



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη του ρόλου της βιταμίνης B₁₂ στον αυξοτροφισμό του βακτηριακού
στελέχους *Sphingomonas haloaromaticamans* στην μεθειονίνη και στην
αποδόμηση του μυκητοκτόνου *ortho*-phenylphenol**

Πτυχιακή εργασία

Αλεβιζάκη Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής: Καρπούζας Δημήτριος

Λάρισα, 2018

Μελέτη του ρόλου της βιταμίνης B₁₂ στον αυξοτροφισμό του βακτηριακού στελέχους *Sphingomonas haloaromaticamans* στην μεθειονίνη και στην αποδόμηση του μυκητοκτόνου *ortho*-phenylphenol

Study of the role of vitamin B₁₂ in auxotrophy of the bacterial strain *Sphingomonas haloaromaticamans* in methionine and the degradation of the fungicide *ortho*-phenylphenol

Η Τριμελής επιτροπή αποτελείται από τους:

- Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Μόσιαλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόλογος

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω τον κ. Καρπούζα Δημήτριο, Αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και τη βοήθεια που μου παρείχε για τη συγγραφή της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Οφείλω να ευχαριστήσω τη Δρ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη και τον Δρ. Μόσιαλο Δημήτριο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή για την παρούσα μελέτη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Dr. Chiara Perruchon για τη πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια του πειράματος προκειμένου να έχω το επιθυμητό αποτέλεσμα. Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα. Αλεβιζάκη Παναγιώτα για την υπομονή, τη συμπαράσταση και την πολύτιμη βοήθεια.

Περίληψη

Το *ortho*-phenylphenol (OPP) είναι μυκτοκτόνο που χρησιμοποιείται κυρίως μετά τη συγκομιδή των φρούτων και των λαχανικών για αποφυγή της ποιοτικής υποβάθμισης τους. Όμως η εκτεταμένη χρήση του από τις βιομηχανίες συσκευασίας έχει σαν αποτέλεσμα απόβλητα εμπλουτισμένα με OPP τα οποία ρυπαίνουν το περιβάλλον. Η βιοαποικοδόμηση είναι πιο αποτελεσματική μέθοδος για την αποδόμηση του OPP. Το βακτηριακό στέλεχος *Sphingomonas haloaromaticamans* που πρόσφατα απομονώθηκε από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος είναι ικανό να αποδομεί το OPP, ενώ παράλληλα εμφανίζει αυξοτροφισμό στην μεθειονίνη. Γονιδιωματική ανάλυση του βακτηρίου έδειξε ότι το μονοπάτι βιοσύνθεσης της μεθειονίνης είναι πλήρες και περιέχει μόνο μια από τις ισομορφές της συνθάσης της μεθειονίνης, την εξαρτώμενη της βιταμίνης B₁₂. Το συγκεκριμένο εύρημα αποτέλεσε και εύνασμα για την παρούσα πτυχιακή που είχε ως στόχο να διαπιστώσει εάν ο αυξοτροφισμός του *S. haloaromaticamans* στην μεθειονίνη συνδέεται με τη βιταμίνη B₁₂, την οποία με βάση την γονιδιωματική ανάλυση το συγκεκριμένο βακτήριο δεν μπορεί να παράξει *de novo*. Έτσι στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση της βιταμίνης B₁₂ στην ικανότητα του αυξοτροφικού βακτηρίου *S. haloaromaticamans* να αποικοδομεί το μυκτοκτόνο OPP. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες του βακτηρίου σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MSMN + OPP παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη βιταμίνης B₁₂ ή μεθειονίνης εξασφάλιζε υψηλή αποδομητική ικανότητα για το βακτήριο έναντι του OPP. Αντίθετα κανένα άλλο ενδιάμεσο προϊόν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της μεθειονίνης όπως *homoserine*, *O-succinyl-homoserine*, *cystathionine*, *homocysteine* δεν αποκατέστησε την αποδομητική ικανότητα του βακτηρίου. Μελέτη του μοτίβου έκφρασης των γονιδίων βιοσύνθεσης της μεθειονίνης *metA*, *metB*, *metC* και *metH* έδειξαν κατασταλτική δράση των μεθειονίνη και βιταμίνη B₁₂ στην έκφραση τους, ενώ η προσθήκη *cystathionine* και *homocysteine* προκάλεσε αύξηση στην έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων *metC* και *metH*. Το ίδιο δεν συνέβει για τα *homoserine* και *O-succinyl-homoserine* και τα αντίστοιχα γονίδια καταδεικνύοντας την πολυπλοκότητα της ρύθμισης του βιοσυνθετικού μονοπατιού της μεθειονίνης. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην εγκατάσταση και μελέτη διαδικών βακτηριακών κοινοπραξιών του *S. haloaromaticamans* με βακτήρια που βιοσυνθέτουν και παρέχουν βιταμίνη B₁₂ ώστε να επιβεβαιώσουμε το ρόλο της βιταμίνης B₁₂ στην αποδόμηση του OPP από το συγκεκριμένο βακτήριο.

Abstract

Ortho-phenylphenol (OPP) is a fungicide used in the post-harvest treatments of fruits and vegetables to control fungal infestations during storage. However, its extensive application by the packaging industries leads to the production of large wastewater volumes containing high loads of OPP, which are of environmental concern. Biodegradation is the most effective method for the degradation of OPP. The bacterial strain *Sphingomonas haloaromaticamans* which was recently isolated in the Laboratory of Plant and Environmental Biotechnology is able to efficiently degrade OPP while exhibiting auxotrophism in methionine. Genomic analysis of the isolated bacterium indicated a complete methionine biosynthetic pathway with only the cobalamin-dependent isoform of methionine synthase present. This specific finding has been a stimulus for the present dissertation aiming to find out whether the auxotrophism of *S. haloaromaticamans* for methionine is linked with vitamin B₁₂, which cannot be produced *de novo* by this particular bacterium, according to genomic analysis. Thus this study evaluated the effect of vitamin B₁₂ on the ability of the auxotrophic *S. haloaromaticamans* bacterium to degrade the fungicide OPP. Experiments conducted in liquid cultures where the bacterium was grown in the minimal medium MSMN + OPP indicated that the addition of vitamin B₁₂ or methionine ensured a high degrading ability against OPP. In contrast, no other intermediate product in the methionine biosynthetic pathway such as homoserine, O-succinyl-homoserine, cystathionine, homocysteine was able to restore the degrading capacity of the bacterium. Study of the expression pattern of the methionine biosynthetic genes *metA*, *metB*, *metC*, *metH* showed a suppressive effect of methionine and vitamin B₁₂ on their expression, while the addition of cystathionine and homocysteine caused an increase in the expression of the corresponding *metC* and *metH* genes. The same did not happen for homoserine and O-succinyl-homoserine and the corresponding genes, indicating the complexity of the regulation of the methionine biosynthetic pathway. Further studies will focus on the establishment and study of bacterial consortia composed of *S. haloaromaticamans* and bacteria known to be able to produce and therefore provide vitamin B₁₂, so as to confirm the role of vitamin B₁₂ in the degradation of OPP by the isolated *Sphingomonas* strain.

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 <i>Ortho</i> -phenylphenol.....	8
1.2 Βακτηριακό Στέλεχος.....	10
1.2.1 <i>Sphingomonas haloaromaticamans</i>	10
1.2.2 Μεταβολισμός του OPP.....	11
1.3 Βασικά Βιοσυνθετικά Μονοπάτια.....	12
1.3.1 Οδός βιοσύνθεσης μεθειονίνης.....	12
1.3.2 Ρύθμιση της Οδού Βιοσύνθεσης Μεθειονίνης.....	16
1.3.3 Οδός βιοσύνθεσης βιταμίνης B ₁₂	18
1.3.4 Ρύθμιση της Οδού Βιοσύνθεσης Βιταμίνης B ₁₂	26
1.4 Γονιδιωματική ανάλυση των μονοπατιών βιοσύνθεσης μεθειονίνης και βιταμίνης B ₁₂ στο στέλεχος <i>S. haloaromaticamans</i>	26
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	26
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	27
2.1 Βακτηριακό στέλεχος.....	27
2.2 Πείραμα 1.....	27
2.3 Πείραμα 2.....	28
2.4 Ανάλυση υπολειμμάτων OPP σε σύστημα HPLC.....	28
2.5 Απομόνωση RNA RT-q-PCR.....	29
2.6 Στατιστική ανάλυση.....	30
3. Αποτελέσματα.....	31
3.1 Πείραμα 1.....	31
3.2 Πείραμα 2.....	33
3.2.1 Αποδόμηση OPP.....	33
3.2.2 Έκφραση των γονιδίων <i>metA</i> , <i>metB</i> , <i>metC</i> , <i>meth1</i>	35

4. Συζήτηση.....	43
5. Βιβλιογραφία.....	45

1. Εισαγωγή

1.1 *Ortho*-phenylphenol

Η *ortho*-phenylphenol (OPP) ανήκει στην κατηγορία των αρωματικών ενώσεων των διφαινυλίων. Συνίσταται από δύο βενζολικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με δεσμό C-C και μια υδροξυλομάδα (OH) στον άνθρακα C-2 του ενός δακτυλίου. Οι κύριες φυσικοχημικές ιδιότητες της χημικής ένωσης αναγράφονται στον Πίνακα 1 ("The Human Metabolome Database").

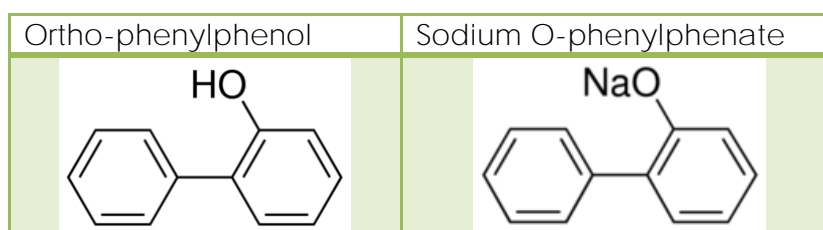
Πίνακας 1. Φυσικοχημικές ιδιότητες του OPP

Φυσικοχημικές ιδιότητες

Χημικός τύπος	C ₁₂ H ₁₀ O
Μοριακό βάρος	170.211 g/mol
Σημείο ανάφλεξης	124 °C
Σημείο τήξης	56°C
Σημείο Βρασμού	286°C
pH	6,1 σε υδατικό διάλυμα στους 22.7°C
Διαλυτότητα	0,7 mg/ml στους 25°C
Φυσική κατάσταση	Στερεό
Χρώμα	Λευκό
Οσμή	Ήπια χαρακτηριστική

Το OPP και το αντίστοιχο άλας νατρίου (Sodium *O*-phenylphenate, SOPP) χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στις βιομηχανίες καλλυντικών, δέρματος, υφάσματος, χαρτιού αλλά κυρίως στη συντήρηση εσπεριδοειδών και λαχανικών (Coelhan et al. 2009). Εφαρμόζονται άμεσα με την τεχνική του κερώματος ή έμμεσα μέσω εμποτισμένων υλικών μετά τη συγκομιδή των φρούτων και των λαχανικών για την αποφυγή των μυκητιάσεων κατά την αποθήκευση. Μπορεί να προστατεύσει από προσβολές των μυκήτων *Penicillium italicum*, *P. digitatum*, *Diplodia natanesis* και άλλα είδη (Appel, 2000).

Πίνακας 2. Χημικοί τύποι των OPP και SOPP



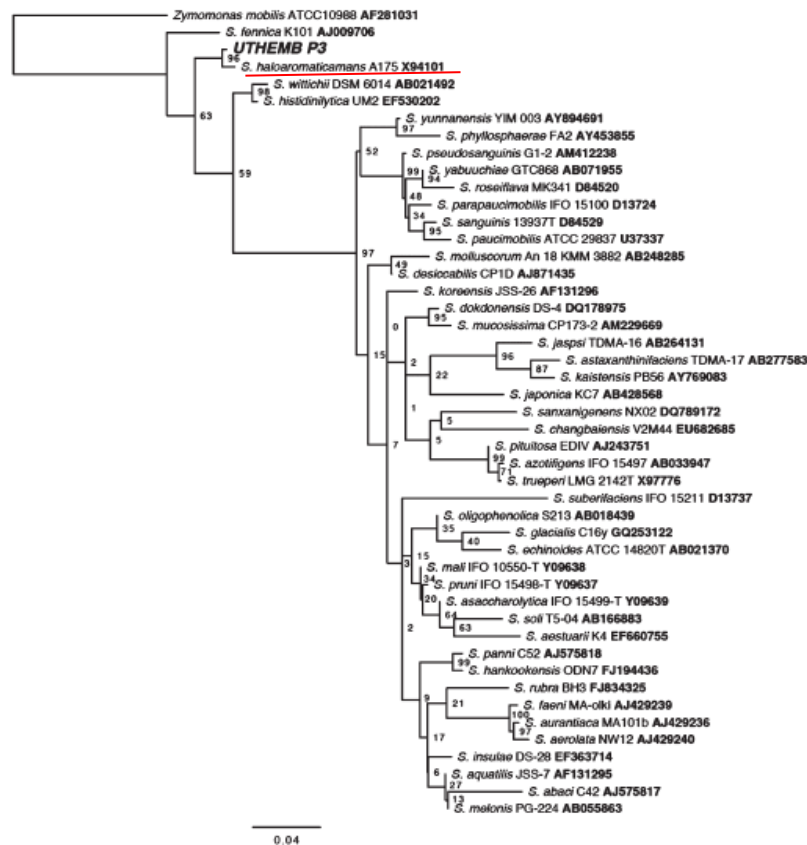
Η εκτεταμένη χρήση του OPP οδηγεί στην παραγωγή μεγάλου όγκου επιβαρημένων αποβλήτων με αποτέλεσμα την υποβάθμιση του περιβάλλοντος αλλά κυρίως τον κίνδυνο για τους υδρόβιους οργανισμούς, καθώς παραμένει ιδιαίτερα υπολειμματικό σε αβιοτικές συνθήκες στο περιβάλλον (Howard et al, 1991 & Besil et al., 2016). Συνεπώς κρίνεται απαραίτητη η απομάκρυνση του OPP από το περιβάλλον, όμως οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τις οδούς αποδόμησης του OPP στο περιβάλλον είναι λίγες. Ο αποτελεσματικότερος τρόπος για τη διάσπαση του συγκεκριμένου γεωργικού φαρμάκου είναι η βιοαποικοδόμηση, ενώ αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα έχουν δείξει και οι διεργασίες φωτόλυσης και οζόνωσης (Olak-Kucharczyk et al., 2015). Η φωτόλυση είναι η

κύρια οδός αποικοδόμησης του OPP στην ατμόσφαιρα αν και πραγματοποιείται με αργό ρυθμό αφού το OPP μπορεί να αξιοποιήσει ένα στενό εύρος μήκος κύματος (Gore et al., 1971). Διεξάγεται με απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας στα 254 nm με αποτέλεσμα το σχηματισμό τριυδροξυδιφαινυλίων, διμερών φαινυλοφαινολών και του μεταβολίτη phenylbenzoquinone (Olak-Kucharczyk et al., 2015). Στο νερό οι βασικές οδοί αποδόμησης είναι η φωτόλυση σε μικρό βάθος, η μικροβιακή διάσπαση και η οζόνωση, η οποία είναι αποτελεσματική και γρήγορη μέθοδος. Κατά τη διαδικασία της οζόνωσης το όζον μπορεί να αντιδράσει με χημικές ουσίες άμεσα και έμμεσα (Olak-Kucharczyk et al., 2015). Η άμεση αντίδραση είναι σχετικά αργή και περιλαμβάνει την αντίδραση μορίων όζοντος με το υπόστρωμα-OPP. Αντιθέτως, η έμμεση αντίδραση είναι γρήγορη και περιλαμβάνει την αντίδραση των ριζών υδροξυλίου που προκύπτουν μετά από διάλυση του όζοντος σε αλκαλικό διάλυμα νερού με υποστρώματα (έμμεση οξειδωση) (Gottschalk et al. 2010 & Olak-Kucharczyk et al., 2007).

