πίνακας 2.2:** Τελικές συγκεντρώσεις, τρόπος δράσης και μηχανισμός ανθεκτικότητας αντιβιοτικών.

Αντιβιοτικό / διαλύτης	Τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο	Διάλυμα αποθήκευσης	Τρόπος δράσης	Μηχανισμός ανθεκτικότητας
Αμπικιλίνη (Amp) / d H <sub>2</sub> O	100 µg/ml	100 mg/ml	Αναστέλλει τη δράση του ενζύμου τρανσπεπτιδάση, εμποδίζοντας τη σύνθεση γειτονικών πεπτιδογλυκανών και προκαλώντας τον τερματισμό της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος	Το γονίδιο bla κωδικοποιεί τη β-λακταμάση, η οποία διασπά τον β-λακταμικό δακτύλιο του αντιβιοτικού
Καναμυκίνη (Km) / d H <sub>2</sub> O	50 µg/ml	50 mg/ml	Προσδέεται στο 70 S ριβόσωμα με αποτέλεσμα να προκαλούνται λάθη στην ανάγνωση του αγγελιοφόρου RNA (m-RNA)	Το γονίδιο kan κωδικοποιεί την τρανσφεράση των αμινογλυκοσιδίων η οποία τροποποιεί το αντιβιοτικό και παρεμποδίζει τη μεταφορά του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του κυττάρου

## 2.4 Αποθήκευση καλλιέργειας μικροοργανισμών

Σε βαθμονομημένα κρυοφιαλίδια με βιδωτό καπάκι προσθέτω :

~ 1500 µl καλλιέργειας που έχει αναπτυχθεί για 24 ώρες (O/N)

~ 300 µl γλυκερόλης 100%

Ακολουθεί ανάδευση και αποθήκευση στους – 80°C.

## 2.5 Πριμοδοτικά μόρια

Τα πριμοδοτικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.3 :** Πριμοδοτικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Oligoname	Seq ( 5' → 3' )	Length	Tm (° C)	% G + C
pyNir sense	CATGAGGGATCCGT GACCGTTACCGACA GCGAGTC	35 n	>75	60 %
pyNir antisense	ATTATAAGGGCCCA CTCCTGCCTGGCCC ATGCGCGTG	37 n	>75	62.2 %
pyNar sense	TTATCTGGATCCGT GAGCACGGCGACTA CGCCGGAC	36 n	>75	61.1 %
pyNar antisense	TATTGAGGGCCCCA CCTGACCTCCTGCG TGGGTTTC	36 n	>75	61.1 %
pyNar R67A for	GCTGGGCGCTATCG TGGTCCG	20 n	65.5	70 %
pyNar R67A rev	CGACCACGATAGCG CCCAGC	20 n	65.5	70 %
pyNar R67K for	GCGCTGGGCAAAAT CGTGGTCCG	22 n	65.8	63.6 %
pyNar R67K rev	CGACCACGATTTTG CCCAGCGC	22 n	65.8	63.6 %
pyNar R67H for	GCGCTGGGTCACAT CGTGGTCCG	22 n	67.7	68.2 %
pyNar R67H rev	CGACCACGATGTGA CCCAGCGC	22 n	67.7	68.2 %
NarK for	TTTCAGGGATCCAT GAGTCACTCATCCG CCCCCGAAAG	38 n	74.9	55.3 %
NarK rev	CTCGAATGGGCCCT TTTTAGAATGCCGA CCATATACCGCC	40 n	74.6	52.5 %
NarU for	GATGATGGATCCAT GGCGCTGCAAAATG AGAAAAATAG	38 n	69.5	42.1 %
NarU rev	ACCGCCTGGGCCCT TTTGACTAAACTTC CGCCGACCATAA	40 n	>75	55 %

LacZ50	GCTTCCGGCTCGTA TGTTGTGTGG	24 n	66.1	58.3%
pT7-5	GACGGGGAGTCAG GCAACTATGG	23 n	66	60.9%

## 2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

### Μέθοδος

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι μία *in vitro* ενζυμική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που έχουν σαν βάση τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό μιας ειδικής αλληλουχίας DNA.

### Στάδια της PCR

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.1.

1. Αποδιάταξη (denaturation step): Οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιάσσονται (διαχωρίζονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95°C για περίπου 30 sec έως 1 min.
2. Υβριδισμός εκκινητών (annealing step): Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65°C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
3. Επιμήκυνση (extension step): Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε την θερμοκρασία στους 72°C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας την συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000bp ανά λεπτό.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή, συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μία προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και την διαδοχή τους.

## Συστατικά της PCR

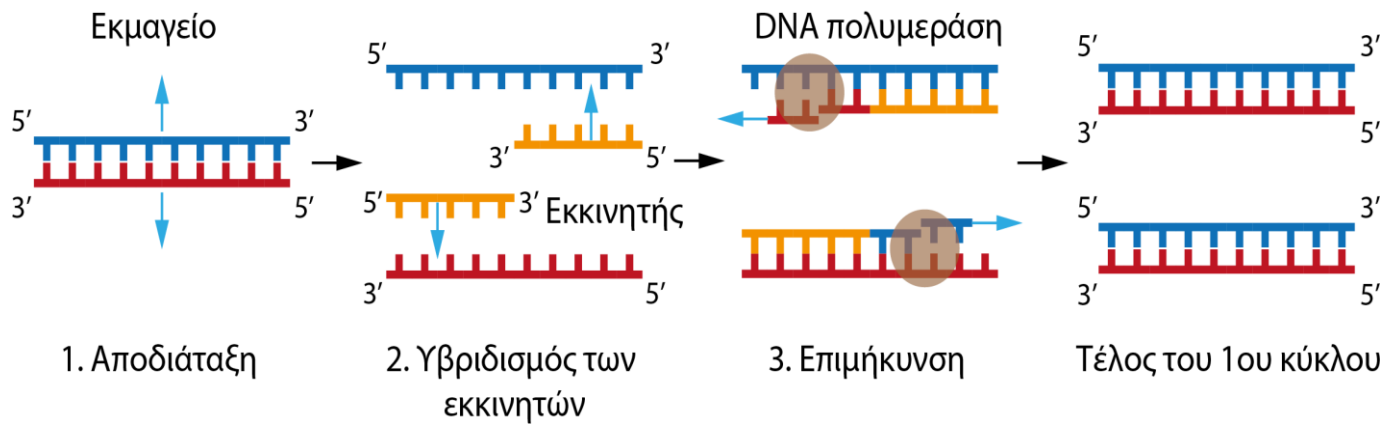
1. DNA πολυμεράση
2. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές
3. Γενετικό υλικό- αλληλουχία στόχος
4. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και  $Mg^{2+}$
5. Νουκλεοτίδια (dNTPs)

## Ενζυμική αντίδραση

Σε μία αντίδραση PCR ένα δείγμα DNA αναμειγνύεται με τους τέσσερις δεοξυριβονουκλεοζίτες (dNTPs), δύο πριμοδοτικά μόρια (primers) και την ειδική DNA πολυμεράση και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου. Το δείγμα θερμαίνεται στους 94-95°C για να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA (στάδιο μετουσίωσης) και ακολούθως ψύχεται στην κατάλληλη θερμοκρασία για να υβριδοποιηθούν τα πριμοδοτικά μόρια με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA (στάδιο πρόσδεσης πριμοδοτών). Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72°C όπου η DNA πολυμεράση συνθέτει μία καινούργια μονόκλωνη αλυσίδα χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την προς ενίσχυση αλυσίδα (στάδιο επιμήκυνσης). Η σύνθεση γίνεται με κατεύθυνση  $5' \rightarrow 3'$ , οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες χρησιμεύουν ως εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές (ο συνήθης αριθμός κύκλων είναι 30). Η αντίδραση είναι εκθετική αφού σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται (Εικόνα 2.1).

## Πολυμεράση

Για να πετύχει η αντίδραση PCR είναι πολύ σημαντικό να γίνεται ολική αποδιάταξη του DNA στόχου και του προϊόντος σε κάθε κύκλο. Η συνήθης θερμοκρασία αποδιάταξης είναι 94-95°C. Οι DNA πολυμεράσες που προέρχονται από ευκαρυωτικούς οργανισμούς απενεργοποιούνται σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες με αποτέλεσμα να απαιτείται προσθήκη ενζύμου στην αντίδραση μετά από κάθε κύκλο αποδιάταξης. Στις σύγχρονες προσεγγίσεις της τεχνικής PCR, χρησιμοποιούνται θερμοανθεκτικές πολυμεράσες με αντοχή σε επαναλαμβανόμενη θέρμανση στους 94-95°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού είναι 75-80°C και η ταχύτητα πολυμερισμού 150 νουκλεοτίδια/μόριο ενζύμου το δευτερόλεπτο. Συνήθως, η θερμοκρασία πολυμερισμού που χρησιμοποιείται στις πειραματικές διαδικασίες είναι 72°C. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η KAPA Hi-Fi DNA Πολυμεράση της KAPABIOSYSTEMS.



Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής PCR.

### Πριμοδοτικά μόρια

Η συγκέντρωση των πριμοδοτικών μορίων καθορίζεται συνήθως μεταξύ 0.1-0.5  $\mu\text{M}$ . Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορούν να οδηγήσουν στην λανθασμένη υβριδοποίηση και την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων ή στη δημιουργία διμερών, που χρησιμοποιούνται επίσης σαν στόχος από το ένζυμο, ελαττώνοντας έτσι την ποσότητα των ειδικών προϊόντων. Η θερμοκρασία (Τα annealing) και ο χρόνος που απαιτείται για την υβριδοποίηση των πριμοδοτικών μορίων εξαρτάται από την συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης παρέχεται από την προμηθεύτρια εταιρία ή υπολογίζεται από τον τύπο  $T_{\text{υβριδοπ}} = 2 \times (A + T) + 3 \times (C + G)$ . Αυξάνοντας τη θερμοκρασία υβριδοποίησης, αυξάνεται η ειδικότητα του τελικού προϊόντος μία και έτσι περιορίζεται η υβριδοποίηση των πριμοδοτικών μορίων στις περιοχές του DNA με τη μέγιστη συμπληρωματικότητα.

### Αριθμός κύκλων

Αν όλοι οι παράγοντες είναι ρυθμισμένοι στο άριστο δυνατό, ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης εξαρτάται κυρίως από την αρχική συγκέντρωση του DNA στόχου. Η διεξαγωγή περισσότερων κύκλων από όσους χρειάζονται αυξάνουν τον αριθμό των μη ειδικών προϊόντων, ενώ λιγότεροι κύκλοι παράγουν μικρότερη ποσότητα του ειδικού προϊόντος.

### Γενετικό υλικό (αλληλουχία στόχος)

Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA το οποίο θα έχει μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA, cDNA). Πολύ μικρές ποσότητες DNA (της τάξης των 25-100 ng ανά αντίδραση τελικού όγκου 50  $\mu\text{l}$ ) είναι επαρκείς για τις περισσότερες αντιδράσεις PCR. Μεγάλη ποσότητα DNA μπορεί να αναστείλει την αντίδραση. Για τη βέλτιστη απόδοση της PCR το DNA πρέπει να είναι μακρομοριακό και υψηλής καθαρότητας, απαλλαγμένο από υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων που μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση.



### Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και συγκέντρωση $Mg^{2+}$

Το διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα  $Mg^{2+}$ , που είναι απαραίτητος συμπράγοντας της DNA πολυμεράσης. Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές. Περίσσεια  $Mg^{2+}$  οδηγεί σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, αυξάνοντας τα μη ειδικά προϊόντα στην αντίδραση. Επίσης μειώνει την πιστότητα αντιγραφής της πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις  $Mg^{2+}$  οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Η βέλτιστη συγκέντρωση  $Mg^{2+}$  για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να προσδιορίζεται εμπειρικά με δοκιμή διαδοχικών συγκεντρώσεων από 1 έως 4 mM.

### Νουκλεοτίδια

Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται στα 80-800  $\mu$ M.

**Πίνακας 2.4:** Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR με Kara Hi-Fi DNA πολυμεράση.

### Αντίδραση

Αντιδραστήριο	Όγκος
5 x Buffer Hi-Fi με $Mg^{2+}$	10 $\mu$ l
dNTPs (10 mM )	1.5 $\mu$ l
Πριμοδοτικό μόριο forward (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l
Πριμοδοτικό μόριο reverse (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l
Υπόστρωμα DNA	1 $\mu$ l
Kara Hi-Fi DNA Polymerase (1U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	34 $\mu$ l
Τελικός όγκος	50 $\mu$ l

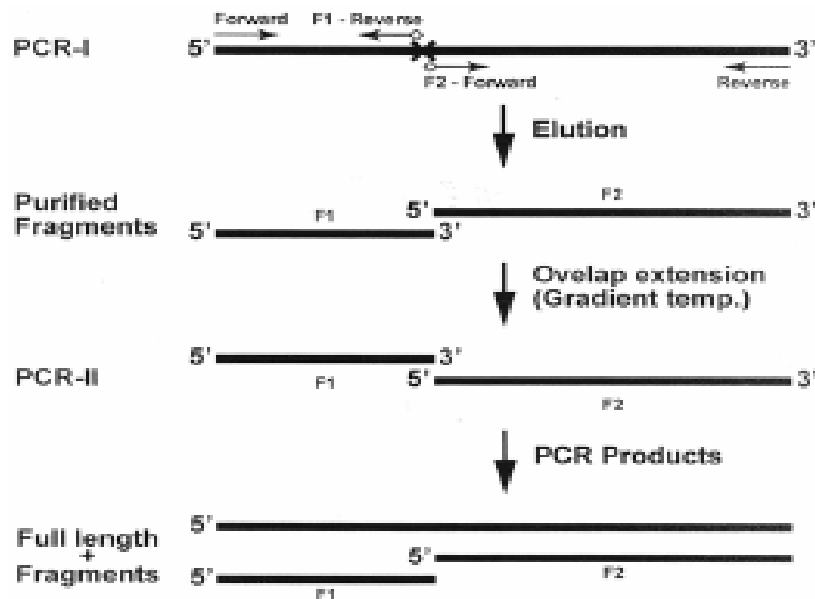
### Ρυθμίσεις κυκλοποιητή

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
98	5 λεπτά	1
95	1 λεπτό	30
(Ανάλογα το Tm των πριμοδοτικών μορίων)	1 λεπτό	
72	2 λεπτά	
72	10 λεπτά	1

### **2.6.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Δύο Σταδίων (Overlap extension PCR)**

#### Μέθοδος

Οι θεση-κατευθυνόμενες μεταλλάξεις είναι σημαντικές στην γενετική και τον μηχανισμό των πρωτεϊνών. Η επιθυμητή μετάλλαξη επιτυγχάνεται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η οποία ενισχύει ειδικά τμήματα DNA χρησιμοποιώντας DNA πολυμεράση. Η τεχνική βασίζεται στη σύνθεση εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων που περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη. Η τεχνική overlap extension PCR (PCR δύο σταδίων) (Patel et al., 2009), περιλαμβάνει δύο κύκλους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, που παράγουν δύο θραύσματα DNA με επικαλυπτόμενα άκρα. Χρειάζονται τέσσερις διαφορετικοί εκκινητές και δύο διαφορετικές φάσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στον κυκλοποιητή. Αρχικά, στην πρώτη φάση PCR πραγματοποιείται αντίδραση PCR με τους εκκινητές Forward (του γονιδίου) και F-1 Reverse (της μετάλλαξης), όπου ενισχύεται το θραύσμα 1, ενώ παράλληλα λαμβάνει χώρα αντίδραση PCR με τους εκκινητές Reverse (του γονιδίου) και F-2 Forward (της μετάλλαξης), όπου ενισχύεται το θραύσμα 2. Στην δεύτερη φάση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ως DNA χρησιμοποιείται ίση ποσότητα των προϊόντων PCR των δύο παραπάνω θραυσμάτων. Η σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.2 και η ενδεικτική αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι ίδια με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, η οποία παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.4.



Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής overlap extension PCR με μετάλλαξη.

## 2.7 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) NucleoSpin® Tissue της Macherey Nagel

### 1. Προετοιμασία δείγματος

1ml καλλιέργειας *Mycobacterium gilvum* Spyr1 σε LB φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 8.000g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.

### 2. Προ-λύση κυττάρων

Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 180μl διαλύματος λύσης T1 και προστίθενται 25μl προτεΐνάσης K. Το δείγμα αναδεύεται και επωάζεται στους 56 °C για 1-3 ώρες μέχρι να είναι ορατή πλήρης λύση των κυττάρων. Τα Gram θετικά βακτήρια αντί για το διάλυμα T1 επαναιωρούνται σε 180μl διαλύματος (20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 1% Triton X-100 σε pH: 8.0, 20mg/ml λυσοζύμη)

### 3. Λύση κυττάρων

Τα δείγματα αναδεύονται και προστίθενται 200μl διαλύματος λύσης B3, ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους 70 °C για 10 λεπτά. Έντονη ανάδευση.

### 4. Ρύθμιση των συνθηκών δέσμευσης του DNA

Στο σείγμα προστίθενται 210μl αιθανόλης (96-100%) και ακολουθεί έντονη ανάδευση.

## 5. Δέσμευση DNA

Το δείγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11.000g.

## 6. Έκλυση της μεμβράνης

Προστίθενται 500μl διαλύματος έκλυσης BW και το δείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11.000g, το έκλουσμα αποχύνεται. Προστίθενται 600μl διαλύματος έκλυσης B5 στη στήλη και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11.000g, το έκλουσμα αποχύνεται.

## 7. Ξήρανση της μεμβράνης

Η στήλη φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11.000g.

## 8. Έκλυση χρωμοσωμικού DNA

Προστίθενται 100μl διαλύματος έκλυσης BE, το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκεντρείται στις 11.000g για 1 λεπτό.

Το έκλουσμα συλλέγεται σε σωληνάριο erpendorf και αποθηκεύεται στους -20 °C.

## 2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

### Μέθοδος

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου απομόνωσης DNA σε μεγάλη κλίμακα προσαρμοσμένη σε μικρούς όγκους καλλιέργειας. Στηρίζεται στην αλκαλική λύση των κυττάρων, κατά την οποία λόγω υψηλού pH, το DNA (χρωμοσωμικό και πλασμιδιακό) αποδιατάσσεται, με διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες. Επαναφορά σε ουδέτερο pH οδηγεί στην επαναδιάταξη του πλασμιδιακού DNA, όχι όμως και του χρωμοσωμικού, επιτρέποντας την εκλεκτική απομόνωσή του.

### Πειραματική πορεία

Για την απομόνωση πλασμιδικού DNA η πειραματική πορεία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Εμβολιάζονται 5ml καλλιέργειας, η οποία αναπτύχθηκε για 24 ώρες, λαμβάνεται 1.5 ml και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 12.000g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.

Ακολουθούν:

2. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 100 μl διαλύματος 1.
3. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
4. Προσθήκη 100 μl διαλύματος 2. Ήπια ανάδευση έξι φορές.

5. Επώαση για 5 λεπτά σε πάγο (0 °C) .
6. Προσθήκη 100 µl διαλύματος 3. Ήπια ανάδευση έξι φορές.
7. Επώαση για 5 λεπτά σε πάγο (0 °C) .
8. Φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στις 12.000g.
9. Μεταφορά υπερκείμενου σε καθαρό σωληνάκι erpendorf.
10. Προσθήκη 1ml παγωμένης αιθανόλης 100%.
11. Επώαση για 10 λεπτά στους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
12. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 12.000g.
13. Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου.
14. Προσθήκη 500µl παγωμένης αιθανόλης 70%.
15. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 12.000g.
16. Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου.
17. Ξήρανση του ιζήματος για 15-20 λεπτά.
18. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 50µl αποστειρωμένου νερού.

#### Διαλύματα

**Διάλυμα 1:** Tris-Cl 50 mM pH: 8.0

EDTA 10 mM

RNase A 100 µg/ml

Μετά την προσθήκη της RNάσης το διάλυμα 1 φυλάσσεται στους 4 °C.

**Διάλυμα 2:** NaOH 200mM (stock διάλυμα 1M)

SDS 1% (stock διάλυμα 10%)

Το διάλυμα 2 παρασκευάζεται την στιγμή που θα χρησιμοποιηθεί.

**Διάλυμα 3:** CH<sub>3</sub>COOK 3 M pH: 5.5

Το διάλυμα 3 φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μετά την παρασκευή του.

## **2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) NucleoSpin® Plasmid της Macherey Nagel**

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA η πειραματική πορεία είναι η εξής:

### **1. Καλλιέργεια και συλλογή κυττάρων**

1-5 ml καλλιέργειας *E.coli* σε LB φυγοκεντρώνται για 5-10 λεπτά στις 11.000g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.

### **2. Λύση των κυττάρων**

Προστίθενται 250 μl διαλύματος επαναιώρησης A1. Τα κύτταρα επαναιωρούνται και μεταφέρονται σε σωληνάκι erpendorf. Προστίθενται 250 μl διαλύματος λύσης A2. Ακολουθεί ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας το σωληνάκι 6-8 φορές και το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά. Προστίθενται 300 μl διαλύματος ουδετεροποίησης A3, το δείγμα αναδεύεται ήπια αναποδογυρίζοντας το σωληνάκι 6-8 φορές και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 11.000g.

### **3. Δέσμευση του DNA**

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ειδική στήλη, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000g, το έκλουσμα απορρίπτεται.

### **4. Έκπλυση της μεμβάνης**

Αφού έχει προθερμανθεί το διάλυμα έκπλυσης AW στους 50 °C προστίθενται σε κάθε στήλη 500 μl αυτού και το δείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11.000g, το έκλουσμα αποχύνεται. Προστίθενται 600 μl διαλύματος έκπλυσης A4, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000g και το έκλουσμα απορρίπτεται.

### **5. Ξήρανση της μεμβράνης**

Για να στεγνώσει η μεμβράνη γίνεται φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 11.000g.

### **6. Έκλυση του πλασμιδιακού DNA**

Προστίθενται 50 μl διαλύματος έκλυσης AE ή αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O, το δείγμα επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 11.000g.

Το έκλουσμα συλλέγεται σε σωληνάριο erpendorf και αποθηκεύεται στους - 20 °C.

## **2.10 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της Macherey Nagel**

Το πήγμα της αγαρόζης που περιέχει την ζώνη DNA που πρόκειται να απομονωθεί, αποκόβεται από το υπόλοιπο πήγμα αγαρόζης, ζυγίζεται και τοποθετείται σε πλαστικό αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι erpendorf.

### **1. Διάλυση της πηκτής**

Για κάθε 100 mg πήγματος αγαρόζης προστίθενται 200 μl διαλύματος πρόσδεσης NT1. Το δείγμα επωάζεται για 5-10 λεπτά στους 50 °C μέχρι το πήγμα της αγαρόζης να διαλυθεί πλήρως αναδεύοντας ισχυρά (vortex) κάθε 2-3 λεπτά.

### **2. Δέσμευση του DNA**

Το δείγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη και φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000g. Το έκλουσμα απορρίπτεται.

### **3. Έκπλυση της μεμβράνης**

Προστίθενται 700 μl διαλύματος έκπλυσης NT3 στη στήλη και το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000g. Το έκλουσμα απορρίπτεται. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται.

### **4. Ξήρανση της μεμβράνης**

Το δείγμα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 11.000g για πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3.

### **5. Έκλουση του DNA**

Προστίθενται στη στήλη 15 μl αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O, το δείγμα επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 11.000g. Το έκλουσμα συλλέγεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται και το έκλουσμα συλλέγεται στο ίδιο erpendorf.

Το DNA αποθηκεύεται στους -20 °C.

## **2.11 Καθαρότητα και ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων**

### Προσδιορισμός με ηλεκτροφόρηση

Για την μέτρηση της ποσότητας των νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιούνται κυρίως δύο μέθοδοι. Αν η ποσότητα του DNA ή του RNA είναι πολλή μικρή τότε μπορεί να προσδιοριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Επίσης, η ηλεκτροφορητική εικόνα του δείγματος παρέχει στοιχεία για την καθαρότητά του π.χ. εάν ένα δείγμα DNA έχει μολυνθεί με RNA και το αντίστροφο.

Εάν το διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων είναι καθαρό, δηλαδή δεν περιέχει σημαντικά ποσά από πρωτεΐνες, αγαρόζη ή φαινόλη χρησιμοποιείται ο φωτομετρικός προσδιορισμός.

### Φωτομετρικός προσδιορισμός

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της καθαρότητας των δειγμάτων DNA γίνονται δύο μετρήσεις: μία στα 260 nm και μία στα 280 nm. Η μέτρηση στα 260 nm χρησιμοποιείται στον υπολογισμό της συγκέντρωσης του νουκλεϊκού οξέος στο δείγμα. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι μία μονάδα οπτικής απορρόφησης ( $OD_{260nm} = 1$ ) αντιστοιχεί περίπου σε 50  $\mu\text{g/ml}$  δίκλωνου μορίου DNA ισχύει ότι:  $C_{DNA} (\mu\text{g/ml}) = OD_{260nm} \times 50 \times \text{συντελεστής αραίωσης}$ . Ομοίως, για το RNA ισχύει ότι μία μονάδα οπτικής απορρόφησης ( $OD_{260nm} = 1$ ) αντιστοιχεί σε 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA επομένως προκύπτει ότι:  $C_{RNA} (\mu\text{g/ml}) = OD_{260nm} \times 40 \times \text{συντελεστής αραίωσης}$ . Η μέτρηση στα 280 nm χρησιμεύει στον προσδιορισμό της καθαρότητας του δείγματος του νουκλεϊκού οξέος, η οποία υπολογίζεται από τον λόγο των τιμών της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm και στα 280 nm ( $OD_{260nm} / OD_{280nm}$ ). Καθαρά δείγματα DNA δίνουν τιμές μεγαλύτερες από 1.7 έως 2.0, εάν υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών ή φαινόλης ο λόγος  $OD_{260nm} / OD_{280nm}$  δίνει πολύ μικρότερες τιμές, ενώ εάν υπάρχει πρόσμιξη με RNA ο λόγος  $OD_{260nm} / OD_{280nm}$  δίνει πολύ μεγαλύτερες τιμές και ο ακριβής προσδιορισμός της ποσότητας των νουκλεϊκών οξέων δεν είναι δυνατός με αυτή τη μέθοδο.

## **2.12 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης**

### Μέθοδος

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό, τον καθαρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι μόρια DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου λόγω του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού σκελετού, θα μετακινηθούν προς το θετικό πόλο και πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τα δίκλιωνα γραμμικά τμήματα DNA κινούνται στην πηκτή αγαρόζης και διανύουν απόσταση, η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου ( $\log_{10}$ ) του μοριακού τους βάρους ή του αριθμού των βάσεων τους. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων DNA σε ένα πήκτωμα αγαρόζης περιγράφεται από την εξίσωση:  $\log \mu = \log \mu_0 - K_r t$ , όπου  $\mu_0$  η ελεύθερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA,  $K_r$  ο συντελεστής καθυστέρησης (retardation coefficient), μία σταθερά που σχετίζεται με τις ιδιότητα της πηκτής, το μέγεθος και το σχήμα των προς ανάλυση μορίων και  $t$  η συγκέντρωση της αγαρόζης. Συνεπώς, επηρεάζεται από την συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, την στερεοδιαμόρφωση του DNA και την εφαρμοζόμενη τάση.



### Η συγκέντρωση της αгарόζης στο πήκτωμα

Ένα γραμμικό μόριο DNA συγκεκριμένου μεγέθους κινείται με διαφορετικό ρυθμό σε πηκτή αгарόζης διαφορετικής συγκέντρωσης. Με τον τρόπο αυτό χρησιμοποιώντας πηκτές διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορεί να διαχωριστεί ένα ευρύ φάσμα μεγεθών. Συνήθως χρησιμοποιείται πηκτή αгарόζης σε συγκέντρωση 0.8%, ενώ για τμήματα DNA με μικρότερο μέγεθος (κάτω από 1000 ζεύγη βάσεων) χρησιμοποιείται συγκέντρωση 1 ή 2%.

### Στερεοδιαμόρφωση του DNA

Μόρια DNA ίδιου μοριακού βάρους αλλά με διαφορετική στερεοδιαμόρφωση (υπερελικωμένα, ανοιχτά κυκλικά ή ευθύγραμμα) κινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα αгарόζης. Αυτό οφείλεται στην διαφορετική μηχανική παρεμπόδιση της μετακίνησης κατά μήκος της πηκτής, ανάλογα με την αναδίπλωση του μορίου DNA στο χώρο. Οι σχετικές κινητικότητες των τριων μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση της αгарόζης και σε μικρότερο βαθμό από την εφαρμοζόμενη τάση του ρεύματος, το βαθμό ιονισμού του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και την πυκνότητα των ελίκων του μορίου DNA. Η σειρά αύξησης της κινητικότητας είναι: ανοιχτά κυκλικά μόρια, ευθύγραμμα μόρια και υπερελικωμένα κυκλικά μόρια (Grinstead and Bennett, 1988).

### Εφαρμοζόμενη τάση

Υπό χαμηλή διαφορά δυναμικού, ο ρυθμός μετακίνησης γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος της εφαρμοζόμενης τάσης. Σε υψηλές διαφορές δυναμικού του κυκλώματος, η κινητικότητα των τμημάτων DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται διαφορικά, συγκριτικά με αυτή των μικρότερων τμημάτων. Συνεπώς, το εύρος διαχωρισμού σε πηκτές αгарόζης μειώνεται όσο αυξάνεται η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού. Για να επιτύχουμε τη μέγιστη ανάλυση τμημάτων DNA μεγαλύτερων από 2kb πρέπει να εφαρμόσουμε στο πήκτωμα όχι μεγαλύτερη τάση από 5V/cm (η μονάδα cm αναφέρεται στην απόσταση μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων και όχι στο μήκος της πηκτής).

### Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Το ρυθμιστικό διάλυμα βοηθά στην διατήρηση της σταθερότητας του pH και παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Απουσία ιόντων η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται ελάχιστα ή καθόλου.

### Βρωμιούχο αιθίδιο

Προκειμένου οι ζώνες του DNA να γίνουν ορατές στο πήκτωμα, χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο λόγω της επίπεδης διαμόρφωσής του, έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων και να δεσμεύεται με αυτόν τον τρόπο στο DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία και φθορίζει στο ορατό φάσμα, με αποτέλεσμα οι ζώνες του DNA σε ένα πήκτωμα να γίνονται ορατές μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να προστεθεί είτε στην πηκτή αгарόζης είτε απ'ευθείας στο δείγμα DNA.

## Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

1. Διάλυση κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης σε διάλυμα 1 x TAE με βρασμό.
  - Ο όγκος του διαλύματος υπολογίζεται σύμφωνα με τις διαστάσεις της μήτρας που θα χρησιμοποιηθεί για την στερεοποίηση της πηκτής.
  - Το ποσό της αγαρόζης που προστίθεται υπολογίζεται με βάση την τελική συγκέντρωση αγαρόζης της πηκτής.
2. Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.5μg/ml, λίγο πριν η θερμοκρασία του διαλύματος φτάσει στο σημείο πήξης (~ 37-40 °C).
3. Στερεοποίηση της πηκτής στη μήτρα στην οποία οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων DNA σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικών “χτενών” που τοποθετούνται στη συσκευή.
4. Στερεοποίηση της πηκτής σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
5. Φύλαξη σε σκοτεινό μέρος αφού το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φωτοευαίσθητο.

## Πορεία ηλεκτροφόρησης

1. Προσθήκη στα δείγματα DNA διαλύματος φόρτωσης.

Η ποσότητα του διαλύματος φόρτωσης (GLB) που προστίθεται καθορίζεται με βάση την αναλογία 1:5 GLB:δείγματος. Το διάλυμα GLB περιέχει γλυκερόλη, με αποτέλεσμα το δείγμα να μην διαχέεται και να κατακρατείται στον πυθμένα του φρεατίου. Επίσης, το διάλυμα GLB περιέχει δύο αρνητικά φορτισμένες χρωστικές, των οποίων η μετακίνηση στο πήγμα αγαρόζης είναι ενδεικτική για το τέλος της ηλεκτροφόρησης.

2. Ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση και μάρτυρα DNA γνωστών μοριακών μεγεθών και συγκέντρωσης (Lambda DNA/Hind III Digest), προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που αναλύονται. Συνήθως χρησιμοποιείται όγκος 8μl.
3. Τοποθέτηση των δειγμάτων DNA και του μάρτυρα σε ειδικές θέσεις της πηκτής.
4. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό σταθερή τάση ρεύματος 100 – 120 Volt σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE x 1.
5. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήγμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm) προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα DNA – βρωμιούχου αιθιδίου, τα οποία παρουσιάζουν ζώνες ρόδινου χρώματος. Φωτογράφιση της πηκτής.

## Διαλύματα

Διάλυμα TAE (Tris-acetate) 1 x :

Το διάλυμα παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 50 φορές μεγαλύτερη (50x) και φυλλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το τελικό διάλυμα (1x) παρασκευάζεται λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με κατάλληλη αραιώση (40 ml διαλύματος 50x αραιώνονται σε 2 λίτρα απιονισμένου νερού).

Διάλυμα TAE 50 x ( 1L ) :     242g Tris  
  100ml 0.5M EDTA pH: 8.0

57.1ml οξικό οξύ

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης: 0.25% μπλε βρωμοφαινόλη

0.25% κυανολικό ξυλένιο

40% (w/v) σακχαρόζη σε dH<sub>2</sub>O

Το διάλυμα φόρτωσης μπορεί να αποθηκευτεί στους 4 °C.

## **2.13 Κατασκευή ανασυνδιασμένου DNA – Κλωνοποίηση**

Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του ανασυνδιασμένου DNA είναι δυνατό να διασφαλιστεί η αντιγραφή μιας αλληλουχίας DNA σε νέο κύτταρο ξενιστή, εισάγοντας την επιθυμητή αλληλουχία σε ένα φορέα κλωνοποίησης. Φορέας κλωνοποίησης είναι απλά ένα μόριο DNA που περιέχει μία αφετηρία της αντιγραφής και το οποίο μπορεί να διπλασιαστεί στο κύτταρο ξενιστή.

### Πλασμίδια ως φορείς κλωνοποίησης

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στη τεχνολογία του ανασυνδιασμένου DNA πληρούν τις περισσότερες από τις παρακάτω προϋποθέσεις:

1. Διαθέτουν έναν ή περισσότερους εύκολα επιλεγόμενους γενετικούς δείκτες για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων (συνήθως γονίδια που προσφέρουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά).
2. Φέρουν μια αφετηρία αντιγραφής (origin ή ori) που διασφαλίζει τον πολλαπλασιασμό τους στο επιθυμητό κύτταρο ξενιστή.
3. Το DNA του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης ιδανικά έχει μόνο μία περιοχή στόχο για κάποια συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση.
4. Ένα χαρακτηριστικό που αυξάνει τις δυνατότητες ενός πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης είναι η ύπαρξη μιας αλληλουχίας πολλαπλής σύνδεσης (polylinker sequence ή polycloning site), δηλαδή μια μικρή αλληλουχία που περιέχει τις θέσεις τομής για ένα πλήθος περιοριστικών νουκλεασών.

5. Διαθέτουν δομικά χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την έκφραση του κλωνοποιημένου DNA, όπως είναι ο υποκινητής (ισχύει κυρίως για τους φορείς κλωνοποίησης).

#### Κλωνοποίηση σε πλασμίδια

Η κλωνοποίηση μιας επιθυμητής αλληλουχίας DNA σε ένα πλασμιδιακό φορέα περιλαμβάνει δύο στάδια: την περιοριστική πέψη και των δύο με μία ή δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες και την ακόλουθη ανασύνδεση των επιθυμητών τμημάτων τους.

- Περιοριστική πέψη (Sambrook et al., 1989)

Η περιοριστική πέψη πραγματοποιείται με ειδικά ένζυμα που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να “κόβουν” συγκεκριμένες περιοριστικές θέσεις αποτελούμενες από τέσσερα έως οκτώ νουκλεοτίδια, σε μία αλληλουχία DNA. Για την κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA σε έναν πλασμιδιακό φορέα, γίνεται πέψη και των δύο με την κατάλληλη ή τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες για την δημιουργία άκρων που θα οδηγήσει στην ανασύνδεση των επιθυμητών τμημάτων.

Ενδεικτικά μία αντίδραση πέψης περιλαμβάνει:

DNA (0.5 – 1 μg)

1 μl περιοριστικού ενζύμου\*

Ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου σε ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου της αντίδρασης\*\*

Αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O για τη ρύθμιση του όγκου της αντίδρασης

\* Σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DNA, η ποσότητα του ενζύμου προσαρμόζεται ανάλογα.

\*\*Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι αυτό που προμηθεύει η εταιρία για το κάθε περιοριστικό ένζυμο, ενώ στην περίπτωση πέψης με δύο περιοριστικά ένζυμα το διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι αυτό που προτείνεται και πάλι από την προμηθεύτρια εταιρία.

Μετά την περιοριστική πέψη με το κατάλληλο ένζυμο και την επώαση της αντίδρασης ακολουθεί ηλεκτροφόρηση για τον διαχωρισμό των τμημάτων DNA που προκύπτουν. Τα επιθυμητά τμήματα που πρόκειται να ανασυνδεθούν μεταξύ τους, κόβονται και απομονώνονται από την πηκτή αφαρόζης με το kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up.

- Αντίδραση ανασύνδεσης (ligation)

Η αντίδραση ανασύνδεσης των επιθυμητών τμημάτων καταλύεται από το ένζυμο λιγάση. Το ένζυμο αυτό καταλύει τον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ ενός 5' – φωσφορικού άκρου με ένα 3' – υδροξυλιωμένο άκρο. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης ανασύνδεσης εξαρτάται από την μοριακή αναλογία της ένθεσης ως προς τον φορέα, η οποία ενδείκνυται να είναι από 6:1 έως 15:1. Τελικός όγκος της αντίδρασης είναι στα 10 ή 20 μl.

Η αντίδραση ανασύνδεσης πραγματοποιείται σε σωληνάκι erpendorf ως εξής:

**Πίνακας 2.5:** Ενδεικτική σύσταση αντίδρασης ανασύνδεσης.

Ευθύγραμμος πλασμιδιακός φορέας	1 – 3 $\mu$ l (10 – 20 ng)
Ευθύγραμμο ένθεμα	(70 – 240 ng)
10 x Buffer λιγάσης	1.5 $\mu$ l
Λιγάση	1 $\mu$ l
Αποστειρωμένο H <sub>2</sub> O	έως 15 $\mu$ l

Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται για τουλάχιστον 18 ώρες στους 16 °C.

Η επιλογή του ανασυνδισμένου πλασμιδίου γίνεται μετά από κατάλληλες πέψεις στο απομονωμένο πλασμιδιακό DNA από τα κύτταρα – ξενιστές στα οποία έχει εισαχθεί με μετασχηματισμό.

Στην παρούσα εργασία ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pT7-5, το οποίο παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Οι περιοριστικές πέψεις που έλαβαν χώρα τόσο στο πλασμίδιο όσο και στα αντίστοιχα γονίδια που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν από τα ένζυμα BamHI και ApaI. Ενώ, στη συνέχεια ακολούθησε η αντίδραση ανασύνδεση από το ένζυμο λιγάση T4.

## **2.14 Μετασχηματισμός του βακτηρίου *E.coli* με πλασμιδιακό DNA**

### Μέθοδος

Η μέθοδος στηρίζεται στην πρόσληψη πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα, τα οποία έχουν καταστεί επιδεκτικά μετά από επίδραση με ιόντα ασβεστίου (Kushner et al., 1978).

### Πειραματικό μέρος

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας *E.coli* DH5a ή TOP10F' μέχρι οπτικής πυκνότητας (OD: 0.2 – 0.4) στα 600nm.
2. 1.5ml από την παραπάνω καλλιέργεια τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι erpendorf και φυγοκεντρείται για 3 λεπτά στις 12.000 rpm.
3. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με 1ml διαλύματος πλύσεως Δ1 και φυγοκέντρησή τους για τρία λεπτά στις 12.000 rpm.

4. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος κατασκευής επιδεκτικών κυττάρων Δ2 και επωάζεται για 30 λεπτά στον πάγο (0 °C).
5. Το εναιώρημα φυγοκεντρείται για 3 λεπτά στις 12.000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 200μl του διαλύματος Δ2.
6. Προστίθεται το πλασμιδιακό DNA (συγκέντρωση 0.1- 0.5μg/ml) και το εναιώρημα των κυττάρων επωάζεται για 30 λεπτά στον πάγο (0 °C).
7. Ακολουθεί θερμικό πλήγμα των κυττάρων για 1 λεπτό στους 43.5 °C με τοποθέτηση του μικροφυγοκεντρικού σωλήνα erppendorf σε υδατόλουτρο.
8. Στο κυτταρικό εναιώρημα προστίθεται 1ml πλήρες θρεπτικό Luria Broth και επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα, έτσι ώστε τα κύτταρα να αναρρώσουν και να τους δοθεί χρόνος να αντιγράψουν και να εκφράσουν το πλασμιδιακό DNA.
9. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων γίνεται εμβολιασμός 0.2ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο Luria Agar που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα υπόλοιπα 0.8ml της καλλιέργειας φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 6.000rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 0.2ml υγρού θρεπτικού μέσου Luria Broth, το οποίο στη συνέχεια εμβολιάζεται σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων.

#### Διαλύματα

Διάλυμα πλύσεως Δ1: RbCl<sub>2</sub> 10mM

MOPs (μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ) pH: 7.0 10mM

Διάλυμα παρασκευής επιδεκτικών κυττάρων Δ2: RbCl<sub>2</sub> 10mM

MOPs pH: 6.5 100mM

CaCl<sub>2</sub> 50mM

Τα διαλύματα Δ1 και Δ2 αποστειρώνονται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45μm και αποθηκεύονται στους 4°C.

Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται στους 0°C, με απαλή ανάδευση και σε στείρες συνθήκες.

## **2.15 Κατασκευή επιδεκτικών κυττάρων του βακτηρίου *E.coli***

1. Εμβολιάζεται μονή αποικία κυττάρων TOP10F' / DH5a σε 4 – 5 ml πλήρους υγρού θρεπτικού μέσου Luria Broth και επωάζεται για 24 ώρες (overnight) στους 37 °C υπό ανάδευση.

2. Μεταφέρονται 100μl της O/N προκαλλιέργειας σε 100ml πλήρες υγρό θρεπτικό μέσο Luria Broth και επωάζεται στους 37°C.
3. Μετράται κατά διαστήματα η απορρόφηση της καλλιέργειας μέχρι να φτάσει την τιμή 0.350 στα 600nm.
4. Η καλλιέργεια επωάζεται στον πάγο (0°C) για τουλάχιστον 10 λεπτά.
5. Η καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο αποστειρωμένα σωληνάκια και ζυγοσταθμίζεται.
6. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 λεπτά στους 4 °C στις 2.700g. Το υπερκείμενο αποχύνεται.
7. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 5ml διαλύματος TB (transformation buffer) σε κάθε σωληνάκι, αντίστοιχα και τα κύτταρα μαζεύονται σε ένα σωληνάκι όπου προστίθενται άλλα 20 ml διαλύματος TB.
8. Ακολουθεί επώαση στον πάγο (0 °C) για 10 λεπτά και φυγοκέντριση για 10 λεπτά στους 4°C στις 2.700g. Το υπερκείμενο αποχύνεται.
9. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 4ml διαλύματος 10 – 15% γλυκερόλης, δηλαδή 3.400μl διαλύματος TB και 600μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 100%.
10. Το εναιώρημα χωρίζεται σε αποστειρωμένα μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια erppendorf από 200μl στο καθένα και αποθηκεύονται στους - 80°C, το πολύ για δύο μήνες.

#### Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα μετασχηματισμού (TB): 50mM CaCl<sub>2</sub>

10mM Tris – HCl pH: 8.0

Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45μm, ενώ κατά την διάρκεια του πειράματος τοποθετείται στον πάγο (0°C).

## **2.16 Μετασχηματισμός με *E.coli* DH5a ή TOP10F' επιδεκτικά κύτταρα**

#### Μέθοδος

Ο μετασχηματισμός οφείλεται στο γεγονός ότι το ρυθμιστικό διάλυμα μετασχηματισμού (TB) καθιστά τα τοιχώματα των κυττάρων ικανά ώστε να τα διαπεράσει το πλασμιδιακό DNA, λόγω της παρουσίας των ιόντων ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>).

#### Πειραματική πορεία

1. Ξεπαγώνονται ήπια τα επιδεκτικά κύτταρα από τους -80°C μέσα σε πάγο για περίπου 10 λεπτά.
2. Προστίθενται στο πλασμιδιακό DNA 200μl από τα επιδεκτικά κύτταρα και το κυτταρικό εναιώρημα επωάζεται για 20 λεπτά σε πάγο.

3. Ακολουθεί θερμικό πλήγμα των δειγμάτων στους 43°C για 90 δευτερόλεπτα.
4. Στο κυτταρικό εναιώρημα προστίθεται 1ml πλήρες θρεπτικό Luria Broth και επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα.
5. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων γίνεται εμβολιασμός 0.2ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο Luria Agar που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασηματισμένων κυττάρων. Τα υπόλοιπα 0.8ml της καλλιέργειας φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά στις 6.000rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 0.2ml υγρού θρεπτικού μέσου Luria Broth, το οποίο στη συνέχεια εμβολιάζεται σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασηματισμένων κυττάρων.
6. Τα τρυβλία που εμβολιάστηκαν επωάζονται overnight στους 37°C.

## 2.17 Αναπλήρωση φαινότυπου-Κατασκευή καμπύλης ανάπτυξης

Η παρακάτω πειραματική πορεία χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί αν οι πιθανοί μεταφορείς νιτρικών/νιτροδών Pynar και Pynir του βακτηρίου *Mycobacterium gilvum* Spyr1 μεταφέρουν νιτρικά και αναπληρώνουν τον φαινότυπο των στελεχών *E.coli* JCB4518 (Clegg et al., 2002).

1. Εμβολιάζεται μονή αποικία κυττάρων (JCB4518-pynar, JCB4518-pynir, JCB4518-nark, JCB4518-naru, JCB4518-pt7) σε 2ml υγρό θρεπτικό μέσο Luria Broth με τα κατάλληλα αντιβιοτικά (Amp Km) και τα κύτταρα επωάζονται για 6 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση.
2. Προστίθενται 2ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε 50ml υγρού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης αλάτων, το οποίο περιέχει γλυκόζη (2mg/ml) και ως νιτρικά (20 mM) και ακολουθεί επώαση στους 30°C χωρίς ανάδευση για 4 ώρες.
3. Προστίθεται διάλυμα IPTG, σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM, το διάλυμα πυροδοτεί την μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης και χρησιμοποιείται για επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών, όταν το γονίδιο είναι υπό τον έλεγχο του οπερονίου της λακτόζης. Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες επωάζονται για 12 ώρες στους 30°C χωρίς ανάδευση.
4. Λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα κυττάρων και ακολουθούν 3 διαδοχικές εκπλύσεις με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αλάτων. Τα κύτταρα εμβολιάζονται σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αλάτων στο οποίο έχει γίνει προσθήκη γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα (0.4% v/v) ώστε η αρχική απορρόφηση να είναι 0.1 (OD) στα 600nm. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C χωρίς ανάδευση, απουσία και παρουσία νιτρικών (20 mM).
5. Η απορρόφησή τους μετράται τους σε τακτά χρονικά διαστήματα στα 600nm και κατασκευάζεται η καμπύλη ανάπτυξης. Ανάπτυξη παρουσία νιτρικών συνεπάγεται ότι οι Pynar και Pynir μεταφέρουν νιτρικά και αναπληρώνουν τον φαινότυπο των στελεχών *E.coli* JCB4518.

Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αλάτων περιγράφεται στην παράγραφο 2.2. Τα στελέχη *E.coli* JCB4518 που φέρουν τους μεταφορείς *nark* και *naru* χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες ενώ το



JCB4518-*pt7* ως αρνητικός μάρτυρας. Μη ανάπτυξη παρουσία νιτρικών συνεπάγεται ότι δεν λειτουργούν ως μεταφορείς.

## 2.18 Πειράματα πρόσληψης νιτρικών (uptake)

Η ακόλουθη πειραματική πορεία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των νιτρικών και νιτρωδών (Unkles et al., 2009, 2015, Brownley and Arst, 1983).

1. Εμβολιάζεται μονή αποικία κυττάρων (JCB4518-*rynar*, JCB4518-*rynir*, JCB4518-*nark*, JCB4518-*pt7-5*, JCB4518-*rynar R67A*, JCB4518-*rynar R67H*, JCB4518-*rynar R67K*) σε 2ml υγρό θρεπτικό μέσο Luria Broth με τα κατάλληλα αντιβιοτικά (Amp Km) και τα κύτταρα επωάζονται για 6 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση.
2. 2ml κυττάρων από την παραπάνω καλλιέργεια προστίθενται σε 50ml θρεπτικού μέσου ανάπτυξης αλάτων, το οποίο περιέχει γλυκόζη (2mg/ml) και νιτρικά (20mM) και ακολουθεί επώαση στους 30°C χωρίς ανάδευση για 4 ώρες.
3. Προστίθεται διάλυμα IPTG, σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM και οι καλλιέργειες επωάζονται για περίπου 12 ώρες στους 30°C χωρίς ανάδευση.
4. Λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα κυττάρων, ακολουθούν 3 διαδοχικές εκπλύσεις με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αλάτων και τα κύτταρα εμβολιάζονται σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αλάτων, το οποίο περιέχει γλυκόζη (συγκέντρωση) και διάφορες συγκεντρώσεις νιτρικών (100, 250, 500, 750, 1000, 1500 και 2000μM) ώστε η αρχική απορρόφηση να είναι 0.5 (OD) στα 600nm.
5. Σε τακτά χρονικά διαστήματα, 500μl καλλιέργειας φιλτράρονται και πραγματοποιείται μέτρηση νιτρικών και νιτρωδών στο υπερκείμενο.

### Μέτρηση νιτρικών

50μl δείγματος προστίθενται σε 950μl υπερχλωρικού οξέος 5% και μετράται η απορρόφηση στα 210nm στο υπεριώδες με κυψελίδα χαλαζία. Η απορρόφηση μετράται σε τριπλέτες για κάθε δείγμα. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αλάτων με γλυκόζη χωρίς νιτρικά.

### Πρότυπη καμπύλη νιτρικών

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης νιτρικών χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις: 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 μM. 50μl κατάλληλης συγκέντρωσης νιτρικών μεταφέρονται σε 950μl υπερχλωρικού οξέος 5% και μετράται η απορρόφηση στα 210nm με κυψελίδα χαλαζία. Η απορρόφηση κάθε δείγματος λαμβάνεται εις τριπλούν.

### Διαλύματα

5% υπερχλωρικό οξύ

### Μέτρηση νιτρωδών

Τα νιτρώδη προσδιορίζονται φωτομετρικά. 40μl δείγματος φορτώνονται ανά τριπλέτες σε κατάλληλη πλάκα ELISA, προστίθενται 80 μl από τα αντιδραστήρια sulfanilamide:NED (N-(1-ναφθυλ)αιθυλενοδιαμινο διϋδροχλωρίδιο) σε αναλογία 1:1, οι πλάκες επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 540nm. Τα διαλύματα sulfanilamide και NED είναι φωτοευαίσθητα και η ανάμιξή τους πραγματοποιείται πριν από την φωτομέτρηση των δειγμάτων.

### Πρότυπη καμπύλη νιτρωδών

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης νιτρωδών χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 μM. 40μl δείγματος κατάλληλης συγκέντρωσης νιτρωδών φορτώνονται ανά τριπλέτες σε ειδική πλάκα ELISA, προστίθενται τα διαλύματα sulfanilamide:NED σε αναλογία 1:1 (80 μl), οι πλάκες επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 540nm.

### Διαλύματα

1g sulfanilamide σε 100ml HCl 3N

0.1g NED σε 100ml απιονισμένου H<sub>2</sub>O

### Ρύθμιση φωτομέτρου

Το φωτόμετρο ELISA ρυθμίζεται στις παρακάτω συνθήκες:

Θερμοκρασία: 24 °C

Ανάδευση: 10 δευτερόλεπτα

Απορρόφηση: 540nm

## **2.19 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)**

### Εισαγωγή

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης είναι μέθοδος ανίχνευσης και ημιποσοτικού προσδιορισμού μιας επιθυμητής πρωτεΐνης σε άγνωστο βιολογικό δείγμα (Karatza and Frillingos, 2005). Εφαρμόζεται σε μίγμα πρωτεϊνών που έχουν διαχωρισθεί με SDS-PAGE. Στηρίζεται στην ειδική σύνδεση της πρωτεΐνης με ειδικό «πρωτεύον» αντίσωμα. Η ανίχνευση γίνεται μετά από σύνδεση του πρωτεύοντος αντισώματος με ένα δευτερεύον. Το δευτερογενές αντίσωμα περιέχει στο μόριο του συζευγμένο κάποιο ένζυμο-δείκτη το οποίο αντιδρά με εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα (αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας) οπότε και επιτυγχάνεται η εμφάνιση των προσδιοριζόμενων πρωτεϊνών σε ειδικό φιλμ (Εικόνα 2.3).

Τα στάδια της ανοσοαποτύπωσης είναι συνοπτικά τα εξής:

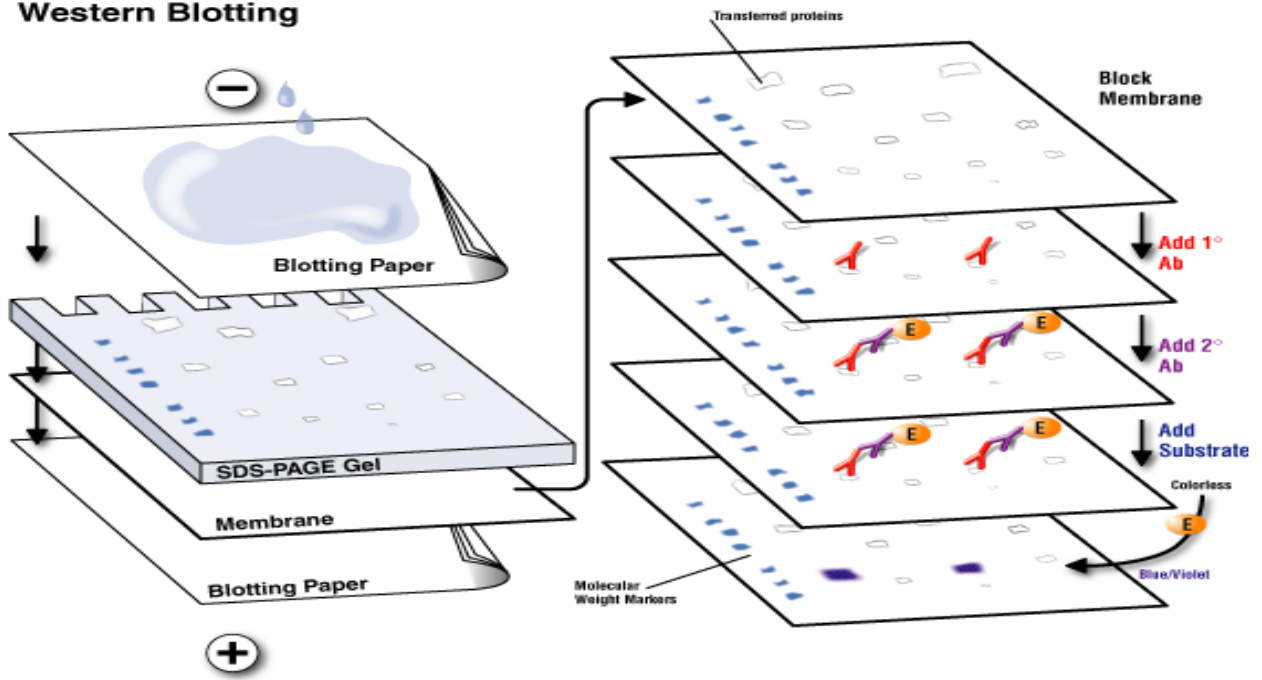
1. Προκατεργασία πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα
2. Ακολουθεί διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.
3. Στη συνέχεια, γίνεται ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήγμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη (νιτροκυτταρίνη ή PVDF). Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται υπό τη μορφή συμπλόκου με το SDS και είναι αρνητικά φορτισμένες μεταφέρονται από το gel προς τη μεμβράνη με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (διαφοράς δυναμικού).
4. Η μεμβράνη επωάζεται με ένα διάλυμα πρωτεΐνης (αραιωμένο διάλυμα γάλακτος) προκειμένου να καλυφθούν μη ειδικές θέσεις της μεμβράνης (θέσεις που δεν έχουν προσδεθεί πρωτεΐνες).
5. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με κατάλληλο **πρωτεύον αντίσωμα** που προσδέεται στην επιθυμητή πρωτεΐνη
6. Ανοσοανίχνευση. Η μεμβράνη επωάζεται με κατάλληλο **δευτερεύον αντίσωμα**, το οποίο είναι ικανό να αναγνωρίζει και να δεσμεύεται στο πρωτεύον. Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύεται έμμεσα η επιθυμητή πρωτεΐνη. Στο στάδιο αυτό γίνεται ο εντοπισμός της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, και που βρίσκεται «καθλωμένη» στη μεμβράνη, με τη βοήθεια αντισωμάτων που αναγνωρίζουν ειδικά την πρωτεΐνη αυτή.

#### Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης και η βαφή των πηγμάτων, είναι ιδανική για την εξέταση όλων των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο δείγμα. Ωστόσο, δεν παρέχουν επαρκείς πληροφορίες για συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Για την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, είναι απαραίτητη η χρήση ανοσοχημικών μεθόδων. Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκε μια μέθοδος μεταφοράς πρωτεϊνών από πήγμα σε μεμβράνη PVDF. Η μέθοδος αυτή της ανοσοαποτύπωσης ή western blotting, χρησιμοποιεί αντισώματα για την ανίχνευση της παρουσίας, σχετικής ποσότητας και μοριακού βάρους μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Για την απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης-αντισωμάτων χρησιμοποιούνται ενζυμικοί δείκτες, συζευγμένοι σε δευτερεύοντα αντισώματα, οι οποίοι στη συνέχεια ανιχνεύονται με τη χρήση του κατάλληλου υποστρώματος μέσω χημειοφωταύγειας. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται αποτυπώνεται σε φωτογραφικό φιλμ. Οι ζώνες αυτές στη συνέχεια μπορούν να αναλυθούν για περαιτέρω πληροφορίες, με τη χρήση ειδικών υπολογιστικών προγραμμάτων.

Στην παρούσα εργασία τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης πραγματοποιήθηκαν με το σύζευγμα avidin-HRP (Karatza and Frillingos, 2005).

## Western Blotting



Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής της ανοσοοποτύπωσης (Mahmood and Yang, 2012).

### Πειραματική πορεία

#### 1. Παρασκευή κλάσματος μεμβρανών

##### A) Διαδικασία

1. Εμβολιάζεται μονή αποικία κυττάρων (JCB4518-*pynar*, JCB4518-*pynir*, JCB4518-*nark*, JCB4518-*naru*, JCB4518-*pynar R67A*, JCB4518-*pynar R67H*, JCB4518-*pynar R67K*) σε 2ml υγρό θρεπτικό μέσο Luria Broth με κατάλληλο αντιβιοτικό και τα κύτταρα επωάζονται για 6 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση.
2. Προστίθενται 2ml από τα παραπάνω κύτταρα σε 50ml πλήρους θρεπτικού μέσου ανάπτυξης αλάτων, το οποίο περιέχει ως πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και ως πηγή αζώτου τα νιτρικά και ακολουθεί επώαση στους 30°C χωρίς ανάδευση για 4 ώρες.
3. Προστίθεται διάλυμα IPTG, σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM και οι καλλιέργειες επωάζονται για περίπου 12 ώρες στους 30°C χωρίς ανάδευση.
4. Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 6.000 rpm για 10 min στους 4°C .
5. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, επαναιωρούνται τα κύτταρα σε 10ml διάλυμα επαναιώρισης.
6. Επαναφυγοκεντρούνται σε 6.000 rpm για 10 min στους 4°C .
7. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 1ml διάλυμα επαναιώρισης και Refabloc.

8. Μεταφέρονται τα δείγματα σε erpendorf και φυγοκεντρώνται σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο για 5 min σε 13.000 rpm.
  9. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, επαναιωρούνται τα κύτταρα σε 1ml διάλυμα σακχαρόζης και 1ml Pefabloc.
- Και ακολουθεί:
10. Επώαση για 20 min στον πάγο.
  11. Επαναφυγοκέντριση για 5 min στα 13.000 rpm και αφαίρεση του υπερκειμένου.
  12. Επαναιώρηση σε 800μl dH<sub>2</sub>O.
  13. Επώαση για 10 min στον πάγο.
  14. Προσθήκη 10μl λυσοζύμης (από stock 10mg/ml).
  15. Επώαση για 30 min στον πάγο.
  16. Ακολουθεί κατεργασία με υπερήχους, 2 φορές για κάθε δείγμα, για 15 sec σε 40% ένταση.
  17. Φυγοκεντρώνται τα δείγματα σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο για 5 min σε 13.000 rpm.
  18. Λαμβάνεται προσεκτικά το υπερκείμενο (περίπου 810 μl).
  19. Ακολουθεί υπερφυγοκέντριση για 30 min σε 9.000 rpm στους 4 °C.
  20. Αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα με 40-50 μL d H<sub>2</sub>O.
  21. Αποθηκεύονται τα δείγματα στους 4°C (έως 2-3 ημέρες).

### **Διαλύματα**

Διάλυμα Επαναιώρισης: 1. Tris-HCl 50 mM pH= 8

2. NaCl 100mM

3. Na<sub>2</sub>EDTA 1mM

Ακολουθεί φιλτράρισμα.

Διάλυμα σακχαρόζης - EDTA: 1. Tris-HCl 25 mM pH=8

2. Σακχαρόζη 45%

3. Na<sub>2</sub>EDTA 1mM

Αποθήκευση διαλυμάτων στους 4 °C.

## **B) Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης (BCA) (Smith P.K. et al., 1985)**

Αρχικά φτιάχνεται η πρότυπη καμπύλη με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αλβουμίνης :

5 , 25 ,50, 125 , 250  $\mu\text{g/ml}$

Χρησιμοποιώ 100  $\mu\text{l}$  από την κάθε συγκέντρωση

Παρασκευάζονται τα δείγματα:

Σε 98 $\mu\text{L}$  d  $\text{H}_2\text{O}$  προσθέτω 2 $\mu\text{L}$  από κάθε δείγμα μεμβρανών ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100 $\mu\text{l}$

### Διαδικασία

Τοποθετούνται 2ml από το διάλυμα αντίδρασης BCA σε σωληνάκια και στη συνέχεια προστίθενται τα 100 $\mu\text{l}$  από κάθε δείγμα αρχίζοντας από το τυφλό και την πρότυπη καμπύλη (από τη μικρότερη συγκέντρωση) και συνεχίζοντας με τα δείγματα. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 30 min. Μετά την επώαση ακολουθεί φωτομέτρηση σε  $\text{OD}_{562}$  αρχίζοντας από το τυφλό. Λαμβάνονται οι απορροφήσεις και φτιάχνεται η πρότυπη καμπύλη και από εκεί με τη γραμμική τάση παίρνω την εξίσωση που θα χρησιμοποιηθεί για να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης των δειγμάτων.

## **2. Ηλεκτροφόριση πρωτεϊνών**

Υπολογίζεται η ποσότητα των δειγμάτων που θα τρέξουν και προστίθενται d $\text{H}_2\text{O}$  μέχρι την εξισορρόπηση των δειγμάτων στα 50  $\mu\text{l}$ . Σε κάθε δείγμα προστίθενται 100 $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης. Στη συνέχεια προστίθενται 4X διάλυμα δείγματος φόρτωσης (16.6  $\mu\text{l}$  στα 50  $\mu\text{l}$ ) και τα δείγματα είναι έτοιμα να φορτωθούν στο πήγμα ακρυλαμίδιου 8%.

<b>Πήγμα διαχωρισμού 100ml (12%)</b>	<b>Πήγμα επιστοιβαξης 30 ml (4%)</b>
<b>H<sub>2</sub>O:</b> 32.3 ml	<b>H<sub>2</sub>O:</b> 17.4ml
<b>Ακρυλαμίδιο:</b> 41.7 ml	<b>Ακρυλαμίδιο:</b> 4.5 ml
<b>Διάλυμα διαχωρισμού:</b> 25ml	<b>Διάλυμα επιστοιβαξης:</b> 7.5 ml
<b>10% SDS:</b> 1ml	<b>10%SDS:</b> 300 $\mu\text{l}$
<b>10% APS:</b> 1ml	<b>10% APS:</b> 300 $\mu\text{l}$
<b>TEMED:</b> 50 $\mu\text{l}$	<b>TEMED:</b> 30 $\mu\text{l}$

- Διάλυμα διαχωρισμού (500ml):**
1. Tris 90.855 gr
  2. SDS 2 gr

Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος 8.8 με προσθήκη HCl.

- Διάλυμα επιστοιβαξης (500ml):**
1. Tris 30.285 gr
  2. SDS 2 gr

Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος 6.8 με προσθήκη HCl.

**4X Διάλυμα Φόρτωσης (Sample Buffer):**

1. 0.5M Tris pH= 6.8 5ml
2. SDS 0.92 gr
3. Γλυκερόλη 4ml
4. Μπλέ βρωμοφαινόλης 0.02 gr

Η ποσότητα είναι περίπου 9ml , τα οποία τα χωρίζονται ανά 900μl περίπου και τα αποθηκεύονται στους -20°C.

- 10X Διάλυμα Ηλεκτροφόρισης ( 1lt ):**
1. 0.25 M Tris 30.27 gr
  2. 1.92 M γλυκίνη 144 gr
  3. 1% SDS 10 gr ή 100 ml από 10% SDS

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται 1X Διάλυμα Ηλεκτροφόρισης.

### **3. Ανοσοαποτύπωση**

i. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήγμα ακρυλαμιδίου απομακρύνεται από τις πλάκες και αφαιρείται το μέρος του πηγματος που αντιστοιχεί στο πήγμα επιστοιβαξης. Το υπόλοιπο θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF. Αφού μετρηθούν οι διαστάσεις του πηγματος κόβεται η μεμβράνη και «ενεργοποιείται» για 5-10 λεπτά σε μεθανόλη. Στη συνέχεια κόβονται 6 αντιστοιχών διαστάσεων τεμάχια διηθητικού χαρτιού (Whatman 3mm filter paper).



Η τοποθέτηση στην κασέτα μεταφοράς γίνεται ως εξής:

Τα 3 τεμάχια διηθητικού χαρτιού εμβαπτίζονται στο διάλυμα μεταφοράς και τοποθετούνται στο κάτω μέρος της κασέτας μεταφοράς. Στη συνέχεια τοποθετείται η μεμβράνη και πάνω από αυτή το πήγμα. Τέλος, τοποθετούνται και τα άλλα 3 τεμάχια διηθητικού χαρτιού αφού εμβαπτιστούν στο διάλυμα μεταφοράς και κλείνεται η κασέτα μεταφοράς. Η κάθοδος (-) τοποθετείται από την πλευρά του πήγματος και η άνοδος (+) από την πλευρά της μεμβράνης. Η μεταφορά γίνεται για 4 ώρες στα 400 mA.

<u>Διάλυμα Μεταφοράς (1Lt):</u>	1. Γλυκίνη	14.4 gr
	2. 1M Tris-HCl pH= 8.3 ή 8	25 ml
	3. Μεθανόλη	200ml

ii. Επώαση με αντίσωμα

Μετά το πέρας της μεταφοράς κρατείται μόνο η μεμβράνη, η οποία μεταφέρεται σε Blocking buffer (1X TBST + 5% BSA) O/N στον ψυχρό θάλαμο υπό ανάδευση.

Την επόμενη μέρα αναδεύεται η μεμβράνη σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά περίπου. Στη συνέχεια προστίθενται τα αντισώματα:

A) Avidin-HRP: Αραίωση 1/50.000μl σε blocking buffer και επώαση για 1 ώρα. Στη συνέχεια ακολουθούν 6-8 πλυσίματα με 1XTBST και εμφάνιση

B) Anti-C-tail: Αραίωση 1/50.000μl σε blocking buffer και επώαση για 2 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθούν 6-8 πλυσίματα με 1XTBST και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα:

IgG-Protein A: Αραίωση 1/50.000μL σε Blocking buffer για 1 ώρα. Στη συνέχεια ακολουθούν 6-8 πλυσίματα με 1XTBST και εμφάνιση

Γ) Anti-His-IgG: Αραίωση 1/50.000μl σε blocking buffer για 1 ώρα. Στη συνέχεια ακολουθούν 6-8 πλυσίματα με 1XTBST και εμφάνιση

Δ) Anti-OGM: 10μl στα 30ml Blocking buffer με προστασία από το φως για 2 ώρες και 7-8 πλυσίματα με 1XTBST

<u>10 X TBST :</u>	1. 1M Tris-HCl	100ml
	2. NaCl	87.66 gr
	3. Triton X-100	20 ml

iii. Οπτικοποίηση του αποτελέσματος

Η μεμβράνη ξεπλένεται στη συνέχεια με dH<sub>2</sub>O και στεγνώνεται ελαφρά. Ακολουθεί η αντίδραση χημειοφωταύγειας (ECL). Η μεμβράνη επικαλύπτεται για 1-2 λεπτά με μίγμα ίσου όγκου των δύο διαλυμάτων A και B, το οποίο φτιάχνεται αμέσως πριν την επώαση.

Στη συνέχεια η μεμβράνη στεγνώνεται ελαφρά και μεταφέρεται στην κασέτα όπου καλύπτεται με διαφανή μεμβράνη. Η εμφάνιση γίνεται σε σκοτεινό θάλαμο με έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ για 1-5 λεπτά. Το φιλμ στη συνέχεια επωάζεται για 3 λεπτά σε διάλυμα εμφάνισης φιλμ και έπειτα αφού εμβαπτιστεί σε νερό επωάζεται για άλλα 2 λεπτά σε διάλυμα μονιμοποίησης φιλμ όπου έχουμε την τελική οπτικοποίηση του αποτελέσματος.

Διάλυμα Εμφάνισης Φιλμ (Developer buffer): 50 mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο.

Διάλυμα Μονιμοποίησης Φιλμ (Fixer buffer): 50 mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο.

## 2.20 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων

Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων (Saitou and Nei, 1987) πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος MEGA 5.05 χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την αλληλούχιση των 2 γονιδίων μεταφοράς νιτρικών και νιτρωδών (*rnpA* και *rnpB*) του βακτηρίου *Mycobacterium gilvum* Srg1. Ο πλέον παραστατικός τρόπος απεικόνισης μιας εξελικτικής διαδρομής είναι το φυλογενετικό δενδρογράφημα. Είναι ένα γράφημα που αποτελείται από κόμβους και κλάδους. Οι κόμβοι υποδηλώνουν εξελικτικά γεγονότα και αντιπροσωπεύουν προγονικές μορφές, ενώ οι άκρες των κλάδων αντιπροσωπεύουν τις σημερινές μορφές. Στο σύνολό τους, ορίζονται ως ταξινομικές μονάδες και για διάκριση οι ταξινομικές μονάδες των άκρων των κλάδων ορίζονται ως λειτουργικές ταξινομικές μονάδες. Η διευθέτηση των κλάδων καθορίζει την τοπολογία του δενδρογραφήματος και τα μήκη των κλάδων είναι ανάλογα με το ποσοστό της εξελικτικής απόστασης που συνδέει δύο ταξινομικές μονάδες. Το μέτρο της εξελικτικής απόστασης δεν είναι ίδιο σε όλα τα δενδρογραφήματα, αλλά εξαρτάται από τη μέθοδο που εφαρμόστηκε για την κατασκευή του. Η μέθοδος κατασκευής καθορίζει και άλλα χαρακτηριστικά, όπως το αν υπάρχει ή όχι ρίζα. Στην περίπτωση του δενδρογραφήματος χωρίς ρίζα δεν φαίνεται εξελικτική πορεία σε συνάρτηση με το χρόνο, περιγράφονται όμως οι φυλογενετικές σχέσεις των λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (Ροδάκης, 2001). Γενικά, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή δενδρογραφήματων μπορούν να διαιρεθούν σε δύο βασικές κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τις μεθόδους αποστάσεων, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει τη μέθοδο της μέγιστης φειδωλότητας. Στην παρούσα μελέτη η κατασκευή τους βασίστηκε στη μέθοδο Neighbor-Joining (NJ) (δηλαδή ένωσης γειτόνων) (Saitou and Nei, 1987). Η μέθοδος αυτή αν και βασίζεται στη μήτρα αποστάσεων ακολουθεί ένα ριζικά διαφορετικό αλγόριθμο. Η αρχή του αλγόριθμου είναι: «Ενώνω τους κόμβους που είναι κοντά μεταξύ τους και μακριά από κάθε άλλον». Από τη μέθοδο αυτή προκύπτει τελικά ένα φυλογενετικό δενδρογράφημα χωρίς ρίζα, το οποίο μπορεί να διαμορφωθεί με ρίζα, αν κάνουμε χρήση μιας παραομάδας (outgroup). Ως παραομάδα σε μία ταξινομική ομάδα (taxa) ορίζεται ένα taxa που απέκλινε από αυτή την ομάδα πριν αυτά διαχωριστούν μεταξύ τους.