1.2 Βακτηριακό Στέλεχος

1.2.1 *Sphingomonas haloaromaticamans*

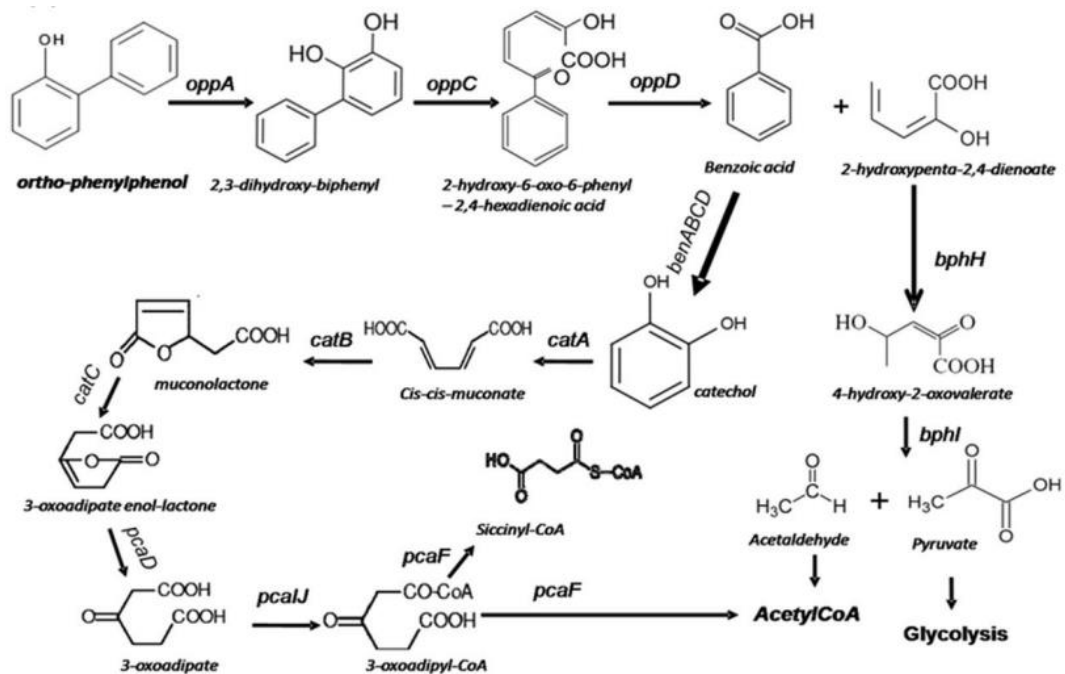
Το βακτηριακό στέλεχος *Sphingomonas haloaromaticamans* είναι ένα gram-αρνητικό βακτήριο, το οποίο ανήκει στην τάξη των άλφα-πρωτεοβακτηρίων και στην οικογένεια των *Sphingomonadaceae* (Εικόνα 1). Συναντάται σε ποικίλα περιβάλλοντα και τα τελευταία χρόνια χρήζει ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, καθώς είναι ικανό να αποδομεί οργανικούς ρύπους λόγω των ευρέων μεταβολικών ικανοτήτων του (Glaeser & Kampher, 2014). Σύμφωνα με Perruchon et al., (2014) το στέλεχος είναι ικανό να αποδομήσει το OPP μόνο με προσθήκη μείγματος αμινοξέων (casamino acids, CA) ή με συν-καλλιέργεια με άλλα βακτήρια. Περαιτέρω πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο απέδειξαν πως το βακτήριο είναι αυξοτροφικό ως προς τη μεθειονίνη για να διατηρήσει την αποικοδομητική του ικανότητα. Το βακτήριο ήταν ικανό να επιβιώνει και να επανακτήσει την αποικοδομητική του ικανότητα όταν διοχετευόταν στο μέσο μεθειονίνη μετά από παρατεταμένη καλλιέργεια χωρίς το αμινοξύ. Πιθανόν το βακτήριο κατά την απουσία της μεθειονίνης δεν μπορεί να αναπυχθεί στο OPP, το οποίο αποτελεί πηγή άνθρακα και μεταβαίνει σε κατάσταση αδράνειας μέχρι την παροχή των απαραίτητων θρεπτικών. Σημαντική παρατήρηση που προέκυψε είναι πως το βακτήριο δεν χρησιμοποιεί τη μεθειονίνη ως υπόστρωμα ανάπτυξης, αλλά για να καλύψει τις αυξανόμενες μεταβολικές απαιτήσεις του κατά την ενεργή αποικοδόμηση και αύξηση στο OPP. Προκαταρκτική γονιδιωματική ανάλυση του μη ολοκληρωμένου γονιδιώματος του βακτηρίου απέδειξε ότι η βιοσυνθετική οδός της μεθειονίνης δεν ήταν πλήρης, καθώς δεν εντοπίστηκαν δύο γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα, γ-συνθάση της κυσταθειονίνης και συνθάση της μεθειονίνης ανεξάρτητη της κοβαλαμίνης. Ωστόσο το γεγονός πως δεν υπάρχει το ένζυμο της συνθάσης της μεθειονίνης ανεξάρτητης της κοβαλαμίνης δεν είναι περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης, γιατί υπάρχει η εξαρτώμενη της κοβαλαμίνης συνθάση της μεθειονίνης.



Εικόνα 1. Φυλογενετική ανάλυση του βακτηριακού στελέχους *Sphingomonas haloaromaticamans* (Perruchon et al., 2014).

1.2.2 Μεταβολισμός του OPP

Το βακτήριο διαθέτει τον απαραίτητο γονιδιακό εξοπλισμό για το μεταβολισμό οργανικών ενώσεων όπως το OPP, ο οποίος είναι οργανωμένος σε τέσσερα οπερόνια. Τα οπερόνια 1 και 2 περιέχουν γονίδια που συμμετέχουν στην διάσπαση του βενζοϊκού οξέος (ben/cat operon). Το οπερόνιο 3 περιλαμβάνει γονίδια που συμμετέχουν στο ανώτερο τμήμα του μεταβολικού μονοπατιού του OPP (opp operon) και στο μονοπάτι διάσπασης του διφαινυλίου (bph), ενώ το οπερόνιο 4 κωδικοποιεί ένα μη ολοκληρωμένο μονοπάτι μετατροπής διφαινυλίου σε βενζοϊκό οξύ και 2-υδροξυπεντά-2,4-διενοϊκό. Οπότε σύμφωνα με την Εικόνα 2, το OPP αρχικά διασπάται από τα ένζυμα που κωδικοποιούνται από τα γονίδια του οπερονίου 3 σε βενζοϊκό οξύ και 2-υδροξυπεντά-2,4-διενοϊκό, τα οποία εν συνεχεία μετατρέπονται σε ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του Krebs. Τα γονίδια του οπερονίου 1 ή 2 οξειδώνουν το βενζοϊκό οξύ προς κατεχόλη και τελικά προς ακέτυλο-CoA και ηλεκτρικό-CoA ενώ, το 2-υδροξυπεντά-2,4-διενοϊκό μετατρέπεται από τα γονίδια του οπερονίου 3 σε ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του Krebs και της γλυκόλυσης (Perruchon et al., 2017).



Εικόνα 2. Το μεταβολικό μονοπάτι του OPP στο βακτηριακό στέλεχος *S.haloaromaticans* (Perruchon et al., 2017).

1.3 ΒΑΣΙΚΑ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

1.3.1 Οδός Βιοσύνθεσης Μεθειονίνης

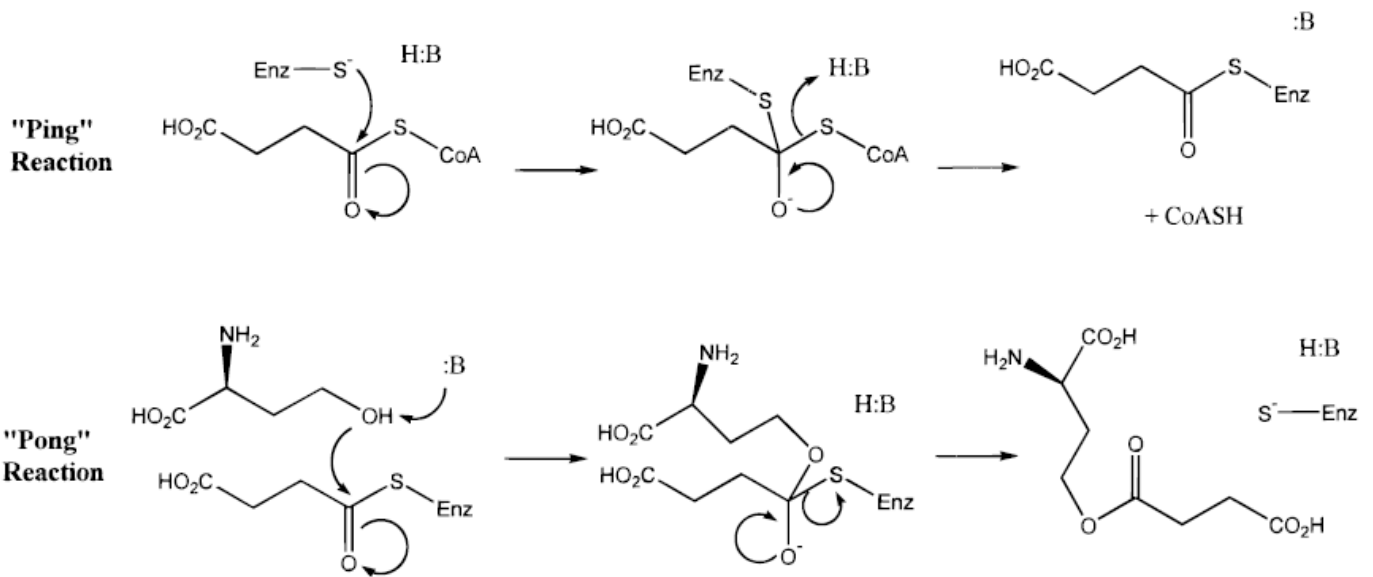
Η μεθειονίνη ανήκει στην οικογένεια των αμινοξέων του ασπαραγινικού οξέος, συνίσταται από μία μη διακλαδισμένη, υδροφοβική πλευρική αλυσίδα και είναι το μόνο αμινοξύ που περιέχει θειοαιθερικό δεσμό (Ferla & Patrick, 2014). Το άτομο άνθρακα στο μόριο της προέρχεται από το οξαλοξικό, ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου Krebs (Lee & Hwang, 2003). Είναι σημαντικός κυτταρικός ρυθμιστής, καθώς συμμετέχει στην έναρξη της μετάφρασης, στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών δομών και αποτελεί ένωση-κλειδί για πολλές μεταβολικές διεργασίες (Leyn et al., 2014). Επίσης η μεθειονίνη είναι υπόστρωμα για τη σύνθεση της S-αδένοσυλ-μεθειονίνης (SAM), η οποία λειτουργεί ως αισθητήρας οξειδοαναγωγής και συμμετέχει στη σύνθεση των μορίων λακτόνης της N-acetyl-homoserine που συμμετέχουν στη γονιδιακή ρύθμιση (Gophna et al., 2005).

Το μονοπάτι βιοσύνθεσης της μεθειονίνης πραγματοποιείται σε προκαρυώτες, αρχαία και ευκάρια με διακριτές διαφορές (Lee & Hwang, 2003). Παρ'όλα αυτά, όλοι οι οργανισμοί ενσωματώνουν μεθειονίνη στις αλληλουχίες των πρωτεϊνών τους και πολλοί από αυτούς πρέπει να την παράγουν μόνοι τους (Gophna et al., 2005).

Το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεση είναι κοινό στους οργανισμούς και αφορά τη μετατροπή του ασπαραγινικού οξέος σε homoserine, το πρόδρομο μόριο θρεονίνης, ισολευκίνης και μεθειονίνης (Berardinis et al., 2008). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο aspartate kinase/homoserine dehydrogenase που κωδικοποιείται από το γονίδιο *metL*.