## 2.21 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (BLAST)

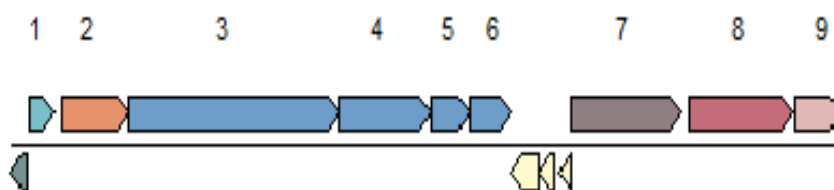
Η πλήρης ανάλυση του γονιδιώματος του εδαφοβακτηρίου *Mycobacterium gilvum* Spyr1 και η εύρεση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, των πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών πραγματοποιήθηκε από το πρόγραμμα Join Genomic Institute (JGI). Τα γονίδια των πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών του στελέχους Spyr1, *pynar* και *pynir*, όπως ονομάστηκαν, κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pT7-5 και η αλληλούχιση των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA έγινε από την εταιρία MWG-Biotech. Η αλληλουχία βάσεων DNA που προέκυψε, αναλύθηκε χρησιμοποιώντας τα προγράμματα Clustal και Vector NTI. Η ανεύρεση τυχόν ομολογιών με γνωστές αλληλουχίες κατατεθειμένες σε τράπεζα δεδομένων (EMBL-Heidelberg) έγινε με το πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Ausubel et al., 1999) της τράπεζας δεδομένων (EBML). Η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων έγινε με τη χρήση του προγράμματος MEGA 5.05.

## **3.Αποτελέσματα**

### 3.1 Μελέτη γονιδίων πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών στο *Spyr1*

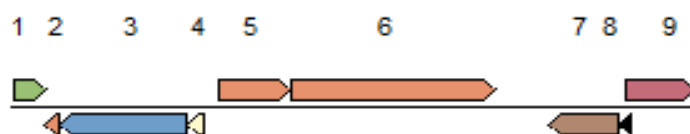
Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης του γονιδιώματος του στελέχους *Spyr1*, πραγματοποιήθηκε μελέτη *in silico* για τον εντοπισμό πιθανών γονιδίων μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών. Εντοπίστηκαν τρία πιθανά γονίδια που κωδικεύουν μεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών εκ των οποίων τα δύο μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται στο κυκλικό χρωμόσωμα του στελέχους *Spyr1* και ονομάστηκαν *rynar* και *rynir*, ενώ οι αντίστοιχες πρωτεΐνες τους ονομάστηκαν Rynar και Rynir (Εικόνα 3.1α και 3.1β).

#### 3.1α Μεταφορέας νιτρικών/νιτρωδών *rynar*



- 1) Mspy1\_15850: πυροφωσφατάση της ADP-ριβόζης [F] 1600203..1600634 (+) (432bp) (143aa)
- 2) **Mspy1\_15860: μεταφορέας νιτρικών/νιτρωδών [P] 1600751..1601971 (+) (1221bp) (406aa)**
- 3) Mspy1\_15870: αναπνευστική αναγωγή νιτρικών άλφα υπομονάδα [C] 1601968..1605669 (+) (3702bp) (1233aa)
- 4) Mspy1\_15880: αναπνευστική αναγωγή νιτρικών βήτα υπομονάδα [C] 1605669..1607321 (+) (1653bp) (550aa)
- 5) Mspy1\_15890: αναπνευστική αναγωγή νιτρικών σαπερόνιο NarJ [C] 1607318..1607983 (+) (666bp) (221aa)
- 6) Mspy1\_15900: αναπνευστική αναγωγή νιτρικών γάμμα υπομονάδα [C] 1607980..1608711 (+) (732bp) (243aa)
- 7) Mspy1\_15940: tyrA: GTP-πρωτεΐνη δέσμησης TyrA/BipA [T] 1609804..1611732 (+) (1929bp) (642aa)
- 8) Mspy1\_15950: ABC-τύπος σύστημα μεταφοράς διπεπτιδίων συστατικό του περιπλάσματος [E] 1611912..1613714 (+) (1803bp) (600aa)
- 9) Mspy1\_15960: 1D-μυο-ινοσιτολ-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-αλφα-D-γλυκοκυρανοσιδική δυακετυλάση [G] 1613761..1614615 (+) (855bp) (284aa)

### 3.1β Μεταφοράς νιτρικών/νιτρωδών *rynir*



- 1) Mspry1\_23440: μεταγραφικός ρυθμιστής οικογένεια TetR [K] 2429614..2430258 (+) (645bp) (214aa)
- 2) Mspry1\_23450: υπομονάδα φερρεδοξίνης της αναγωγάσης νιτρωδών και υδροξυλιωμένη διοξυγονάση δακτυλίου [P] 2430210..2430500 (-) (291bp) (96aa)
- 3) Mspry1\_23460: NAD(P)H-εξαρτώμενη αναγωγάση νιτρωδών μεγάλη υπομονάδα [C] 2430497..2432968 (-) (2472bp) (823aa)
- 4) Mspry1\_23470: υποθετική πρωτεΐνη 2432972..2433325 (-) (354bp) (117aa)
- 5) **Mspry1\_23480: πρωτεΐνη αποβολής νιτρώδων [P] 2433578..2434981 (+) (1404bp) (467aa)**
- 6) Mspry1\_23490: θειώδη αναγωγάση (NADPH) άλφα υπομονάδα (EC1.8.1.2) [P] 2434992..2438945 (+) (3954bp) (1317aa)
- 7) Mspry1\_23510: υποθετική πρωτεΐνη [M] 2439983..2441311 (-) (1329bp) (442aa)
- 8) Mspry1\_23520: tRNA-OTHER 2441319..2441404 (-) (86bp)
- 9) Mspry1\_23530: διακετυλάση ακετυλορνηθίνης [E] 2441484..2442839 (+) (1356bp) (451aa)

**Εικόνα 3.1α και 3.1β:** Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης των πιθανών γονιδίων μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών, *rpnar* και *rynir*, στο χρωμόσωμα του στελέχους *Spry1*.

Παρατηρούμε ότι στην παραπάνω σχηματική αναπαράσταση καθοδικά του γονιδίου *rpnar* υπάρχουν γονίδια που ενδέχεται να συμμετέχουν στην μεταφορά και τον μεταβολισμό των νιτρικών.

### **3.2 Ανάλυση νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας- Ομολογία**

Με χρήση του προγράμματος BlastN πραγματοποιήθηκε σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων *rpnar* και *rynir* με άλλες κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων αλληλουχίες στο διαδίκτυο και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Βρέθηκε ότι το γονίδιο *rpnar* έχει ταυτοσημότητα 100% με το γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη της Μείζονος Υπεροικογένειας Διευκολυνόμενης Μεταφοράς, MFS1 και την αποπρωτεΐνη της άλφα υπομονάδας της αναπνευστικής αναγωγάσης νιτρικών του βακτηρίου *Mycobacterium gilvum* *PYR-GCK*, 85% με το γονίδιο της Μείζονος Υπεροικογένειας Διευκολυνόμενης Μεταφοράς, MFS1 του *Mycobacterium vaanbalenii* *PYR-1*, ομοίως 84% με το *Mycobacterium* sp. *JLS* και 79% με το γονίδιο που κωδικεύει τον μεταφορέα MFS του *Rhodococcus aetherivorans* strain *IcdP1*.

Επίσης, το γονίδιο *pynir* βρέθηκε ότι έχει ταυτοσημότητα 88% με το γονίδιο που κωδικεύει τον μεταφορέα νιτροδών του βακτηρίου *Mycobacterium vaanbalenii* *PYR-1*, 83% με το γονίδιο της άλφα υπομονάδας της αναγωγάσης θειικών και την πρωτεΐνη αποβολής νιτροδών του *Mycobacterium chubuense* *NBB4*, 80% ταυτοσημότητα με το γονίδιο που κωδικεύει μία υποθετική πρωτεΐνη του *Mycobacterium tuberculosis* *RGTB327* και 80% ταυτοσημότητα με το γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη-μεταφορέα νιτρικών του *Mycobacterium bovis* *BCG-1*.

**Πίνακας 3.1:** Αποτελέσματα ανάλυσης BlastN πιθανών γονιδίων μεταφορέων νιτρικών/νιτροδών του στελέχους *Spyr1*.

<i>Pynar</i> BlastN				
Στέλεχος	Γονίδιο	Ομολογία	Χαρακτηρισμός	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL
<i>Spyr1</i>	<i>pynar</i>	100%	<i>Mycobacterium gilvum</i> <i>Spyr1</i>	CP002385.1
		100%	<i>Mycobacterium gilvum</i> <i>PYR-GCK</i>	CP000656.1
		85%	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> <i>PYR-1</i>	CP000511.1
		84%	<i>Mycobacterium</i> sp. <i>JLS</i>	CP000580.1
		79%	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> strain <i>IcdP1</i>	CP011341.1
<i>Pynir</i> BlastN				
<i>Spyr1</i>	<i>pynir</i>	100%	<i>Mycobacterium gilvum</i> <i>Spyr1</i>	CP002385.1
		88%	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> <i>PYR-1</i>	CP000511.1
		83%	<i>Mycobacterium chubuense</i> <i>NBB4</i>	CP003053.1
		80%	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>RGTB327</i>	CP003233.1
		80%	<i>Mycobacterium bovis</i> strain <i>BCG-1</i>	CP011455.1

Εκτός από την σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων *pynar* και *pynir* πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών που κωδικεύουν με άλλες κατατεθειμένες βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο με χρήση του προγράμματος BlastP, όπου τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Βρέθηκε ότι, η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης Pynar έχει ταυτοσημότητα 99% με την πρωτεΐνη της Μείζονος Υπεροικογένειας Διευκολυνόμενης Μεταφοράς MFS1 του βακτηρίου *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK, 87% με πρωτεΐνη-μεταφορέα MFS του *Mycobacterium* sp. JLS, 89% με την πρωτεΐνη-μεταφορέα MFS του *Mycobacterium vaanbalenii* και 78% με την πρωτεΐνη-μεταφορέα MFS του *Rhodococcus* sp. R1101. Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης Pynir βρέθηκε ότι έχει ταυτοσημότητα 94%, 81 και 82%, 80% με πρωτεΐνες-μεταφορείς MFS του βακτηρίου *Mycobacterium vaanbalenii*, *Mycobacterium tuberculosis* και *Mycobacterium bovis*, αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.2:** Αποτελέσματα ανάλυσης BlastP πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών του στελέχους Spyr1.

<b>Pynar BlastP</b>				
<b>Στέλεχος</b>	<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Ομολογία</b>	<b>Χαρακτηρισμός</b>	<b>Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL</b>
Spir1	Pynar	100%	<i>Mycobacterium gilvum</i> Spyr1	WP013471100.1
		99%	<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	ABP44633.1
		87%	<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	WP011854955.1
		89%	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	WP041306962.1
		78%	<i>Rhodococcus</i> sp. R1101	WP016933069.1
<b>Pynir BlastP</b>				
Spir1	Pynir	100%	<i>Mycobacterium gilvum</i> Spyr1	WP013471479.1
		94%	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	WP011780691.1
		82%	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WP031694216.1
		81%	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WP031665354.1
		80%	<i>Mycobacterium bovis</i>	WP044292194.1



Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων *pynar*, *pynir*, *naru*, *nark* και των αμινοξικών αλληλουχιών των αντίστοιχων πρωτεϊνών Pynar, Pynir, Naru, Nark, με χρήση του προγράμματος Muscle και τα αποτελέσματα παρατίθενται στους Πίνακες 3.3 και 3.4.

**Πίνακας 3.3:** Αποτελέσματα στοίχισης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία (nucleotide alignment)

<b>Στοίχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών</b>	<b>Muscle</b>
<i>Pynar- NarK</i>	57.96%
<i>Pynar- NarU</i>	54.67%
<i>Pynir- NarK</i>	59.67%
<i>Pynir- NarU</i>	57.59%
<i>Pynar- Pynir</i>	61.98%
<i>NarK- NarU</i>	70.67%

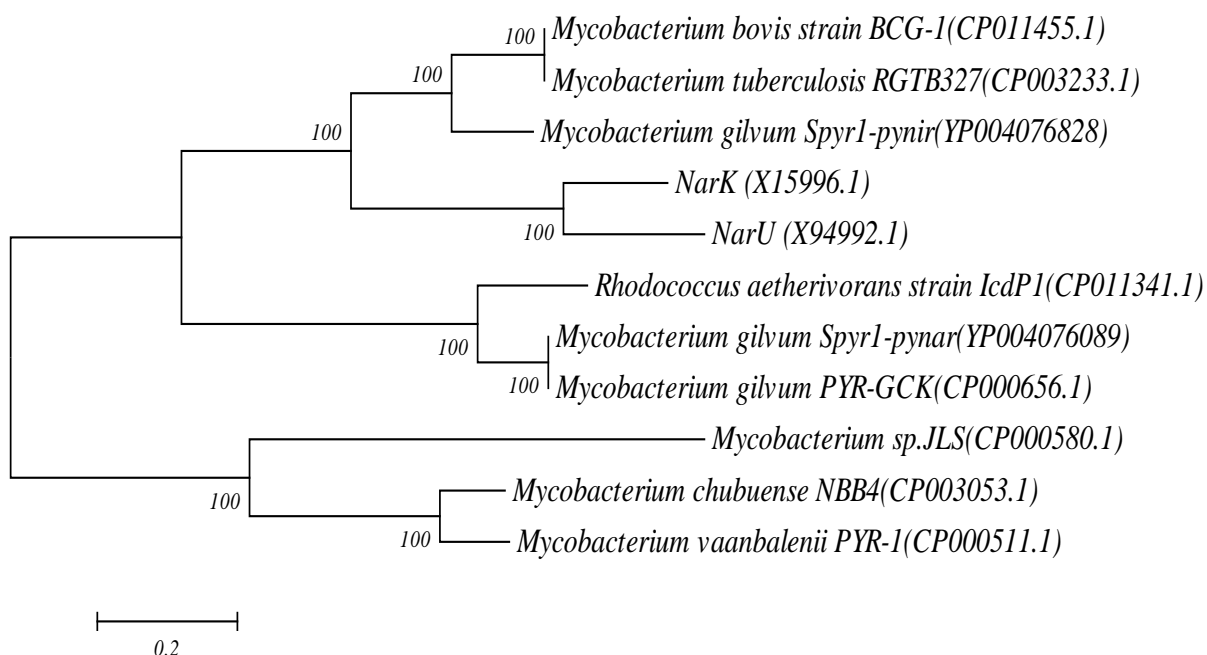
**Πίνακας 3.4:** Αποτελέσματα στοίχισης αμινοξικών αλληλουχιών των μεταφορέων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία (protein alignment)

<b>Στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών</b>	<b>Muscle</b>
<i>Pynar- NarK</i>	26.26%
<i>Pynar- NarU</i>	24.81%
<i>Pynir- NarK</i>	44.83%
<i>Pynir- NarU</i>	42.20%
<i>Pynar- Pynir</i>	28.21%
<i>NarK- NarU</i>	74.78%

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρατίθενται στους Πίνακες 3.3 και 3.4 παρατηρούμε ότι τα γονίδια *pynar* και *pynir* εμφανίζουν μεταξύ τους ομολογία σε ποσοστό 61.98%, ενώ οι αντίστοιχες πρωτεΐνες Pynar και Pynir έχουν ομολογία σε ποσοστό 28.21%.

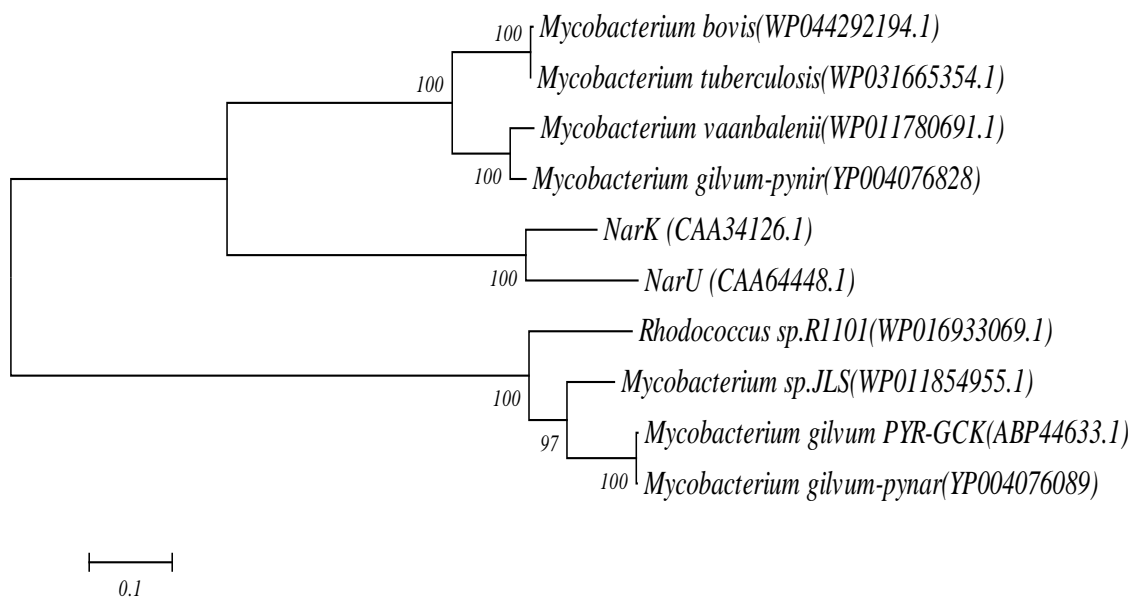
### 3.3 Φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων *pynar* και *pynir* και συγκριτική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών τους

Πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση τόσο των γονιδίων όσο και των αμινοξικών αλληλουχιών και κατασκευή των αντίστοιχων φυλογενετικών δέντρων. Χρησιμοποιώντας τις κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων αλληλουχίες που εμφανίζουν ομολογία με τα γονίδια των πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών, *pynar* και *pynir*. Τα φυλογενετικά δέντρα προέκυψαν με ανάλυση neighbour – joining χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA 5.05 (Σχήμα 3.1 και 3.2).



**Σχήμα 3.1:** Φυλογενετικό δέντρο που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA 5.05 (Tamura et al., 2007) και προέκυψε με σύγκριση κατατεθειμένων σε βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

Η ανωτέρω ανάλυση δείχνει ότι το γονίδιο *pynar* βρίσκεται πλησιέστερα στο γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη της MFS υπεροικογένειας και την αποπρωτεΐνη της άλφα υπομονάδας της αναπνευστικής αναγωγής νιτρικών του *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK, ενώ το γονίδιο *pynir* βρίσκεται πλησίον στο γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη-μεταφορέα νιτρικών του *Mycobacterium bovis* strain BCG-1 και το γονίδιο που κωδικεύει μία υποθετική πρωτεΐνη του *Mycobacterium tuberculosis* RGTB327. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις φορές που ένας κλάδος εμφανίζεται σε 100 bootstrap επαναλήψεις. Η ράβδος 0.2 αντιπροσωπεύει τη σχετική απόκλιση των αλληλουχιών.



**Σχήμα 3.2:** Φυλογενετικό δέντρο που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA 5.05 (Tamura et al., 2007) και προέκυψε με σύγκριση κατατεθειμένων σε βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο αμινοξικών αλληλουχιών.

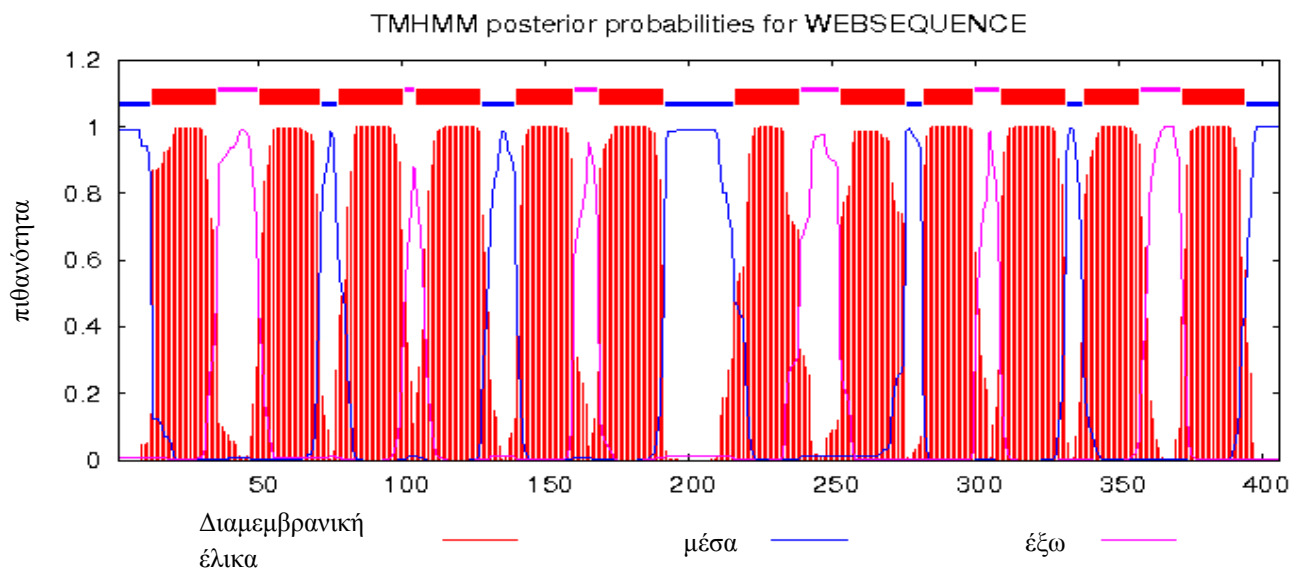
Σύμφωνα με την ανωτέρω φυλογενετική ανάλυση παρατηρούμε ότι η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης Pynar βρίσκεται πλησίον μιας πρωτεΐνης της Μείζονος Υπεροικογένειας Διευκολυνόμενης Μεταφοράς MFS του στελέχους *Mycobacterium gilvum PYR-GCK*, όπως και η πρωτεΐνη Pynir βρίσκεται πλησιέστερα της πρωτεΐνης μεταφορέα MFS του *Mycobacterium vaanbalenii*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις φορές που ένας κλάδος εμφανίζεται σε 100 bootstrap επαναλήψεις. Η ράβδος 0.1 αντιπροσωπεύει τη σχετική απόκλιση των αλληλουχιών.

### 3.4 Χαρακτηριστικά πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών, Pynar και Pynir

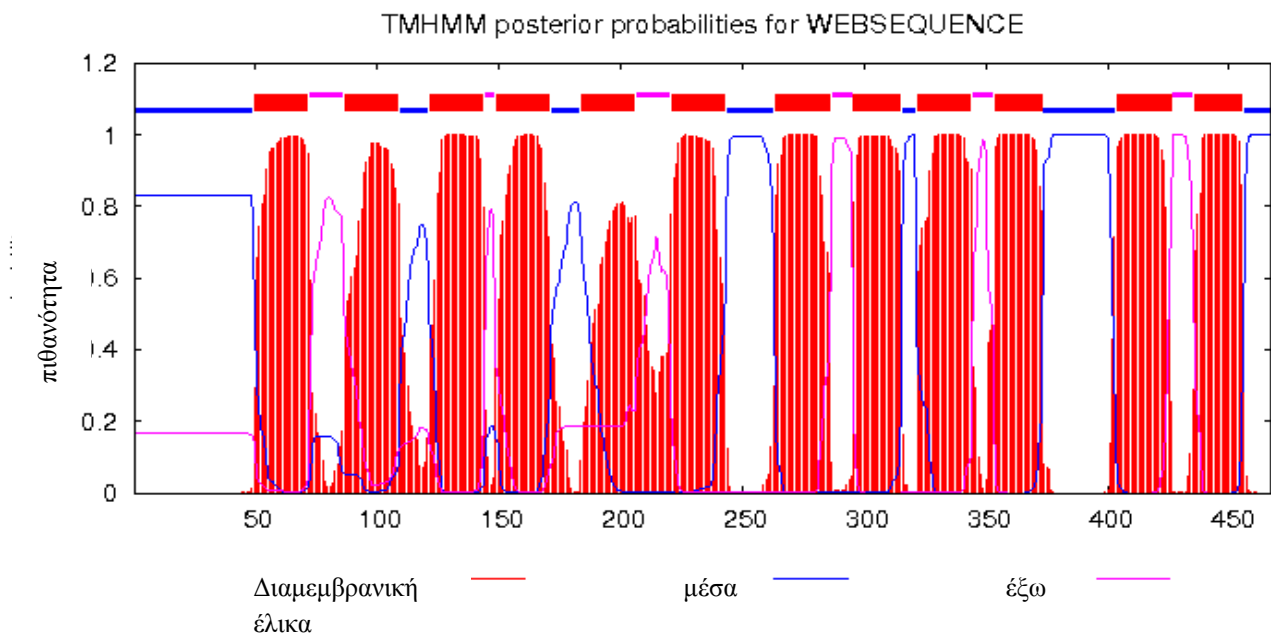
Οι μεταφορείς που ανήκουν στην οικογένεια των NNP (μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών) φέρουν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως έχει αναφερθεί στην Εισαγωγή στην ενότητα 1.4.3. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούνται από 12 διαμεμβρανικές έλικες, οι οποίες χωρίζονται σε δύο διαμεμβρανικούς τομείς, όπου ο καθένας αποτελείται από 6 διαμεμβρανικές έλικες (TM1-6 και TM7-12). Επίσης, φέρουν δύο μοτίβα υπογραφής νιτρικών, NS1 και NS2. Η δομή του μοτίβου αυτού είναι AAGxGNxGG και επαναλαμβάνεται με μικρές διαφορές στις διαμεμβρανικές έλικες TM5 και TM11, αντίστοιχα (Εισαγωγή 1.4.3) (Yan N., 2013, Forde, 2000, Trueman et al., 1996). Οι NNP διαθέτουν εννέα συντηρημένα κατάλοιπα γλυκίνης, τα οποία συμμετέχουν στην ευελιξία/δυναμική του κέντρου δέσμευσης (Weinglass and Kaback, 1999, Guan et al., 2007), καθώς και δύο συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνης στις διαμεμβρανικές έλικες 2 και 8, αντίστοιχα, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην δέσμευση του υποστρώματος (Unkles et al., 2004, 2012).

### 3.4.1 Διαμεμβρανικά τμήματα

Με χρήση του προγράμματος TMHMM Server v 2.0 Tm prediction, πραγματοποιήθηκε η σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών Rynar και Rynir. Όπως φαίνεται στις εικόνες 3.2 και 3.3, οι πρωτεΐνες Rynar και Rynir αποτελούνται από 12 διαμεμβρανικά τμήματα, χαρακτηριστικό των μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών της οικογένειας των NNP, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.



Εικόνα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση 12 διαμεμβρανικών τομέων της πρωτεΐνης Rynar.



Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση 12 διαμεμβρανικών τομέων της πρωτεΐνης Rynir.

### 3.4.2 Στοιχίση πρωτεϊνών NNP

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πλήρης ανάλυση της στοιχίσης των αλληλουχιών των πρωτεϊνών Rynar και Rynir με άλλους NNP μεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών, ώστε να διαπιστωθεί αν φέρουν συντηρημένα κατάλοιπα που χαρακτηρίζουν τους μεταφορείς αυτούς. Η στοιχίση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών αυτών που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Muscle παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.4. Στον Πίνακα 3.5 στο Παράρτημα παρατίθενται επιπλέον αλληλουχίες πρωτεϊνών γονιδίων μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών όπου απεικονίζονται τα μοτίβα υπογραφής νιτρικών NS1 και NS2 στις TM5 και TM11, αντίστοιχα καθώς και τα συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνης R67 και R268 στις TM2 και TM8.

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

AtNRT1.1 -----MSLPETKSDDIILLDAWDFQGRPAD-----
AtNRT1.2 -----MEVEEVSRRWEGYADWRNRAAV-----
AoNarK -----MSATEPAAKKSRYLLTDWNPDESTW---D
TthNarK2 -----MLKSAKGTW--ITDWNPEDEPKRW---D
pynir -----MTVTDSESTGIVAAAPPQQRHRGKHWIDDRPEDPEFWSSVG
NarK -----MSHSSAPERATGAVITDWRPEDPAFWQQRG
NarU -----MALQNEKNSRYLLRDWKPENPAFWENKG
pynar -----MSTATTPDII GARRGLNLAL
CrNAR4 -----MATVEKKYPYALDSEKAKYVPVWRFTQ
OsNRT2.1 MDSSTVGPAGSSLLHGVTGREPAFAFSTEVEGGEDAAAAASKFDLPVDSEHKAKTIRLLSFFAN
TaNRT2.1 -----MEVQAGSHADAAASKFTLPVDSEHKAKSFRLLSFFAN
AtNRT2.1 -----MGDSTGEPGSSMHGVTGREQSFQSVQSPIVHTDKTAKFDLPVDTEHKAKTVFKLFSFAK
AtNRT2.4 -----MADGFGEPGSSMHGVTGREQSYAFSVESPAVPSDSSAKFSLPVDTEHKAKVFKLLSFEA
HpYNT1 -----MQLSTLWEPPIVNPRLKATSIPILFNL
NrtA -----MDFAKLLVASPEVNPNNRKALTI PVLNP
CrnA -----MDFAKLLVASPEVNPNNRKALTI PVLNP

AtNRT1.1 -----RSKTGGWASAAMILCIEAVERLTTLGIGVNLVTYLTG-----TMHLGNATAA
AtNRT1.2 -----KGRHGGMLAASFVILVEIILENLAYLANASNLVLYLRE-----YMHMSPSKSA
AoNarK SKLAWRTLWITTYSLILAFVCV-----WFLPSAIAPKLTLL-----GFNLDKSOLY
TthNarK2 PALAWRTLWITTFNLTLSFIT-----WYVVSALVVRLPKV-----GFELSTTQLF
pynir KPIARRNLI FSI FAEHIGFSV-----WLLWSIVVVQMTAAADGSAASGFALTTTQAL
NarK QRIASRNLI WISVPCLLLAFCV-----WMLFSAVAVNLPKV-----GFNFTTDQLF
NarU KHIARRNLWISVSCLLLAFCV-----WMLFSAVTVNLNKI-----GFNFTTDQLF
pynar -----ATWVS-AINFWA-----WNMIGPLSTTYAGD-----MSLSSSQAS
CrNAR4 PHM--MAFHLSWICFFMSFVA-----TFAPASLAP-VIRD-----DLFLTKESEVG
OsNRT2.1 PHM--RTFHLSWISFFSCFVS-----TFAAAPLVP-IIRD-----NLNLTKADIG
TaNRT2.1 PHM--RTFHLSWISFFTCFVS-----TFAAAPLVP-IIRD-----NLNLAKADIG
AtNRT2.1 PHM--RTFHLSWISFFTCFVS-----TFAAAPLVP-IIRD-----NLNLTQADIG
AtNRT2.4 PHM--RTFHLSWISFFTCFVS-----TFAAAPLVP-IIRD-----NLNLTQADIG
HpYNT1 WNVYGRNFFFGWFGFVCLLS-----WFAPFPPLLHGMLKK-----DLRLTAVDIS
NrtA FNTYGRVFFFSWFGFMLAFLS-----WYAFPPLLTVTIRD-----DLDMSTQIA
CrnA FNTYGRVFFFSWFGFMLAFLS-----WYAFPPLLTVTIRD-----DLDMSTQIA

AtNRT1.1 NTVTNFLGTSFMLILLGGFIADTFELGRYLTI AIFAAIQATGVSILTLSTIIPGLRPPRCN
AtNRT1.2 NDVTNFMGTAFLLALLGGFLSDAFFSTFQIFLISASIEFLGLIILTIQARTPSLMPSPCD
AoNarK WLTALPGLAAGILRLIYMFPLPLIGTRK-----LVGITSLICILPMA-----
TthNarK2 WLTAMPGLAGGTLRIIWTFLPPLIGTRH-----LVTFTSTLLLIPLL-----
pynir WLVAVPSGVGAFLLPLPYTFAVVFVGGRR-----WTVISALLLVI PCL-----
NarK MLTALPSVSGALLKVPYSFMVPIFGGRR-----WTAFSTGILLI PCV-----
NarU LLTALPSVSGALLKVPYSFMVPIFGGRR-----WTVFSTALLI PCV-----
pynar VLVATPILVGA LGRI VVGPLTDRFGGRV-----MFIGVTVASIVPVL-----
CrNAR4 NAGVASVCGAIAAALFMGI FVDVVGPRI-----GAAAAMLMTAFAPV-----
OsNRT2.1 NAGVASVSGSIFSLAMGAI CDMLGPRY-----GCAFLIMLAAPT VVF-----
TaNRT2.1 NAGVASVSGSIFSLAMGAI CDLLGPRY-----GCAFLVMLSAPT VVF-----
AtNRT2.1 NAGVASVSGSIFSLVMGAVCDLLGPRY-----GCAFLVMLSAPT VVF-----
AtNRT2.4 NAGVASVSGSIFSLVMGAVCDLLGPRY-----GCAFLVMLSAPT VVF-----
HpYNT1 NNNICGLTGTLLGRFILGPLNDKYGPR I-----TLTGVLVAGAI PTA-----
NrtA NSNIIALLATLLVLLICGPLCDRFGPRL-----VFIGLLLVGSI PTA-----
CrnA NSNIIALLATLLVLLICGPLCDRFGPRL-----VFIGLLLVGSI PTA-----

AtNRT1.1 PTTSSHCEQASGIQLTVLYLALYLTALGTGGVKASVSGFGSDQFDETEPKERSKMTYFFN
AtNRT1.2 SPT--CEEVSGSKAAMLFVGLYLVALGVGGIKGSLASHGAEQFDESTPKGRKQRSTFFN
AoNarK -----GWFYAVQDNTPYVWLLTLAF-----MCGIGGGAFSGYMP-----STG
TthNarK2 -----GWGFAVQNTGTPTVWLLLLAF-----LAGIGGGHFSGYMP-----STS
pynir -----GLAWAVSNPDIINFALLLVIAA-----TAGFGGGNFASSMA-----NIS
NarK -----WLGFAVQDTSTPYSVFI IISL-----LCGFAGANFASSMA-----NIS
NarU -----WLGIAVQNPNTPFGIFIVIAL-----LCGFAGANFASSMG-----NIS
pynar -----AVGVAGTQGS--YPLLVVFGFL-----FLGIAGTVFVAVGIP-----FAN
CrNAR4 -----CMALVTDFAST-----FACVRF-----FIGLSLCMFVCCQF-----WCG
OsNRT2.1 -----CMSLIDSAAG-----YIAVRF-----LIGFSLATFVSCQY-----WMS
TaNRT2.1 -----CMAVIDDASG-----YIAVRF-----LIGFSLATFVSCQY-----WMS
AtNRT2.1 -----SMSFVSDAAG-----FITVRF-----MIGFCLATFVSCQY-----WMS
AtNRT2.4 -----SMSFVGGAGG-----YITVRF-----MIGFCLATFVSCQY-----WMS
HpYNT1 -----FVPLVTNVAG-----LHAIRF-----FISFLGSSFVCCSQ-----FCA
NrtA -----MAGLVTSPQG-----LIALRF-----FIGILGGTFVPCQV-----WCT
CrnA -----MAGLVTSPQG-----LIALRF-----FIGILGGTFVPCQV-----WCT

```



AtNRT1.1 RFFFCINVGSLLAVTVLVYVQDDVGR-KWGYGICAFAIVLALS VFLAGTNRVR-FKKLIG  
AtNRT1.2 YFVFCLACGALVA VTFVVWLEDNKGW-EWGFVSTIAIFVSI LIFLSGSRFYR-NKIPCG  
AoNarK YFFPKRLSGTALGL-----QGIGNLGLSVIQLVGPILMGFGLFGITW LAPQTQATG  
TthNarK2 YFFPKRLQGTALGL-----QAGIGNFGVSI VQFVTPWII GFAL-----FGSLLG  
pynir FFYPESEKGWALGL-----NAAGGNI GVAVAQKII PVVVTL-----G  
NarK FFFPKKQKGGALGL-----NGGLGNMGVSV MQLVAPLVVSL SIFAVFGSQGVKQPDG  
Naru FFFPKAKQGSALGI-----NGGLGNLGVSV MQLVAPLVI FVPVFAFLGVNGVPQADG  
pynar HWYDASRRGFATGV-----FGMGVGTAMSAFFTPRFVN-----  
CrNAR4 TMFNVQIVGTANA I-----AAGWGNMGGGACHFIMPLIVQ-----GIKDGG  
OsNRT2.1 TMFNSKII GLVNGL-----AAGWGNMGGGATQLIMPLVYD-----VIRKCG  
TaNRT2.1 TMFNSKII GTVNGL-----AAGWGNMGGGATQLIMPLVFH-----AIQKCG  
AtNRT2.1 TMFNSQII GLVNGT-----AAGWGNMGGGITQLLMPIVYE-----IIRRCG  
AtNRT2.4 TMFNGQII GLVNGT-----AAGWGNMGGGVTQLLMPMVYE-----IIRRLG  
HpYNT1 VFFDNNII GTANA I-----SAGWGNAGGGVAFFVMPAISN-----ALENRG  
NrtA GFFDKSIVGTANSL-----AAGLGNAGGGITYFVMPAIFDS-----LIRDQG  
CrnA GFFDKSIVGTANSL-----AAGLGNAGGGITVFVMPAIFDS-----LIRDQG

AtNRT1.1 SPMTQVA AVIVAA-----WRNRKLE--LPADPSYL-YDVDDIIAAEGSM---KGKQ  
AtNRT1.2 SPLTTILKVL LAASVKCCSSGSSSNVAVASMSVSPSNHCV-SKGKKEVESQGELEKPRQEE  
AoNarK D-----HAGEHI-----WV-----YNAAAFFI-PWC--IVAA I LAF---IWLR  
TthNarK2 GPQTFTPKPGVVP-----AH-----LAPERHLR-LGALVLLGALLAW---VYLK  
pynir AGV---ALSLAG-----L-----FYI-PFA--VAAAVCAF---LFMN  
NarK TEL---YLANAS-----W-----IWV-PFL--AIFTIAAW---FGMN  
NarU SVM---SLANAA-----W-----IWV-PLL--AIATIAAW---SGMN  
pynar -----WF-----GLFTTHVI-IAVALALTAVLCL---VVMR  
CrNAR4 -----VPGYQA-----WR-----WA---FFV-PGGIYIVTATLTL---LLGI  
OsNRT2.1 -----ATPFTA-----WR-----LA---YFV-PGTLHVVMGVVLV---TLGQ  
TaNRT2.1 -----ATPFVA-----WR-----IA---YFV-PGMMHIVMGLLVL---TMGQ  
AtNRT2.1 -----STAFTA-----WR-----IA---FFV-PGWLHIIMGILVL---NLGQ  
AtNRT2.4 -----STSFTA-----WR-----MA---FFV-PGWMHIIMGILVL---TLGQ  
HpVNT1 -----YSLHHS-----WS-----YS---FVIGPFLILIMITAILIF---VFGS  
NrtA -----LPAHKA-----WR-----VA---YIV-PFILIVAAALGML---FTCD  
CrnA -----LPAHKA-----WR-----VA---YIV-PFILIVAAALGML---FTCD

AtNRT1.1 KLPHT-----EQFR  
AtNRT1.2 ALPPR-----AQLT  
AoNarK DVPVK-----  
TthNarK2 SVPIR-----  
pynir NLSEA-----  
NarK DLATS-----  
NarU DIASS-----  
pynar DSPQF-----  
CrNAR4 DHPSG-----  
OsNRT2.1 DLPDG-----  
TaNRT2.1 DLPDG-----  
AtNRT2.1 DLPDG-----  
AtNRT2.4 DLPDG-----  
HpYNT1 DCPRGRWSLRGDI LGINMDNMLVKS VSVTRHFSKEGELTSVFVEPVNAIDKVVVEPNQDQ  
NrtA DTPTG-----  
CrnA DTPTGKWSERHIWMKEDTQTASKGNIVDLSSGAQSSRPSGPPSIIAYAI PDVEKKGTEP

AtNRT1.1 SLDKAAIRDQ---EAGVTSNVFNKWTLSLTLDVEEVKQIVRMLPIWATCILEWTVHAQL  
AtNRT1.2 N---SLKVL---NGAADEKPVHRLLECTVQQVEDVKIVLKMLPIFACTIMNCCLAQL  
AoNarK -----ANIKQQLDIFSNPNT-----WYMTILYVMTFGLF  
TthNarK2 -----ANFREQFDIFRDNHT-----WIMTTLYIITFGSF  
pynir -----KADV KPVWQSLRHADT-----WIMSLLYIGTFGSF  
NarK -----KASIKEQLPVLKRGHL-----WIMSLLYLATFGSF  
NarU -----RASIADQLPVLQRLHL-----WLSLLYLATFGSF  
pynar -----TPNHDAVMPKLRAAAKLPVT-----WEMSFLYAVVFGGF  
CrNAR4 -KDYRDLKKE---GTLKARGNMWPVIKCGLGNYS-----WILALTYGYSFGVE  
OsNRT2.1 ---NLRSLQK---KGDVNRDSFSRVLWYAVTNYRT-----WIFVLLYGYSMGVE  
TaNRT2.1 ---NLASLQK---KGDMAKDKFSKVLWGAVTNYRT-----WIFVLLYGYCMGVE  
AtNRT2.1 ---NRATLEK---AGEVAKDKFGKILWYAVTNYRT-----WIFVLLYGYSMGVE  
AtNRT2.4 ---NRSTLEK---KGAVTKDKFSKVLWYAITNYRT-----WVFVLLYGYSMGVE  
HpYNT1 EILEVADIIN---GDEIIEDPSLNDVVKICLSPT-----MLVGLCYMCSFGTE  
NrtA -----KSPSRKEAFNVIFSLAT-----MAVAVPYACSFSGE  
CrnA LEPQSQAIGQFDAFRANAVASPSRKEAFNVIFSLAT-----MAVAVPYACSFSGE

AtNRT1.1 TTLSVAQSETLDRSIG---SFEIPPASMAVFYVGGLLLTAVYDVAIRLCKKLFNYPHG  
 AtNRT1.2 STFSVQQAASMNTKIG---SLKIPPASLPFPVVFIMILAPIYDLIIIPFARKATKTKETG  
 AoNarK SGFSAVFGLLINNQFGRESSLDLPVLGATYAFGLPLI---GSIIIMSWGVFCD---RMG  
 TthNarK2 SGFSAIFPLLIREVYG---KFEGAPDPLRYAFLGPLV---GSLAVIAGAISD---RLG  
 pynir IGYSAAFPTLLKAVFD-----RGDIALMWAFLGAGI---GSVAIPLGGKLSD---RIG  
 NarK IGFSAGFAMLSKTQFP---DVQI---LQYAFFGPF I---GALASAGGALS D---RLG  
 NarU IGFSAGFAMLAKTQFP---DVNI---LLAFRFGPFI---GAIASVGGAISD---KFG  
 pynar VAFSNYLPTYIKTIYD---FSAVDAGARTA AFALA---AVLAPVGGMLADRIIPKY-  
 CrNAR4 LTVDNVIVEYLFDFQF---LNLAVAGALGAI FGLM---NIFSPATGMISDLIAKPFG  
 OsNRT2.1 LTTDNVIAEYFYDRFD---LDLRVAGI IAASFGMA---NIVAPPTGGLSDLGARYFG  
 TaNRT2.1 LTTDNVIAEYFYDFH---LDLRAAGT IAACFGMA---NIVAPMGGYLSDLGARYFG  
 AtNRT2.1 LSTDNVIAEYFFDRFH---LKLHTAGLIAACFGMA---NFFAPAGGYASDFAAKYFG  
 AtNRT2.4 LTTDNVIAEYFFDRFH---LKLHTAGI IAASFGMA---NFFAPIGGWASDIAARRFG  
 HpYNT1 LAVESIISNLFQGKMT---NWSTSKAGAWGSMGLLL---NVVAPAGGISDFLYQRFK  
 NrtA LAIN SILGDY YDKNFP---YMGQTQTGKWAAMFGFL---NIVCPAGGFLADFLYRKTN  
 CrnA LAIN SILGDY YDKNFP---YMGQTQTGKWAAMFGFL---NIVCPAGGFLADFLYRKTN

AtNRT1.1 LRPLQRIGLGLFFGSMAMAVAALVELKRLRRTAHAHG--PTVKTLPLGFYLLIPQYLIVGI  
 AtNRT1.2 VTHLQRIGVGLVLSILAMAVAALVEIKRKGVAKDSGLLDSKETLPVTLFWIALQYLFLGS  
 AoNarK GAIWTFISGVGMAITLAGIAWVLY-----N-PTGMVDFRI FLGLMLAMFLFSGF  
 TthNarK2 GAIVTQVSAIGIF--LSALLVTLY-----TRPTSLDQPFMFVAMLLIFFFSGV  
 pynir GARITAMSFIMLAAGAAGALWSVQ-----VKNMPPVFIFAFMFLFVATGI  
 NarK GTRVTLVNFILMAIFSGLLFLTLTP-----TDG---QGGSFMAFFAVFLALFLTAGL  
 NarU GVRVTLINFI FMAIF SALLFLTLTP-----G---TGSGNFIAFYAVFMGLFLTAGL  
 pynar -----VVLGSAFAGTAAAFVAIF-----QPPDDLWSAVTFITLALFLGI  
 CrNAR4 MR--GRLWVWLWIQTLLGGIFCIIM-----G---KVSNSLTATIVIMI IFSIFCQQ  
 OsNRT2.1 MR--ARLWNIWILQTAGGAFCLL-----G---RASTLPTSVMCMVLF SFCQAQA  
 TaNRT2.1 MR--ARLWNIWILQTAGGAFCIWL-----G---RASALPASVTAMVLF SICAQA  
 AtNRT2.1 MR--GRLWTLWI IQTAGGLFCVWL-----G---RANTLVTAVVAMVLF SFGAQA  
 AtNRT2.4 MR--GRLWTLWI IQTLGGFFCLWL-----G---RATTLPTAVVFMILFSLGAQA  
 HpYNT1 TTKAKKFWM I-FTGLMQGIFLIWI-----G-LVPELSIAGLIVSVSFLCFLWFEM  
 NrtA -TPWAKKLLLSFLGVVMGAFMIAM-----G-FSDPKSEATMFGLTAGLAF FLES  
 CrnA -TPWAKKLLLSFLGVVMGAFMIAM-----G-FSDPKSEATMFGLTAGLAF FLES

AtNRT1.1 GEALIYTGQLDFFLREC-----PKGMKGMSTGLLSTLALGFFSSV  
 AtNRT1.2 ADLFTLAGLLEYFFTEA-----PSSMRSLATSLSWASLAMGYLSSV  
 AoNarK GNAGTF-KQMPMIM-----PARQAGGAI GFTSAIASLGPFLVGV  
 TthNarK2 GNASTF-KQMPMIF-----PPRQAGGVI GWTAAVAAAYGFFLST  
 pynir GNGSTY-RMISKI FRVKGEDAGGDPLTMLE----MRRQAAGALGCI ISSVAGFGGFVPL  
 NarK GSGSTF-QMISVI FRKLTMDRVKAEGGSDERAMREAAATDAAALGFISAIGAI GGGFIPK  
 NarU GSGSTF-QMIAVIFRQIT IYRVKMKGGSDEQAHEAVTETAALGFISAIGAVGGFFIPQ  
 pynar GTGGVFAVVARRA-----PASSVGSVTGI VAAAGGLGGYFPPL  
 CrNAR4 ACGMHF-GITPFV-----SRRAYGVVSGLVGAGNVGAAITQA  
 OsNRT2.1 ACGAIF-GVIPFV-----SRRSLGI ISGMTGAGGNFGAL TQL  
 TaNRT2.1 ACGAVF-GVAPFV-----SRRSLGI ISGLTGAGGNV GAGLTQL  
 AtNRT2.1 ACGATF-AIVPFV-----SRRALGI ISGLTGAGGNFGSGL TQL  
 AtNRT2.4 ACGATF-AIIPFI-----SRRSLGI ISGLTGAGGNFGSGL TQL  
 HpYNT1 GNGANY-ACVPVV-----NRHHSIGIVSGVTGAMN LGGILFSL  
 NrtA CNGAIF-SLVPHV-----HPYANGIVSGMVGGFGNLGGIIFAI  
 CrnA CNGAIF-SLVPHV-----HPYANGIVSGMVGGFGNLGGIIFAI

AtNRT1.1 LVTIVEKFTGKA--HPWI-ADDLNKGRLYNFYWLVAVLVALNFLIFLV-----  
 AtNRT1.2 IVSIVNSITGSSGNTPWLRGK SINRYKLDYFYWLMCVLSAANFLHYLF-----  
 AoNarK ALSAVG-----TGGAWAFFLGCAIFCSLCSVLCWM-----  
 TthNarK2 LAAYTQ-----QATGGFTAFFYGLMVFYAFNFFLNWY-----  
 pynir AYAWSK-----SQFGNIEPALQFYIGFFIVLLGVTFW-----  
 NarK AFGSSL-----ALTGSPVGAMKVFLIFYIACVVITWA-----  
 NarU AFGMSL-----NMTGSPVGAMKVFLIFYIIVCVLLTWL-----  
 pynar VMGGT-----YDSVDNDYTI GLSLLVATALIALL-----  
 CrNAR4 IWFSGTA-----TWQINLSRPDSFVVMGVQAVALTVAVMF IWFPMWGSMTGP  
 OsNRT2.1 LFFTSS-----RYSTGTGLEYM GIMIMACTLPVVLVHFPQWGSMLFPP  
 TaNRT2.1 LFFTSS-----QYSTGRGLEYM GIMIMACTLPVALVHFPQWGSMLFPA  
 AtNRT2.1 LFFSTS-----HFTTEQGLTWMGMIVACTLPVTLVHFPQWGSMLFPP  
 AtNRT2.4 VFFSTS-----TFSTEQGLTWMGMIMACTLPVTLVHFPQWGSMLFPS  
 HpYNT1 VFRYTI-----SNGVN NYFKAFWIIIGIVCTAVNLVCVLI-----  
 NrtA IFRYSH-----HDYARGIWI LGVISMVAFISVSWV-----  
 CrnA IFRYSH-----HDYARGIWI LGVISMVAFISVSWV-----

AtNRT1.1	-----FS--KWYVYKEKRLAEVGIELDDEPSIPMGH-----
AtNRT1.2	-----WAMRYKYRSTGSR-----
AoNarK	-----MY-----ARKNAPFFPG-----
TthNarK2	-----YY--ARKGAEKPC-----
pynir	-----FY-----MRKGTRMGQAGV-----
NarK	-----VYGRH--SKK-----
NarU	-----VYGRRKFSQK-----
pynar	-----YTALRLHAHEPKPTQEV-----
CrNAR4	REG---VEEEDYYLREWSAEEVAQGLHQGSMRFAMESKSQRGYKDKRMLDAVGNRGSPLL
OsNRT2.1	NAG---AEEHHYYGSEWSEQEKSKGLHGASLKFENSRSERGRN--VINAAAAAATPP-
TaNRT2.1	SAD---ATEEEYYASEWSEEEKNKGLHIAGQKFAENSRSERGRN--VI--LATSATPP-
AtNRT2.1	STDPVKGTEAHYYGSEWNEQEKQKNMHQGLRFAENAKSEGGR-----VRSATPP-
AtNRT2.4	TEDEVKSTEEYYMKEWTETEKRRKGMHEGSLKFAVNSRSEGR-----VASAPSP-
HpYNT1	-----PIREERPKAEN-----
NrtA	-----RPVPKSQMRE-----
CrnA	-----RPVPKSQMRE-----
AtNRT1.1	-----
AtNRT1.2	-----
AoNarK	-----
TthNarK	-----
pynir	-----
NarK	-----
NarU	-----
pynar	-----
CrNAR4	TFAPVAPRFHYWTGRQOGRQGT
OsNRT2.1	-----NNSPEHA
TaNRT2.1	-----NNTPOHV
AtNRT2.1	-----ENTPNNV
AtNRT2.4	-----PEHV
HpYNT1	-----
NrtA	-----
CrnA	-----

**Εικόνα 3.4:** Πλήρης στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των μεταφορέων νιτρικών/νιτροδών. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται τα συντηρημένα κατάλοιπα φαινυλαλανίνης (F47), με κόκκινο χρώμα τα συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνης στην διαμεμβρανική έλικα Tm2 (R67), με γαλάζιο απεικονίζεται το μοτίβο υπογραφής νιτρικών (NS1) στην διαμεμβρανική έλικα Tm5. Αντίθετα, με πράσινο χρώμα τα συντηρημένα κατάλοιπα τυροσίνης (Y249), με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνης στην διαμεμβρανική έλικα Tm8 (R268) και με φούξια χρώμα απεικονίζεται το μοτίβο υπογραφής νιτρικών (NS2) στην διαμεμβρανική έλικα Tm11. Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για την στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών ανήκουν στους μεταφορείς νιτρικών/νιτροδών και παρατίθενται αναλυτικά στον Πίνακα 3.5 στο Παράρτημα.

Οι πρωτεΐνες Pynar, Pynir μετά την στοίχιση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών (Εικόνα 3.4) φαίνεται να διαθέτουν δύο μοτίβα υπογραφής νιτρικών NS1, NS2 στις διαμεμβρανικές έλικες TM5 και TM11 καθώς και δύο συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνης R67 και R268 στις διαμεμβρανικές έλικες TM2 και TM8, αντίστοιχα (Σχήμα 3.3 και 3.4).



**Μοτίβα υπογραφής νιτρικών για την οικογένεια μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών (NS1 στην Tm5 και NS2 στην Tm11)**

	<b>Tm 5</b>	<b>Tm 11</b>
<b>AtNRT1.1</b>	NV <b>GS</b> LLAVTVLVVYVQDDV <b>GR-KWGYG</b> ICA	MK <b>GM</b> ST <b>GLLL</b> STLAL <b>G</b> FFF
<b>AtNRT1.2</b>	AC <b>GA</b> LVAVTFVWLEDNK <b>GW-EWGFG</b> VST	M <b>RS</b> LAT <b>SLS</b> WAS <b>LAMGY</b> YL
<b>AoNarK</b>	LS <b>GT</b> AL <b>GLQGGIGNLGLS</b> VIQ	Q <b>AGGAIGFTSAIASL</b> GPFL
<b>TthNarK2</b>	L <b>QGT</b> AL <b>GLQAGIGNFGVS</b> IVQ	Q <b>AGGVIGWTAAVAA</b> YGPFL
<b>Pynir</b>	E <b>KGW</b> AL <b>GLNAAGGNIGVA</b> VAQ	QA <b>AGALGISSVGA</b> FGGFV
<b>NarK</b>	K <b>QGG</b> AL <b>GLNGGLGNMGVS</b> VMQ	DT <b>AAALGFISAIGA</b> IGFFF
<b>NarU</b>	K <b>QGS</b> AL <b>GINGGLGNLGV</b> SVMQ	ET <b>AAALGFISAIGA</b> VGGFF
<b>Pynar</b>	RR <b>GFATGVF-GMGM</b> V <b>GTAM</b> SA	SV <b>GS</b> VT <b>GIVAAAGGL</b> GGYF
<b>CrNAR4</b>	IV <b>GT</b> AN <b>AIAAGWGNMGGG</b> A <b>CH</b>	AY <b>GV</b> V <b>SGLVGAGGN</b> V <b>GA</b> AI
<b>OsNRT2.1</b>	I <b>IGL</b> VN <b>GLAAGWGNMGGG</b> ATQ	SL <b>GIISGMTGAGGN</b> FGAGL
<b>TaNRT2.1</b>	I <b>IGT</b> VN <b>GLAAGWGNMGGG</b> ATQ	SL <b>GIISGLTGAGGN</b> VGAGL
<b>AtNRT2.1</b>	I <b>IGL</b> VN <b>GTAAAGWGNMGGG</b> ITQ	AL <b>GIISGLTGAGGN</b> FGSGL
<b>AtNRT2.4</b>	I <b>IGL</b> VN <b>GTAAAGWGNMGGG</b> VTQ	SL <b>GIISGLTGAGGN</b> FGSGL
<b>HpYNT1</b>	I <b>IGT</b> AN <b>AISAGWGNAGGG</b> VAF	HS <b>GIVSGVTGAMGN</b> LGGIL
<b>NrtA</b>	IV <b>GT</b> AN <b>SLAAGLGNAGGG</b> ITY	AN <b>GIVSGMVGGFGN</b> LGGII
<b>CrnA</b>	IV <b>GT</b> AN <b>SLAAGLGNAGGG</b> ITY	AN <b>GIVSGMVGGFGN</b> LGGII

**Σχήμα 3.3:** Μοτίβα υπογραφής νιτρικών, NS1 και NS2, σε πρωτεΐνες της οικογένειας NNP στις διαμεμβρανικές έλικες TM5 και TM11, αντίστοιχα. Οι μεταφορείς NNP διαθέτουν δύο μοτίβα υπογραφής νιτρικών πλούσια σε γλυκίνες. Η δομή του μοτίβου αυτού είναι AAGxGNxGG και επαναλαμβάνεται με μικρές διαφορές στις διαμεμβρανικές έλικες TM5 και TM11, αντίστοιχα (Εισαγωγή 1.4.3) (Forde, 2000, Trueman et al., 1996).

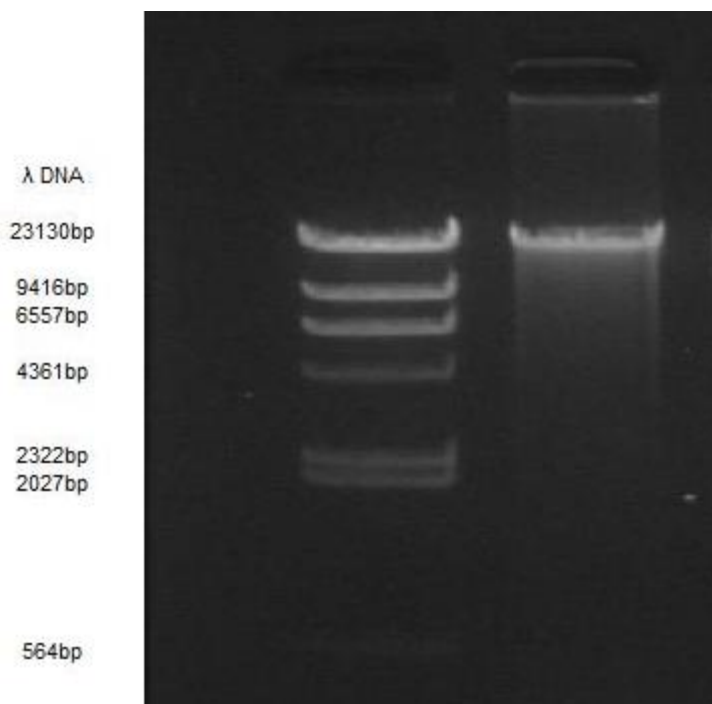
### Συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνων (R) στην Tm 2 (R67) και στην Tm 8 (R268)

	Tm 2	Tm 8
AtNRT1.1	TSFML <b>C</b> LLGGFIADT	GLLLTTAVYDR <b>V</b> AIRLCKKLF
AtNRT1.2	TAFLL <b>A</b> LLGGFLSDA	FIMILAPIYD <b>H</b> LIIPFARKAT
AoNarK	AAGIL <b>R</b> LIYMFLPPL	PLIGSI <b>R</b> MSWGVFCD
TthNarK2	AGGTL <b>R</b> IIWTFLLPPI	PLVGS <b>L</b> ARVIAGAISD
Pynir	VGAF <b>L</b> R <b>L</b> PYTF <b>A</b> VPV	AGIGSV <b>A</b> R <b>P</b> LGGK <b>L</b> SD
NarK	SGALL <b>R</b> VPY <b>S</b> FMVPI	PFIGAL <b>A</b> RSAGG <b>A</b> LS <b>D</b>
NarU	SGALL <b>R</b> VPY <b>S</b> FMVPI	PFIGAI <b>A</b> RSVGG <b>A</b> ISD
Pynar	VGAL <b>G</b> R <b>I</b> V <b>V</b> G <b>P</b> L <b>T</b> D <b>R</b>	LA-AV <b>L</b> A <b>R</b> P <b>V</b> GG <b>M</b> L <b>A</b> D <b>R</b> I
CrNAR4	GAIA <b>A</b> R <b>L</b> FMGIFVDV	LM-NIF <b>S</b> R <b>A</b> TGG <b>M</b> ISD <b>L</b> I
OsNRT2.1	GSIFS <b>R</b> LAMGAICDM	MA-NIV <b>A</b> R <b>P</b> TGG <b>L</b> LS <b>D</b> LG
TaNRT2.1	GSIFS <b>R</b> LAMGAICDL	MA-NIV <b>A</b> R <b>P</b> MG <b>G</b> YLS <b>D</b> LG
AtNRT2.1	GSIFS <b>R</b> LVMGAVCDL	MA-NFF <b>A</b> R <b>P</b> AG <b>G</b> YAS <b>D</b> FA
AtNRT2.4	GSIFS <b>R</b> LVMGAVCDL	MA-NFF <b>A</b> R <b>P</b> IG <b>G</b> WAS <b>D</b> IA
HpYNT1	GTLL <b>G</b> R <b>F</b> ILG <b>P</b> LNDK	LL-NV <b>V</b> A <b>R</b> PAG <b>G</b> IIS <b>D</b> FL
NrtA	ATLL <b>V</b> R <b>L</b> ICG <b>P</b> LC <b>D</b> R	FL-NIV <b>C</b> R <b>P</b> AG <b>G</b> FL <b>A</b> D <b>F</b> L
CrnA	ATLL <b>V</b> R <b>L</b> ICG <b>P</b> LC <b>D</b> R	FL-NIV <b>C</b> R <b>P</b> AG <b>G</b> FL <b>A</b> D <b>F</b> L

Σχήμα 3.4: Συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνων, R67 και R268, στις διαμεμβρανικές έλικες TM2 και TM8, αντίστοιχα.

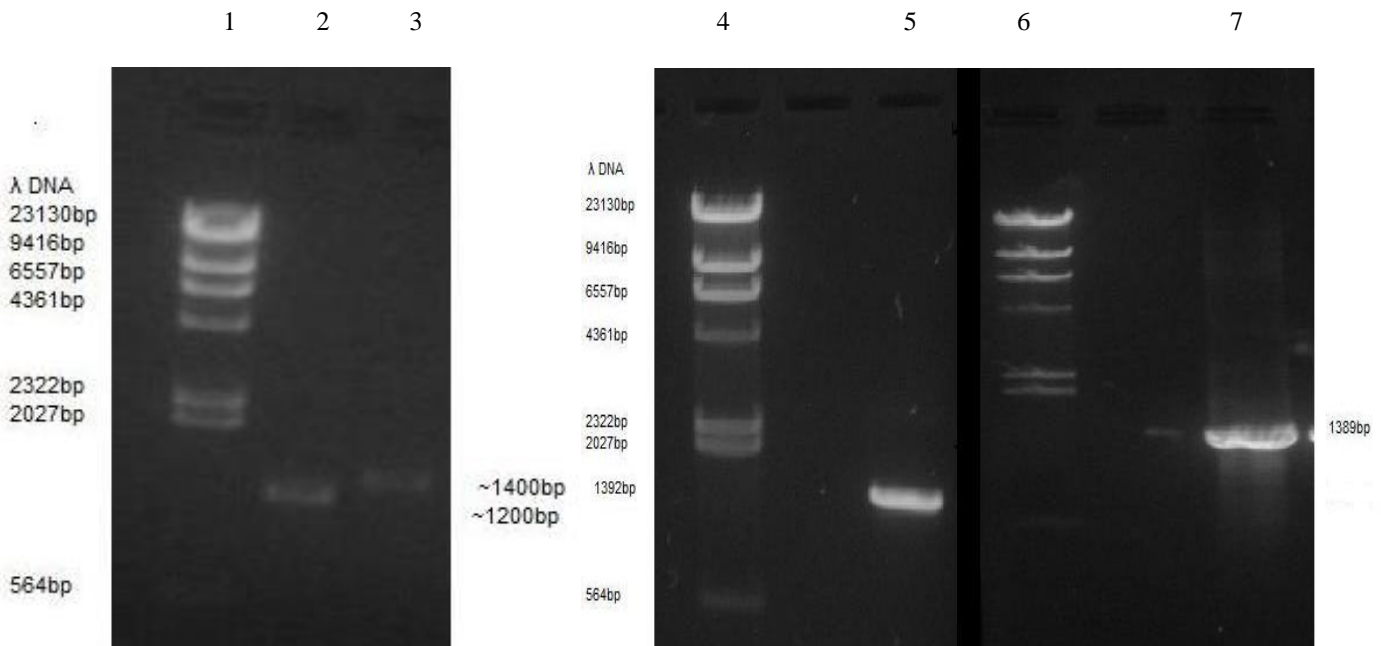
### 3.5 Κινητοποίηση των γονιδίων *pynar*, *pynir* από το γονιδίωμα του στελέχους *Spyr1*

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από το εδαφοβακτήριο *Mycobacterium gilvum* *Spyr1* με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) NucleoSpin® Tissue της Macherey Nagel, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι στην ενότητα 2.7 (Εικόνα 3.5).



**Εικόνα 3.5:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του χρωμοσωμικού DNA του στελέχους Spyr1 του εδαφοβακτηρίου *Mycobacterium gilvum*. **Διαδρομή 1:** μάρτυρας λDNA/HindIII, **Διαδρομή 2:** χρωμοσωμικό DNA του Spyr1

Στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν τα κατάλληλα πριμοδοτικά μόρια για τα γονίδια *rynar*, *rynir*, *naru*, *nark* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 2.3 στην ενότητα 2.5 στα Υλικά και Μέθοδοι. Τα προμοδοτικά αυτά μόρια φέρουν περιοριστικές θέσεις για τα ένζυμα BamHI/ApaI. Κατόπιν, ακολούθησαν πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Υλικά και Μέθοδοι ενότητα 2.6) για κάθε γονίδιο και έπειτα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης (Υλικά και Μέθοδοι ενότητα 2.12). Διαπιστώθηκε ότι τα προϊόντα PCR είχαν το επιθυμητό μέγεθος των γονιδίων *rynar*, *rynir*, *nark*, *naru* και πραγματοποιήθηκε απομόνωση-καθαρισμός DNA (προϊόντων PCR) από την πηκτή αγαρόζης με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της Macherey Nagel και εκ νέου ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Υλικά και Μέθοδοι ενότητα 2.10) (Εικόνα 3.6). Στην Εικόνα 3.6, στην διαδρομή 2 παρατηρούμε μία ζώνη στα 1200bp περίπου, η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο *rynar*, ενώ στη διαδρομή 3 απεικονίζεται μία ζώνη περίπου στα 1400bp, η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο *rynir*. Στις διαδρομές 5 και 6 παρατηρούμε από μία ζώνη περίπου στα 1400bp, καθεμία από αυτές αντιστοιχεί στα γονίδια *nark* και *naru*. Τα γονίδια *nark* και *naru* είναι μεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών του βακτηρίου *E.coli*, τα οποία παραχωρήθηκαν στο εργαστήριό μας από την συνεργάτιδα Unkles Shiela.

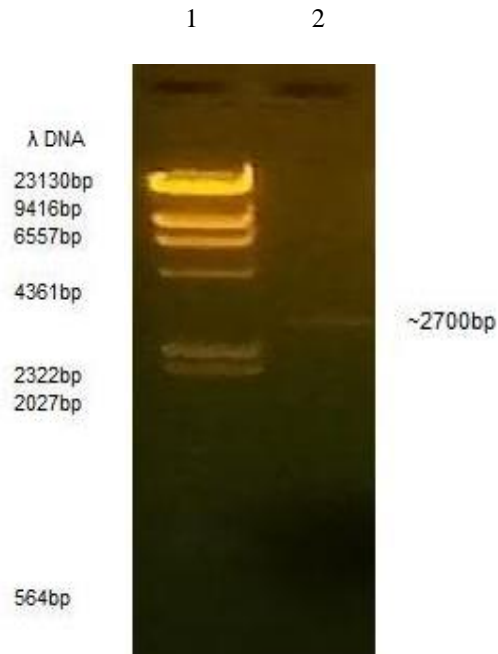


**Εικόνα 3.6:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR των καθαρών γονιδίων *rynar*, *rynir*, *nark*, *naru*.

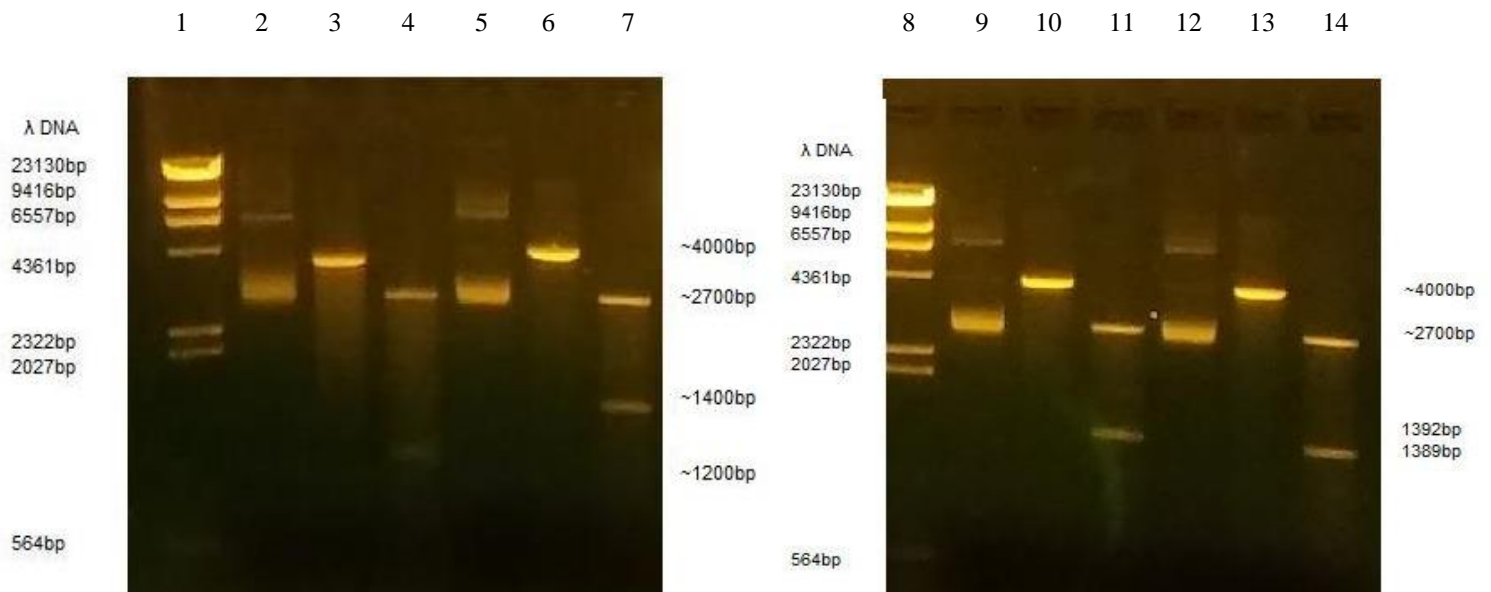
**Διαδρομή 1:** μάρτυρας  $\lambda_{DNA}/HindIII$ , **Διαδρομή 2:** καθαρό γονίδιο *rynar* (~ 1200 bp), **Διαδρομή 3:** καθαρό γονίδιο *rynir* (~ 1400 bp), **Διαδρομή 4:** μάρτυρας  $\lambda_{DNA}/HindIII$ , **Διαδρομή 5:** καθαρό γονίδιο *nark* (1392bp), **Διαδρομή 6:** μάρτυρας  $\lambda_{DNA}/HindIII$ , **Διαδρομή 7:** καθαρό γονίδιο *naru* (1389bp).

### 3.5.1 Κλωνοποίηση γονιδίων μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών στο πλασμίδιο pt7-5

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων στο πλασμίδιο pt7-5 πραγματοποιήθηκαν πέψεις, τόσο στο πλασμίδιο pt7-5 (Εικόνα 3.7) όσο και στα προϊόντα PCR των γονιδίων, *rynar*, *rynir*, *nark* και *naru*, με τα ένζυμα BamHI/ApaI και ακολούθησε η αντίδραση ανασύνδεσης των γονιδίων στο πλασμίδιο με το ένζυμο T4 DNA λιγάση. Κατόπιν, έλαβε χώρα μετασχηματισμός των κυττάρων *E.coli* TOP10F' με τα πλασμίδια που φέρουν τα επιθυμητά γονίδια (pt7-5::*rynar*, pt7-5::*rynir*, pt7-5::*nark* και pt7-5::*naru*), απομόνωση πλασμιδιακού πλέον DNA, pt7-5::*rynar*, pt7-5::*rynir*, pt7-5::*nark* και pt7-5::*naru* και πέψεις για επιβεβαίωση του μεγέθους (Εικόνα 3.8). Στη φάση αυτή ελέγχθηκε η ορθότητα των αλληλουχιών από την εταιρία MWG-Biotech (sequencing) και τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παρουσιάζονται στο Παράρτημα.



**Εικόνα 3.7:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης του πλασμιδίου *pt7-5*, έπειτα από διπλή πέψη με τα ένζυμα *BamHI* – *ApaI*. **Διαδρομή 1:** μάρτυρας  $\lambda_{DNA}/HindIII$ , **Διαδρομή 2:** πλασμίδιο *pt7-5* πέψη με *BamHI* – *ApaI*



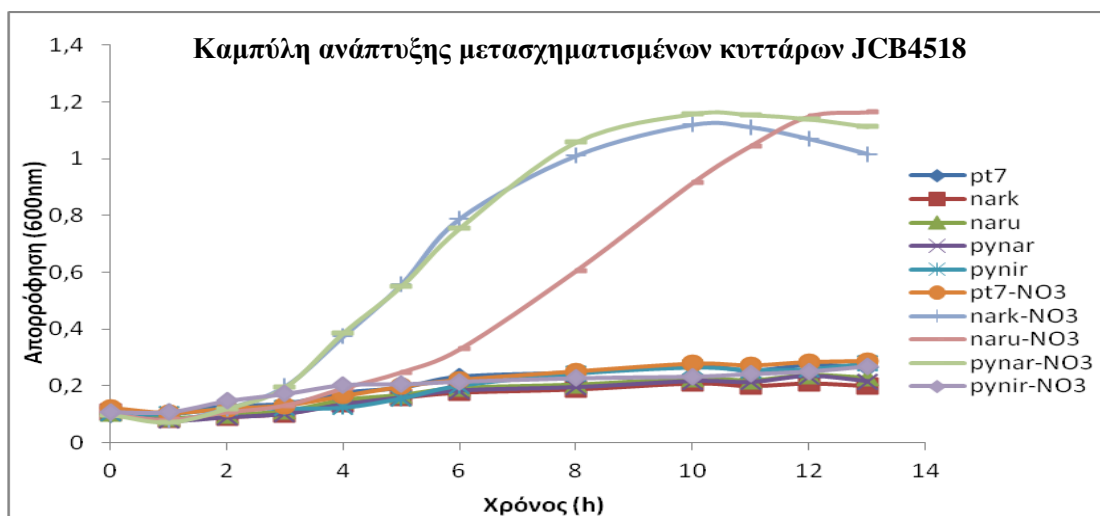
**Εικόνα 3.8:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης προϊόντων PCR των γονιδίων *rynar*, *rynr*, *nark*, *nar*, τα οποία κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο *pt7-5*.

**Διαδρομή 1:** μάρτυρας  $\lambda_{DNA}/HindIII$ , **Διαδρομή 2:** άκοπο πλασμίδιο *pt7-5::rynar*, **Διαδρομή 3:** πλασμίδιο *pt7-5::rynar* πέψη με *ApaI*, **Διαδρομή 4:** πλασμίδιο *pt7-5::rynar* πέψη με *BamHI*-*ApaI* **Διαδρομή 5:** άκοπο πλασμίδιο *pt7-5::rynr*, **Διαδρομή 6:** πλασμίδιο *pt7-5::rynr* πέψη με *ApaI* **Διαδρομή 7:** πλασμίδιο *pt7-5::rynr* πέψη με *BamHI* – *ApaI* **Διαδρομή 8:** μάρτυρας  $\lambda_{DNA}/HindIII$  **Διαδρομή 9:** άκοπο πλασμίδιο *pt7-5::nark*, **Διαδρομή 10:** πλασμίδιο *pt7-5::nark* πέψη με *ApaI* **Διαδρομή 11:** πλασμίδιο *pt7-5::nark* πέψη με *BamHI*-*ApaI*, **Διαδρομή 12:** άκοπο πλασμίδιο *pt7-5::nar*, **Διαδρομή 13:** πλασμίδιο *pt7-5::nar* πέψη με *ApaI*, **Διαδρομή 14:** πλασμίδιο *pt7-5::nar* πέψη με *BamHI* – *ApaI*

Στην Εικόνα 3.8 στις διαδρομές 3, 6, 10 και 13 παρατηρούμε από μία ζώνη στα περίπου 4000bp, η οποία αντιστοιχεί στα ευθύγραμμα πλασμίδια *pt7-5::rynar*, *pt7-5::rynir*, *pt7-5::nark*, *pt7-5::naru*, αντίστοιχα, έπειτα από πέψη με το ένζυμο *ApaI*. Στις διαδρομές 4, 7, 11 και 14 παρατηρούμε από δύο ζώνες, έπειτα από διπλή πέψη των παραπάνω πλασμιδίων με τα ένζυμα *BamHI-ApaI*, η ζώνη κοντά στα 2700bp αντιστοιχεί στο πλασμίδιο (*pt7-5*), ενώ οι ζώνες στα 1200, 1400, 1392 και 1389bp περίπου αντιστοιχούν σε καθένα από τα γονίδια *rynar*, *rynir*, *nark*, *naru*.