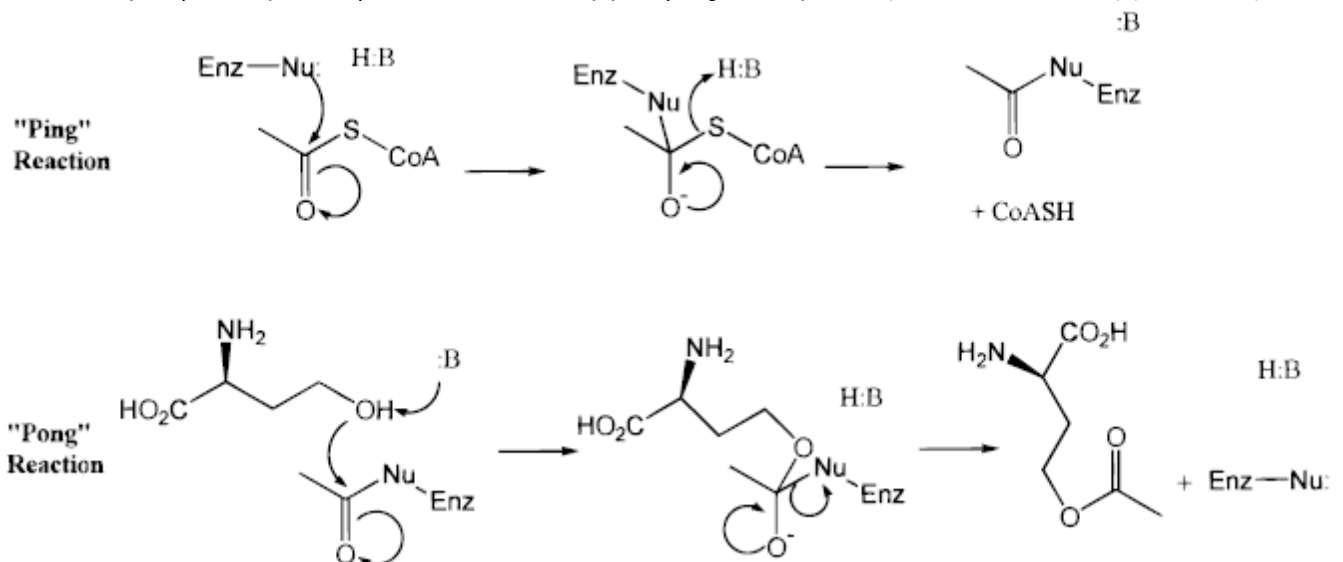
Στο επόμενο στάδιο γίνεται η ενεργοποίηση της homoserine, η οποία αποτελεί βασική διαφορά μεταξύ των οργανισμών και μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους:

1. Στα gram-αρνητικά, προαιρετικά αερόβια και αναερόβια βακτήρια, η homoserine ενεργοποιείται μέσω μεταφοράς της succinyl -ομάδας από το succinyl-CoA στη γ-υδροξυλο-ομάδα της homoserine οδηγώντας στην O-succinyl-homoserine (OSH) (Hacham et al., 2003). Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η homoserine O-succinyltransferase (HST, EC 2.3.1.46) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *metA* (Gophna et al., 2005). Η συγκεκριμένη αντίδραση επιτυγχάνεται μέσω ενός μηχανισμού τύπου ring ring. Στο πρώτο μισό της αντίδρασης, το succinyl-CoA δεσμεύεται στο ένζυμο (HST) και μια ενεργή θέση θειολικού επιδρά σε αυτό ώστε να σχηματιστεί το πρώτο τετραεδρικό ενδιάμεσο. Το τετραεδρικό ενδιάμεσο θα διαχωριστεί, πιθανόν μέσω πρωτονίωσης του θειολικού ανιόντος του ενδιάμεσου προϊόντος από μια δραστική όξινη θέση, σε ελεύθερο CoA και σε ενδιάμεσο προϊόν του ενζύμου. Στο δεύτερο μισό της αντίδρασης, η homoserine δεσμεύεται στο ενδιάμεσο του ενζύμου, και μια βάση δραστικής θέσης μπορεί να απομακρύνει το γ-υδροξυλο -πρωτόνιο επιτρέποντας την επίθεση στο ενδιάμεσο προϊόν του succinyl-ενζύμου ώστε να σχηματιστεί το δεύτερο τετραεδρικό ενδιάμεσο προϊόν. Τελικά, αυτό το δεύτερο ενδιάμεσο προϊόν διαχωρίζεται οδηγώντας στο σχηματισμό του τελικού προϊόντος (OSH) και την αναγέννηση του ενζύμου (Born & Blanchard, 1999)(Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Μηχανισμός τύπου ring pong που λαμβάνει χώρα κατά τη δημιουργία της O-succinyl-homoserine (Born & Blanchard, 1999)

1. Στα gram-θετικά βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, όπως και στους μύκητες και τις ζύμες, η homoserine ενεργοποιείται μέσω ακετυλίωσης, πιο συγκεκριμένα το ενζύμο homoserine O-acetyltransferase (HAT, EC 2.3.1.46), προϊόν του γονιδίου *metA*, μεταφέρει την ακετυλο-ομάδα του ακετυλο-CoA στην homoserine μέσω μηχανισμού τύπου ring pong (Hacham et al., 2003). Στο πρώτο μέρος της αντίδρασης, ένα νουκλεόφιλο ένζυμο επιτίθεται στο θειοεστερικό δεσμό του ακετυλο-CoA ώστε να σχηματιστεί το πρώτο τετραεδρικό ενδιάμεσο. Το νουκλεόφιλο πιθανόν είναι η κυστεΐνη του ενζύμου HTS, καθώς το νουκλεόφιλο του ενζύμου HTA δεν είναι γνωστό μέχρι στιγμής. Το πρώτο τετραεδρικό ενδιάμεσο διαχωρίζεται σε ακετυλιωμένο ένζυμο και CoASH. Η homoserine δεσμεύει το ακετυλιωμένο ένζυμο και μια βάση δραστικής θέσης απαιτείται για την απομάκρυνση του πρωτονίου από τη γ-υδρόξυλο-ομάδα (Born et al., 2000) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Μηχανισμός τύπου ring-pong που λαμβάνει χώρα κατά τη δημιουργία της O-acetyl-homoserine (Born et al., 2000)

Τα ένζυμα HAT και HST χρησιμοποιούν τον ίδιο μηχανισμό τύπου ping-pong, κατά τον οποίο η ακέτυλο-ομάδα προερχόμενη είτε από succinyl-CoA είτε από acetyl-CoA αρχικά μεταφέρεται σε μια ενεργή θέση πριν την ακόλουθη μεταφορά της στην υδρόξυλο-ομάδα της homoserine. Η ενεργή θέση σερίνης (HAT) ή κυστεινής (HST) συμπεριφέρεται ως νουκλεόφιλο (Zubieta et al., 2008). Η μελέτη της MetA πρωτεΐνη αποκαλύπτει πως ένα μόνο αμινοξύ στην ενεργή θέση καθορίζει την εξειδίκευση ακέτυλο-CoA (Glu-111) και succinyl-CoA (Gly-111) στις ακετυλοτρανσφεράσες (Zubieta et al., 2008).

Εξαιρέση αποτελούν βακτήρια όπως το *P. putida*, όπου η ακετυλίωση της homoserine καταλύεται από το προϊόν των γονιδίων *metXW* και οδηγεί στην παραγωγή της acetyl-L-homoserine. Η αντίδραση είναι ισοδύναμη με τις αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα του γονιδίου *metA* (Alaminos & Ramos, 2001). Το γονίδιο *metX* είναι ομόλογο με την homoserine O-acetyltransferase ενώ το *metW* δεν παρουσιάζει ομολογία με καμία γνωστή πρωτεΐνη συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων της ευκαρυωτικής και προκαρυωτικής βιοσύνθεσης της μεθειονίνης (Andersen et al., 1998).

Αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν απέδειξαν ότι το ένζυμο HAT κωδικοποιείται από δύο γονίδια: το γονίδιο *metA* (EC 2.3.1.46) και το γονίδιο *metX* (EC 2.3.1.31) ενώ, το ένζυμο HST κωδικοποιείται μόνο από το γονίδιο *metA* (EC 2.3.1.46) (Hwang et al., 2001). Τα ένζυμα που προκύπτουν από τα γονίδια *metA* και *metX* δεν παρουσιάζουν ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας ή τρισδιάστατης δομής αλλά χρησιμοποιούν το ίδιο μηχανισμό τύπου ping-pong (Zubieta et al., 2008). Το γονίδιο *metX* χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα αποκλειστικά το acetyl-CoA σε αντίθεση, με το γονίδιο *metA* που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα succinyl-CoA ή acetyl-CoA (Zubieta et al., 2008).

1. Η τρίτη εναλλακτική αντίδραση ενεργοποίησης της homoserine, συναντάται μόνο στα φυτά και καταλύεται από το ένζυμο homoserine kinase (Hacham et al., 2003). Η κινάση χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το ATP και φωσφορυλιώνει την homoserine οδηγώντας στην παραγωγή της O-phosphohomoserine (Hacham et al., 2003).

Το επόμενο βήμα είναι η αφομοίωση του θείου στο σκελετό της μεθειονίνης που συνιστά μια ακόμα σημαντική διαφορά μεταξύ των οργανισμών (Leyn et al., 2014). Επιτυγχάνεται μέσω:

- έμμεσης σουλφυδρυλίωσης (transsulfuration), ολοκληρώνεται σε δύο βήματα και οδηγεί στην παραγωγή της homocysteine. Η κυστεινή δρα ως δότης θείου, καθώς μέσω μεταφοράς τηςθειόλης ενσωματώνεται στον εστέρα της homoserine και οδηγεί στην παραγωγή της cystathionine (Hwang et al., 2001). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο cystathionine γ -synthase (CGS, EC 2.5.1.48), η οποία είναι προϊόν του γονιδίου *metB* (Hwang et al., 2001). Ακολούθως πραγματοποιείται η β -εξάλειψη, κατά την οποία η cystathionine μετατρέπεται σε homocysteine με τη δράση του ενζύμου cystathionine β -lyase (CBL, EC 4.4.1.8), η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *metC* (Gophna et al., 2005).
- άμεσης σουλφυδρυλίωσης (direct sulfhydrylation) οδηγεί στην άμεση παραγωγή της homocysteine (Hwang et al., 2001). Το ρόλο του δότη θείου παίζει ένα ανόργανο σουλφίδιο, το οποίο ενσωματώνεται στον εστέρα της homoserine (Leyn et al., 2014). Η αντίδραση καταλύεται από τα ένζυμα OAH-sulfhydrylase ή OSH-sulfhydrylase, τα οποία κωδικοποιούνται από τα γονίδια *metY* και *metZ* αντίστοιχα (Alaminos & Ramos, 2001). Τα ένζυμα απαιτούν ως συμπαραγόντα την 5'-φωσφορική πυριδοξάλη, η οποία σχηματίζει μία βάση Schiff με το εκάστοτε υπόστρωμα και σταθεροποιεί τα ενδιάμεσα προϊόντα (Berardinis et al., 2008 & Taté et al., 1998).

Επιπλέον έχουν αναφερθεί τα γονίδια *metI*, *metC* ότι κωδικοποιούν τα πολυπεπτίδια της οικογένειας των πρωτεϊνών της cystathionine γ -synthase (Gophna et al., 2005). Η *MetI* πρωτεΐνη έχει διπλή δράση: cystathionine γ -synthase και O-acetylhomoserine thiolase, δηλαδή έχει τη δράση των *metB* και *metY* αν και δεν είναι ξεκαθαρο πιο από τα δύο μονοπάτια χρησιμοποιείται (Auger et al., 2002). Συμμετέχει στη σύνθεση της cystathionine μέσω της έμμεσης σουλφυδρυλίωσης, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την O-acetylhomoserine (Auger et al., 2002). Η *MetC* έχει δράση cystathionine β -lyase και μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή της homocysteine (Auger et al., 2002).

Στην πλειοψηφία των οργανισμών ευνοείται ένα από τα παραπάνω μονοπάτια για τη βιοσύνθεση της μεθειονίνης (Hwang et al., 2001). Ωστόσο, σε πολλά είδη της τάξης των ακτινοβακτηρίων, των α - και γ -πρωτεοβακτηρίων υπάρχουν και οι δύο οδοί σουλφυδρυλίωσης, πιθανόν γιατί προσφέρουν μεταβολική ευελιξία και αποτελεσματική προσαρμογή του οργανισμού στο περιβάλλον του (Lee & Hwang, 2003). Για παράδειγμα η κυστεΐνη ως πηγή θείου είναι πιο «ακριβή» μεταβολικά αλλά, συχνά είναι πιο διαθέσιμη από το ελεύθερο σουλφίδιο, το οποίο είναι και εξαιρετικά ασταθές (Ferla & Patrick, 2014). Στους οργανισμούς που διαβιούν σε περιβάλλον με άφθονο υδρόθειο προτιμάται η οδός της άμεσης σουλφυδρυλίωσης ενώ, σε οργανισμούς που παράγεται μεθανεθιόλη ως καταβολικό παράγωγο αξιοποιείται ως υπόστρωμα με αποτέλεσμα την απευθείας βιοσύνθεση μεθειονίνης, σε ένα βήμα (Ferla & Patrick, 2014).

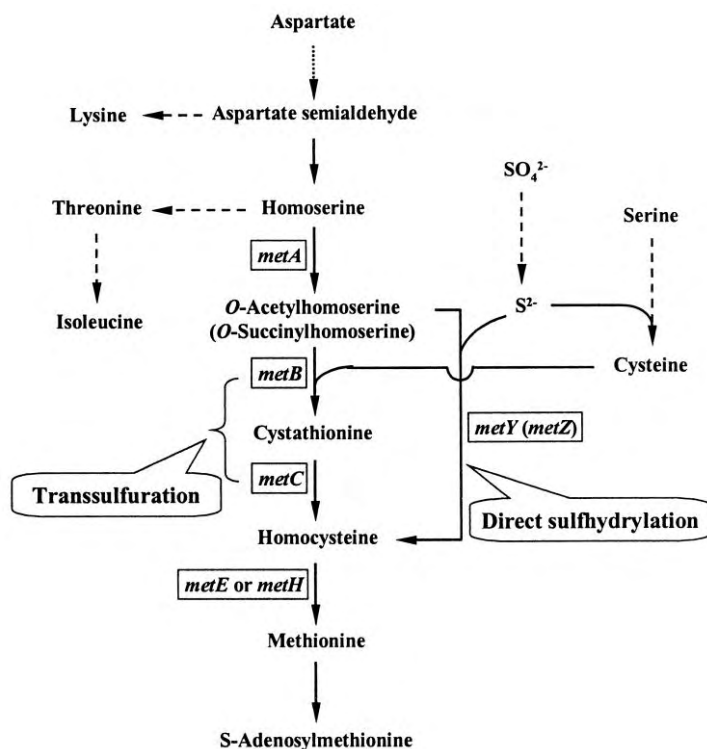
Το τελευταίο βήμα της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης είναι υψηλά συντηρημένο στους οργανισμούς και αφορά την S-μεθυλίωση της homocysteine (Hwang et al., 2001). Στην αντίδραση συμμετέχουν οι δύο ισομορφές του ένζυμου συνθάση της μεθειονίνης (Ferla & Patrick, 2014). Η εξαρτώμενη της κοβαλαμίνης ή βιταμίνη B₁₂ συνθάση της μεθειονίνης ή CDMS (Cobalamin Dependent Methionine Synthase) απαντάται σε μετάζωα και πολλά βακτηριακά φύλλα, κωδικοποιείται από το γονίδιο *metH* (EC 2.1.1.13) και χρησιμοποιεί την κοβαλαμίνη ως συμπαράγοντα (Gophna et al., 2005, Ferla & Patrick, 2014) (Εικόνα 5). Το N⁵-μέθυλο-τετραυδροφολικό ή ένα πολυ-γλουταμινικό παράγωγο χρησιμοποιούνται ως δότες της μεθυλομάδας (Fogolino et al., 1995). Η μη εξαρτώμενη της κοβαλαμίνης ή βιταμίνης B₁₂ συνθάση της μεθειονίνης ή CIMS (Cobalamin Independent Methionine Synthase) (EC 2.1.1.14) απαντάται σε βακτήρια, αρχαία, και μύκητες, κωδικοποιείται από το γονίδιο *metE* και χρησιμοποιεί ως δότη μεθυλομάδας το N⁵-μέθυλο-τετράυδροπτερόϋλο τριγλουταμινικό οξύ (Lee & Hwang, 2003, Gophna et al., 2005). Η αντίδραση που καταλύεται από το CDMS είναι 100 φορές ταχύτερη από την αντίδραση που καταλύει το ένζυμο CIMS. Και στα δύο ισοένζυμα οι δότες μεθυλομάδων σχηματίζονται από τη ρεδουκτάση του N^{5,10}-methylene-tetra-hydrofolate που κωδικοποιείται από το γονίδιο *metF* (Lee & Hwang, 2003).