### 3.6 Καμπύλες ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων JCB4518 (συμπλήρωση φαινότυπου)

Μετά την επιβεβαίωση της αλληλουχίας από την MWG-Biotech (sequencing, Παράρτημα) πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των κυττάρων *E.coli* JCB4518, από τα οποία έχουν απενεργοποιηθεί τα ενδογενή συστήματα μεταφοράς νιτρικών/νιτρωδών, *nark*, *naru* και *nirc*, με τα πλασμίδια *pt7-5::rynar*, *pt7-5::rynir*, *pt7-5::nark*, *pt7-5::naru* για να μελετηθεί η λειτουργία των πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών, *rynar* και *rynir*. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια, *nark* και *naru*. Για να διαπιστωθεί αν τα γονίδια αυτά είναι μεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών πραγματοποιήθηκαν πειράματα συμπλήρωσης του φαινότυπου, όπου εμβολιάστηκαν κύτταρα *E.coli* JCB4518, που φέρουν τα γονίδια *rynar*, *rynir*, *nark*, *naru*, σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αλάτων παρουσία και απουσία πηγής αζώτου - νιτρικών και πηγή άνθρακα γλυκερόλη (Σχήμα 3.5), όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι στην ενότητα 2.17.



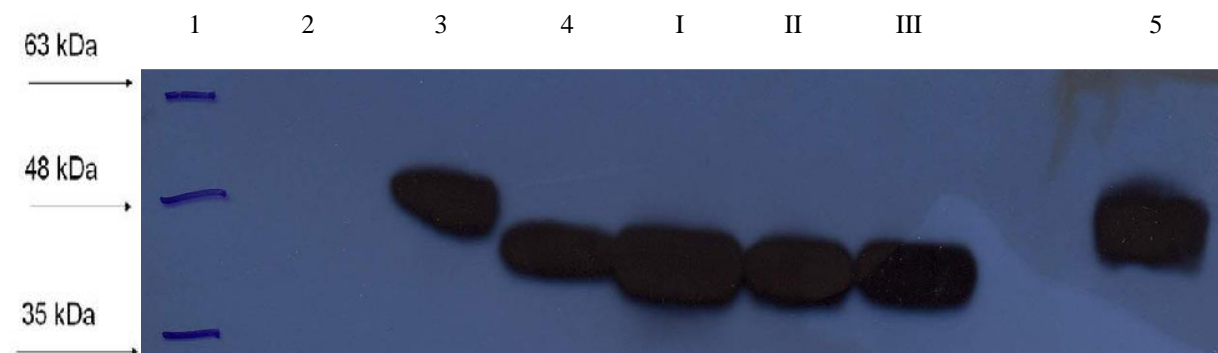
**Σχήμα 3.5:** Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων *E.coli* JCB4518 που φέρουν γονίδια μεταφορέων νιτρικών/νιτρωδών απουσία και παρουσία πηγής αζώτου.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.5 τα κύτταρα JCB4518 που φέρουν τα γονίδια *rynar*, *nark*, *naru* αναπτύσσονται παρουσία νιτρικών, ενώ δεν παρατηρείται ανάπτυξη απουσία νιτρικών. Το γονίδιο *rynar* φαίνεται να συμπληρώνει το φαινότυπο των κυττάρων JCB4518, όπως και τα γονίδια *nark* και *naru*, που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Η μη ανάπτυξη των κυττάρων απουσία νιτρικών σε αναερόβιες συνθήκες ήταν αναμενόμενη, καθώς σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα ένα μη ζυμούμενο σάκχαρο, όπως η γλυκερόλη, η ανάπτυξη εξαρτάται από την αναγωγή ενώσεων που δρουν ως τελικοί δέκτες ηλεκτρονίων (Feng et al., 2014).

Επομένως, εφόσον τα νιτρικά είναι ο μόνος δέκτης ηλεκτρονίων, κύτταρα στα οποία δεν υπάρχει κάποιος μεταφορέας νιτρικών δεν μπορούν να αναπτυχθούν. Συμπεραίνοντας λοιπόν, ότι το *rynar* κωδικεύει μία πρωτεΐνη που είναι μεταφορέας νιτρικών. Αντίθετα τα κύτταρα που φέρουν το γονίδιο *rynir* δεν αναπτύσσονται παρουσία νιτρικών δείχνοντας ότι το γονίδιο *rynir* δεν συμπληρώνει τον φαινότυπο. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα JCB4518 με το πλασμίδιο pt7-5, τα οποία δεν εμφανίζουν ανάπτυξη παρουσία και απουσία νιτρικών. Αφού ολοκληρώθηκε η μελέτη και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των γονιδίων *rynar*, *rynir* διαπιστώθηκε ότι μόνο το γονίδιο *rynar* λειτουργεί ως μεταφορέας νιτρικών/νιτροδών (Σχήμα 3.5).

### 3.7 Ανοσοαποτύπωση πιθανών μεταφορέων νιτρικών/νιτροδών, Rynar και Rynir

Η ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών που κωδικεύονται από τα γονίδια *rynar* και *rynir* πραγματοποιήθηκε με αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης. Οι αναλύσεις αυτές έλαβαν χώρα στο εργαστήριο του κ.Φριλίγγου (E. Karena) στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Εικόνα 3.9).



**Εικόνα 3.9:** Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών NarK, Rynar και Rynir που απομονώθηκαν από κύτταρα JCB4518, τα οποία αναπτύχθηκαν αναερόβια στους 37°C.

**Διαδρομή 1:** πρωτεΐνη πρότυπου μοριακού βάρους, **Διαδρομή 2:** pt7-5, **Διαδρομή 3:** NarK, **Διαδρομή 4:** Rynar **Διαδρομή 5:** Rynir. Οι ζώνες I, II, III αφορούν μεταλλάγματα (βλέπε Εικόνα 3.13).

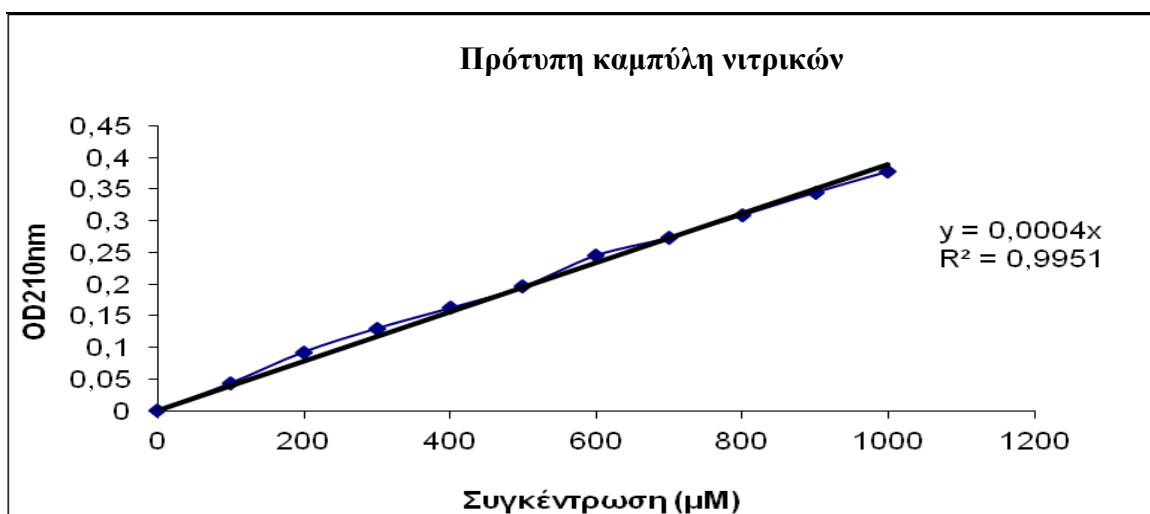
Στην Εικόνα 3.9 απεικονίζεται η ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών NarK, Rynar και Rynir. Ο χρόνος εμφάνισης του φίλμ είναι τα 5 λεπτά, ενώ χρησιμοποιήθηκαν 100μg πρωτεΐνης και ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο NIPPON Genetics Europe Prestained Protein Marker. Στα δείγματα των κυττάρων *E.coli* JCB4518 που εκφράζουν τις πρωτεΐνες NarK, Rynar και Rynir εμφανίζεται μία ζώνη στα 50, 43 και 52 kDa (διαδρομές 3, 4, 5), αντίστοιχα, ενώ παράλληλα δεν παρατηρείται έκφραση πρωτεΐνης στον αρνητικό μάρτυρα του στελέχους JCB4518 που φέρει το πλασμίδιο pt7-5 (διαδρομή 2). Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες Rynar και Rynir εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη των κυττάρων, όπως επίσης και η πρωτεΐνη NarK. Στην διαδρομή 1 απεικονίζονται οι ζώνες της πρωτεΐνης πρότυπου μοριακού βάρους.



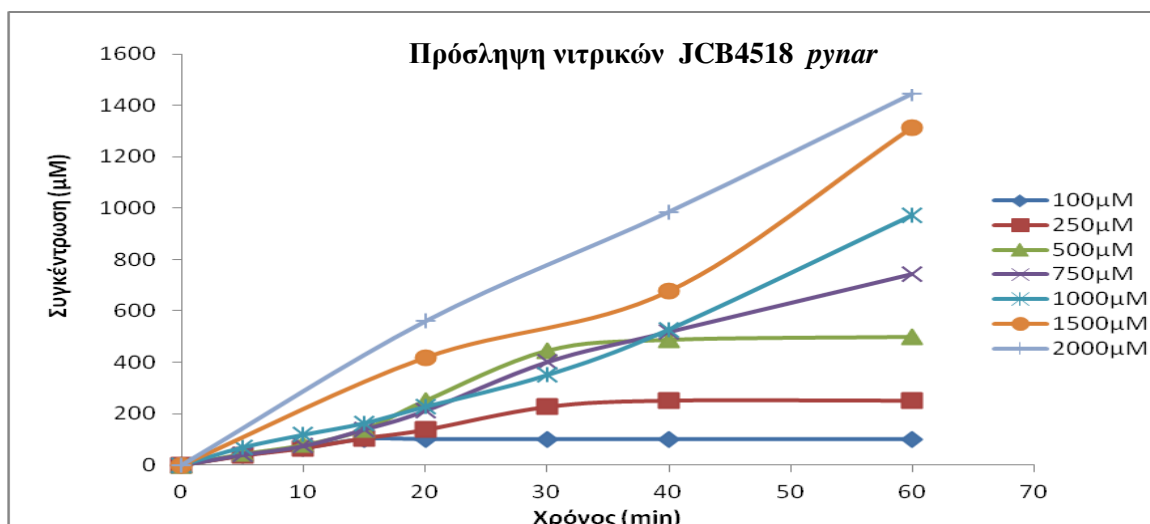
### 3.8 Πειράματα πρόσληψης νιτρικών

#### 3.8.1 Μέτρηση νιτρικών

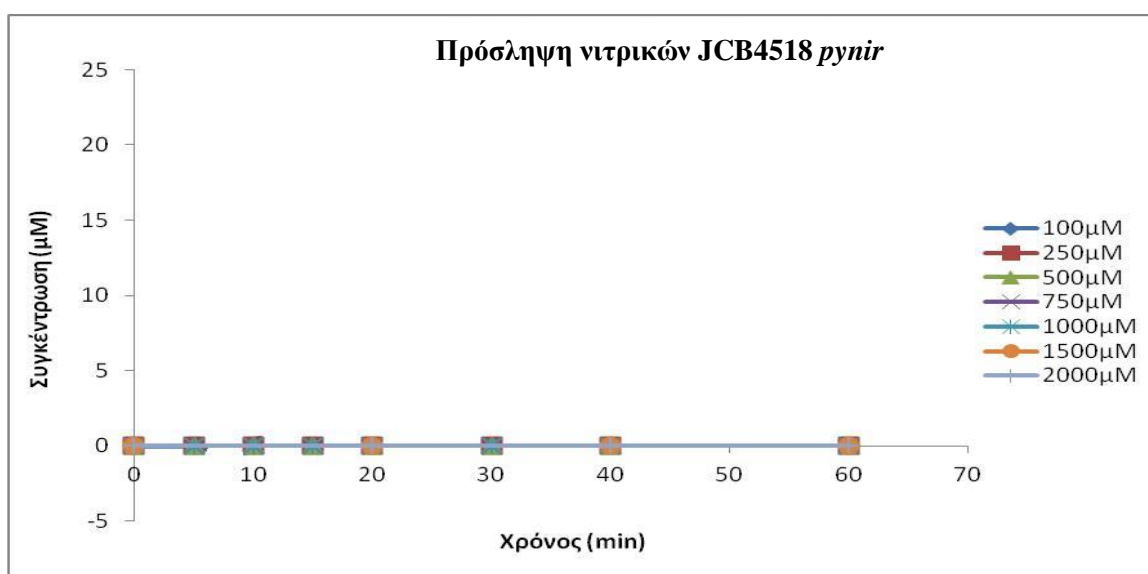
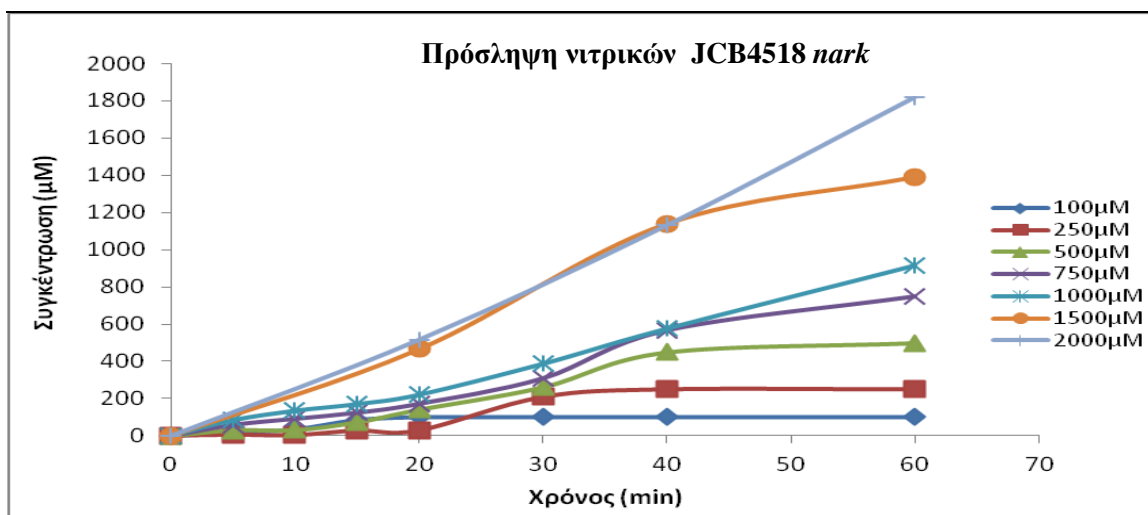
Αφού πραγματοποιήθηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης και βρέθηκαν οι συνθήκες αναπλήρωσης του φαινότυπου στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα πρόσληψης νιτρικών, στα στελέχη JCB4518-*rynar*, JCB4518-*rynir* και JCB4518-*nark* (Σχήμα 3.7), όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι στην ενότητα 2.18. Πραγματοποιείται εμβολιασμός των κυττάρων στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αλάτων σε αναερόβιες συνθήκες. Ακολουθεί επαγωγή με IPTG, όπου μετά από 12 ώρες αναερόβιας επώασης λαμβάνεται δείγμα σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η μέτρηση των νιτρικών πραγματοποιείται έπειτα από φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 210nm. Αρχικά, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη νιτρικών, η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.6.



Σχήμα 3.6: Πρότυπη καμπύλη νιτρικών





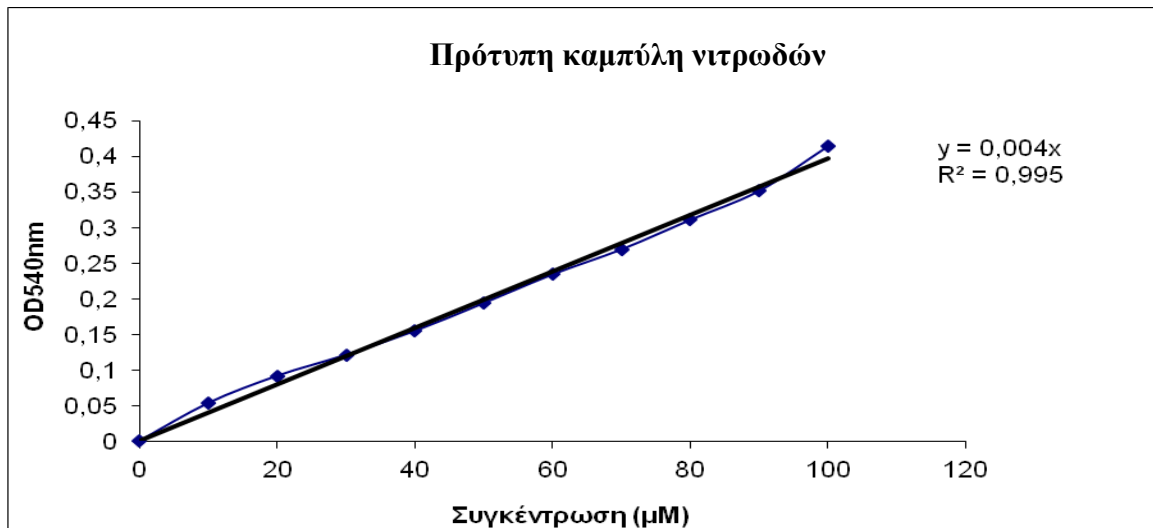


**Σχήμα 3.7:** Διαγράμματα πρόσληψης νιτρικών από τα κύτταρα JCB4518 με τα *rynar*, *nark*, *rynir* από τα οποία έχει αφαιρεθεί ο αρνητικός μάρτυρας.

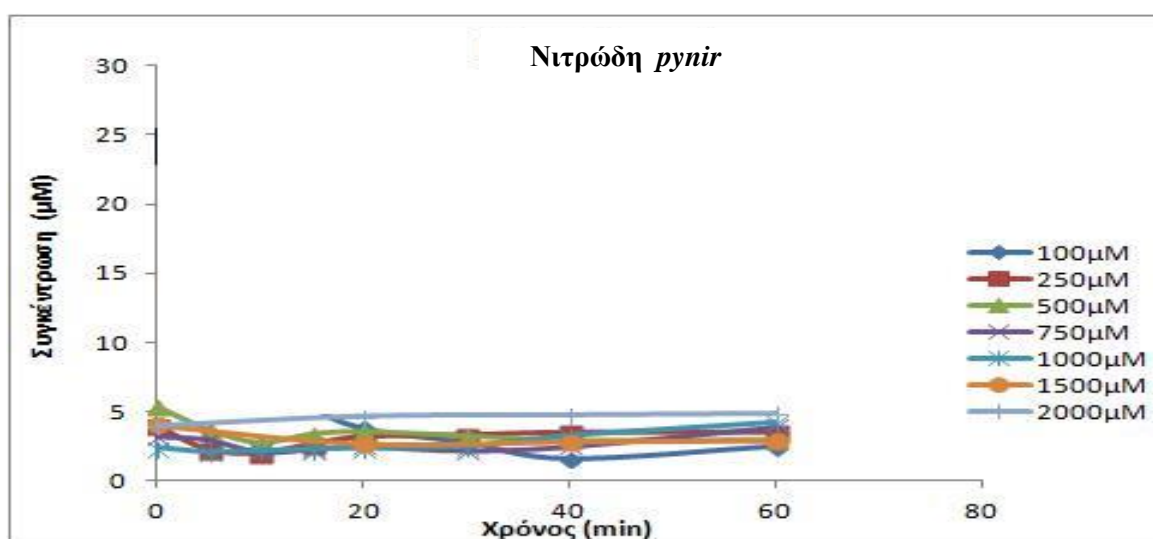
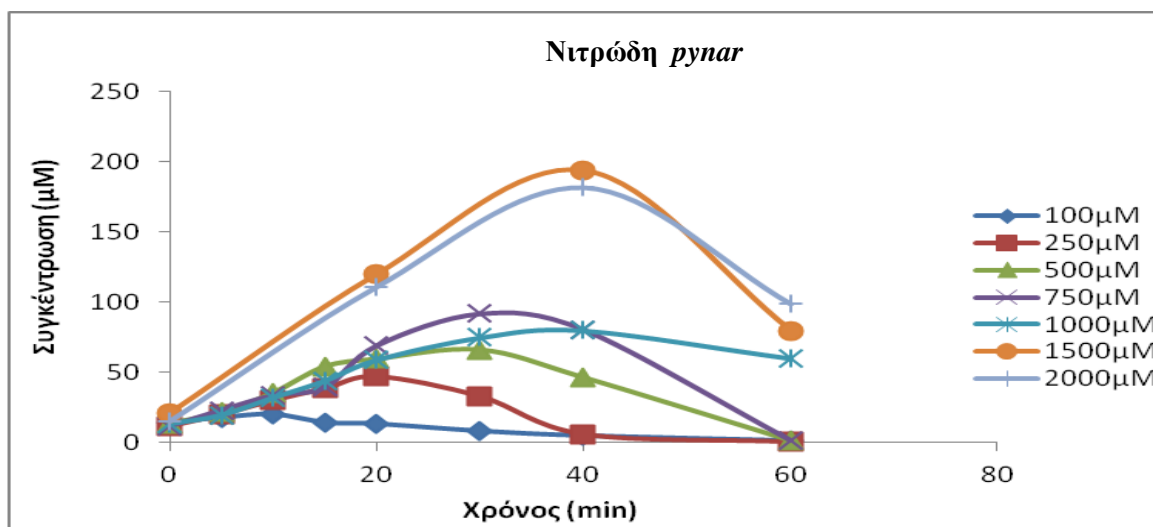
Σύμφωνα με το σχήμα 3.7 παρατηρούμε ότι υπάρχει πρόσληψη νιτρικών στα κύτταρα JCB4518 που φέρουν τα γονίδια *rynar* και *nark*, αντίθετα δεν παρατηρείται πρόσληψη νιτρικών στο στέλεχος JCB4518-*rynir*. Παρατηρείται ότι, η πρόσληψη νιτρικών είναι γραμμική μέχρι την χρονική στιγμή  $t=20$  λεπτά.

### 3.8.2 Μέτρηση νιτρωδών

Παράλληλα με τα νιτρικά μετρήθηκαν και τα νιτρωδή που υπάρχουν στο υπερκείμενο των στελεχών JCB4518-*rynar* και JCB4518-*rynir*. Η μέτρηση των νιτρωδών πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά. Όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι στην ενότητα 2.18, σε 40μl δείγματος προστέθηκαν τα διαλύματα σουλφαναμιδίου και N-(1-ναφθυλ)αιθυλενοδιαμινο διϋδροχλωρίδιο (NED) σε αναλογία 1:1. Ακολούθησε μέτρηση των νιτρωδών σε φωτόμετρο ELISA στα 540nm. Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη νιτρωδών, η οποία παρατίθεται στο Σχήμα 3.8.



Σχήμα 3.8: Πρότυπη καμπύλη νιτροδών

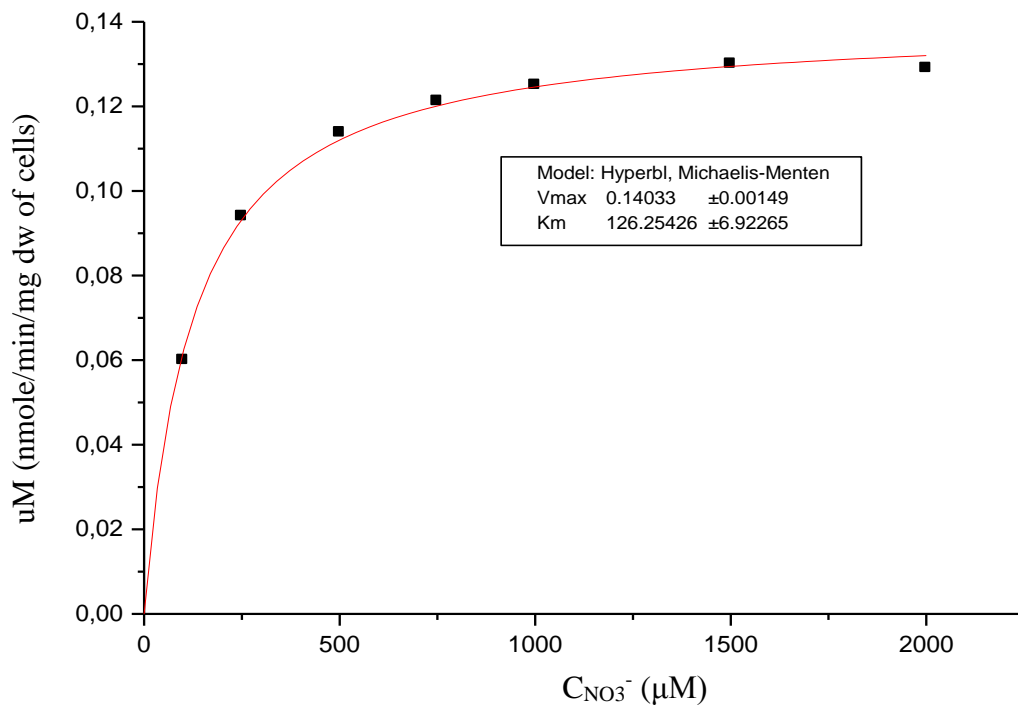


Σχήμα 3.9: Διαγράμματα νιτροδών για το στέλεχος JCB4518-rynar και JCB4518-rynir.

Στο Σχήμα 3.9 παρουσιάζονται τα νιτρώδη που βρίσκονται στο υπερκείμενο των κυττάρων JCB4518 με το *rynar* και JCB4518 με το *rynir*, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι, τα νιτρώδη στην αρχή αυξάνονται, ενώ στη συνέχεια μειώνονται, στο υπερκείμενο των κυττάρων JCB4518 με το *rynar* που ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι τα νιτρώδη μπαίνουν μέσα στο κύτταρο και στη συνέχεια μετατρέπονται σε αμμωνία. Αντίθετα, στο υπερκείμενο των κυττάρων JCB4518 με το *rynir* δεν παρατηρούνται νιτρώδη συμπεραίνοντας ότι δεν πραγματοποιείται μεταφορά των νιτρωδών στα κύτταρα.

### 3.9 Κινητική ανάλυση της *Rynar*

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων πρόσληψης νιτρικών (uptake) υπολογίστηκε η κινητική της πρωτεΐνης *Rynar*, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.10. Τα αποτελέσματα υπολογισμού της κινητικής συνοψίζονται στον Πίνακα 3.6.



Σχήμα 3.10 : Εύρεση κινητικής της πρωτεΐνης *Rynar*.

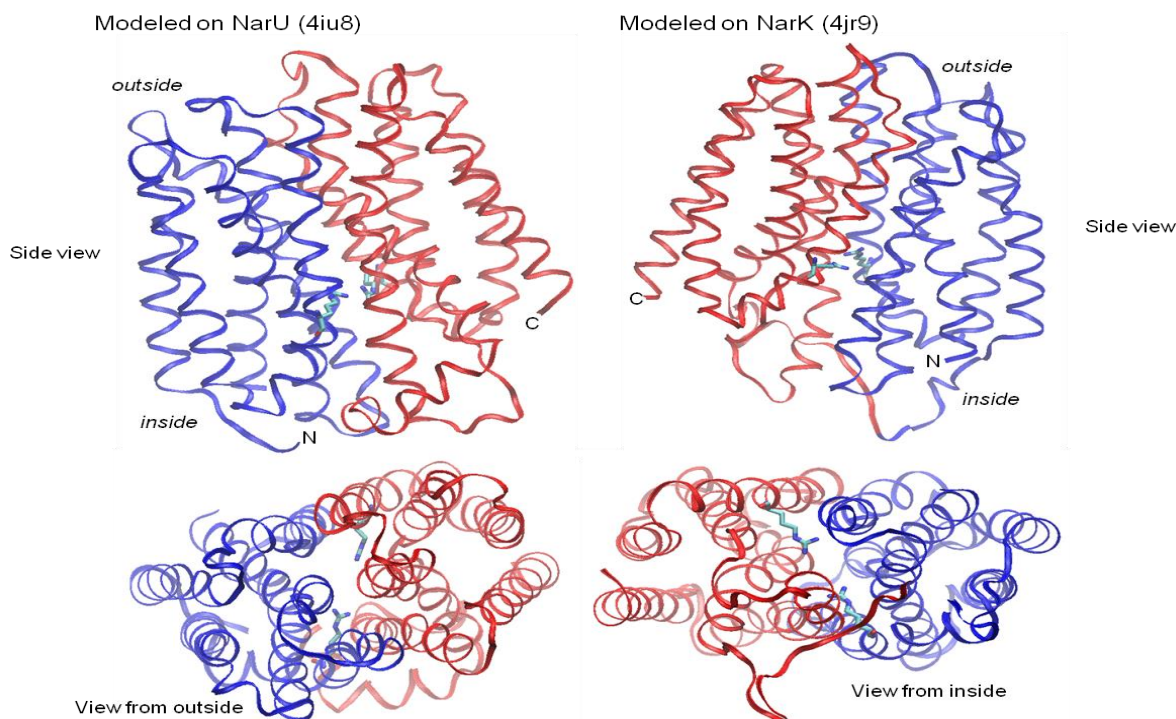
Πίνακας 3.6: Τιμές  $K_m$  και  $V_{max}$  για την πρωτεΐνη *Rynar*.

$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ (nmole/min/mg dry weight of cells)	$V_{max}/K_m$ [(min·lit·kg dw of cells) <sup>-1</sup> ]
126.25±6.92	0.14±0.00149	1.11±0.21

Οι τιμές  $V_{max}$  και  $K_m$  προσδιορίστηκαν σύμφωνα με την κινητική Michaelis-Menten χρησιμοποιώντας το λογισμικό Microcal Origin. Βρέθηκαν τα  $V_{max}=0.14\pm 0.00149$  nmole/min/mg dry weight of cells και το  $K_m=126.25\pm 6.92$   $\mu$ M.

### 3.10 Μοντέλα

Τα τρισδιάστατα μοριακά μοντέλα για τον μεταφορέα νιτρικών/νιτρωδών Rynar σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων VMD, το οποίο είναι απεικονιστικό πρόγραμμα και το SWISS-MODELLER, που είναι ένα πρόγραμμα μοριακής μοντελοποίησης, στο εργαστήριο του κ.Φριλίγγου στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Οι πρωτεΐνες NarK και NarU χρησιμοποιήθηκαν ως δομικά πρότυπα γνωστών κρυσταλλογραφικών δομών (Fukuda et al., 2015, Yan et al., 2013). Στο Σχήμα 3.11 παρουσιάζονται τα συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνων R67 στην διαμεμβρανική έλικα 2 και R268 στην διαμεμβρανική έλικα 8.



**Σχήμα 3.11:** 3D μοντέλα της πρωτεΐνης Rynar, τα οποία βασίστηκαν στα προγράμματα Swiss-Model Server και VDM.

Οι έξι έλικες στο N-άκρο φαίνονται με μπλε χρώμα, ενώ οι έξι έλικες στο C-άκρο με κόκκινο χρώμα. Ταυτόχρονα παρουσιάζεται η θέση πρόσδεσης των αργινίνων 67 και 268 στο κέντρο της δομής.

### 3.11 Μεταλλαξιγένεση στην πρωτεΐνη Rynar

Με πολλαπλή στοίχιση πρωτεϊνών της οικογένειας NNP διαπιστώθηκε ότι ο μεταφορέας Rynar φέρει συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνης R67 και R268 στις διαμεμβρανικές έλικες 2 και 8, αντίστοιχα (Εικόνα 3.4).

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των αργινίνων αυτών στην δέσμευση του υποστρώματος ακολούθησαν πειράματα μεταλλαξιγένεσης, όπου οι αργινίνες R67 και R268 αντικαταστάθηκαν από τα αμινοξέα αλανίνη (A), ιστιδίνη (H) και λυσίνη (K) για να διαπιστωθεί αν προκαλούν κάποια αλλαγή στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης μεταφορέα του γονιδίου *pynar*. Η επιλογή των τριών αυτών αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της μεταλλαξιγένεσης πραγματοποιήθηκε με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους. Τα αμινοξέα λυσίνη και ιστιδίνη είναι βασικά αμινοξέα, όπως και η αργινίνη, όμως η ιστιδίνη φέρει έναν μη-φορτισμένο ημιδαζολικό δακτύλιο, ενώ η αντικατάσταση της αργινίνης από λυσίνη πραγματοποιείται για να ελεγχθεί πιθανός ηλεκτροστατικός ρόλος του καταλοίπου της αργινίνης. Αντίθετα, η αλανίνη είναι ένα μη-πολικό αμινοξύ με μικρό μέγεθος. Για να πραγματοποιηθούν οι μεταλλάξεις, στην παρούσα εργασία έλαβε χώρα η τεχνική overlap extension PCR (PCR 2 σταδίων), η οποία αναφέρεται στην παράγραφο 2.7.1 στα Υλικά και Μέθοδοι, αποτελείται από το 1<sup>ο</sup> στάδιο (Εικόνα 3.10) και 2<sup>ο</sup> στάδιο (Εικόνα 3.11) PCR (Πίνακας 3.7 α,β,γ). Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που παρατίθενται στον Πίνακα 2.3 στην παράγραφο 2.6 στα Υλικά και Μέθοδοι. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.7α χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *lacz50-pyNar R67A rev*, *lacz50-pyNar R67H rev*, *lacz50-pyNar R67K rev* και ως υπόστρωμα το DNA *pt7::pynar* κάθε φορά, οπότε λάβαμε το Θραύσμα 1. Στον Πίνακα 3.7β χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *pyNar R67A for- pt7-5*, *pyNar R67H for- pt7-5*, *pyNar R67K for- pt7-5* και ως υπόστρωμα το DNA *pt7::pynar*, οπότε λάβαμε το Θραύσμα 2. Στη συνέχεια, έλαβε χώρα το PCR 2<sup>ο</sup> σταδίου, Πίνακας 3.7γ, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *lacz50- pt7-5* για καθεμία από τις μεταλλάξεις και ως υπόστρωμα τα θραύσματα 1 και 2 του PCR 1<sup>ο</sup> σταδίου.

**Πίνακας 3.7α:** PCR 1<sup>ο</sup> Σταδίου - Θραύσμα 1

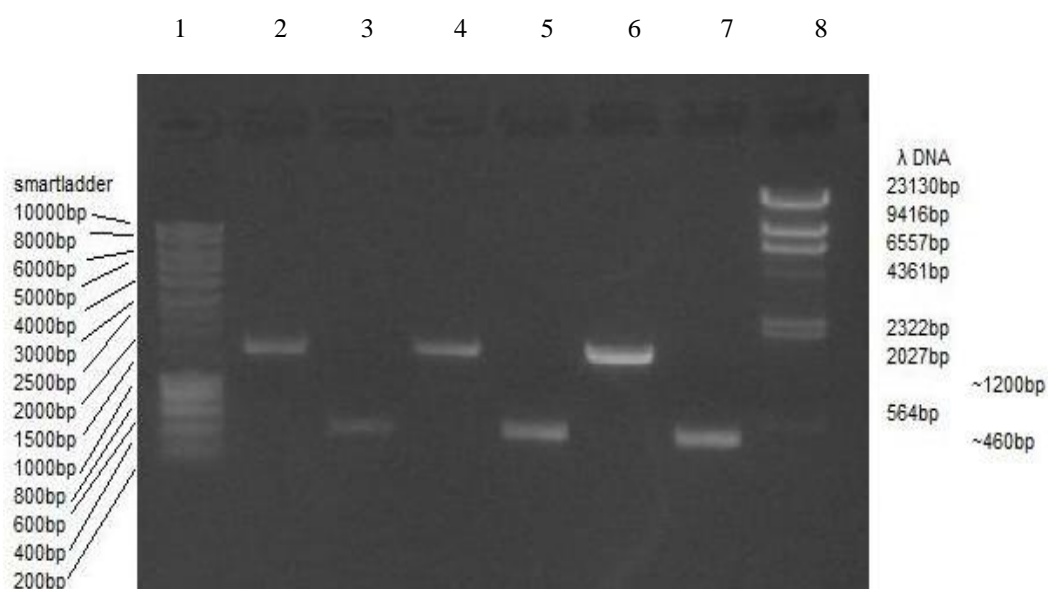
<b>Εκκινητής 1 (Forward primer)</b>	<b>Εκκινητής 2 (Reverse primer)</b>	<b>Υπόστρωμα (πλασμιδιακό DNA)</b>	<b>Μέγεθος προϊόντος PCR</b>	<b>Συμβολισμός προϊόντος PCR</b>
<i>lacz50</i>	<i>pyNar R67A rev</i>	<i>pt7::pynar</i>	~460bp	A <sup>-</sup>
<i>lacz50</i>	<i>pyNar R67H rev</i>	<i>pt7::pynar</i>	~460bp	H <sup>-</sup>
<i>lacz50</i>	<i>pyNar R67K rev</i>	<i>pt7::pynar</i>	~460bp	K <sup>-</sup>

Πίνακας 3.7β: PCR 1<sup>ο</sup> Σταδίου - Θραύσμα 2

Εκκινητής (Forward primer) 1	Εκκινητής (Reverse primer) 2	Υπόστρωμα (πλασμιδιακό DNA)	Μέγεθος προϊόντος PCR	Συμβολισμός προϊόντος PCR
pyNar R67A for	pt7-5	pt7::rynar	~1200bp	A <sup>+</sup>
pyNar R67H for	pt7-5	pt7::rynar	~1200bp	H <sup>+</sup>
pyNar R67K for	pt7-5	pt7::rynar	~1200bp	K <sup>+</sup>

Πίνακας 3.7γ: PCR 2<sup>ο</sup> Σταδίου

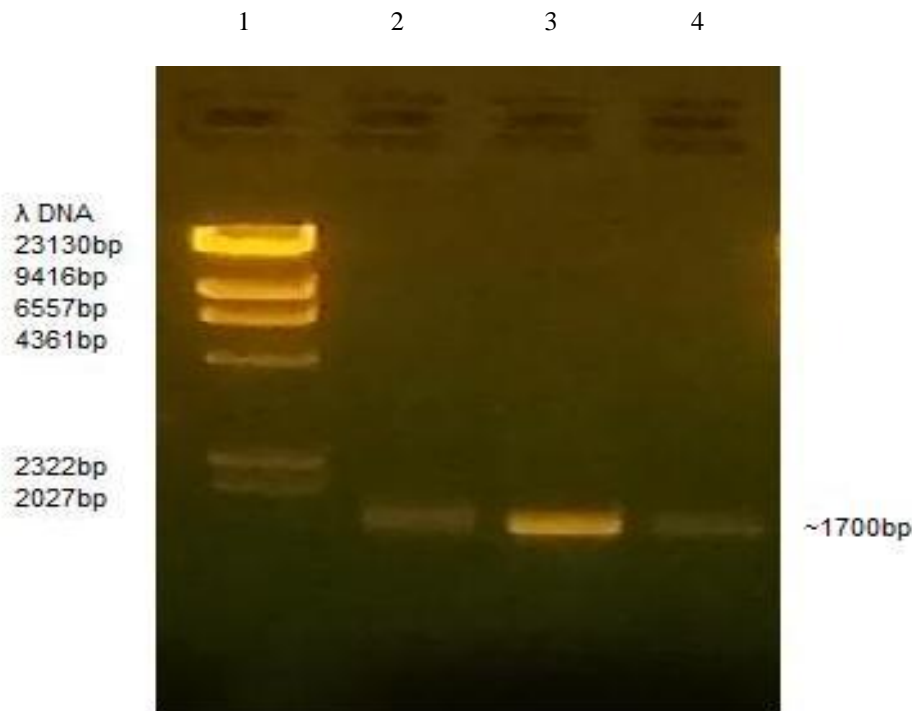
Εκκινητής (Forward primer) 1	Εκκινητής (Reverse primer) 2	Υπόστρωμα (πλασμιδιακό DNA)	Μέγεθος προϊόντος PCR	Συμβολισμός προϊόντος PCR
lacz50	pt7-5	προϊόντα PCR 1 <sup>ο</sup> Σταδίου A <sup>+</sup> , A <sup>-</sup>	~1700bp	A
lacz50	pt7-5	προϊόντα PCR 1 <sup>ο</sup> Σταδίου H <sup>+</sup> , H <sup>-</sup>	~1700bp	H
lacz50	pt7-5	προϊόντα PCR 1 <sup>ο</sup> Σταδίου K <sup>+</sup> , K <sup>-</sup>	~1700bp	K



Εικόνα 3.10: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR 1<sup>ο</sup> σταδίου για τις μεταλλάξεις της R67 από τα αμινοξέα αλανίνη, ιστιδίνη και λυσίνη στο γονίδιο *rynar*.

**Διαδρομή 1:** μάρτυρας smartladder, **Διαδρομή 2:** θραύσμα 1-A<sup>+</sup>, **Διαδρομή 3:** θραύσμα 2-A<sup>-</sup>, **Διαδρομή 4:** θραύσμα 1-H<sup>+</sup>, **Διαδρομή 5:** θραύσμα 2-H<sup>-</sup>, **Διαδρομή 6:** θραύσμα 1-K<sup>+</sup>, **Διαδρομή 7:** θραύσμα 2-K<sup>-</sup>, **Διαδρομή 8:** μάρτυρας λ<sub>DNA</sub>/HindIII

Στην Εικόνα 3.10 στις διαδρομές 2, 4, 6 παρατηρούμε από μία ζώνη στα περίπου 1200bp, για τις μεταλλάξεις της αργινίνης από αλανίνη, ιστιδίνη και λυσίνη, αντίστοιχα, οι ζώνες αυτές αντιστοιχούν στο θραύσμα 1 των προϊόντων του PCR 1<sup>ου</sup> σταδίου, τα οποία συμβολίζονται ως A<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, αντίστοιχα. Αντίθετα, στις διαδρομές 3, 5, 7 παρατηρούμε από μία ζώνη στα περίπου 460bp, οι οποίες αντιστοιχούν στο θραύσμα 2 των προϊόντων του PCR 1<sup>ου</sup> Σταδίου, τα οποία συμβολίζονται ως A<sup>-</sup>, H<sup>-</sup>, K<sup>-</sup>, τα οποία αντιστοιχούν στις ανωτέρω μεταλλάξεις.



**Εικόνα 3.11:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR 2<sup>ου</sup> σταδίου των τριών μεταλλάξεων της αργινίνης 67 από τα κατάλοιπα αλανίνη, ιστιδίνη, λυσίνη, αντίστοιχα.

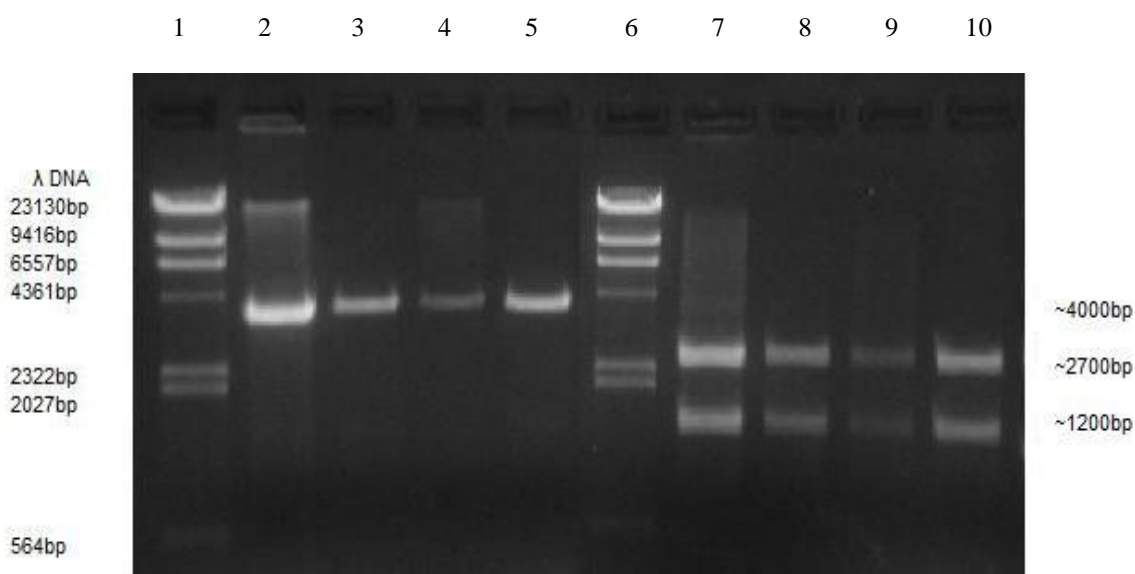
**Διαδρομή 1:** μάρτυρας λDNA/HindIII, **Διαδρομή 2:** A(αλανίνη), **Διαδρομή 3:** H(ιστιδίνη) **Διαδρομή 4:** K(λυσίνη)

Στην Εικόνα 3.11 στις διαδρομές 2, 3, 4 απεικονίζεται από μία ζώνη κοντά στα 1700bp, η καθεμία εκ αυτών αντιστοιχεί στις μεταλλάξεις της αργινίνης από αλανίνη, ιστιδίνη, λυσίνη και αποτελούν τα προϊόντα του 2<sup>ου</sup> σταδίου PCR, στο οποίο χρησιμοποιούνται τα προϊόντα PCR 1<sup>ου</sup> Σταδίου, θραύσμα 1: 1200 και θραύσμα 2: 460 bp περίπου, όπου λαμβάνουμε το ολικό τμήμα του γονιδίου που φέρει την αντίστοιχη πλέον μετάλλαξη.



### 3.11.1 Κλωνοποίηση γονιδίων που φέρουν τις μεταλλάξεις στο πλασμίδιο pt7-5

Αφού ολοκληρώθηκαν τα πειράματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης δύο σταδίων (overlap extension PCR), προχωρήσαμε σε πέψεις τόσο στο πλασμίδιο pt7-5, όσο και στα προϊόντα του second round PCR του γονιδίου *rynar* που φέρει τις μεταλλάξεις της αργινίνης 67 από τα αμινοξέα αλανίνη, ιστιδίνη και λυσίνη, με τα ένζυμα BamHI/ApaI. Ακολούθησε η αντίδραση ανασύνδεσης των γονιδίων στο πλασμίδιο με το ένζυμο T4 DNA λιγάση και έτσι τα προαναφερθέντα γονίδια κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pt7-5. Κατόπιν, έλαβε χώρα μετασηματισμός των κυττάρων *E.coli* TOP10F' με τα πλασμίδια που φέρουν τα επιθυμητά γονίδια, απομόνωση πλασμιδιακού πλέον DNA pt7-5::rynar R67A, pt7-5::rynar R67H και pt7-5::rynar R67K και πέψεις για επιβεβαίωση του μεγέθους (Εικόνα 3.13). Στη φάση αυτή ελέγχθηκε η ορθότητα των αλληλουχιών από την εταιρία MWG-Biotech (sequencing), τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παρουσιάζονται στο Παράρτημα.



**Εικόνα 3.12:** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR 2<sup>ου</sup> σταδίου του γονιδίου *rynar* που φέρει τις τρεις μεταλλάξεις R67A, R67H, R67K, τα οποία κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pt7-5.

**Διαδρομή 1:** μάρτυρας λDNA/HindIII, **Διαδρομή 2:** άκοπο πλασμίδιο pt7-5::rynar, **Διαδρομή 3:** άκοπο πλασμίδιο pt7-5::rynar R67A, **Διαδρομή 4:** άκοπο πλασμίδιο pt7-5::rynar R67H, **Διαδρομή 5:** άκοπο πλασμίδιο pt7-5::rynar R67K **Διαδρομή 6:** μάρτυρας λDNA/HindIII, **Διαδρομή 7:** πλασμίδιο pt7-5::rynar πέψη με BamHI/ApaI, **Διαδρομή 8:** πλασμίδιο pt7-5::rynar R67A πέψη με BamHI/ApaI, **Διαδρομή 9:** πλασμίδιο pt7-5::rynar R67H πέψη με BamHI/ApaI, **Διαδρομή 10:** πλασμίδιο pt7-5::rynar R67K πέψη με BamHI/ApaI

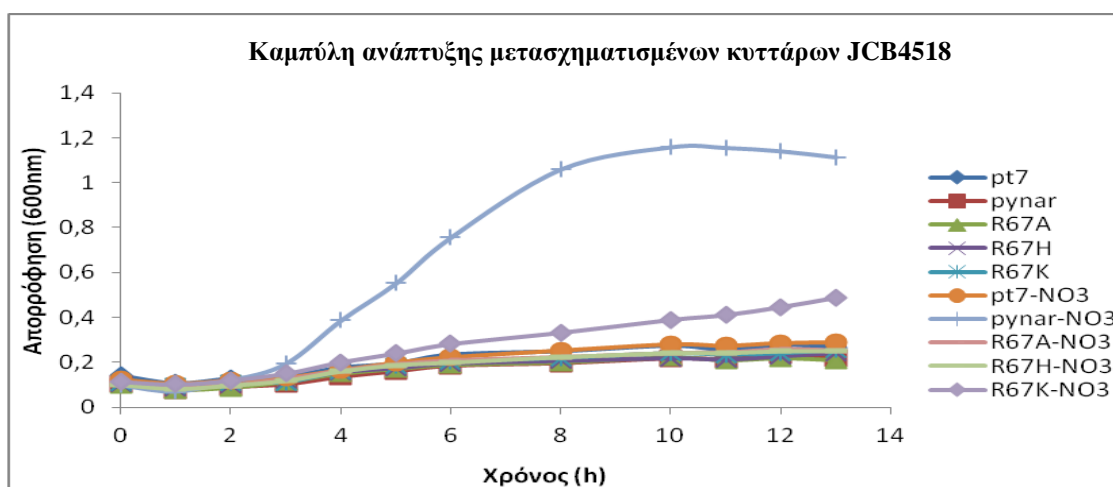
Στην Εικόνα 3.12 στις διαδρομές 2, 3, 4 και 5 παρατηρούμε από μία ζώνη στα περίπου 4000bp, η οποία αντιστοιχεί στα πλασμίδια pt7-5::rynar, pt7-5::rynar R67A, pt7-5::rynar R67H, pt7-5::rynar R67K. Αντίθετα, στις διαδρομές 7, 8, 9 και 10 παρατηρούμε από δύο ζώνες σε κάθε διαδρομή, έπειτα από διπλή πέψη με τα ένζυμα BamHI-ApaI, η ζώνη κοντά στα 2700bp αντιστοιχεί στα πλασμίδια pt7-5::rynar, pt7-5::rynar R67A, pt7-5::rynar R67H, pt7-5::rynar R67K, ενώ η ζώνες κοντά στα 1200bp αντιστοιχούν στα γονίδια *rynar*, *rynar* R67A, *rynar* R67H, *rynar* R67K. Στην παραπάνω ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *rynar* ως θετικός μάρτυρας.



Σύμφωνα με τις διαδρομές που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.12 και έχοντας ως θετικό μάρτυρα το γονίδιο *pynar*, στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι ανωτέρω μεταλλάξεις συμπεραίνουμε ότι λάβαμε τα επιθυμητά μεγέθη για τις αντίστοιχες ζώνες των γονιδίων που φέρουν τις μεταλλάξεις.

### 3.12 Καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων JCB4518 που φέρουν τα γονίδια *pynar R67A*, *pynar R67H*, *pynar R67K* (συμπλήρωση φαινότυπου)

Αφού λάβαμε τα αποτελέσματα της αλληλούχισης από την MWG-Biotech (sequencing, Παράρτημα) προχωρήσαμε σε απομόνωση πλασμιδιακού DNA *pt7-5::pynar*, *pt7-5::pynar R67A*, *pt7-5::pynar R67H*, *pt7-5::pynar R67K* και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός στα κύτταρα *E.coli* JCB4518, από τα οποία έχουν απενεργοποιηθεί τα ενδογενή συστήματα μεταφοράς νιτρικών/νιτρωδών, *nark*, *narX* και *nirc*. Για να μελετηθεί η λειτουργία του γονιδίου *pynar* που φέρει τις μεταλλάξεις R67A, R67H και R67K. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *pynar*, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο *pt7-5* (Σχήμα 3.12). Για να διαπιστωθεί αν τα γονίδια αυτά είναι μεταφορείς νιτρικών/νιτρωδών πραγματοποιήθηκαν πειράματα συμπλήρωσης του φαινότυπου, όπου εμβολιάστηκαν κύτταρα *E.coli* JCB4518, που φέρουν τα γονίδια *pynar R67A*, *pynar R67H*, *pynar R67K*, σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης αλάτων παρουσία και απουσία πηγής αζώτου-νιτρικά και πηγή άνθρακα γλυκερόλη (Σχήμα 3.12), όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι στην ενότητα 2.17.

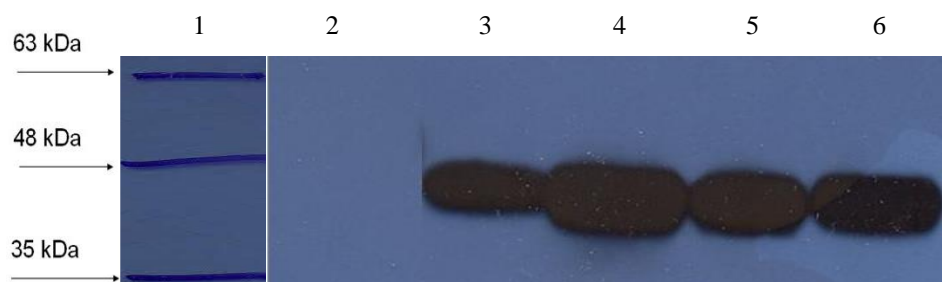


**Σχήμα 3.12:** Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων JCB4518 του γονιδίου *pynar* που φέρει τις μεταλλάξεις R67A, R67H και R67K απουσία και παρουσία πηγής αζώτου.

Σύμφωνα με την καμπύλη ανάπτυξης (Σχήμα 3.12) παρατηρούμε ότι τα κύτταρα *E.coli* JCB4518 που φέρουν το γονίδιο *pynar* αναπτύσσονται παρουσία νιτρικών, γεγονός προφανές αφού το γονίδιο αυτό αποτελεί το θετικό μάρτυρά μας και εφόσον ήδη έχει αποδειχθεί ότι συμπληρώνει το φαινότυπο (Σχήμα 3.5). Παρατηρείται μικρή ανάπτυξη των κυττάρων JCB4518-*pynar R67K* παρουσία νιτρικών. Αντίθετα, τα JCB4518-*pynar R67A* και JCB4518-*pynar R67H* δεν αναπτύσσονται παρουσία νιτρικών, ενώ κανένα από τα παραπάνω στελέχη δεν αναπτύσσεται απουσία νιτρικών. Επομένως, κανένα από τα γονίδια που φέρουν τις μεταλλάξεις δεν συμπληρώνει το φαινότυπο.

### 3.13 Ανοσοαποτύπωση μεταλλάξεων

Η μελέτη της ετερόλογης έκφρασης των γονιδίων *rynar* και *rynir* που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης. Οι αναλύσεις αυτές έλαβαν χώρα στο εργαστήριο του κ.Φριλίγγου (E.Karena) στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Εικόνα 3.13).



**Εικόνα 3.13:** Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών Rynar, R67A, R67H και R67K που απομονώθηκαν από κύτταρα *E.coli* JCB4518, τα οποία αναπτύχθηκαν αναερόβια στους 37°C.

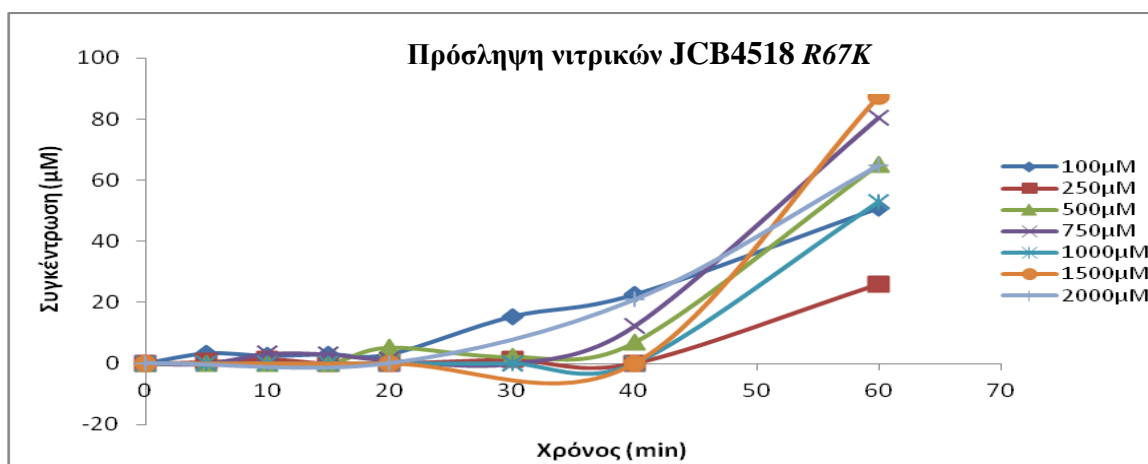
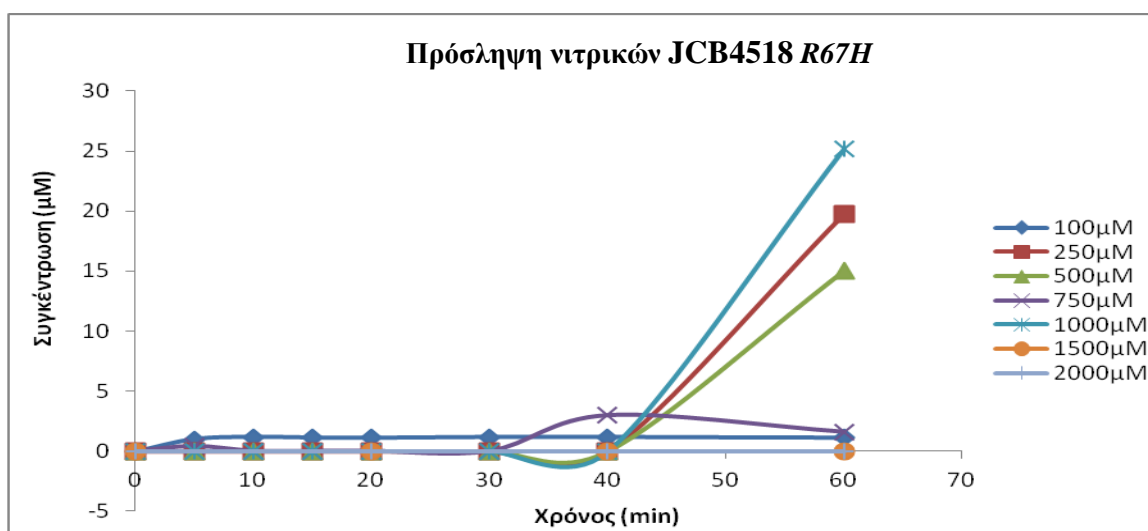
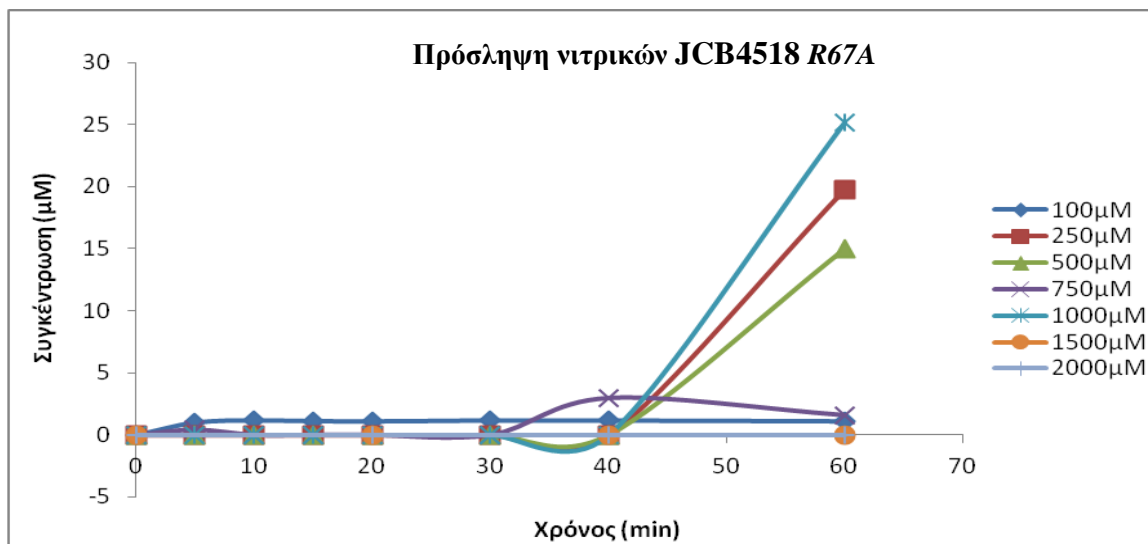
**Διαδρομή 1:** πρωτεΐνη πρότυπου μοριακού βάρους, **Διαδρομή 2:** rt7-5, **Διαδρομή 3:** Rynar, **Διαδρομή 4:** R67A **Διαδρομή 5:** R67H, **Διαδρομή 6:** R67K

Στην Εικόνα 3.13 απεικονίζεται η ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών Rynar, R67A, R67H και R67K. Ο χρόνος εμφάνισης του φίλμ είναι τα 5 λεπτά, ενώ χρησιμοποιήθηκαν 100μg πρωτεΐνης και ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο NIPPON Genetics Europe Prestained Protein Marker. Το στέλεχος *E.coli* JCB4518 που εκφράζει το γονίδιο *rynar* εμφανίζει μία ζώνη στα 43 kDa (διαδρομές 3), αντίστοιχα στα 43kDa εμφανίζουν ζώνη και τα στελέχη JCB4518 που φέρουν τις μεταλλάξεις R67A, R67H, R67K (διαδρομές 4, 5, 6), ενώ παράλληλα δεν παρατηρείται έκφραση πρωτεΐνης στον αρνητικό μάρτυρα του στελέχους JCB4518 που φέρει το πλασμίδιο rt7-5 (διαδρομή 2). Στην διαδρομή 1 απεικονίζεται η πρωτεΐνη πρότυπου μοριακού βάρους.