Οι συνθάσες της μεθειονίνης είναι παρούσες στους μικροοργανισμούς που είναι ικανοί να βιοσυνθέτουν το αμινοξύ αλλά και στους αυξότροφους μικροοργανισμούς για τη μεθειονίνη, όπου χρειάζονται για την αναγέννηση της SAM (Leyn et al., 2014).

Μια οδός μεθυλίωσης ανεξάρτητη των παραπάνω καταλύεται από την betaine-homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.5), μία τρανσμεθυλάση, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *bhmT* (Ferla & Patrick, 2014). Η αντίδραση που καταλύει το συγκεκριμένο ένζυμο σχετίζεται με τη μετατροπή της betaine και της homocysteine σε διμέθυλο-γλυκίνη και μεθειονίνη (Gophna et al., 2005).

Η μεθειονίνη μπορεί να μετατραπεί σε SAM με τη δράση της συνθάσης της SAM, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *metK* (Leyn et al., 2014). Η SAM είναι ο κύριος μεταφορέας

μεθυλομάδων στα κύτταρα, συνεπώς συμμετέχει σε αντιδράσεις μεθυλίωσης και είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση των πολυαμινών (Leyn et al., 2014).



Εικόνα 5. Βιοσυνθετικό μονοπάτι της μεθειονίνης στα βακτήρια (Hwang et al., 2001)

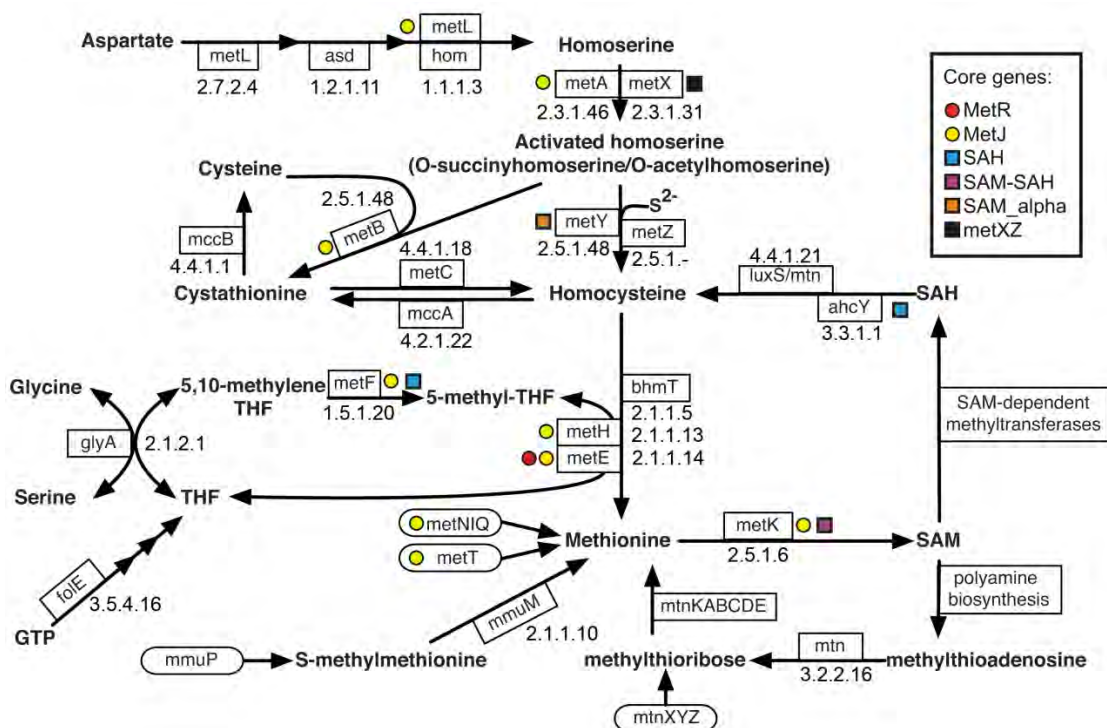
1.3.2. Ρύθμιση της Οδού Βιοσύνθεσης Μεθειονίνης

Η βιοσύνθεση της μεθειονίνης παρουσιάζει υψηλό βαθμό ρύθμισης σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης και ενζυμικής δραστηριότητας και οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί σχετίζονται με τη συσσώρευση του θείου (Leyn et al., 2014) (Εικόνα 6). Η μεθειονίνη ανήκει στην οικογένεια του ασπαραγινικού οξέος γι' αυτό το μονοπάτι βιοσύνθεσης ρυθμίζεται εν μέρει από άλλα μέλη της οικογένειας όπως η λυσίνη και η θρεονίνη (Leyn et al., 2014). Ο μεταγραφικός παράγοντας MetJ δεσμεύει τη SAM και είναι υπεύθυνος για την καταστολή όλων των *met* γονιδίων του μονοπατιού έμμεσης σουλφυδρυλίωσης της βιοσύνθεσης με εξαίρεση το γονίδιο *methH* (Leyn et al., 2014). Ο μεταγραφικός παράγοντας MetR είναι θετικός ρυθμιστής της έκφρασης των γονιδίων *metE* και *methH*. Ο ρόλος του MetR είναι η αποτροπή της συσσώρευσης homocysteine η οποία είναι τοξική για το κύτταρο (Leyn et al., 2014).

Η προσθήκη βιταμίνης B₁₂ οδηγεί σε καταστολή των γονιδίων *metE* και *metF* καθώς σε αυτή την περίπτωση, η μεθειονίνη συντίθεται αποκλειστικά από το γονίδιο *methH*, το οποίο ενεργοποιείται από τη βιταμίνη B₁₂. Γι' αυτό, οι μικροοργανισμοί που μπορούν να συνθέσουν τη βιταμίνη B₁₂ προτιμούν την πρωτεΐνη MetH από την πρωτεΐνη MetE επειδή η αντίδραση καταλύεται γρηγορότερα (Lee & Hwang, 2003). Η μεθειονίνη καταστέλλει την έκφραση της homoserine acetyltransferase, cystathionine γ-synthase, cystathionine β-lyase, OAH-sulfhydrylase που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *metA*, *metB*, *metC* και *metY* αντίστοιχα (Lee & Hwang, 2003). Επίσης, παρατηρείται ανάδρομη αναστολή της homoserine acetyltransferase από τη μεθειονίνη ή τη SAM, όπως και από την homocysteine ή τη κυστεΐνη (Lee & Hwang, 2003). Η έκφραση του γονιδίου *metY* ρυθμίζεται από αμινοξέα ή από ενώσεις που περιέχουν θείο και ενδεχομένως από τη θερμοκρασία. Επίσης η

ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *metA* από τη θερμοκρασία υποδεικνύει τη σημαντικότητα της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης στον έλεγχο της κυτταρικής φυσιολογίας (Hwang et al., 2001).

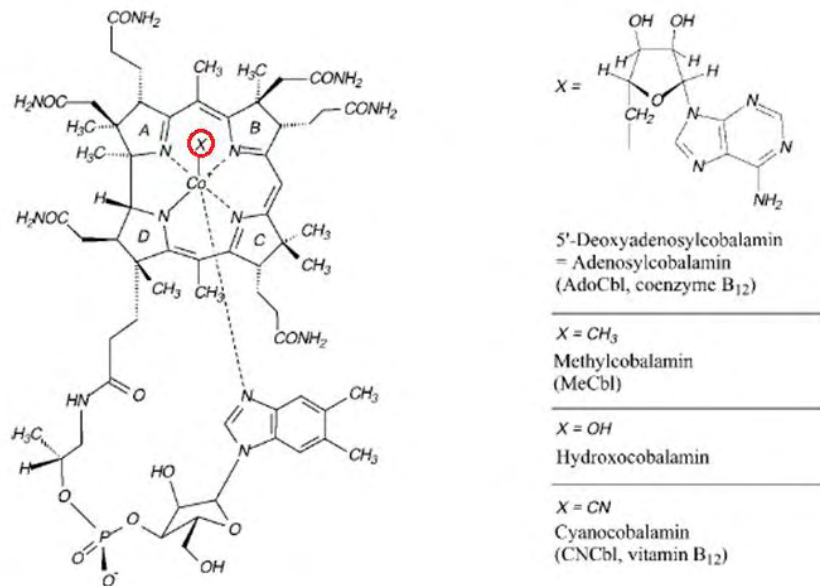
Η S-αδένοσυλ-homocysteine (SAH) είναι προϊόν της SAM-εξαρτώμενης μεθυλοτρανσφεράσης και λειτουργεί ως αναστολέας των SAM-εξαρτώμενων ενζύμων (Leyn et al., 2014). Τα γονίδια *metI* και *metC* σχηματίζουν οπερόνιο, η έκφραση του οποίου εξαρτάται από το θείο. Αναλύσεις υπέδειξαν μοντέλο ρύθμισης μέσω μεταγραφής αντιπερματισμού (Taté et al., 1998). Σε ένα τέιο σύστημα, σχηματίζεται ένας μεταγραφικός τερματιστής, που καθορίζει τη συνέχεια ή τη λήξη της μεταγραφής (Auger et al., 2002). Η κυστεΐνη, η cystathionine και η homocysteine ως πηγές θείου οδηγούν σε υψηλό επίπεδο μεταγραφής του οπερονίου, το οποίο μειώνεται με την παρουσία μεθειονίνης (Taté et al., 1998).



Εικόνα 6. Βιοσυνθετικό μονοπάτι της μεθειονίνης και η ρύθμιση του στα πρωτεοβακτήρια (Leyn et al., 2014)

1.3.3. Οδός Βιοσύνθεσης Βιταμίνης B₁₂

Ο όρος βιταμίνη B₁₂ αντιπροσωπεύει μια ομάδα ουσιών που καλούνται κορρινοειδή, λόγω του κορρινικού τους πυρήνα. Πιο αναλυτικά δομικά η βιταμίνη B₁₂ αποτελείται από: (α) τον κορρινικό πυρήνα, ο οποίος είναι ένας μακροκυκλικός δακτύλιος αποτελούμενος από τέσσερις ανηγμένους πυρρολικούς δακτυλίους (A, B, C, D) ενωμένους τόσο μεταξύ τους όσο και στο κέντρο του πυρήνα με ένα άτομο κοβαλτίου (Co), (β) τον κάτω ή άλφα προσδέτη, ο οποίος είναι το νουκλεοτίδιο 5,6 dimethyl benzimidazole (DMB) και (γ) τον πάνω ή βήτα προσδέτη, ο οποίος μπορεί να είναι μια ομάδα μεθυλίου, αδενοσίνης ή κυανομάδα (Groppe et al., 2005 & Martens et al., 2002). Στην κοβαλαμίνη η πλευρική αλυσίδα προπιονικού στο D δακτύλιο του κορρινικού πυρήνα συνδέεται με ένα νουκλεοτιδικό βρόγχο, ο οποίος επεκτείνεται κάτω από το μόριο (Moore et al., 2012). Πρόκειται για μια ένωση πολύπλοκης δομής, η οποία συνίσταται από ένα περίπλοκο σύστημα δακτυλίων κορρίνης που σχετίζεται από χημική άποψη με το σύστημα των δακτυλίων πορφυρίνης της αίμης με κοβάλτιο αντί για σίδηρο στο κέντρο (Lehninger, 2011). Είναι η μοναδική βιταμίνη που εκτός από ένα περίπλοκο οργανικό μόριο περιέχει επίσης και ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, το κοβάλτιο. Η βιταμίνη B₁₂ είναι γνωστή και ως κυανοκοβαλαμίνη καθώς περιέχει μια κυανομάδα (-CN) προσδεμένη στο άτομο του κοβαλτίου (Lehninger, 2011) (Εικόνα 7). Μόνο δύο κοβαλαμίνες, η 5'- δεοξυαδενοσυλκοβαλαμίνη και η μεθυλοκοβαλαμίνη είναι ενεργές ως συνένζυμα ((Groppe et al., 2005). Το κλειδί για τη βιολογική λειτουργία της βιταμίνης B₁₂ είναι ο δεσμός μεταξύ των ατόμων άνθρακα και κοβαλτίου (Moore et al., 2012). Έχει καταγραφεί πως οι ενεργές κοβαλαμίνες είναι φωτοευαίσθητες και μετασχηματίζονται εύκολα σε υδροξοκοβαλαμίνη, όταν βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου και σε υδατικό διάλυμα (Martens et al., 2002).



Εικόνα 7. Δομή της βιταμίνης B₁₂
(Martens et al., 2002)

Η βιταμίνη B₁₂ είναι σημαντική για τους οργανισμούς, καθώς συμμετέχει ως συνένζυμο σε ένα μεγάλο εύρος μεταβολικών διαδικασιών, όπως ενδομοριακές αναδιατάξεις, αναγωγές και μεθυλώσεις (Raux et al., 2000). Επίσης παίζει κεντρικό ρόλο στην κυτταρική αύξηση και το συντονισμό του κυτταρικού μεταβολισμού, αφού συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού της μεθειονίνης, της ουβικουινόνης και του φυλλικού οξέος. Ακόμα οι ενεργές μορφές της βιταμίνης λειτουργούν ως αισθητήρες μεταγραφικών ρυθμιστών για τη ρύθμιση λειτουργιών που απαιτούν

φως (Romine et al., 2017). Ωστόσο μόνο μερικά βακτήρια και αρχαία είναι ικανά για τη *de novo* βιοσύνθεση της B₁₂ (Romine et al., 2016).