### 3.14 Πειράματα πρόσληψης νιτρικών

#### 3.14.1 Μέτρηση νιτρικών

Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε πειράματα πρόσληψης νιτρικών, στα στελέχη JCB4518-*rynar* R67A, JCB4518-*rynar* R67H και JCB4518-*rynar* R67K (Σχήμα 3.13), όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι στην ενότητα 2.18, ενώ η πρότυπη καμπύλη νιτρικών παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.6. Ο εμβολιασμός των κυττάρων και η μέτρηση νιτρικών πραγματοποιήθηκαν, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι στην ενότητα 2.18.

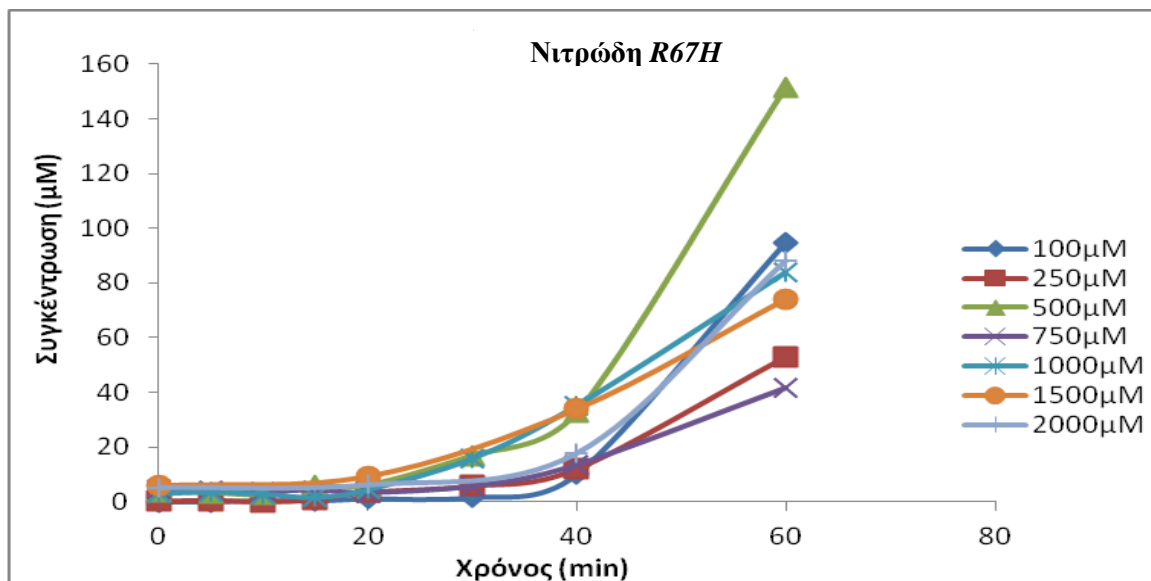
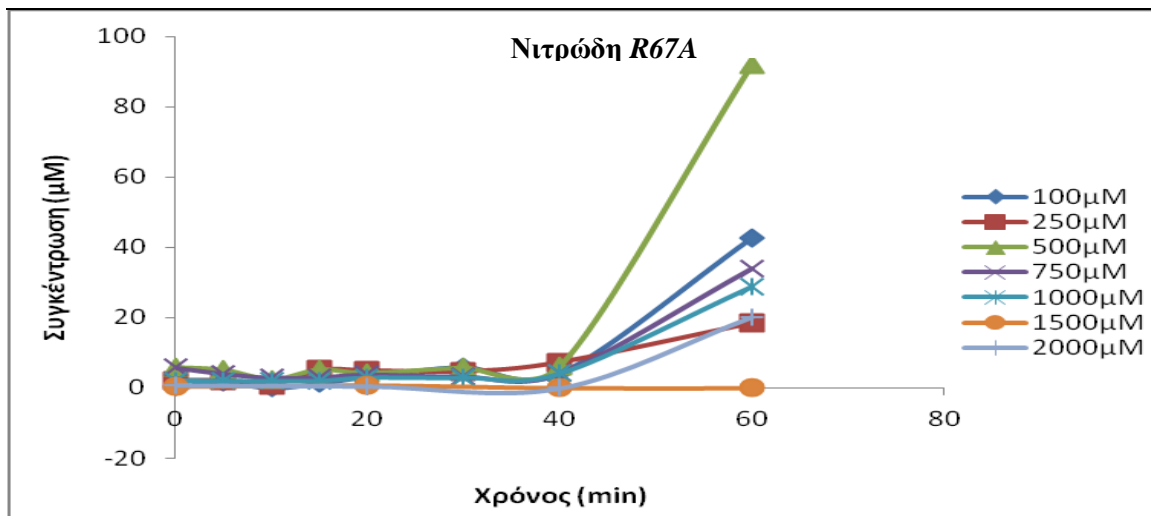


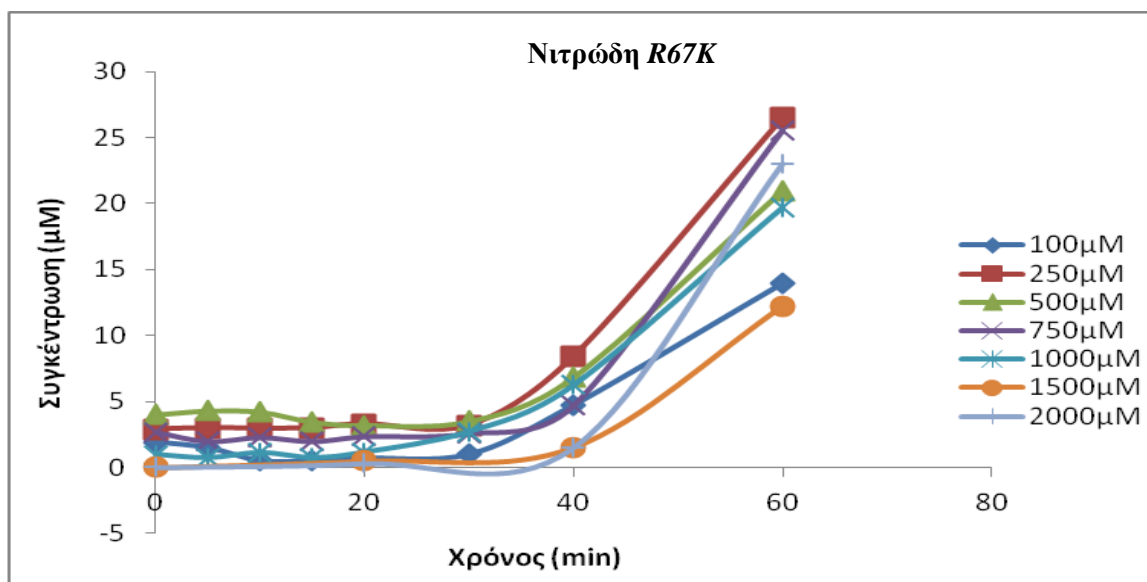
**Σχήμα 3.13:** Διαγράμματα πρόσληψης νιτρικών από τα κύτταρα JCB4518 με τα R67A, R67H, R67K, από τα οποία έχει αφαιρεθεί ο αρνητικός μάρτυρας.

Σύμφωνα με το σχήμα 3.13 παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει πρόσληψη νιτρικών στα κύτταρα JCB4518 που φέρουν τα γονίδια με τις μεταλλάξεις *rynar R67A*, *rynar R67H*, *rynar R67K*. Η αντικατάσταση επομένως της αργινίνης 67 από τα κατάλοιπα αλανίνη, ιστιδίνη και λυσίνη οδηγεί σε μηδενική ενεργότητα, συμπεραίνοντας ότι το κατάλοιπο της αργινίνης 67 είναι λειτουργικά αναντικατάστατο.

### 3.14.2 Μέτρηση νιτρωδών

Παράλληλα με τα νιτρικά μετρήθηκαν και τα νιτρώδη που υπάρχουν στο υπερκείμενο των στελεχών JCB4518-*rynar R67A*, JCB4518-*rynar R67H* και JCB4518-*rynar R67K*. Ο εμβολιασμός των κυττάρων και η μέτρηση των νιτρωδών πραγματοποιήθηκε, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι στην ενότητα 2.18, ενώ η πρότυπη καμπύλη νιτρωδών παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.8.





**Σχήμα 3.14:** Διαγράμματα νιτρώδων για το στέλεχος *JCB4518-rynar R67A*, *JCB4518-rynar R67H* *JCB4518-rynar R67K*.

Στο Σχήμα 3.14 παρουσιάζονται τα νιτρώδη που βρίσκονται στο υπερκείμενο των κυττάρων *JCB4518* των γονιδίων που φέρουν τις μεταλλάξεις *R67A*, *R67H*, *R67K*, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν νιτρώδη στο υπερκείμενο των ανωτέρω κυττάρων άρα δεν υπάρχει μεταφορά νιτρώδων στα κύτταρα.

## **4.Συζήτηση**

Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες αποτελούν τους πιο συνηθισμένους οργανικούς ρυπαντές που επιφέρουν επιβλαβείς επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και στην ανθρώπινη υγεία, και η βιοαποκατάσταση των ρυπασμένων περιοχών μέσω βιοδιέγερσης (προσθήκη N, P) αποτελεί μία από τις πλέον κατάλληλες μεθόδους απορρύπανσης (Brezna et al., 2005, Dandie et al., 2004). Επειδή οι προσπάθειες απορρύπανσης των εδαφών μπορούν να περιοριστούν λόγω αβιοτικών ή/και βιοτικών παραγόντων (Doyle et al., 2008), η μελέτη των συστημάτων πρόσληψης αζώτου από τα εδαφοβακτήρια που αποδομούν PAHs θα μπορούσαν να βελτιστοποιήσουν το τελικό αποτέλεσμα. Τα νιτρικά ιόντα απαντούν σε αφθονία στο έδαφος ως προϊόντα αποικοδόμησης τόσο φυσικών ενώσεων όσο και απορριμάτων. Η μελέτη μηχανισμών πρόσληψης των νιτρικών από εδαφοβακτήρια είναι ελλιπής όπως έχει ήδη αναφερθεί. Μόνο σε κάποια στελέχη *Mycobacterium* και στο *Corynebacterium glutamicum* έχει μελετηθεί (Sohaskey and Wayne, 2003, Nishimura et al., 2007, Amon et al., 2009), ενώ δεν έχει γίνει καμία μελέτη μέχρι τώρα σε στελέχη εδαφοβακτηρίων του γένους *Mycobacterium*.

Στην παρούσα εργασία, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε το σύστημα πρόσληψης νιτρικών ενός εδαφοβακτηρίου του γένους *Mycobacterium*, του *Mycobacterium gilvum* Spyr1, το οποίο έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί στο εργαστήριό μας και έχει την ικανότητα αποδόμησης PAHs (Karabika et al., 2009, Kallimanis et al., 2011).

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα δύο γονίδια *rynar* και *rynir* που βρέθηκαν από την *in silico* μελέτη, ότι κωδικεύουν πιθανούς μεταφορείς νιτρικών/νιτρώδων και ανήκουν στην οικογένεια NNP. Το πρώτο στάδιο της αφομοίωσης των νιτρικών είναι η μεταφορά τους στα κύτταρα, η οποία επιτυγχάνεται με τους μεταφορείς νιτρικών/νιτρώδων (Nitrate Nitrite Porters, NNP), οι οποίοι ανήκουν στην Υπεροικογένεια MFS (Major Facilitator Superfamily). Στη συνέχεια, τα νιτρικά αποβάλλονται από το κύτταρο ως νιτρώδη ( $\text{NO}_2^-$ ), τα οποία και πάλι εισέρχονται στο κύτταρο και τελικά αποβάλλονται ως αμμωνία ( $\text{NH}_3$ ) (Bothe et al., 2007, Zheng et al., 2013).

Οι πρωτεΐνες *Rynar* και *Rynir*, αποτελούνται από 12 διαμεμβρανικούς τομείς, οι οποίοι οργανώνονται σε δύο επικράτειες των 6 διαμεμβρανικών ελίκων, διαθέτουν συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνης R67 και R268 στις διαμεμβρανικές έλικες TM2 και TM8, δύο μοτίβα υπογραφής νιτρικών NS1, NS2, στις διαμεμβρανικές έλικες TM5 και TM11 και 9 συντηρημένα κατάλοιπα γλυκίνης, τα οποία συμβάλουν στην ευελιξία του κέντρου δέσμευσης (Εισαγωγή ενότητα 1.4.3).

Η μελέτη των γονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω της ετερόλογης έκφρασης σε κύτταρα του στελέχους *Escherichia coli*, JCB4518, στο οποίο έχουν απενεργοποιηθεί όλα τα ενδογενή συστήματα μεταφοράς νιτρικών/νιτρώδων. Συγκεκριμένα στο μεταλλαγμένο στέλεχος, λείπουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας NNP που κωδικεύονται από τα γονίδια *nark* και *narU*, όπως επίσης και ο μεταφορέας *NirC* που είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά νιτρώδων και ανήκει στην οικογένεια FNT. Από τα αποτελέσματα, όπως φαίνονται (ενότητα 3.6) συμπεραίνουμε ότι το γονίδιο *rynar* κωδικεύει μεταφορέα νιτρικών, ενώ το γονίδιο *rynir* δεν φαίνεται να συμμετέχει στη μεταφορά ούτε νιτρικών ούτε νιτρώδων. Η αιτία που δεν εμφάνισε κάποια λειτουργία το γονίδιο *rynir* δεν οφείλεται στη μη έκφραση της πρωτεΐνης, διότι όπως φαίνεται από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης (ενότητα 3.7) εμφανίζεται έκφραση στις μεμβράνες των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα τόσο της πρωτεΐνης *Rynar* όσο και της πρωτεΐνης *Rynir*. Περαιτέρω πειράματα επομένως απαιτούνται για τη διευκρίνιση του ρόλου του γονιδίου *rynir*.

Από την κινητική μελέτη που ακολούθησε, ώστε να προσδιοριστεί η ικανότητα μεταφοράς των νιτρικών σε εύρος συγκεντρώσεων (100 – 2000  $\mu\text{M}$ ), προέκυψε ότι ο μεταφορέας Pynar μεταφέρει νιτρικά με υψηλή συγγένεια ( $K_m = 126.25 \pm 6.92 \mu\text{M}$ ) και υψηλή ικανότητα μεταφοράς ( $V_{max} = 0.14 \pm 0.00149 \text{ nmole/min/mg}$  ξηρού βάρους κυττάρων). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε πλήρη συμφωνία με άλλα που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία όπως για τον μεταφορέα NrtA του *A. nidulans* όπου εμφανίζει  $K_m = 100 \mu\text{M}$  και  $V_{max} = 10 \text{ nmole/min/mg}$  ξηρού βάρους κυττάρων (Unkles et al., 2004). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για τον μεταφορέα NarK και NarU του *E.coli* όταν εκφράστηκε σε κύτταρα *Paracoccus denitrificans* από τα οποία είχε απαλειφθεί ο ενδογενής μεταφορέας NarK. Συγκεκριμένα οι τιμές  $K_m$  για τους μεταφορείς NarK και NarU ήταν 0.18 mM και 0.20 mM αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο *Paracoccus denitrificans* ο μεταφορέας NarK εμφανίζεται ως συγχωνευμένη πρωτεΐνη ( $K_m = 0.17 \text{ mM}$ ) και εκφράζεται ως 2 NarK τύπου μεταφορείς. Ο NarK1 μόνος του λειτουργεί ως συν-μεταφορέας νιτρικών και πρωτονίων υψηλής συγγένειας ( $K_m = 0.66 \text{ mM}$ ) και ο NarK2 ως αντιμεταφορέας νιτρικών/νιτρωδών χαμηλότερης συγγένειας ( $K_m = 15 \text{ mM}$ ) (Goddard et al., 2008). Προηγούμενη μελέτη από τον Kucera (2003) για την πρόσληψη νιτρικών από τον *P. denitrificans* είχε δείξει  $K_m = 20 \mu\text{M}$ , τιμή πολύ μικρότερη. Η διαφορά αυτή στη τιμή της  $K_m$  μπορεί να εξηγηθεί επειδή στη μελέτη του ο Kucera (2003), είχε αποδείξει μια ανασταλτική επίδραση της συγκέντρωσης των νιτρωδών επί της τιμής της  $K_m$ , αυξάνοντάς την σε 150 mM, όταν η συγκέντρωση των νιτρωδών ήταν 500 mM (συγκέντρωση ημικορεσμού  $\sim 200 \text{ mM}$ ). Επειδή λοιπόν η εξωκυττάρια συγκέντρωση των νιτρωδών στα πειράματα των Goddard et al. (2008), ήταν μεγαλύτερη των 200 mM, οι συγγραφείς θεωρούν ότι δεν διαφέρουν στην ουσία οι δύο τιμές  $K_m$ . Γενικά οι μεταφορείς νιτρικών θεωρούνται υψηλής συγγένειας με τιμές  $K_m$  της τάξης των  $\mu\text{M}$  όπως για παράδειγμα, 125  $\mu\text{M}$  για τον φωσφορυλιωμένο CHL1 (Liu and Tsay, 2003), 130  $\mu\text{M}$  για τον NrtA (Unkles et al., 2004) και 180  $\mu\text{M}$  για τον NarK του *E. coli* (Goddard et al., 2008), ενώ θεωρούνται χαμηλής συγγένειας όταν οι τιμές  $K_m$  είναι της τάξης των mM όπως για παράδειγμα 2.2 mM του αποφωσφορυλιωμένου CHL1 (Liu and Tsay, 2003). Προκειμένου να κατανοήσουμε τη σημαντικότητα των συντηρημένων αργινίνων που ανιχνεύτηκαν στην πρωτεΐνη Pynar (ενότητα 3.4.2), καθώς επίσης και τον ρόλο τους στη δομή και τη λειτουργία αυτού του μεταφορέα, αντικαταστήσαμε με στοχευμένη μεταλλαγμένη την αργινίνη R67 με αλανίνη (A), ιστιδίνη (H), ή λυσίνη (K), οι οποίες επιλέχθηκαν με βάση το μέγεθος και το φορτίο των αμινοξέων αυτών. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων συμπλήρωσης του φαινότυπου των μεταλλαγμένων κυττάρων *E.coli* JCB4518 (ενότητα 3.12) όσο και των πειραμάτων πρόσληψης νιτρικών (ενότητα 3.14) φάνηκε ότι οι αντικαταστάσεις αυτές οδήγησαν σε μη λειτουργικούς μεταφορείς, ενώ υπήρχε υψηλή έκφρασή τους στις μεμβράνες των κυττάρων όπως φαίνεται στην εικόνα 3.13 (ενότητα 3.13). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η αργινίνη R67 παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του μεταφορέα, όσον αφορά τη δέσμευση του υποστρώματος, αποτέλεσμα που είναι απολύτως συμβατό με προηγούμενα αποτελέσματα άλλων μεταφορέων νιτρικών της ίδιας οικογένειας που απαντούν σε μύκητες (Unkles et al., 2004). Συγκεκριμένα η αντικατάσταση των R87 και R368 στον *Aspergillus nidulans* στις διαμεμβρανικές έλικες TM2 και TM8 απέδειξε ότι οι αργινίνες αυτές είναι απαραίτητες και αποτελούν την θέση πρόσδεσης των νιτρικών στο υπόστρωμα για τις πρωτεΐνες της NNP οικογένειας (Unkles et al., 2004, 2012).



Ομοίως η αντικατάσταση των αργινίνων R87 και R303 είχε ως αποτέλεσμα την ολική απώλεια της μεταφοράς των νιτρικών αποδεικνύοντας ότι αυτά τα δύο συντηρημένα κατάλοιπα αργινίνης είναι σημαντικά για τη μεταφορά των νιτρικών και νιτρωδών στο κύτταρο καθώς επίσης είναι απαραίτητα για την πρόσδεση του υποστρώματος στον ευκαρυωτικό μεταφορέα της NNP οικογένειας, του *Aspergillus nidulans nrtA* (Yan et al., 2013). Επίσης οι Goddard et al. (2008), απέδειξαν την αναγκαιότητα της παρουσίας των δύο συντηρημένων αργινινών της NarK του *P. Denitrificans* για την ενεργότητα του μεταφορέα.

Φαίνεται λοιπόν ότι τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για μελλοντικές μελέτες για την βελτιστοποίηση των συνθηκών απορρύπανσης των εδαφών από τους PAHs, όσον αφορά τη διαθεσιμότητα των πηγών αζώτου, με τη χρήση του εδαφοβακτηρίου *M. gilvum* Sryg1. Τα νιτρικά σε σχέση με άλλους δέκτες ηλεκτρονίων πλεονεκτούν λόγω της υψηλής διαλυτότητάς τους, του χαμηλού κόστους αλλά και της μη τοξικότητάς τους. Επίσης, τα νιτρικά προτιμούνται από τα κύτταρα ως δέκτης ηλεκτρονίων όταν υπάρχει έλλειψη οξυγόνου, εμφανίζοντας ενεργειακή απόδοση παρόμοια του οξυγόνου (Stauffert et al., 2014).

## Παράρτημα

**Πίνακας 3.5:** Αλληλουχίες πρωτεϊνών γονιδίων μεταφορέων νιτρικών/νιτροδών.

Όνομα πρωτεΐνης	Χαρακτηρισμός	Αριθμός πρόσβασης στην τράπεζα δεδομένων EMBL	Μέγεθος πρωτεΐνης
AoNarK	πρωτεΐνη αποβολής νιτρικών NarK ( <i>Actinomyces sp. oral taxon 180 str. F0310</i> )	ZP_07880347.1	450aa
TthNarK2	NarK2 πρωτεΐνη, πρωτεΐνη αποβολής νιτροδών (Q9RA45_THETH)	Q9RA45	443aa
Pynir	πρωτεΐνη αποβολής νιτροδών ( <i>Mycobacterium sp. Splyr1</i> )	YP004076828	467aa
NarK	πρωτεΐνη πρόσληψης νιτρικών, πρόσληψης/αποβολής νιτροδών ( <i>Escherichia coli K-12</i> )	X15996.1	463aa
NarU	πρωτεΐνη αποβολής νιτροδών ( <i>Escherichia coli K-12</i> )	X94992.1	462 aa
Pynar	μεταφορέας νιτρικών/νιτροδών ( <i>Mycobacterium sp. Splyr1</i> )	YP004076089	403aa
CrNAR4	μεταφορέας νιτρικών υψηλής συγγένειας ( <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> )	XP_001696788	527aa

OsNRT2.1	Os02g0112100 ( <i>Oryza sativa Japonica Group</i> )	NP_001045658	533aa
TaNRT2.1	μεταφορέας νιτρικών υψηλής συγγένειας ( <i>Triticum aestivum</i> )	AAK19519	507aa
AtNRT2.1	μεταφορέας νιτρικών 2:1 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	NP_172288	530aa
AtNRT2.4	μεταφορέας νιτρικών 2.4 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	AED97375	527aa
HpYNT1	μεταφορέας νιτρικών ( <i>Hansenula polymorpha</i> )	CAA11229	508aa
NrtA	μεταφορέας νιτρικών υψηλής συγγένειας ( <i>Aspergillus nidulans</i> )	BD102857.1	433aa
CrnA	μεταφορέας νιτρικών ( <i>Aspergillus nidulans</i> )	AAA76713	507aa
AtNRT1.1	μεταφορέας νιτρικών 1.1 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	AEE28838	590aa
AtNRT1.2	οικογένεια NRT1 μεταφορέας νιτρικών ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	Q8H157	585aa

Στο Παράρτημα παρατίθενται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης από την εταιρία MWG-Biotech.

\* Pynar forward – Pynar reverse

5'-

GGGACGGGGCGTACACTTATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCAGGCGTAATAAGGAAAGGATCCGTGAG  
CACGGCGACTACGCCGGACATCGGCGCACGGCGGGGACTCAATCTGGCTCTGGCCACCTGGGTTTCTGCGATCAACT  
TCTGGGCCTGGAACATGATCGGCCCGCTCTCGACGACCTACGCCGGGACATGTCGCTCAGCAGCAGCCAGGCATCT  
GTGCTGGTGGCCACCCCGATCCTGGTCGGGGCGCTGGGCGGATCGTGGTCGGCCCGCTGACCGACCGGTTCCGGCG  
GACGCGTGATGTTTCATCGGGGTGACCGTCGCGTCCATCGTGCCGGTGCTCGCGGTCGGCGTCGCGGGCACACAGGG  
GTCCTACCCGCTGCTGGTGGTGTTCGGCCTCTTCTCGGCATCGCGGGACCGTCTTTCGCTGTCGGCATCCCGTTCCGCC  
AACCCTGGTACGACGCGTCGCGGCGGGGATTCGCCACCGGCGTCTTCGGCATGGGGATGGTCGGCACCGCGATGTC  
GGCGTTCTTACCCCGCGGTTTCGTCAACTGGTTCGGTCTGTTACACCACGCACGTGATCATCGCCGTGGCGCTGGCCCTC  
ACCGCGGTGCTGTGCCTGGTGGTTCATGCGCGATTACCGCAGTTACCCCGAACCACGACGCGGTGATGCCGAAGCT  
CCGGGCGGCCGCGAAACTGCCGGTGACATGGGAGATGTCGTTTCTCTACGCGGTGGTGTTCGGCGGCTTCGTGCGGT  
TCTCCAACCTACCTGCCACCTACATCAAGACGATCTACGACTTCTCCGCCGTGACGCGCGGCGCGCACCGCGGCGGT  
CGCGCTCGCCGCGGTGCTGGCCGTCCGGTTCGGGCGGGATGCTGGCCGACCGCATCCCGCCGAAGTACGTCGTGCTG  
GGATCGTTTCGCCGGCACCGCGGCGGCGGCATTGTCGCGATCTTCCAACCGCCACCGGATCTCTGGTCGGCGGTAC  
GTTTCATCACGCTCGCGCTGTTCTGGGTATCGGTACCGGCGGGGTCTTCGCTGGGTTGCGCGGCGGGCCCCCGCCA  
GCTCGGTGCTCGGTACCGGCATCGTGCGGCCGCGGTGGTCTGCTACTCCCGCCCTGGTCATGGGCGGACCTAC  
GACAGGCGTCGACAACGAACCTACACCCATTCCGGGGCTGTTTCGCTTGTCTTGTGCG-3'

3'-

CCGGTTCTGTTCAACCACCGCACGTGATCATCGCCGTGGGCGCTGGCCCTACCGCGGTGCTGTGCCTGTGGTCATGC  
GCGATCACGCAGTACCCCGAACACGACGCGGTGATGCCGAAGCTCCGGGCGGCCGCGAAACTGCCGGTGACATGG  
GAGATGTCGTTTCTCTACGCGGTGGTGTTCGGCGGCTTCGTGCGGTTCTCCAACCTACCTGCCACCTACATCAAGACGA  
TCTACGACTTCTCCGCCGTGACGCGCGCGCACCGCGGCGTTCGCGCTCGCCGCGGTGCTGGCCCGTCCGGTTCG  
GCGGGATGCTGGCCGACCGCATCCCGCCGAAGTACGTCGTGCTGGGATCGTTTCGCCGGCACCGCGGCGGCGGCATT  
GTCGCGATCTTCCAACCGCCACCGGATCTCTGGTCGGCGGTACGTTTCATCACGCTCGCGCTGTTCTGGGTATCGGTA  
CCGGCGGGGTCTTCGCTGGGTTGCGCGGCGGGCCCCCGCCAGCTCGGTGCGTCCGGTACCGGCATCGTGGCGGCC  
GCCGGTGGGCTCGGTGGTACTTCCCGCCCCTGGTCATGGGCGGCACCTACGACAGCGTCGACAACGACTACACCAT  
CGGGCTGTCGCTGCTCGTCGCGACCGCGCTGATCGCTCTGCTCTACACCGGTTGCGGTTGACGCCCACGAGCCGAA  
ACCCACGCAGGAGGTCAGGTGGGGCCCTACTGCTGCTGCTCCTGCTCCTGCTCCTGCTCCTGCAACCGCCGCTGCCG  
CCCGGCCGCGCCGGCACCCCGGTGACCGCCCCGCTGGCGGGCACTATCTGGAAGGTGCTGGCCAGCGAAGGCCAG  
ACGGTGGCCGACGGCGAGGTGCTGCTGATTCTGGAAGCCATGAAGATGGAAACCGAAATCCGCGCCGCGCAGGCCG  
GGACCGTGCAGGATCGCGGTGAAAGCCGGCGACGCGGTGGCGGTGCGGACACCCTGATGACCCTGGTTCGACTA  
AGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTA  
CCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTTCTCAGCGATCGAACGGTTC – 5'





\* Pynar R67H forward - Pynar R67H reverse

5'-

CCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCAGGCGTAATAAGGAAAGGATCCGTGAGCACGGCGACTA  
CGCCGGACATCGGCGCACGGCGGGGACTCAATCTGGCTCTGGCCACCTGGGTTTCTGCGATCAACTTCTGGGCCTGG  
AACATGATCGGCCCCGCTCTCGACGACCTACGCCGGGGACATGTCGCTCAGCAGCAGCCAGGCATCTGTGCTGGTGGC  
CACCCCGATCCTGGTCGGGGCGCTGGGTACATCGTGGTTCGCCCCGCTGACCGACCGGTTTCGGCGGACGCGTGATGT  
TCATCGGGGTGACCGTCGCGTCCATCGTGCCGGTGTCTCGGGTCGGCGTCGCGGGCACACAGGGGTCTACCCGCTG  
CTGGTGGTGTTCGGCCTCTTCCTCGGCATCGCGGGCACCGTCTTCGCTGTCCGCATCCCGTTCGCCAACCACTGGTACG  
ACGCGTCGCGGGCGGGGATTCCGCCACCGGCGTCTTCGGCATGGGGATGGTTCGGCACCGCGATGTCCGGCCTTCTCACC  
CCGCGGTTTCGTCAACTGGTTCGGTCTGTTACACACGCACGTGATCATCGCCGTGGCGCTGGCCCTCACCGCGGTGCTG  
TGCCTGGTGGTTCATGCGGATTCACCGCAGTTCACCCGAACCACGACGCGGTGATGCCGAAGCTCCGGGCGGCCGC  
GAAACTGCCGGTGACATGGGAGATGTCGTTTCTCTACGCGGTGGTGTTCGGCGGCTTCGTGCGGTTCTCAAACCT  
GCCACCTACATCAAGACGATCTACGACTTCTCCGCCGTGACGCCGGCGCGCACCGCGGCTTCGCGCTCGCCGC  
GGTGTGGCCCGTCCGGTCGGCGGGATGCTGGCCGACCGCATCCCGCCGAAGTACGTCTGTGCTGGGATCGTTTCGCC  
GGCACCGCGTCGGCGGCATTCGTGCGGATCTTCCA-3'

3'-

CGGCCGCGAAACTGCCGGTGACATGGGAGATGTCGTTCTCTACGCGGTGGTGTTCGGCGGCTTCGTGCGGTTCTCCAA  
CTACCTGCCACCTACATCAAGACGATCTACGACTTCTCCGCCGTGACGCCGGCGCGCGCACCGCGGCGTTTCGCGCT  
CGCCGCGGTGCTGGCCCGTCCGGTCGGCGGGATGCTGGCCGACCGCATCCCGCCGAAGTACGTCTGTGCTGGGATCGT  
TCGCCGGCACCGCGGCGGGCGGCATTTCGTGCGGATCTTCCAACCGCCACCGGATCTCTGGTCGGCGGTTCACGTTTCATCA  
CGCTGCGGCTGTTCTGGGTATCGGTACCGGCGGGGTCTTCGCTGGGTTGCGCGGCGGGCCCCCGCCAGCTCGGTC  
GGCTCGGTACCGGCATCGTGGCGGCCGCCGGTGGGCTCGGTGGCTACTTCCCGCCCCTGGTCATGGGCGGCACCTA  
CGACAGCGTCGACAACGACTACACCATCTGGCTGTGCTGCTCGTCGCGACCGCGCTGATCGCTCTGCTCTACACCGC  
GTTGCGGTTGCACGCCACGAACCGAAACCCACGCAGGAGGTTCAGGTGGGGCCCTACTGCTGCTGCTCCTGCTCCTG  
CTCCTGCCTCTGCACCCGCCGCTGCCGCCCGGCCGGCGCCGGCACCCCGGTGACCGCCCCGCTGGCGGGCACTATCT  
GGAAGGTGCTGGCCAGCGAAGGCCAGACGGTGGCCGACGGCGAGGTGCTGCTGATTCTGGAAGCCATGAAGATGG  
AAACCGAAATCCGCGCCGCGCAGGCCGGACCGTGCAGCGGTATCGCGGTGAAAGCCGGCGACCGGTTGGCGGTGCG  
GCGACACCTGATGACGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCT-5'

\* Pynar R67K forward - Pynar R67K reverse

5'-

CAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCAGGCGTAATAAGGAAAGGATCCGTGAGCACGGCGACTAC  
GCCGGACATCGGCGCACGGCGGGGACTCAATCTGGCTCTGGCCACCTGGGTTTCTGCGATCAACTTCTGGGCCTGGA  
ACATGATCGGCCCCGCTCTCGACGACCTACGCCGGGGACATGTCGCTCAGCAGCAGCCAGGCATCTGTGCTGGTGGCC  
ACCCCGATCCTGGTCGGGGCGCTGGGCAAAATCGTGGTCGGCCCCGCTGACCGACCGGTTCCGGCGGACGCGTGATGTT  
CATCGGGGTGACCGTCGCGTCCATCGTGCCGGTGCTCGCGGTCGGCGTCGCGGGCACACAGGGGTCTACCCGCTGC  
TGGTGGTGTTCGGCCTCTTCTCGGCATCGCGGGCACCGTCTTCGCTGTGGCATCCCCTTCGCAACCACTGGTACG  
ACGCGTCGCGGCGGGGATTGCCACCGGCGTCTTCGGCATGGGGATGGTCGGCACCGCGATGTGGCGTTCTTACC  
CCGCGGTTCTCAACTGGTTTCGGTCTGTTACCCACGCACGTGATCATCGCCGTGGCGCTGGCCCTCACCGCGGTGCTG  
TGCCTGGTGGTCATGCGGATTACCGCAGTTCACCCCGAACCACGACGCGGTGATGCCGAAGCTCCGGGCGGCCGC  
GAAACTGCCGGTGACATGGGAGATGTCGTTTCTCTACGCGGTGGTGTTCGGCGGCTTCGTCGCGTTCTCAACTACCT  
GCCACCTACATCAAGACGATCTACGACTTCTCCGCCGTCGACGCCGGCGCGCACCGCGGCGTTTCGCGCTCGCCCG  
GGTGTGGCCCGTCCGGTCGGCGGGATGCTGGCCGACCGCATCCCGCCGAAGTACGTCGTGCTGGGATCGTTCGCCG  
GCACCGCGGCGGCGGCATTTCGTGCGGAT-3'

3'-

ACGACCTCTCCGCCGTCGACGCCGGCGCGCGCACCGCGGCGTTCGCGCTCGCCGCGGTGCTGGCCCGTCCGGTCGGC  
GGGATGCTGGCCACCGCATCCCGCCGAAGTACGTCGTGCTGGGATCGTTCCGCCGGCACCGCGGCGGCGGCATTCTG  
CGCGATCTTCAACCGCCACCGGATCTCTGGTCGGCGGTACGTTTCATCACGCTCGCGCTGTTCTGGGTATCGGTACC  
GGCGGGGTCTTCGCTGGGTTGCGCGGCGGGCCCCCGCCAGCTCGGTCGGCTCGGTCACCGGCATCGTGGCGGCCG  
CCGGTGGGCTCGGTGGCTACTTCCCGCCCCTGGTCATGGGCGGCACCTACGACAGCGTCGACAACGACTACCATC  
GGGCTGTGCTGCTCGTCGCGACCGCGCTGATCGCTCTGCTCTACACCGGTTGCGGTTGCACGCCACGAGCCGAAA  
CCCACGCAGGAGGTCAGGTGGGGCCCTACTGCTGCTGCTCCTGCTCCTGCCTCTGCACCCCGCGCTGCCGCC  
CCGGCCGGCGCCGGCACCCCGGTGACCGCCCCGCTGGCGGGCACTATCTGGAAGGTGCTGGCCAGCGAAGGCCAGA  
CGGTGGCCCGAGGCGAGGTGCTGCTGATTCTGGAAGCCATGAAGATGGAACCGAAATCCGCGCCGCGCAGGCCGG  
GACCGTGCAGCGGTATCGCGGTGAAAGCCGGCGACGCGGTGGCGGTGCGGACACCCCTGATGACGTATATATGAGTA  
AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCT -5'



\* NarK for ward – NarK reverse

5'-

ACCACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCAGGCGTAATAAGGAAAGGATCCATGAGTCACTCATCCGC  
CCCCGAAAGGGCTACTGGAGCTGTCATTACAGATTGGCGACCGGAAGATCCTGCGTTCTGGCAACAACGCGGTCAAC  
GTATTGCCAGCCGCAACCTGTGGATTTCCGTTCCCTGTCTGCTGCTGGCGTTTTGCGTATGGATGTTGTTTCAGCGCTGT  
TGCGGTGAACCTACCGAAAGTCGGCTTTAATTTTACGACCGATCAGCTATTTATGTTGACTGCGCTGCCTTCGGTTTTCT  
GGCGCGTTATTACGTGTTCCATACTCCTTTATGGTTCCTATCTTCGGTGGTCGTCGCTGGACGGCGTTCAGCACCGGTA  
TTCTGATTATTCCTTTCGCTCTGGCTGGGTTTTGCCGTGCAGGATACCTCCACGCCCTTATAGCGTCTTCATCATCATCTCT  
CTGCTATGCGGCTTTGCTGGCGCGAACTTCGCATCCAGTATGGCAAACATCAGCTTCTTCTTTCCGAAACAGAAGCAG  
GGTGGCGCGCTGGGTCTGAATGGTGGTCTGGGAAACATGGGCGTCAGCGTCATGCAGTTGGTTGCTCCGCTGGTGGT  