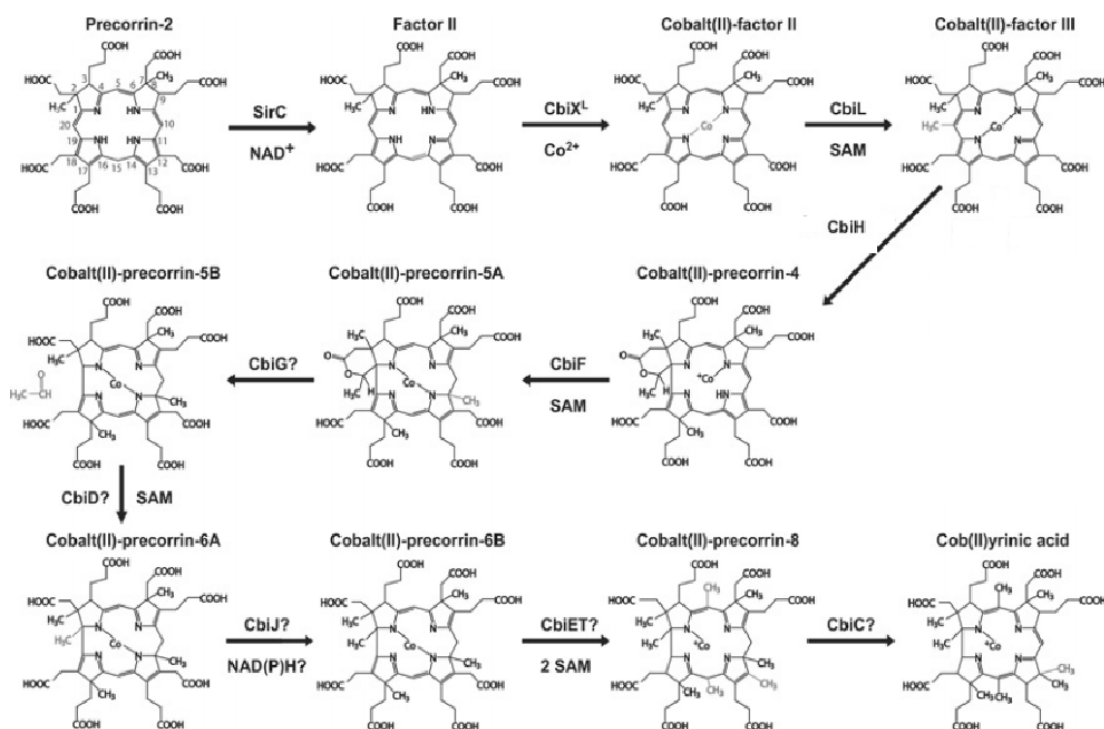
Η περίπλοκη δομή της βιταμίνης B₁₂ συνεπάγεται υψηλό ενεργειακό κόστος σύνθεσης, το οποίο δικαιολογεί το γεγονός πως μόνο μια μικρή ομάδα οργανισμών είναι ικανοί να την βιοσυνθέτουν (Rodionov et al., 2003). Ανάλογα με την απαίτηση σε οξυγόνο, το χρόνο ενσωμάτωσης του ατόμου Co στο σκελετό της βιταμίνης και τον τύπο της Co-chelatase υπάρχουν δύο διαφορετικά μονοπάτια βιοσύνθεσης: (α) το αερόβιο ή εξαρτώμενο από το οξυγόνο και (β) το αναερόβιο ή μη εξαρτώμενο από το οξυγόνο (Fang et al., 2017 & Escalante-Semerena, 2007). Η οδός βιοσύνθεσης της B₁₂ μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια: (I) σύνθεση του κορρινικού πυρήνα, (II) σύνθεση του κάτω προσδέτη και (III) συναρμολόγηση των επιμέρους συστατικών για τη δημιουργία της βιταμίνης (Raux et al., 2000).

Στάδιο I: σύνθεση κορρινικού πυρήνα

Ο κορρινικός πυρήνας όπως αναφέρθηκε αποτελείται από τέσσερις πυρρολικούς δακτύλιους. Η σύνθεση του τετραπυρρολικού δακτυλίου ξεκινά από το δ-aminolevulinate (ALA), το οποίο μπορεί να παραχθεί μέσω της C₄ ή της C₅ οδού (Raux et al., 2000). Στο C₄ μονοπάτι το ALA συντίθεται από τη γλυκίνη και το succinyl-CoA με τη δράση του ενζύμου ALA synthase (EC 2.3.1.37), ενώ στο C₅ μονοπάτι το ALA συντίθεται από το σκελετό του γλουταμινικού οξέος (Fang et al., 2017). Στη συνέχεια, δύο μόρια ALA συμπυκνώνονται για να δημιουργήσουν το πρώτο δομικό στοιχείο του πυρρολικού δακτυλίου, το prothobilinogen (PBG). Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η ALA dehydratase (ALAD, EC 4.2.1.24). Το επόμενο ένζυμο είναι η PBG deaminase (PBGD, EC 4.3.1.8), η οποία πολυμερίζει τέσσερα μόρια PBG σε ένα γραμμικό τετραπυρρολικό μόριο, το preuro-porphyrinogen. Το τελευταίο ένζυμο στη σύνθεση του τετραπυρρολίου είναι η uroporphyrinogen III synthase (EC 4.2.1.75), η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση του μακροκυκλικού μορίου uroporphyrinogen III (Fang et al., 2017). Η αποκαρβοξυλίωση του uroporphyrinogen III οδηγεί στην παραγωγή των μορίων της αίμης και της χλωροφύλλης. Όμως, η μεθυλίωση του uroporphyrinogen III στους άνθρακες C-2 και C-7 οδηγεί στη σύνθεση της precorrin-2 (Martens et al., 2002). Ο αριθμός αναφέρεται στον αριθμό των μεθυλομάδων που προστέθηκαν στην περιφέρεια του τετραπυρρολικού κύκλου (Moore et al., 2012). Οι μεθυλομάδες που προστίθεται στο τετραπυρρολικό ενδιάμεσο προέρχονται από την SAM με τη δράση της uroporphyrinogen III methyltransferase (EC 2.1.1.107) (Raux et al., 1997). Αρχικά, το ένζυμο μεθυλιώνει το uroporphyrinogen III στον άνθρακα C2 παράγοντας την precorrin-1 και εν συνεχεία μεθυλιώνει το μόριο στον άνθρακα C7 παράγοντας την precorrin-2. Στο σημείο της precorrin-2 οι δύο οδοί βιοσύνθεσης της βιταμίνης αποκλίνουν (Raux et al., 2000).

Στο **αναερόβιο μονοπάτι (Εικόνα 8)** η precorrin-2 οξειδώνεται σε παράγοντα II από το ένζυμο CysG και εν συνεχεία ενσωματώνεται το άτομο κοβαλτίου (Co) είτε από το ένζυμο CbiK είτε από το ένζυμο CbiX σχηματίζοντας τον Co-παράγοντα II. Εξαιτίας της πρώιμης ενσωμάτωσης του Co η πλειοψηφία των ενδιάμεσων προϊόντων αυτής της οδού είναι Co-συμπλέγματα (Martens et al., 2002). Έπειτα μεθυλιώνεται ο παράγοντας II από το ένζυμο CbiL και σχηματίζεται ο Co-παράγοντας III (Raux et al., 2000). Ακολουθώντας δρα το ένζυμο CbiH με αποτέλεσμα τη μεθυλίωση στον άνθρακα C-17 και την εξώθηση της μεθυλιώμενης θέσης C-20 μεταξύ των δακτυλίων A και D, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός δακτυλίου δ-λακτόνης και παραγωγή της Co(II)-precorrinn-4. Το επόμενο βήμα συνιστά η μεθυλίωση του C-11 από το ένζυμο CbiF για την παραγωγή της Co-precorrinn-5A (Moore et al., 2013). Το ένζυμο CbiG καταλύει το άνοιγμα του δακτυλίου της δ-λακτόνης με αποτέλεσμα το σχηματισμό της Co-precorrinn-5B και την απελευθέρωση του C-2 ως ακεταλδεύδη. Το ένζυμο CbiD καταλύει τη μεθυλίωση του μορίου στον C-1 για την παραγωγή της precorrinn-6A (Moore et al.,

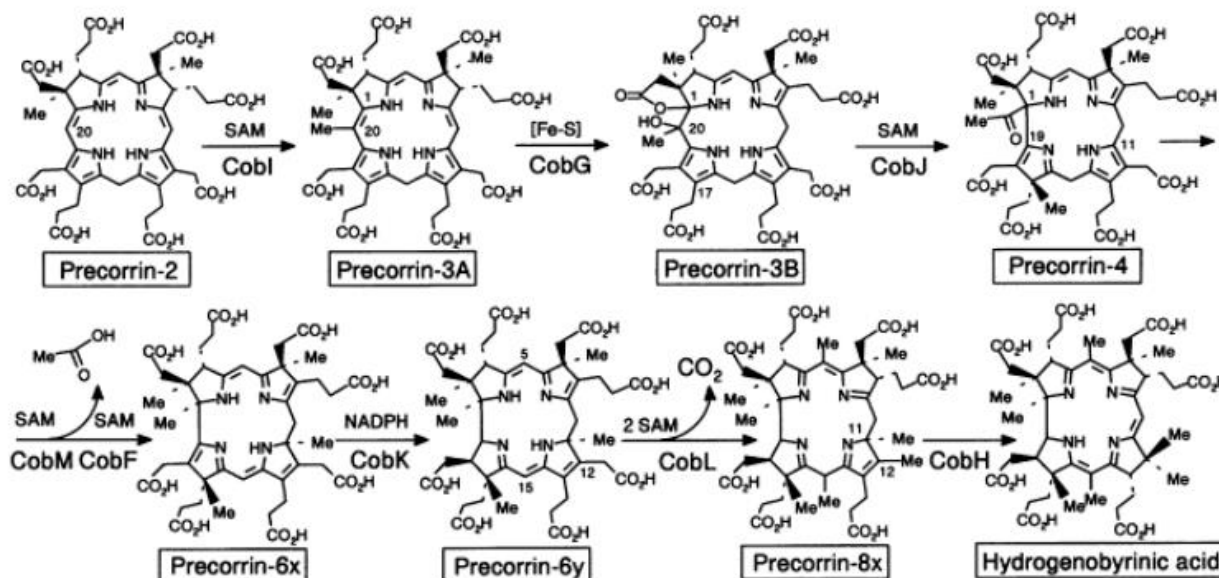
2012). Οι επόμενες αντιδράσεις και τα ενδιάμεσα προϊόντα που θα οδηγήσουν στο σχηματισμό του cobyrinic acid δεν έχουν χαρακτηριστεί. Ωστόσο, τα ένζυμα CbiJ, CbiE, CbiT, CbiC είναι ομόλογα με τα ένζυμα του αερόβιου μονοπατιού που είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή της precorrin-6 σε hydrogenobyrrinic acid πιστεύεται ότι συμμετέχουν στις αντιδράσεις μεθυλίωσης. Εν τέλει σχηματίζεται το cobyrinic acid από τα ένζυμα CbiA και CbiP (Moore et al., 2012). Αρχικά, το CbiA που είναι ομόλογο του CobB, καταλύει την αμιδίωση των πλευρικών αλυσίδων οξικού οξέος των δακτυλίων A και B του cobyrinic acid για να σχηματιστεί το cob(ii)yrinic acid a,c-diamide, το οποίο ανάγεται σε cob(i)yrinic acid a,c-diamide, δύο μόρια γλουταμίνης απαιτούνται ως δότες αμιδομάδων. Στη συνέχεια, το μόριο αδενοσυλιώνεται από το ένζυμο CobA για την παραγωγή του adenosylcobyrinic acid a,c-diamide. Το ένζυμο CbiP ομόλογο του COBQ πραγματοποιεί τέσσερις αντιδράσεις αμιδίωσης στο ενδιάμεσο μόριο με αποτέλεσμα την παραγωγή του AdoCby (Moore et al., 2012 & Roessner et al., 2005).



Εικόνα 8. Το αναερόβιο μονοπάτι βιοσύνθεσης (Moore et al., 2012)

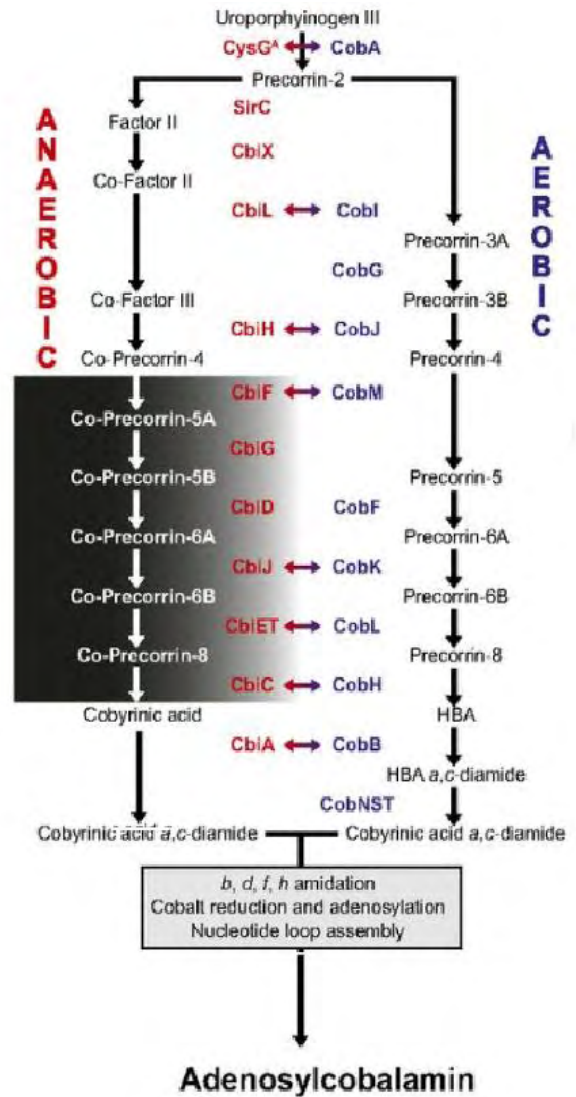
Στο **αερόβιο μονοπάτι** (Εικόνα 9) πραγματοποιούνται οκτώ προσθήκες μεθυλομάδων οι οποίες προέρχονται από τη SAM. Αρχικά προστίθεται μια μεθυλομάδα στον άνθρακα C-20 της precorrin-2 από το ένζυμο CobI με αποτέλεσμα την παραγωγή της precorrin-3A. Στη συνέχεια, η CobG, μια μονοξυγενάση, οδηγεί στην παραγωγή της precorrin-3B, η οποία φέρει υδροξυλομάδα στον άνθρακα C-20 και σχηματίζει μια γ-λακτόνη μεταξύ των ατόμων άνθρακα C-1 και C-2. Κατόπιν το μόριο υφίσταται ring contraction από τη μεθυλοτρανσφεράση CobJ, η οποία μεταφέρει μια μεθυλομάδα στη θέση του άνθρακα C-17 σχηματίζοντας την precorrin-4 και η μεθυλωμένη θέση C-20 απομακρύνεται ως οξικό οξύ (Moore et al., 2012). Η μεθυλοτρανσφεράση CobM καταλύει την αντίδραση μεθυλίωσης στη θέση C-11 παράγοντας το ενδιάμεσο προϊόν της precorrin-5, το οποίο δεν φέρει πλέον την ακετυλομάδα, που θα μεθυλωθεί στη θέση C-1 από το ένζυμο CobF οδηγώντας στην precorrin-6A (Raux et al., 2000). Ακολουθεί η παραγωγή της precorrin-6B από το ένζυμο CobK, μια NADH-εξαρτώμενη ρεδοκτάση. Έπειτα, το ένζυμο CobL μεθυλιώνει την precorrin-6B στις θέσεις C-5 και C-15 και αποκαρβοξυλιώνει τον C-12 ώστε να σχηματιστεί η

precorrin-8 (Debussche et al., 1993). Ακολούθως η precorrin-8 από τη δράση του ενζύμου CobH θα υποστεί μια ενδομοριακή μετακίνηση της μεθυλομάδας από τον C-11 στον C-12 με αποτέλεσμα την παραγωγή του hydrogenobyrrinic acid, την πιο απλή ένωση με κορρινικό πυρήνα (Debussche et al., 1993). Με τη δράση του ενζύμου CobB θα προστεθούν δυο αμιδικές ομάδες που προέρχονται από τη γλουταμίνη ώστε να σχηματιστεί το hydrogenobyrrinic acid a,c-diamide, το οποίο μέσω του συμπλόκου της Co-chelatase CobNST και ταυτόχρονη κατανάλωση ATP, θα μετασχηματιστεί σε cob(ii)yrinic acid a, c-diamide (Raux et al., 2000 & Moore et al., 2012).



Εικόνα 9. Το αερόβιο μονοπάτι βιοσύνθεσης (Debussche et al., 1993)

Στο σημείο του cob(ii)yrinic acid a,c-diamide οι δύο οδοί, αερόβιος και αναερόβιος, συγκλίνουν. Το μόριο ανάγεται σε cob(i)yrinic acid a,c-diamide από τη ρεδοκτάση CobR. Ακολουθεί αδενσυλίωση από το ένζυμο CobO για το σχηματισμό του adenosylcobyrinic acid a,c-diamide. Τέλος, το ένζυμο CobQ θα καταλύσει την προσθήκη αμιδικών ομάδων που προέρχονται από τη γλουταμίνη για το σχηματισμό του AdoCby (Raux et al., 2000).

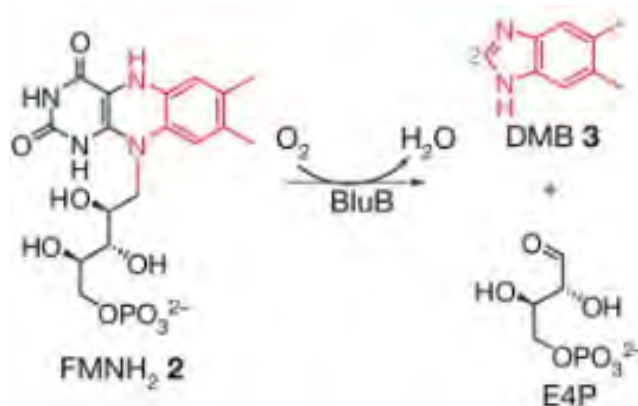


Εικόνα 10. Σύνοψη του αερόβιου και ανερόβιου μονοπατιού βιοσύνθεσης (Moore et al., 2013)

Στάδιο II: σύνθεση του κάτω προσδέτη

Στην **αερόβια οδό** η σύνθεση του DMB καταλύεται από το BluB, ένα ένζυμο που παρουσιάζει ομοιότητα με τις φλαβινο-οξειδο-ρεδουκτάσες και έχει λειτουργική συνάφεια με τις μονο-οξυγενάσες (Taga et al., 2007). Το BluB χρησιμοποιεί το FMNH₂ για τη σύνθεση του DMB με ταυτόχρονη απελευθέρωση της αλυσίδας ribityl ως 3-φωσφορική-D-γλυκεραλδεϋδη (GA3P) και CO₂ ή ως 4-φωσφορική-D-ερυθρόζη (E4P) (Taga et al., 2007) (Εικόνα 11). Στην ενεργοποίηση του κάτω προσδέτη εμπλέκεται η phosphoribosyltransferase CobT (EC 2.7.8.26) (Escalente-Semerena, 2007). Στην περίπτωση που η CobT αξιοποιεί ως υποστρώματα τα NAD⁺ και DMB παράγεται α-5,6-dimethyl benzimidazole adenine dinucleotide (α-DAD), το οποίο θα διασπαστεί από μια υδρολάση. Αλλά όταν τα υποστρώματα της CobT είναι το NAMN και το DMB, τότε παράγεται το α-DMB-ribose-5'-phosphate (α-RP), το οποίο αποφωσφορυλιώνεται από τη φωσφατάση CobC (EC 3.1.3.73) σε α-ribazole (α-R) (Hazra et al., 2013 & Zayas and Escalente-Semerena, 2007). Το (R)-1-amino-2-propanol-O-2-phosphate ενσωματώνεται απευθείας στο δακτύλιο μέσω των πρωτεϊνών α και β. Η αμινοπροπανόλη προστίθεται στο cobyrinic acid καθώς αποτελεί τον συνδέτη του DMB με τον κορρινικό δακτύλιο (Roth et al., 1993). Η πρωτεΐνη α μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστη και η πρωτεΐνη β είναι σύμπλοκο των CobC και CobD. Το μόριο στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται από το

ένζυμο CobP, το οποίο είναι ένζυμο διπλής λειτουργίας, καθώς κατέχει τη δράση ATP κινάσης και GTP γουάνυλοτρανσφεράσης. Δύο επιπλέον αντιδράσεις θα μεταφέρουν τον κάτω συνδέτη στην adenosylcobalamin-GTP, παράγοντας την adenosylcobalamin (Fang et al., 2017).



Εικόνα 11. Παραγωγή του DMB από το ένζυμο BluB (Taga et al., 2007)

Στο **αναερόβιο μονοπάτι** ο νουκλεοτιδικός βρόγχος μεταξύ του κορρινικού πυρήνα και του κάτω προσδέτη είναι φωσφορυλιωμένος πριν την προσκόληση του κορρινικού δακτυλίου (Fang et al., 2017 & Hazra et al., 2015). Η L-threonine φωσφορυλιώνεται σε L-threonine-O-3-phosphate με ταυτόχρονη κατανάλωση ATP από το ένζυμο PduX, την L-threonine kinase (Fan & Bobik, 2008). Ακολουθεί αποκαρβοξυλίωση του ενδιάμεσου προϊόντος από το ένζυμο CobD για τη παραγωγή του (R)-1-amino-2-propanol-O-2-phosphate (AP-P). Το AP-P αποτελεί υπόστρωμα για το ένζυμο CbiB, το οποίο ευθύνεται για τη μετατροπή του AdoCby σε adenosylcobinamide (AdoCbi) και στη συνέχεια μέσω του ενζύμου CobU σε AdoCbi-phosphate (Fang et al., 2017). Η AdoCbi μετατρέπεται μέσω δύο αντιδράσεων σε AdoCbi-GDP από το ένζυμο CobU που έχει διπλή δράση AdoCbi kinase (EC 2.7.7.62) και γουάνυλ-τρανσφεράσης (EC 2.7.1.156). Το AdoCby ακολουθεί διαφορετική οδό, καθώς μετατρέπεται σε AdoCbi-phosphate (AdoCbi-P) από το ένζυμο CbiB, AdoCbi-P synthase και τελικά μετασχηματίζεται σε AdoCbi-GDP από το ένζυμο CobU (Zayas & Escalante-Semerena 2007).

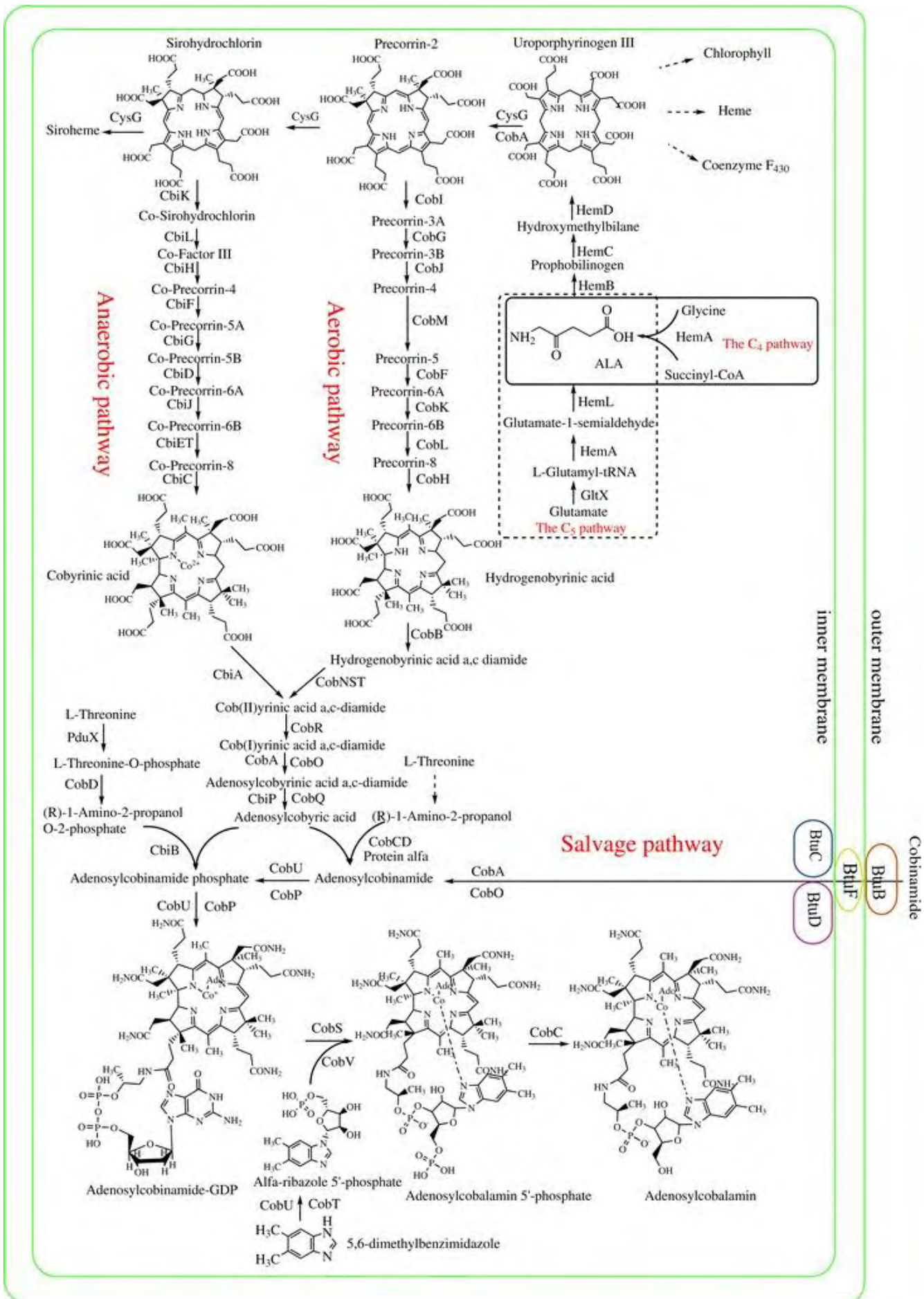
Στη συνέχεια πραγματοποιείται η σύνθεση της adenosylcobalamin (AdoCbl) μέσω δύο εναλλακτικών. Η μία άποψη αφορά τη δράση της cobalamin synthase για την προσθήκη του α-ribose, το οποίο προέρχεται από το DMB. Η άλλη εναλλακτική αφορά στη προσθήκη του α-ribose 5'-phosphate στην AdoCbi-GDP και έτσι η τελευταία αντίδραση είναι η αποφωσφορυλίωση της AdoCbi-5'-phosphate σε AdoCbl από τη AdoCbi-5'-phosphate (AdoCbi-5'-P) phosphatase (CobC) (Fang et al., 2017).

Στάδιο III: συναρμολόγηση

Στο τελευταίο στάδιο τα επιμέρους συστατικά συναρμολογούνται ώστε να σχηματιστεί η βιταμίνη B₁₂. Η AdoCbl -5'-P synthase (CobS) καταλύει την αντίδραση ένωσης των AdoCbi-GDP και α-RP για την παραγωγή της AdoCbl -5'-P. Τέλος η AdoCbl -5'-P αποφωσφορυλιώνεται από το ένζυμο CobC (Campbell et al., 2005).

Μονοπάτι Διάσωσης B_{12} (Salvage pathway)

Το μονοπάτι της διάσωσης της B_{12} για τα βακτήρια είναι λιγότερο ενεργοβόρο όσον αφορά τη βιοσύνθεση της κοβαλαμίνης. Σε αυτή την οδό εξωγενείς ενώσεις κορρινοειδών, όπως cobinamide και cobyrinic acid, μεταφέρονται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω ειδικού συστήματος μεταφοράς που αποτελείται από τις πρωτεΐνες BtuB, BtuC, BtuD και BtuF. Η BtuB είναι μια πρωτεΐνη μεταφορέας που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη και μεταφέρει τα κορρινοειδή στην περιπλασματική πρωτεΐνη δέσμευσης BtuF, η οποία μεταφέρει τα κορρινοειδή στον ABC μεταφορέα, BtuCD στην εσωτερική μεμβράνη. Ακολουθεί αδενοσυλίωση των κορρινοειδών από το ένζυμο CobA με παράλληλη κατανάλωση ATP για την παραγωγή αδενοσυλιωμένων προϊόντων που εισέρχονται σε διαφορετικά στάδια στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της βιταμίνης B_{12} . Η AdoCbl που θα παραχθεί συνιστά υπόστρωμα για το ένζυμο CobU του αναερόβιου μονοπατιού, όπως και για το ομόλογο ένζυμο CobP του αερόβιου μονοπατιού (Zayas & Escalente-Semerena, 2007 & Fang et al., 2017) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σύνοψη βιοσύνθεσης της βιταμίνης B₁₂
(Fang et al., 2017)

1.3.4. Ρύθμιση της οδού βιοσύνθεσης της Βιταμίνης B₁₂

Η βιταμίνη B₁₂ καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της (Vitreschak et al., 2003). Η κοβαλαμίνη, όπως η αίμη και η βακτηριοχλωροφύλλη, ανήκουν στην οικογένεια των τετραπυρρολικών ενώσεων. Συνεπώς στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της βιταμίνης B₁₂ συμμετέχουν και αυτές οι ενώσεις καθώς χαρακτηρίζονται από δυναμική και πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ τους (Fang et al., 2017). Οι μεθυλοτρανσφεράσες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του κορρινικού δακτυλίου χρησιμοποιούν την SAM ως δότη μεθυλομάδων. Η SAM μετατρέπεται σε SAH, η οποία είναι ισχυρός αναστολέας αυτών των ενζύμων (Raux et al., 2000). Πολύ σημαντικός ρυθμιστής είναι το B12-στοιχείο, το οποίο εμπλέκεται στη ρύθμιση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της βιταμίνης B₁₂ αλλά και στη μεταφορά της. Πρόκειται για ένα συντηρημένο στοιχείο RNA σε επίπεδο αλληλουχίας και δομής, που περιλαμβάνει το μοτίβο του B12-box, όπως επίσης συντηρημένες έλικες και εκτεταμένες περιοχές, που είναι απαραίτητες για τη δέσμευση συγκεκριμένων μεταβολιτών. Είναι ευρέως διαδεδομένο στα βακτηριακά γονιδιώματα, εντοπίζεται ανοδικά των γονιδίων στις 5'-UTRs και ρυθμίζει την έκφραση σε επίπεδο μεταγραφής ή μετάφρασης. Στα gram θετικά βακτήρια η ρύθμιση πραγματοποιείται σε επίπεδο μεταγραφής καθώς σχηματίζεται φουρκέτα τερματισμού, ενώ στα gram αρνητικά βακτήρια η ρύθμιση πραγματοποιείται σε μεταφραστικό επίπεδο, αφού σχηματίζονται φουρκέτες επικάλυψης στη θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (RBS). Ένα επιπλέον ρυθμιστικό στοιχείο είναι ο ενισχυτής που βρίσκεται μεταξύ του στοιχείου B12 και της ανασταλτικής φουρκέτας. Κατά την απουσία της κοβαλαμίνης οδηγεί στην έναρξη της μετάφρασης αντιθέτως κατά την παρουσία της κοβαλαμίνης καταστέλλει τη διαδικασία (Vitreschak et al., 2003).