ATCACTGTGATTTTCGAGTATTTGGTAGCCAGGGCGTCAAACAGCCGGATGGGACTGAGCTGTATCTGGCGAATGC  
GTCCTGGATATGGGTGCCGTTCCCTTCCATCTTCACCATTGCGGCGTGGTTTGGCATGAACGATCTTGCTACCTCGAAA  
GCCTCCATCAAGGAGCAGTTGCCGGTACTCAAACGGGGTCATCTGTGGATTATGAGCCTGCTGTATCTGGCAACCTTC  
GGCTCCTTCATCGGCTTCTCCGCGGGCTTTGCAATGCTGTCAAAAACGCAGTTCCCGGGATGTTTCAGATTCTGCAATAC  
GCTTTTCTTCGGGCCGTTTATTGGTGCCTGGCG-3'

3'-

TGCTCCTGCCTCTGCACCCGCCGCTGCCGCCCCGGCCGGCGCCGGCACCCCGGTGACCGCCCCGCTGGCGGGCACTAT  
CTGGAAGGTGCTGGCCAGCGAAGGCCAGACGGTGGCCGAGGCGAGGTGCTGCTGATTCTGGAAGCCATGAAGATG  
GAAACCGAAATCCGCGCCGCGCAGGCAACGCAGTTCGCGGGATGTTTCAGATTCTGCAATACGCTTTCTTCGGGCCGTT  
TATTGGTGCCTGGCGGTTCTGCAGGTGGTGCATTATCTGACCGTCTGGGCGGAACTCGTGTACGCTGGTGAACCT  
TATTCTGATGGCGATTTTCAGCGCCTGCTGTTCTGACCTTACCGACTGACGGGCGAGGGCGGAAGCTTCATGGCGTT  
CTTCGCGGTCTTCTGGCGCTGTTCTGACAGCTGGGCTGGGTAGTGGTCCACTTTCAGATGATTTTCAGTGATCTTC  
CGTAAACTGACAATGGATCGCGTGAAGCAGAAGGGGGTTCTGACGAACGTGCGATGCGTGAAGCGGCAACCGACA  
CGGCGGCGGCGCTGGGTTTCATCTCTGCGATTGGCGCGATTGGTGGCTTCTTATCCCAGAAAGCGTTTGGTAGCTCGC  
TGGCATTAACGGGTTCCGCGATCGGCGCAATGAAGGTATTTTATTTTCTATATCGCCTGCGTAGTGATTACCTGGGC  
GGTATATGGTTCGGCATTCTAAAAAGGGCCCTACTGCTGCTGCTCCTGCTCCTGCTCCTGCCTCTGCACCCGCCGCTGCC  
GCCCCGGCCGGCGCCGGCACCCCGGTGACCGCCCCGCTGGCGGGCACTATCTGGAAGGTGCTGGCCAGCGAAGGCC  
AGACGGTGGCCGAGGCGAGGTGCTGCTGATTCTGGAAGCCATGAAGATGGAAACCGAAATCCGCGCCGCGCAGGC  
CGGGACCGTGCAGGATCGCGGTGAAAGCCGGCGACGCGGTGGCGGTGGCGACACCCTGATAAAGTATATATGA  
GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTT-5'

\* NarU forward – NarU reverse

5'-

GTACCACTTATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCAGGCGTAATAAGGAAAGGATCCATGGCGCTGCAAAT  
GAGAAAAATAGTCGTTATCTTTTGC GCGACTGGAAACCAGAAAATCCGGCCTTCTGGGAAAATAAAGGAAAACATATT  
GCTCGAAGAAATCTCTGGATATCAGTCAGTTGTCTACTTCTTGCCCTTCTGTGTCTGGATGCTATTTAGCGCAGTTACCGT  
TAATCTCAATAAAAATCGGTTTTAATTTTACTACCGATCAACTCTTTTTATTAACCGCATTACCCTCCGTTTCTGGCGCATT  
ATTGCGTGTTCCCTACTCCTTTATGGTGCCTATATTCGGTGGACGCCGATGGACGGTTTTTAGTACTGCAATCCTGATT  
ATTCCTTGCGTCTGGCTCGGAATTGCCGTGCAAATCCGAATACTCCTTTTGGGATATTTATCGTTATCGCTTTGCTATG  
CGGTTTTGCAGGTGCAAACCTTTGCTTCGAGCATGGGCAATATCAGTTTCTTCTTTCCAAAAGCCAAACAAGGGAGCGC  
TCTTGGGATTAATGGCGGATTAGGAACTTAGGTGTAAGTGTAAATGCAGCTGGTTGCACCGCTGGTCATTTTTGTACC  
TGTATTTGCCTTCTCGGCGTCAATGGCGTACCGCAGGCCGACGGTTCGGTGATGTCGCTGGCGAATGCCGCATGGAT  
TTGGGTACCGCTACTGGCGATTGCCACGATCGCCGCATGGTCAGGGATGAATGATATCGCCAGTTCACGCGCCTCAAT  
TGCCGACCAGCTCCCTGTCTTACAACGCCTGCATCTCTGGCTGCTGAGCCTACTTTACCTTGCCACCTTCGGTTCGTTTA  
TCGGTTTTTCTGCGGGTTTTGCCATGCTGGCAAAAACCCAGTTCCCGGATGTGAA- 3'

3'-

CATGCTGGCAAAAACCCAGTTTCCCGGATGTGAATATTCTGCGCCCTTGC GTTCTTTGGCCATTTATCGGTGCCATCG  
CGCGGTGCGTTGGTGGTGCTATTTCCGATAAGTTCGGCGGCGTGCGGGTGACGTTGATCAACTTTATTTTTATGGCGA  
TTTTAGTGCCCTGCTGTTCCCTACCTTACCGGGCACAGGCTCCGGTAATTTATCGCCTTTTACGCCGATTTATGGGG  
CTGTTTCTGACTGCGGGTCTGGGAAGTGGTTCTACTTTCCAGATGATCGCCGTCATCTTTCGCCAGATAACCATTTATC  
GGGTAAAGATGAAAGGCGGTAGTGATGAGCAAGCTCATAAAGAAGCCGTCACCGAAACGGCGGGCGGCTCTGGGCTT  
TATCTCAGCCATTGGCGCAGTGGGCGGCTTTTTTATTCCGCAGGCGTTTGGCATGTCGCTCAATATGACCGGCTCTCCG  
GTCGGCGCGATGAAAGTGTTTTAATCTTCTACATCGTTTGTGTGCTGCTGACCTGGCTGGTTTATGGTCGGCGGAAG  
TTTAGTCAAAGGGCCCTACTGCTGCTGCTCCTGCTCCTGCTCCTGCCTCTGCACCCGCCGCTGCCGCCCCGGCCGGCG  
CCGGCACCCCGGTGACCGCCCCGCTGGCGGGCACTATCTGGAAGGTGCTGGCCAGCGAAGGCCAGACGGTGGCCGC  
AGGCGAGGTGCTGCTGATTCTGGAAGCCATGAAGATGGAACCGAAATCCGCGCCGCGCAGGCCGGGACCGTGCGC  
GGTATCGCGGTGAAAGCCGGCGACGCGGTGGCGGTCGGCGACACCCTGATGAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCT  
GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTTCT-5'

\* Πλασμίδιο pt7-5 reverse

5'-

CCGATGCGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTA  
GATTGATTTAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTAGTCGACCAGGGTCATCAGGGTGTGCGCCGACCGC  
CACCGCGTCGCCGGCTTTCACCGCGGATACCGCGCACGGTCCCGGCCTGCGCGGCGCGGATTTGCGTTTCCATCTTCA  
TGGCTTCCAGAATCAGCAGCACCTCGCCTGCGGCCACCGTCTGGCCTTCGCTGGCCAGCACCTTCCAGATAGTGCCCCG  
CCAGCGGGGCGGTACCGGGGTGCCGGCGCCGGCCGGGGCGGCAGCGGCGGGTGCAGAGGCAGGAGCAGGAGCA  
GGAGCAGCAGCAGTAGGGCCCTGAACCTGCATCACCAGCATCGCGCAAGCACGGCGACGAACCACATGCGGGCTT  
GACCTCGGAAACCTTCCGAGAGCAAGCTTCATCATAACGAAGGCGATGATGGCAAGCGACAGGCCGAGAGTTATCG  
AAAACGTCAGCGGAATGAGCACGATTGCGAGAAAGGCCGGGATGGCGTCTTCCATGTCCGCCAGTTGATCTGCCCC  
ATCGGCGCCGACATGAAGAGGCCCGTGAGGATGAGGACGGGCGCCGTGGCAATCGTCGGCACCAGCGAAAGGAGC  
GGCGAGAGGAACAGGAACGGCAGGAATAGGAGCCCCGCAATAAAGGCGACGAGGCCAGTCCGCCACCCTGCGCG  
ATGCCGGCGCCCGATTCCAGGTAGACCGTTGCCGGGCTAGTGCCGAGCGGGGCGGATATCAGCGCCGCGACGGCGT  
CGACATGCATCGATTCTTGATGTTGCGTGCATCCCACTCTCGTCTTCAGGTTGGCCGCTTCCGCGAGCCCCAAGAAA  
GTGACAGCGCTCCACGAAGTTGGTGAGAGAGACGAGATGACGTGCATAGCGACTGAGGCACCAGAGATCGATCTG  
CGACGAACTGAATCGGCGCGCAACAGCCGCTCAGTGACGAGCGTCTGACATCGGCGTCCACCCGCAAAGGCCTGCGT  
CTCCCCAAGGCGACCGATCGTATCCAAGCACCGGGGGGTGATG -3'

# **5.Βιβλιογραφία**

- 1) Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Kaback HR, Verner G. and Iwata S., 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301, p. 610-5.
- 2) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- 3) Al-Bashir B., Cseh T., Leduc R., Samson R., 1990. Effect of soil/contaminant interactions on the biodegradation of naphthalene in flooded soil under denitrifying conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34, p. 414–419.
- 4) Alexander, M. 1999. “Biodegradation and Bioremediation.” Academic Press, San Diego.  
Environment Management Act, 1981.
- 5) Alexander M., 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, 211 p. 132-138.
- 6) Alexander M., 1994. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, New York.
- 7) Amon J., Titgemeyer F., Burkovski A., 2009. A genomic view on nitrogen metabolism and nitrogen control in mycobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 17, p. 20-29.
- 8) Anandan R., Dharumadurai D. and Manogaran G.P., 2016. An Introduction to Actinobacteria. INTECH, p. 1-37.
- 9) ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2005. CERCLA Priority list of hazardous substances US Department of Health and Human Service, Atlanta, GA, USA.
- 10) Bamford, S. M., and Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, p. 723–726.
- 11) Barton NH, Briggs DE, Eisen JA, Goldstein DB & Patel NH., 2007. *Evolution (Cold Spring Harbor Laboratory Press)*, chapters 6 and 7: Bacteria and Archaea.
- 12) Bastiaens L, Springael D, Wattiau P, Harms H, deWachter R, Verachtert H, Diels L., 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Appl Environ Microbiol.*, 66: p. 1834–1843.
- 13) Battersby S. 2004. Space molecules point to organic origins. University of Toledo, Ohio.
- 14) Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M., and Raffetellu, H. 2013. Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. *Perspectives In Medicine*.
- 15) Bento F.M., Camargo F.A.O., Okeke B.C., Frankenberger W.T., 2004. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Biores. Techn.* 96,9: p. 1049-1055.

- 16) Berks, B. C., Ferguson, S. J., Moir, J. W. B. & Richardson, D. J. ,1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim Biophys Acta* ,1232, p. 97–173.
- 17) Bianco C., Speranza L., Defez R., 2010. Isolation and characterization of PAH degrading bacteria from polluted Venice lagoon. *Journal of Biotechnology* 150: p. 1–576.
- 18) Bibi, E. & Kaback, H. R. , 1990 . In vivo expression of the lacY gene in two segments leads to functional lac permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, p. 4325- 4329.
- 19) Bigger, C. A., Sawicki, J. T., Blake, D. M., Raymond, L. G., and Dipple, A. (1983). Products of binding of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene to DNA in mouse skin. *Cancer Res.* 43, p. 5647–5651.
- 20) Blasco, F., Iobbi, C., Ratouchniak, J., Bonnefoy, V. & Chippaux, M. , 1990 . Nitrate reductases of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJI* operon. *Mol Gen Genet* 222, p. 104–111.
- 21) Blumer, M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci. Am.* 234, p. 35–45.  
Bouchez M, Blanchet D, Bardin V, Haeseler F & Vandecasteele JP 2000. Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. *Biodegradation* 10: p. 429–435.
- 22) Bothe H., Ferguson S.J., Newton W.E., 2007. *Biology of the Nitrogen Cycle*.  
Fernandez E., A. Galvan, 2008. Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*, *Eukaryot. Cell* 7, p. 555–559.
- 23) Bonnefoy. V., Burini, J.F., Giordano, G., Pascal, M.C. and Chippaux, M. , 1987. Presence in the 'silencio terminus region of the *Escherichia coli* chromosome of cryptic gene(s) encoding a new nitrate reductase. *Mol Microbiol* 1: p. 143-150.
- 24) Bonnefoy, V., Ratouchniak, J., Blasco, F. and Chippaux, M. , 1997 . *FEMS Microbiol Lett.* 147, p. 147–149.
- 25) Brezna, B., Khan, A. A., and Cerniglia, C. E. 2003. Molecular characterization of dioxygenases from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, p. 177–183.
- 26) Brezna, B., Kweon, O., Stingley, R.L., Freeman, J.P., Khan, A.A., Polek, B., *et al.* 2006. Molecular characterization of cytochrome P450 genes in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: p. 522–532.
- 27) Brezna B., Kweon O., Stingley RL., Freeman JP., Khan AA., Polek B., Jones RC., Cerniglia CE., 2005. Molecular characterization of cytochrome P450 genes in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl Microbiol Biotechnol* , 71:p. 522-532.
- 28) Brownlee, A. G. and Arst, Jr, H. N., 1983. Nitrate uptake in *Aspergillus nidulans* and involvement of the third gene of the nitrate assimilation gene cluster. *J. Bacteriol.* 155, p. 1138–1146.

- 29) Bumpus, J. A. 1989. Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, p. 154–158.
- 30) Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, p. 351–368.
- 31) Cerniglia C.E. , 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current opinion in Biotechnology* , 4: p. 331-338.
- 32) Chadhain S., Norman R., Pesce K., Kukor J., and Zylstra G., 2006. Microbial Dioxygenase Gene Population Shifts during Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation. *Appl Environ Microbiol*, 72 (6) : p. 4078-4087.
- 33) Chang, L., Wei, L. I.-C., Audia, J. P., Morton, R. A. & Schellhorn, H. E., 1999 . Expression of the *Escherichia coli* NRZ nitrate reductase is highly growth phase dependent and is controlled by RpoS, the alternative vegetative sigma factor. *Mol Microbiol* 34, p.756–766.
- 34) Choe, M. & Reznikoff, W. S., 1993. Identification of the regulatory sequence of anaerobically expressed locus *aeg-46.5*. *J Bacteriol* 175, p. 1165–1172.
- 35) Clegg, S., Yu, F., Griffiths, L., and Cole, J.A. , 2002. The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC, in *Escherichia coli* K-12; two nitrate and three nitrite transporters. *Mol Microbiol* 44: p. 143–155.
- 36) Clegg, S.J., Jia, W., and Cole, J.A., 2006. Role of the *Escherichia coli* nitrate transport protein, NarU, in survival during severe nutrient starvation and slow growth. *Microbiology* 152: p. 2091–2100.
- 37) Cole, J. , 1996 . *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis of c-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm. *Mol Microbiol* 19, p. 476–481.
- 38) Collins, J. F., Brown, J. P., Dawson, S. V., and Marty, M. A. 1991. Risk assessment for benzo[a]pyrene. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 13, p. 170–184.
- 39) Crawford N.M., and Glass A.D.M., 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Plant. Sci.*, 3, p. 385-389.
- 40) Dandie CE, Thomas SM, Bentham RH, McClure NC 2004: Physiological characterization of *Mycobacterium* sp. strain 1B isolated from a bacterial culture able to degrade high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Appl Microbiol* 97, p. 246–255.
- 41) Daniel-Vedel F., Filleur S., and Caboche M., 1998. Nitrate transport : a key step in nitrate assimilation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, p. 235-239.
- 42) Daws LC., 2009. Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy. *Pharmacol Ther* 121,:p. 89-99.

- 43) Dechorgnat J., Nguyen C.T., Armengaud P., Jossier M., Diatloff E., Filleur S., Daniel-Vedele F. , 2011. From the soil to the seeds: The long journey of nitrate in plants. *J. Exp. Bot.* 62: p. 1349–1359.
- 44) DeMoss J. A. and Hsu P.-Y. , 1991. NarK enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: p. 3303–3310.
- 45) Dixon, R. & Kahn, D., 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, p. 621–631.
- 46) Doyle E., Muckian L., Hickey A. and Clipson N. 2008: Microbial PAH Degradation-Advances in Applied Microbiology (65): p. 27-53.
- 47) Dua M., Singh A., Sethunathan N., Johri A.K., 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: p. 143-152.
- 48) Einsle O., Kroneck P.M.H., 2004. Structural basis of denitrification. *Biological Chemistry*, 385, p. 875–883.
- 49) Entry J.A., Mattson K.G., Emmingham W.H., 1993. The influence of nitrogen on atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid mineralization in grassland soils. *Biol. Fertil. Soils.*, 16:p. 179-182.
- 50) Eriksson Mikael, Erik Sodersten, Zhongtang Yu, Gunnel Dalhammar, and William W. Mohn, 2003. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: p. 275–284.
- 51) Fantroussi S.E., Agathos S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Curr. Op. Microbiol.*, 8: p. 268-275.
- 52) Feng H., Sun Y., Zhi Y., Wei X., Luo Y., Mao L. and Zhou P., 2014. Identification and characterization of the nitrate assimilation genes in the isolate of *Streptomyces griseorubens* JSD-1. *Microbial Cell Factories* 13: p., 174.
- 53) Floyd M.M., Tang J., Kane M., Emerson D., 2005. Captured diversity in a culture collection: case study of the geographic and habitat distributions of environmental isolates held at the American type culture collection. *Appl. Environ. Microbiol.* ,71: p. 2813-2823.
- 54) Forde, B. G. , 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465, p. 219–235.
- 55) Forrest LR, Krämer R, Ziegler C., 2011. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta.*, 1807(2): p. 167-88.
- 56) Gallego J.L.R., Loredó L., Llamas J.F., Vazquez F., Sanchez J., 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by of bacterial degradation. *Biodeg.*, 12: p. 325-335.



- 57) Galvan, A., Quesada, A., Fernandez, E., 1996. Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a specific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol.Chem.* 271, p. 2088–2092.
- 58) Galvan, A., Fernandez, E., 2001. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, p. 225–233.
- 59) Giffin M.M, Ronald W. Raab, Melissa Morganstern, Charles D. Sohaskey, 2012. Mutational Analysis of the Respiratory Nitrate Transporter NarK2 of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE* 7(9): p. 454-59.
- 60) Goddard A. D., James W. B. Moir, David J. Richardson and Stuart J. Ferguson, 2008. Interdependence of two NarK domains in a fused nitrate/nitrite transporter. *Molecular Microbiology* 70(3), p. 667–681.
- 61) Goldstein R.M., Mallory L.M., Alexander M., 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation . *Appl. Environ. Microbiol.* 50: p. 977-983.
- 62) Graham, A., Tucker, A. D. & Smith, N. H. , 1981. The formate-nitrate respiratory chain of *E. coli*: localisation of proteins by immunoadsorption studies. *FEMS Microbiol Lett* 11, p. 141–148.
- 63) Grove, J., Tanapongpipat, S., Thomas, G., Griffiths, L., Crooke, H. & Cole, J. , 1996. *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis of c-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm. *Mol Microbiol* 19, p. 476–481.
- 64) Guan L, Kaback HR., 2007. Site-directed alkylation of cysteine to test solvent accessibility of membrane proteins. *Nat Protoc.* , 2: p. 2012–2017.
- 65) Guerin, W.F.; Jones, G.E. , 1988. Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54,: p. 937-944.
- 66) Harayama S., Kok. M., and Neidle E.L., 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:p. 565-601.
- 67) Haritash A.K. and Kaushik C.P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of hazardous materials*, 169: p.1-15.
- 68) Hartmans S, De Bont JA, Stackebrandt E., 2006. The genus *Mycobacterium*-Nonmedical. In *The Prokaryotes*, 3rd edn. S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer, E Stackebrandt (eds.). New York: Springer, pp. 889–918.
- 69) Heitkamp, M. A., J. P. Freeman, D. W. Miller, and C. E. Cerniglia. 1988. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: p. 2556–2565.
- 70) Heitkamp, M.A.; Franklin, W.; Cerniglia, C.E., 1988. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, : p. 2549-2555.

- 71) Henner P., Schiavon M., Morel J.L., Lichtfouse E., 1997. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. *Analysis Magazine* 25: p. 56-59.
- 72) Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed). 1994, Williams and Wilkins, Baltimore.
- 73) Huang, Y., Lemieux, M.J., Song, J., Auer, M. and Wang, D.N., 2003. *Science* 301, p. 616–620.
- 74) International Agency for Research on Cancer (IARC) Benzo[a]pyrene, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, vol. 32, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 1986, pp. 211–224.
- 75) Iobbi, C., Santini, C. L., Bonnefoy, V. & Giordano, G., 1987 . Biochemical and immunological evidence for a second nitrate reductase in *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 168, p. 451–459.
- 76) Iobbi-Nivol, C., Santini, C. L., Blasco, F. & Giordano, G. , 1990 . Purification and further characterisation of the second nitrate reductase of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 188, p.679–687.
- 77) Jia, W., and Cole, J.A., 2005. Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* 33: p. 159–161.
- 78) Jia, W., Tovell, N., Clegg, S., Trimmer, M. and Cole, J., 2009, A single channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarU and a role for NirC in nitrite export and uptake. *Biochem. J.* 417, p. 297–304.
- 79) Johnson CR, Scow KM , 1999. Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils. *Biodegradation* ;10: p. 43–50.
- 80) Jouanneau Y., Willison J.C., Meyer C., Krivobok S., Chevron N., Besombes J.L., Blake G., 2005. Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *Environ. Sci. Technol.* 39:p. 5729-5735.
- 81) Juhasz A.L., R. Naidu, 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 45, p. 57–88.
- 82) Juhasz AL, Naidu R 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int Biodeterior Biodegrad* 45: p. 57–88.
- 83) Kallimanis Aristeidis , Eugenia Karabika, Kostantinos Mavromatis , Alla Lapidus, Kurt M. LaButti, Konstantinos Liolios , Natalia Ivanova, Lynne Goodwin, Tanja Woyke, Athana-sios D. Velentzas , Angelos Perisynakis, Christos C. Ouzounis, Nikos C. Kyrpides, Anna I. Koukkou and Constantin Drainas, 2011. Complete genome sequence of *Mycobacterium sp.* strain (Spyr1) and reclassification to *Mycobacterium gilvum* Spyr1. *Standards in Genomic Sciences*, 5:p. 144-153.
- 84) Kanaly, R. A., and Harayama, S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182, p. 2059–2067.

- 85) Kanaly R.A. and Harayama S., 2010. Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microbial Biotechnology* 3(2), p. 136–164.
- 86) Karabika E, Kallimanis A, Dados A, Pilidis G, Drainas C, Koukkou AI. Taxonomic identification and use of free and entrapped cells of a new *Mycobacterium* sp., strain Spyr1 for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl Biochem Biotechnol* 2009; 159:155–167.
- 87) Kästner, M., Breuer-Jammali, M., and Mahro, B. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Appl Environ Microbiol* 64: 359–362.
- 88) Katoh, K. and Toh, H. , 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings Bioinf.* 9, p. 286–298.
- 89) Keith LH & Telliard WA 1979 . Priority pollutants. I. A perspective view. *Environ Sci Technol* 13: p. 416–423.
- 90) Kelley I. and Cerniglia CE. 1991. The metabolism of fluoranthene by a species of *Mycobacterium*. *J Ind Microbiol*, 7: p. 19-26.  
Kielland K., 1994. Amino Acid Absorption by Arctic Plants: Implications for Plant Nutrition and Nitrogen Cycling . *Ecology* , 75, p. 2373-2383.
- 91) Kim S.J., Kweon O., Cerniglia C.E., 2010. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Mycobacterium* Strains. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* K.N. Timmis (ed) Springer-Verlag Berlin 1866-1879.
- 92) Kinghorn, J. R., Sloan, J., Kana'n, G. J. M., DaSilva, E. R., Rouch, D. A. and Unkles, S. E. 2005. Missense mutations that inactivate the *Aspergillus nidulans* nrtA gene encoding a high-affinity nitrate transporter. *Genetics* 169, p. 1369–1377.
- 93) Koukkou A.E. and Vandera E., 2011. Microbial Bioremediation of non-metals, p. 93-117.
- 94) Law CJ, Maloney PC, Wang DN., 2008. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol.*, 62: p. 289–305.
- 95) Lee, R.B., 1979. The effect of nitrite on root growth of barley and maize. *New Phytol.* 83, p. 615–622.
- 96) Leys, N.M., Bastiaens, L., Verstraete, W., and Springael, D. 2005. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: p. 726–736.
- 97) Liebeg E.W., Cutright T.J., 1999. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *Inter. Biodet. Biodeg.* 44:p. 55-64.

- 98) Lin JT , Stewart V., 1998. Nitrate assimilation by bacteria. *Adv Microb Physiol.*, 39: p. 1-30.
- 99) Liu K.H., Huang C.U. and Tsay Y.F., 1999. CHL1 is a dual affinity transporter of *Arabidopsis* involved in a multiple phases of nitrate uptake. *Plant cell* 11, p. 865-874.
- 100) MacGregor, C. H. & Christopher, A. R. , 1978. Asymmetric distribution of nitrate reductase subunits in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*: evidence derived from surface labelling studies with transglutaminase. *Arch Biochem Biophys* 185, p. 204–213.
- 101) MacGregor, B. J., Biddle, J. F., Harbort, C., Matthyse, A. G. & Teske, A., 2013. Sulfide oxidation, nitrate respiration, carbon acquisition, and electron transport pathways suggested by the draft genome of a single orange Guaymas Basin Beggiatoa (*Cand. Maribeggiatoa*) sp. filament. *Mar. Genomics* 11, p. 53–65.
- 102) Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, p. 339.
- 103) Major D.W., McMaster M.L., Cox E.E., Edwards E.A., Dworatzek S.M., Hedrickson E.R., Starr M.G., Payne J.A., Buonamici L.W., 2002. Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethane. *Environ. Sc. Technol.*, 36: p. 5106-5116.
- 104) Maliszewska-Kordybach, B. 1999. Sources, concentrations, fate and effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment. Part A: PAHs in air. *Pol. J. Environ. Stud.* 8, p. 131–136.
- 105) Marger, M. D., and M. H. Saier., 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18: p.13–20.
- 106) Markowitz VM, Szeto E, Palaniappan K *et al.* , 2008. The Integrated Microbial Genomes (IMG) System in 2007: data content and analysis tools extensions. *Nucleic Acids Res* 36, p. 528-33.
- 107) Martinez-Espinosa RM, Cole JA, Richardson DJ, Watmough NJ., 2011. Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochem Soc Trans.*, 39:p. 175–178.
- 108) Margullis L., and Schwartz K., 1998. *Five kingdoms, an illustrated guide to the phyla of life on earth*. 3rd Edition. W.H. Freeman and Co. New York.
- 109) Masahiro Fukuda, Hironori Takeda, Hideaki E. Kato, Shintaro Doki, Koichi Ito, Andre's D. Maturana, Ryuichiro Ishitani & Osamu Nureki, 2015. Structural basis for dynamic mechanism of nitrate/nitrite antiport by NarK.
- 110) Mihelcic, J. R., and R. G. Luthy., 1988. Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-watersystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: p. 1188–1198.
- 111) Miller, E. C., and Miller, J. A. 1981. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer* 47, p. 2327–2345.

- 112) Mills S.A., Frankenberger Jr. W.T., 1994. Evaluation of phosphorous sources promoting bioremediation of diesel fuel in soil. *Bull. Environ. Cont. Toxic.*, 53:p. 280-284.
- 113) Mirza O, Guan L, Verner G, Iwata S, Kaback HR., 2006. Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H<sup>+</sup> symport in LacY. *Embo J.* , 25:p. 1177–1183.
- 114) Moir J. W. B. and Wood N. J. 2001. Nitrate and nitrite transport in bacteria. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58 : p. 215–224.
- 115) Moreno-Vivián C, Ferguson S J. , 1998. Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways. *Mol Microbiol.*, 29: p. 664–666.
- 116) Mueller, J. G., Cerniglia, C. E., and Pritchard, P. H. 1996. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. In ‘‘Bioremediation: Principles and Applications’’ (R. L. Crawford and D. L. Crawford, Eds.), pp. 125–198. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 117) Navarro M.T., Guerra E., Fernandez E. and Galvan A., 2000. Nitrite reductase mutants as an approach to understanding nitrite assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 122, p. 283-289.
- 118) Nishimura T., Vertes A. A., Shinoda Y., Inui M., Yukawa H., 2007. Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, p. 889-897.
- 119) Noji. S-, Nohno, T., Saito. T., and Taniguchi, S., 1989. The *narK* gene product participates in nitrate transport induced In *Escherichia coli* nitrate respiring cells. *FEBS Lett* 252:p. 139-143.
- 120) Olson GJ , Brierley CL, 2003. Bioleaching review: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: p. 249-257.
- 121) Pao SS, Paulsen IT & Saier MH Jr., 1998. Major Facilitator Superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, :p. 1-34.
- 122) Patel D.H., Wi S.G., Bae H. J., 2009. Modification of overlap extension PCR: A mutagenic approach. *Indian Journal of Biotechnology* 8: p. 183-186.
- 123) Peakman, T., Crouzet, J., Mayaux, J.F., Busby, S., Mohan, S.B., Wootton, J., *et al.*, 1990. Nucleotide sequence organisation and structural analysis of the products of the *nirB* to *cysG* region of the *Escherichia coli* chromosome. *Eur J Biochem* 191: p. 315–323.
- 124) Peng R-H, Xiong A-S., Xue Y., Fu X-Y. , Gao F. , Zhao W., Tian Y-S & Yao Q-H., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev* 32 :p. 927–955.
- 125) Piddington D. L., Kashkouli A., and Buchmeier N. A., 2000. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a Defined Medium Is Very Restricted by Acid pH and Mg<sup>2+</sup> Levels. *Infect Immun.* 68(8): p. 4518–4522.

- 126) Poolman MG, Sebu C, Pidcock MK, Fell DA ., 2007. Modular decomposition of metabolic systems via null-space analysis. *J Theor Biol* 249: p. 691–705.
- 127) Potter, L. C. & Cole, J. A., 1999. Essential roles for the products of the *napABCD* genes, but not *napFGH*, in periplasmic nitrate reduction by *Escherichia coli* K-12. *Biochem J* 344, p. 69–76.
- 128) Potter, L. C., Millington, P., Griffiths, L., Thomas, G. H. & Cole, J. A., 1999 . Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase. *Biochem J* 344, p. 77–84.
- 129) Primm T.P., Lucero C.A., Falkinham J.O. , 3rd., 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17(1): p. 98-106.
- 130) Quesada, A., Galvan, A. & Fernandez, E. , 1994. Identification of nitrate transporters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 5, p. 407–419.
- 131) Quesada A. , J. Hidalgo, E. Fernandez, *Mol. Gen. Genet.* 258 , 1998, 373-377.
- 132) Rabin, R. S. & Stewart, V., 1993. Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 175, p. 3259–3268.
- 133) Radestock, S. & Forrest, L. R. , 2011. The alternating-access mechanism of MFS transporters arises from inverted-topology repeats. *J. Mol. Biol.* 407, p. 698–715.
- 134) Ramirez, S., Moreno, R., Zafra, O., Castan, P., Valles, C., and Berenguer, J. , 2000. Two nitrate/nitrite transporters are encoded within the mobilizable plasmid for nitrate respiration of *Thermus thermophilus* HB8. *J Bacteriol* 182: p. 2179–2183.
- 135) Rowe J.J., Trees Ubbink-Kok, Oouwe Molenaar, Wil N. KonJngs and Arnold J. M. Driessen, 1994. NarK is a nitrite-extrusion system involved in anaerobic nitrate respiration by *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 12(4), p. 579-586.
- 136) Ruberto L., Vazquez S.C., Mac Cormack W.P., 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Inter. Biodet. Biodeg.*, 52, 2 : p. 115-125.
- 137) Rudnick G ., 2006. Serotonin transporters—structure and fuction. *J Membr Biol* 213, : p. 101-10.
- 138) Rycovska A., Hatahet L., Fendler K., Michel H., 2012. The nitrite transport protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a nitrite/proton antiporter. *Biochemica et Biophysica Acta* 1818: p. 1342-1350.
- 139) Sabate J. , M. Vinas, A.M. Solanas, 2006. Bioavailability assessment and envi-ronmental fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in biostimulated creosote-contaminated soil, *Chemosphere* 63:p. 1648–1659.

- 140) Saier MH Jr, Yen MR, Noto K, Tamang DG & Elkan C., 2009. *Nucleic Acids Res* 37, D274-8; The Transporter Classification.
- 141) Saier MH Jr., 1999. A functional-phylogenetic system for the classification of transport proteins. *J Cell Biochem* 75 (S32-33), :p. 84-94.
- 142) Samanta, S. K., Singh, O. V., and Jain, R. K. 2002 . Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, p. 243–248.
- 143) Seo J.S., Keum Y.S., Li Q.X., 2009. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds *Int. J. Environ. Res. Pub. Heal.*, 6: p. 278-309.
- 144) Seo JS, Keum YS, Harada RM, Li QX. , 2007. Isolation and characterization of bacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organophosphorus pesticides from PAH-contaminated soil in Hilo, Hawaii. *J Agric Food Chem* 55: p. 5383–5389.
- 145) Schneider J., Grosser R., Jayasimhulu K., Xue W., and Warshawsky D., 1996. Degradation of Pyrene, Benz[*a*]anthracene, and Benzo[*a*]pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135, Isolated from a Former Coal Gasification Site, 62 : p. 13–19.
- 146) Scow KM, 1983. Rate of biodegradation, in: W.J. Lyman, W.F. Rosenbalt (Eds.) *Handbook of chemical property estimation methods*. McGraw-Hill, New York.  
Shrestha R.A., Pham T.D., Sillanpaa M., 2009. Effect of ultrasound on removal of persistent organic pollutants (POPs) from different types of soil. *J. Hazard. Mater.*, 170:p. 871-875.
- 147) Scheible W.R., Gonzales-Fontes A., Laurer M, Muller-Rober B., Caboche M., and Stitt M., 1997. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell*, 9, p. 1-17.
- 148) Scow K.M., Hicks K.A., 2005. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Curr. Op. Biotechnol.* 16: p. 246-253.  
Seklemova E., Pavlova A., Kovacheva K., 2001. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodeg.* 12:p. 311-316.
- 149) Showe, M. K. & DeMoss, J. A. ,1968. Localization and regulation of synthesis of nitrate reductase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 95, p. 1305–1313.
- 150) Shuttleworth KL & Cerniglia CE 1995. Environmental aspects of PAH biodegradation. *Appl Biochem Biotechnol* 54: p. 291–302.
- 151) Silva, E., A.M. Fialho, I. Sa-Correia, R.G. Burns, and L.J. Shaw. 2004. Combined bioaugmentation and biostimulation to clean up soil contaminated with high concentrations of atrazine. *Environ. Sci. Technol.* 38: 632-637.
- 152) Simon M.A., Bonner J.S, Page C.A., Townsend R.T., Mueller D.C., Fuller C.B., Autenrieth R.L., 2004. Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland. *Ecological Engineering* 22: p. 263-277.
- 153) Singh A., and Ward O.P., 2004. Biodegradation and Bioremediation . *Soil Biology* :p. 279-304.

- 154) Smith P.K., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 (1): p. 76-85.
- 155) Sohaskey C. and Wayne L.G., 2003. Role of *narK2X* and *narGHJI* in hypoxic upregulation of nitrate reduction by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 185, p. 7247-7256.
- 156) Solcan N, Kwok J, Fowler PW, Cameron AD, Drew D, Iwata S, Newstead S. 2012. Alternating access mechanism in the POT family of oligopeptide transporters. *Embo J.* , 31: p. 3411–3421.
- 157) Srivastava, V. K., Chauhan, S. S., Srivastava, P. K., Kumar, V., and Misra, U. K. 1986. Fetal translocation and metabolism of PAH obtained from coal fly ash given intratracheally to pregnant rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 18, p. 459–469.
- 158) Stackebrandt E., Rainey F., Ward-Rainey N.L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: p. 479-491.
- 159) Stahl DA, Urbance JW., 1990. The division between fast and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol.*, 172: p. 116–124.
- 160) Stauffert M., Duran R., Gassie C., Cravo-Laureau C., 2014. Response of Archaeal Communities to Oil Spill in Bioturbated Mudflat Sediments. *Microb Ecol.*, 10, p. 248-288.
- 161) Stewart, V. & Parales, J. (1988). Identification and expression of genes *narL* and *narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 170, p. 1589–1597.
- 162) Sun L, Xin Zeng, Chuangye Yan, Xiuyun Sun, Xinqi Gong, Yu Rao, Nieng Yan, 2012. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature.*, 490: p. 361–366.
- 163) Sutherland, J. B., Rafii, F., Khan, A. A., and Cerniglia, C. E. 1995. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In “Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals” (L. Y. Young and C. E. Cerniglia, Eds.), pp. 269–306. Wiley-Liss Inc, New York.
- 164) Swindoll C.M., Action C.M., Ofaender F.K., 1988. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:p. 212-217.
- 165) Tabor S. and Richardson C.C., 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Acad Sci USA* 82: p. 1074-8.
- 166) Talley J.W., Tucker S., Furey J., Ghosh U., and Luthy R.G., 2002. Particle-scale understanding of the bioavailability of PAHs in sediment. *Environ. Sci. Technol.* 36:p. 477-483.
- 167) Tavoulari T, Forrest LR & Rudnick G., 2009. Fluoxetine (Prozac) binding to serotonin transporter is modulated by chloride and conformational changes. *J Neurosci* 29, :p. 9635-43.



- 168) Thomassin-Lacroix E.J.M., Eriksson M., Reimer K.J., Mohn W.W., 2002. Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:p. 551-556.
- 169) Top E.M., Springael D., Boon N., 2002. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *Fems Microbiol. Ecol.* 42:p. 199-208.
- 170) Traxler RW, Proteau PR, Traxler RN., 1965. Action of microorganisms on bituminous materials. I. Effect of bacteria on asphalt viscosity. *Appl Microbiol.*, 13:p. 838–841.
- 171) Trindale P.V.O., Sobral L.G., Rizzo A.C.L., Leite S.G.F., Soriano A.U., 2005. Bioremediation of a weathered and a recently contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chem.* 58: p. 515-522.
- 172) Trueman L. J., Richardson A. and Forde B. G. , 1996. Molecular cloning of higher plant homologues of the highaffinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene* 175: p. 223–231.
- 173) Unden, G., Bongaerts, J., Becker, S., Holighaus, G., Schirawski, J., and Six, S. 1995. O<sub>2</sub>-sensing and O<sub>2</sub> - dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* 164: p. 81–90.
- 174) Unkles, S. E., Rouch, D. A., Wang, Y., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. and Kinghorn, J. R., 2004. Two perfectly conserved arginine residues are required for substrate binding in a high-affinity nitrate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, p. 17549–17554.
- 175) Unkles, S. E., Zhou, D., Siddiqi, M. Y., Kinghorn, J. R. and Glass, A. D., 2001. Apparent genetic redundancy facilitates ecological plasticity for nitrate transport. *EMBO J.* 20, p. 6246–6255.
- 176) Unkles, S. E., Hawker, K. L., Grieve, C., Campbell, E. I., Montague, P. & Kinghorn, J. R. 1991. *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, p. 204–208.
- 177) Unkles, S.E., Karabika, E., Symington, V.F., Cecile, J.L., Rouch, D.A., Akhtar, N., Cromer, B.A., and Kinghorn, J.R., 2012. Alanine scanning mutagenesis of a high-affinity nitrate transporter highlights the requirement for glycine and asparagine residues in the two nitrate signature motifs. *Biochem. J.* 447, p. 35–42.
- 178) Unkles S.E. , K.L. Hawker, C. Grieve, E.I. Campbell, P. Montague, J.R. Kinghorn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 , 1995, 3076-3076.
- 179) Uyttebroek, M., Breugelmans, P., Janssen, M., Wattiau, P., Joffe, B., Karlson, U., Ortega-Calvo, J.J., Bastiaens, L., Ryngaert, A., Hausner, M., Springael, D., 2006. Distribution of the Mycobacterium community and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among different size fractions of a long term PAH-contaminated soil. *Environ. Microbiol.* 8, 836–847.
- 180) van Agteren M.H., KeuningS., Janssen D.B., 1998. *Microtransformation-Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds.* Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands.

- 181) van Hamme, J.D., Singh, A., and Ward, O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: p. 503–549.
- 182) Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F. and van Sinderen D., 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 71 p. 495–548.
- 183) Vidali M., 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.*, 73, pp. 1163–1172.
- 184) Vidmar J.J. Zhuo D., Siddiqi M.Y., Schjoerring J.K., Touraine B., and Glass A.D.M., 2000. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiol.* 123, p. 307-318.
- 185) von Wittgenstein N. JJB, Cuong H Le , Barbara J Hawkins and Jürgen Ehling, 2014. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. *BMC Evolutionary Biology* 2014, 14:11.
- 186) Wang Y, Li W, Siddiqi Y *et al.* , 2008. Nitrite transporter is mediated by the nitrite-specific-affinity NitA transporter and by nitrate transporters NrtA, NrtB in *Aspergillus nidulans*. *Fung Genet Biol* 45, : p. 94-102.
- 187) Wang, H., Tseng, C. P. & Gunsalus, R. P., 1999. The napF and narG nitrate reductase operons in *Escherichia coli* are differentially expressed in response to submicromolar concentrations of nitrate but not nitrite. *J Bacteriol* 181, p. 5303–5308.
- 188) Ward O.P., Singh A., van Hamme J.D., 2003. Accelerated biodegradation of petroleum waste. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: p. 260-270.
- 189) Weinglass A.B. and Kaback,H.R., 2000. The central cytoplasmic loop of the major facilitator superfamily of transport proteins governs efficient membrane insertion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97, p. 8938–8943.
- 190) WHO 1998. “Environmental Criteria 202. Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.” World Health Organisation, Geneva, Switzerland.
- 191) Wick L.Y., Pasche N., Bernasconi S.M., Pelz O., Harms H., 2003a. Characterization of multiple-substrate utilization by anthracene-degrading *Mycobacterium frederiksbergense* LB501T. *Appl. Environ. Microbiol.* , 69:p. 6133-6142.
- 192) Wick LY, Pelz O, Bernasconi SM, Andersen N, Harms H., 2003b. Influence of the growth substrate on esterlinked phospho- and glycolipid fatty acids of PAHdegrading *Mycobacterium* sp. LB501T. *Environ Microbiol* 5: p. 672–680.
- 193) Wick LY, Ruiz de Munain A, Springael D, Harms H, de MA., 2002a. Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: p. 378–385.
- 194) Wick LY, Wattiau P, Harms H., 2002b Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles of mycobacteria. *Environ Microbiol* ., 4: p. 612–616.

- 195) Wick A.F., Haus N.W., Sukkariyah B.F., Haering K.C., and Daniels W.L., 2011. Remediation of PAH-Contaminated Soils and Sediments: A Literature Review. Soil and Landscape Rehabilitation.
- 196) Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshida, T., Habe, H. and Omori, T. 2002. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. Applied Microbiology and Biotechnology, 58: p. 202-209.
- 197) Wood Nicholas J., Tooba Alizadeh, David J. Richardson, Stuart J. Ferguson and James W. B. Moir, 2002. Two domains of a dual-function NarK protein are required for nitrate uptake, the first step of denitrification in *Paracoccus pantotrophus*. Molecular Microbiology, 44(1), : p. 157–170.
- 198) Wray J.L., and Kinghorn J.R., 1989. Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation. Oxford Scientific Publications , Oxford,UK.
- 199) Yan, H. , Huang W, Yan C, Gong X, Jiang S, Zhao Y, Wang J, Shi Y. 2013. Structure and mechanism of a nitrate transporter. Cell Rep. 3, p. 716–723.
- 200) Yan Z., Jiang H., Li X., Shi Y., 2014. Accelerated removal of pyrene and benzo[a]pyrene in freshwater sediments with amendment of cyanobacteria-derived organic matter. Journal of Hazardous Materials 272: p. 66–74.
- 201) Yan Nieng, 2013. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. Trends Biochem. Sci. 38: p. 151-159.
- 202) Yu, S.H., Ke, L., Wong, Y.S., and Tam, N.F.Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environ Int* 31: p. 149–154.
- 203) Yu X.Z., Wu S.C., Wu F.Y., Wong M.H., 2010. Enhanced dissipation of PAHs from using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. J Hazard Mater . 186 (2-3):p. 1206-1217.
- 204) Zhang H., and Forde B.G., 1998. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced root architecture. Science, 279, p. 407-409.
- 205) Zheng, H., Wisedchaisri, G. & Gonen, T. , 2013. Crystal structure of a nitrate/nitrite exchanger. Nature 497, 647–651.
- 206) Καλλιμάνης Α., 2004. Διδακτορική Διατριβή: Απομόνωση και βιοχημικός-μοριακός χαρακτηρισμός βακτηρίων από έδαφος επιβαρημένο με κρεοζωτέλαιο. Ιωάννινα.