1.4. Γονιδιωματική ανάλυση των μονοπατιών βιοσύνθεσης μεθειονίνης και βιταμίνης B₁₂ στο στέλεχος *S. haloaromaticamans*

Γονιδιωματική ανάλυση (Perruchon et al., 2017) και πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος απέδειξαν πως το βακτήριο *S. haloaromaticamans* είναι αυξοτροφικό ως προς τη μεθειονίνη παρα το ότι το βιοσυνθετικό μονοπάτι της μεθειονίνης καλύπτει τις ελάχιστες ανάγκες βιοσύνθεσης του συγκεκριμένου αμινοξέος καθώς περιλαμβάνει τα γονίδια *metA*, *metB*, *metC* και *metH*. Το βακτήριο δεν διαθέτει τα γονίδια που κωδικοποιούν την μη εξαρτώμενη της βιταμίνης B₁₂ συνθάση της μεθειονίνης (*metE*) καταδεικνύοντας ότι η βιοσύνθεση της μεθειονίνης απαιτεί την παρουσία της βιταμίνης B₁₂.

Όσον αφορά το βιοσυνθετικό μονοπάτι της βιταμίνης B₁₂ η γονιδιωματική ανάλυση έδειξε ότι από το γονιδίωμα του βακτηρίου λείπουν τα γονίδια για τη αερόβια σύνθεση του κορρινοειδή πυρρήνα. Κατά συνέπεια η βιοσύνθεση της βιταμίνης B₁₂ από το βακτήριο *S. haloaromaticamans* δεν είναι δυνατή *de novo*.

1.5 Σκοπός της Εργασίας

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα οδηγούμαστε στο σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας που είναι η μελέτη της επίδρασης της βιταμίνης B₁₂ στον αυξοτροφισμό του βακτηρίου στη μεθειονίνη και αν ο αυξοτροφισμός αυτός συνδέεται άμεσα με την ικανότητα του βακτηρίου να αποδομεί το OPP.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βακτηριακό Στέλεχος

Το βακτηριακό στέλεχος *Sphingomonas haloaromaticamans* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε από περιοχή απόρριψης αποβλήτων εγκατάστασης συσκευασίας φρούτων στην Αγιά, Λάρισα (Perruchon et al., 2015). Για την ανάπτυξη των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο MSMN με σύσταση: K_2HPO_4 22.7 g/l, Na_2HPO_4 (12H₂O) 59.7g/l, NH_4CL 10 g/l, Mg_2SO_4 (7H₂O) 2.44 g/l, $CaCl_2$ (2H₂O) 0.1g/l, $MnSO_4$ (4H₂O) 0.15 g/l, $FeSO_4$ (7H₂O) 0.46 g/l και εμπλουτισμένο με το μυκητοκτόνο OPP σε διάφορες συγκεντρώσεις. Στο συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο το μυκητοκτόνο αποτελούσε τη μοναδική πηγή C.

2.2 Πείραμα 1

Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε εάν ο αυξοτροφισμός που εμφάνιζε το στέλεχος *S. haloaromaticamans* στην μεθειονίνη είναι εξαρτώμενος με τη βιταμίνη B₁₂ ή το κοβάλτιο, που αποτελεί δομικό συστατικό της βιταμίνης B₁₂. Επίσης εξετάστηκε εάν η μεθειονίνη ή η βιταμίνη B₁₂ χρησιμοποιείται από το βακτήριο ως πηγή C. Στην περίπτωση αυτή η προσθήκη γλυκόζης θα προκαλούσε ανάσχεση του αυξοτροφισμού. Έτσι στο παρόν πείραμα προετοιμάστηκαν οι μεταχειρίσεις που περιγράφονται στον Πίνακα 3. Για την προετοιμασία των παρακάτω μεταχειρίσεων προετοιμάστηκαν διαλύματα γλυκόζης (20%), βιταμίνης B₁₂ (100 mg/L), μεθειονίνης (2000 mg/L) και κοβαλτίου (10 mg/L) σε νερό, τα οποία αποστειρώθηκαν μέσω διήθησης με φίλτρο σύριγγας. Κατάλληλες ποσότητες από τα παραπάνω διαλύματα προστέθηκαν σε θρεπτικό μέσο MSMN (15 mL) + OPP (25 mg/L) ώστε να πάρουμε στις αντίστοιχες μεταχειρίσεις συγκεντρώσεις γλυκόζης 0,1%, βιταμίνης B₁₂ 0.025 mg/l, μεθειονίνης 3.6 mg/L και κοβαλτίου 0.1 mg/L. Τρεις φλάσκες από κάθε μεταχείριση εμβολιάστηκαν με 0,75 mL από καλλιέργεια του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* βρισκόμενη στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Αντίστοιχα για κάθε μεταχείριση προετοιμάστηκαν και δυο φλάσκες μάρτυρες που δεν εμβολιάστηκαν με το βακτήριο ώστε να παρακολουθήσουμε την αβιοτική διάσπαση του OPP. Οι φλάσκες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα σε συνθήκες 26°C, 160 rpm στο σκοτάδι.

Πίνακας 3. Οι μεταχειρίσεις που μελετήθηκαν στο πείραμα 1

MSMN + OPP + Γλυκόζη
MSMN + OPP + B ₁₂
MSMN + OPP + Κοβάλτιο
MSMN + OPP + Μεθειονίνη + Γλυκόζη
MSMN + OPP + Μεθειονίνη

Αμέσως μετά την έναρξη του πειράματος και σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά τον εμβολιασμό, δείγματα από τις καλλιέργειες απομακρύνονταν και χρησιμοποιούνταν για ανάλυση της συγκέντρωσης του OPP σε σύστημα HPLC όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.3. Πείραμα 2

Σε δεύτερο πείραμα μελετήθηκε εάν και κατά πόσο η προσθήκη ενδιάμεσων προϊόντων του μονοπατιού βιοσύνθεσης της μεθειονίνης μπορούν να προκαλέσουν ανάσχεση του αυξοτροφισμού του βακτηρίου στην μεθειονίνη σε σχέση με την προσθήκη βιταμίνης B₁₂. Έτσι στο παρόν πείραμα προετοιμάστηκαν οι μεταχειρίσεις που περιγράφονται στον Πίνακα 4. Αρχικά προετοιμάστηκαν υδατικά διαλύματα των ενδιάμεσων προϊόντων της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης, homoserine (16,7 mM), O-succinylhomoserine (9.12 mM), cystathionine (8.99 mM), homocysteine (14.8 mM) καθώς και μεθειονίνης (13.4 mM) και βιταμίνης B₁₂ (7.4 mM), τα οποία αποστειρώθηκαν μέσω φίλτρου σύριγγας. Κατάλληλες ποσότητες από τα παραπάνω διαλύματα προστέθηκαν σε θρεπτικό μέσο MSMN (40 ml) + OPP (25 mg/l) ώστε να πάρουμε στις αντίστοιχες μεταχειρίσεις συγκεντρώσεις βιταμίνης B₁₂, μεθειονίνης, homoserine, O-succinyl-homoserine, cystathionine και homocysteine 0.05 mM. Τρεις φλάσκες από κάθε μεταχείριση εμβολιάστηκαν με 2 mL από καλλιέργεια του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* βρισκόμενη στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Αντίστοιχα για κάθε μεταχείριση προετοιμάστηκαν και δύο φλάσκες μάρτυρες που δεν εμβολιάστηκαν με το βακτήριο ώστε να παρακολουθήσουμε την αβιοτική διάσπαση του OPP. Οι φλάσκες τοποθετήθηκαν σε επωαστήριο σε συνθήκες 26°C, 160rpm στο σκοτάδι.

Πίνακας 4. Οι μεταχειρίσεις που μελετήθηκαν στο πείραμα 2

MSMN + OPP + Μεθειονίνη
MSMN + OPP + B ₁₂
MSMN + OPP
MSMN + OPP + Homoserine
MSMN + OPP + O -succinyl-homoserine
MSMN + OPP + Cystathionine
MSMN + OPP + Homocysteine
MSMN + OPP + Homocysteine + B ₁₂

Αμέσως μετά την έναρξη του πειράματος και σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά τον εμβολιασμό δείγματα από τις καλλιέργειες απομακρύνονταν και χρησιμοποιούνταν για ανάλυση της συγκέντρωσης του OPP σε σύστημα HPLC όπως περιγράφεται παρακάτω. Πέραν των παραπάνω σε τακτά χρονικά διαστήματα (1, 3, 4 και 7 ημέρες) απομακρύνονταν 4 ml από τις εμβολιασμένες καλλιέργειες των διαφόρων μεταχειρίσεων τα οποία αφού φυγοκεντρήθηκαν σε μέγιστη ταχύτητα για 2 min χρησιμοποιήθηκαν για την συλλογή βακτηριακής βιομάζας. Τα συγκεκριμένα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για εξαγωγή RNA και μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση της μεθειονίνης στις διάφορες μεταχειρίσεις.

2.4. Ανάλυση υπολειμμάτων OPP σε σύστημα HPLC

Για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του OPP στο θρεπτικό μέσο ώστε να παρακολουθηθεί η πορεία διάσπασης του μυκητοκτόνου χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC-UV-VIS (Marathon III; RigasLabs, Athens, Greece) με στήλη CNW Athena RPC18 (CNW Technologies, Düsseldorf, Germany). Σε κάθε χρονικό σημείο λαμβάνονταν 0.2 ml από τις καλλιέργειες και αναμιγνύονταν με 0.4 ml μεθανόλη (HPLC grade). Τα δείγματα αναδεύονταν έντονα σε vortex για 1 min και στην συνέχεια ακολουθούσε φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 1 min. Ακολούθως το εκχύλισμα χρησιμοποιούνταν για έγχυση στο HPLC. Η ανίχνευση του OPP πραγματοποιήθηκε στα 254 nm με

χρόνο κατακράτησης 3.3 min με κινητή φάση 39%ACN:60,5% H_2O :0,5% NH_3 (κ.ο.) και ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 1 ml/min.

2.5. Απομόνωση RNA και RT-q-PCR

Η απομόνωση του RNA από το βακτηριακό ίζημα που συλλέχθηκε στις διάφορες μεταχειρίσεις πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit NucleospinRNA της Machery–Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για να διαπιστωθεί εάν τα δείγματα RNA φέρουν επιμόλυνση DNA πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA με τους εκκινητές 63f-1087r (ca. 1000 bp) και ηλεκτροφόρηση. Η αλληλουχία του εμπρόσθιου εκκινητή (63f) ήταν 5'-AGGCCTAACACATGCAAGTC-3' και του οπίσθιου εκκινητή (1087r) ήταν 5'-CTCGTTGCGGGACTTAACCC-3' (Marchesi et al., 1998 & Hauben et al., 1997). Ο συνολικός όγκος αντίδρασης της PCR ήταν 25 μ L. Τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον Πίνακα 5 και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης στον Πίνακα 6. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 1,2%. Τα δείγματα τα οποία περιείχαν DNA υπέστησαν επεξεργασία με DNaseI (ThermoScientific) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ακολούθως επαναλήφθηκε PCR ώστε να διαπιστωθεί πως το RNA ήταν ελεύθερο επιμόλυνσης με DNA. Τα καθαρά πλέον δείγματα RNA χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση cDNA με την χρήση random hexamers και του εμπορικού kit της Takara PrimeScript™ Reagent Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της PCR ελέγχου για μόλυνση DNA

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Όγκος (μ l)	Τελική συγκέντρωση
H_2O		19,9	
Buffer $MgCl_2$	10X	2,5	1X
dNTPS	10mM	0,5	200 μ M
Εμπρόσθιος εκκινητής (63f)	20 μ M	0,5	0,4 μ M
Οπίσθιος εκκινητής (1087r)	20 μ M	0,5	0,4 μ M
DNA		1	
Kapa taq πολυμεράση	5U/ μ L	0,1	1U/50 μ L
Συνολικός όγκος		25	

Πίνακας 6. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της PCR

Θερμοκρασία	Χρόνος
95°C	5 min
95 °C	30 sec
55 °C	30sec
72 °C	1min
72 °C	10 min

} 35 κύκλοι

Για την παρακολούθηση της έκφρασης των γονιδίων *metA*, *metB*, *metC*, *metH1* πραγματοποιήθηκε RT-q-PCR με τους εκκινητές που περιγράφονται στον Πίνακα 7. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση ενός μικρού τμήματος γονιδίου (200-250 bp) κατάλληλο για ανάλυση RT-q-PCR. Αρχικά οι αλληλουχίες των εκκινητών αναλύθηκαν με το πρόγραμμα PrimerSelect™ (Lasergene®, DNASTAR) για τυχόν δευτερογενείς δομές όπως φουρκέτες και διμερή

μεταξύ των εκκινήτων. Η εξειδίκευση των εκκινήτων που προετοιμάστηκαν ελέγχθηκε *in silico* μέσω της ηλεκτρονικής πλατφόρμας Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) και το καλύτερο ζευγάρι εκκινήτων επιλέχθηκε.

Πίνακας 7. Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της μεθειονίνης

Γονίδιο	Εμπρόσθιος εκκινήτης	Οπίσθιος εκκινήτης	Μήκος προϊόντος ενίσχυσης (bp)
<i>metA</i>	TCGAGCTCACGCTGGTGC	CAATATGTCGCGCAGTTCATCC	191
<i>metB</i>	ACGGTGGAGATGCTGGAACAG	AGAGCTTGGTGTTCCGGCAGG	265
<i>metC</i>	CTTCGGCCAGCATGTCCG	AGTCGCGCTGCCACAGGTC	194
<i>metH</i>	CGAAGCCTATCTGGATGCC	GACAGCGTCTTGTGGTCCG	216

Τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 5μl 5x SYBR Green PCR MasterMix, 20 pmoles κάθε εκκινήτη, 1 μl cDNA και απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 10μl. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης RT-q-PCR φαίνονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της RT-q-PCR

Θερμοκρασία	Χρόνος	
95°C	3 min	} 40κύκλοι
95 °C	15 sec	
56 °C	20sec	
72 °C	1min	

Για την ανίχνευση ενίσχυσης πιθανών παραπροϊόντων πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την ολοκλήρωση της RT-q-PCR μελέτη της καμπύλης αποδιάταξης. Το γονίδιο *gyrB* χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των επιμέρους γονιδίων.

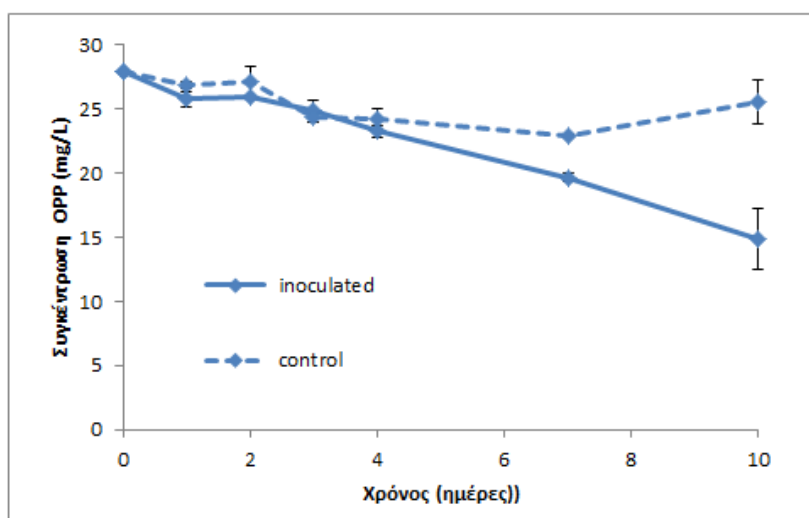
2.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSSv20. Ειδικότερα πραγματοποιήθηκε ανάλυση παραλλακτικότητας δύο μεταβλητών (*two-way-ANOVA*) για την διερεύνηση στατιστικά σημαντικών διαφορών στην έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης της μεθειονίνης ως αναφορά τον χρόνο και τις μεταχειρίσεις.

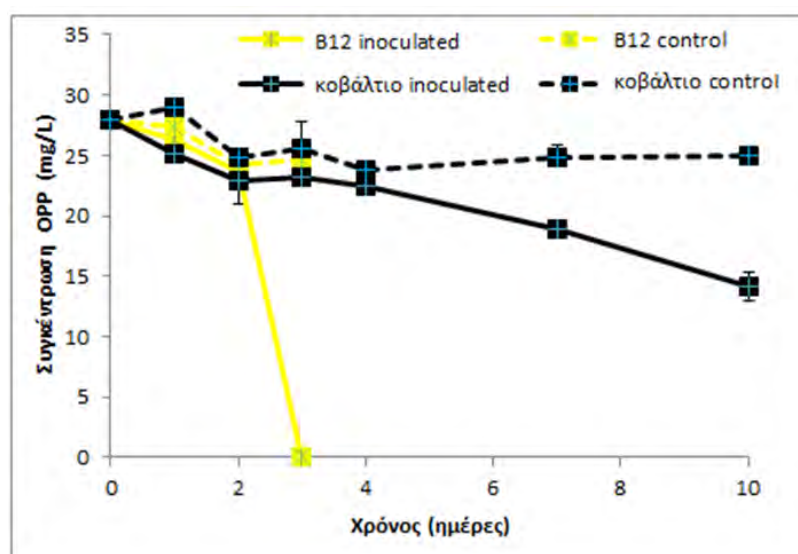
3.Αποτελέσματα

3.1. Πείραμα 1

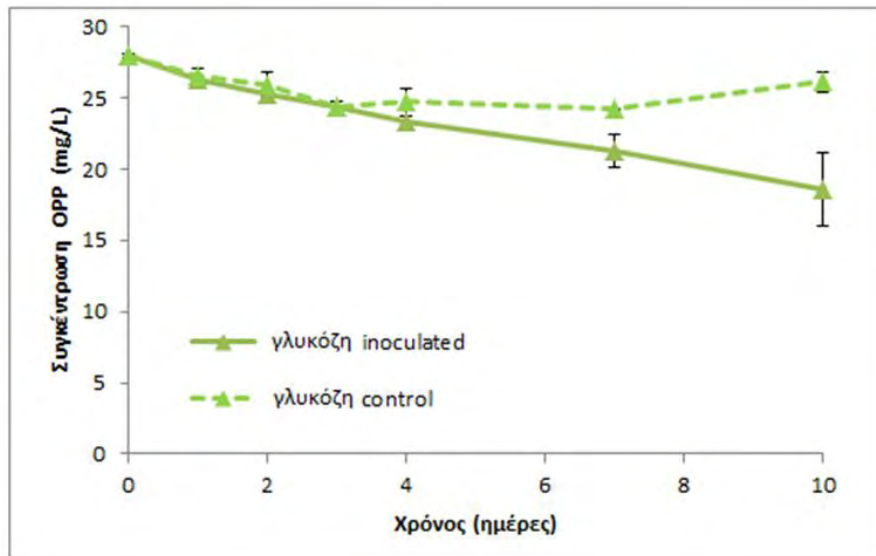
Στο πείραμα αυτό μελετήθηκε η επίδραση των βιταμίνη B₁₂, μεθειονίνη, γλυκόζη και κοβαλτίου στην αποδομητική ικανότητα του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* έναντι του μυκητοκτόνου OPP. Τα πρότυπα αποδόμησης του OPP από το βακτήριο *S. haloaromaticamans* στις υγρές καλλιέργειες παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 1-4. Στα Διαγράμματα 1, 2 και 3 φαίνεται πως η προσθήκη κοβαλτίου και γλυκόζης δεν επηρέασε σημαντικά την αποδόμηση του OPP από το βακτήριο και εμφάνισε πρότυπο ανάλογο με αυτό που παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες του βακτηρίου χωρίς καμία προσθήκη (MSMN + OPP). Αντιθέτως, στις υγρές καλλιέργειες του βακτηρίου που εμπλουτίστηκαν με βιταμίνη B₁₂ παρατηρήθηκε ταχύτατη αποδόμηση του OPP εντός 3 ημερών (Διάγραμμα 2) ανάλογη με αυτή που παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες που εμπλουτίστηκαν με μεθειονίνη ή μεθειονίνη + γλυκόζη (Διάγραμμα 4). Τέλος δεν παρατηρήθηκε σημαντική αβιοτική αποδόμηση σε καμία από τις μεταχειρίσεις - μάρτυρες όπου δεν εμβολιάστηκε το βακτήριο.



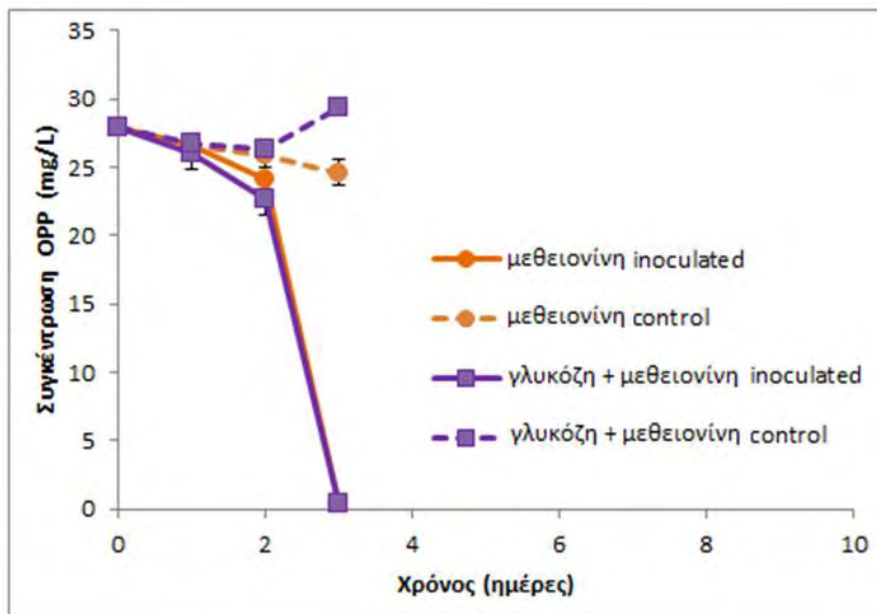
Διάγραμμα 1. Η αποδόμηση του OPP σε MSMN που εμβολιάστηκε (inoculated) ή όχι (control) με το βακτήριο *S. haloaromaticamans*. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων ± την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 2. Η αποδόμηση του OPP σε MSMN + B12 ή κοβάλτιο που εμβολιάστηκε (inoculated) ή όχι (control) με το βακτήριο *S. haloaromaticamans*. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων ± την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3. Η αποδόμηση του OPP σε MSMN + γλυκόζη που εμβολιάστηκε (inoculated) ή όχι (control) με το βακτήριο *S. haloaromaticans*. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων \pm την τυπική απόκλιση.

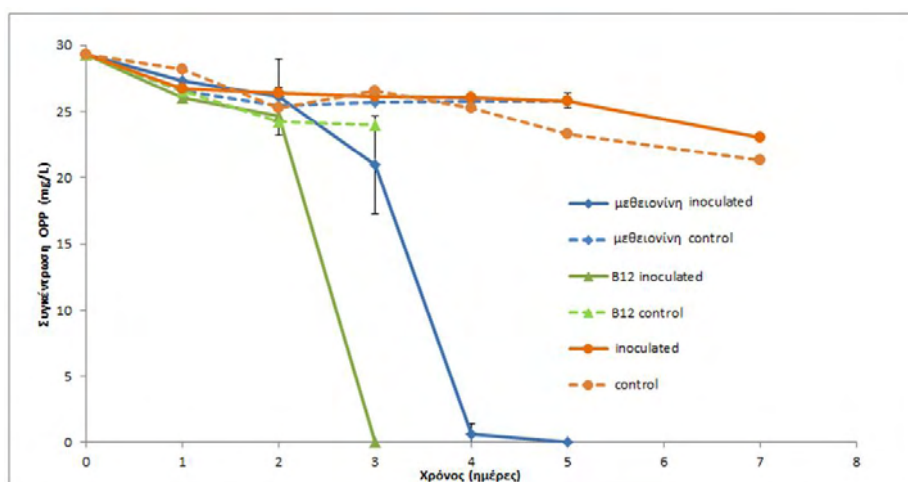


Διάγραμμα 4. Η αποδόμηση του OPP σε MSMN + μεθειονίνη ή γλυκόζη + μεθειονίνη που εμβολιάστηκε (inoculated) ή όχι (control) με το βακτήριο *S. haloaromaticans*. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων \pm την τυπική απόκλιση.

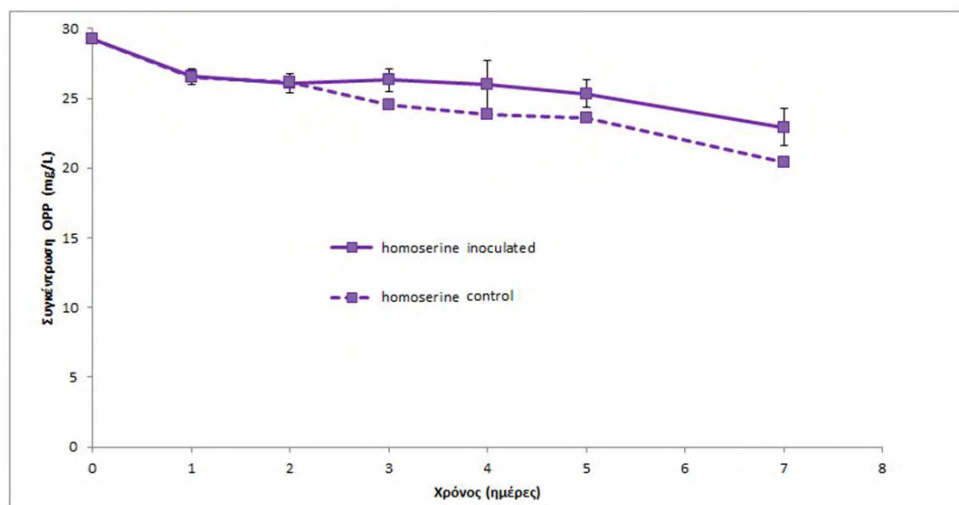
3.2. Πείραμα 2

3.2.1 Αποδόμηση του OPP

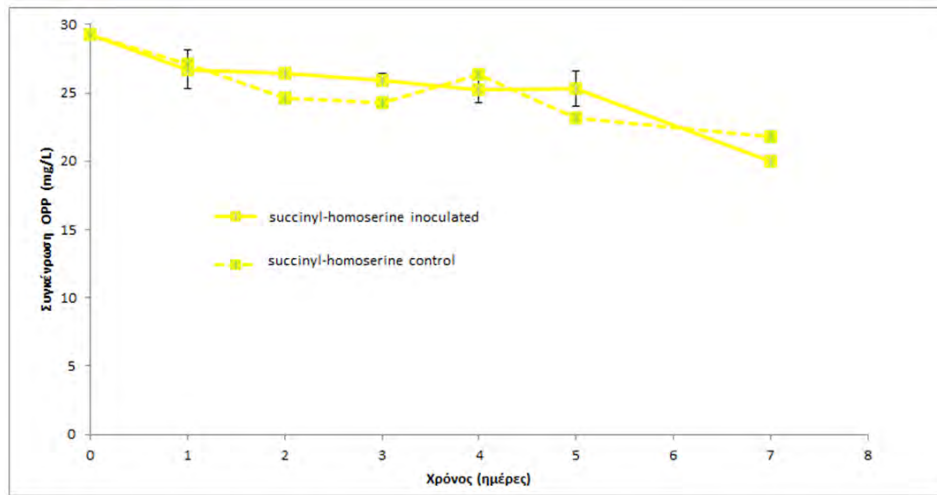
Τα πρότυπα αποδόμησης του OPP από το βακτήριο *S. haloaromaticamans* στις υγρές καλλιέργειες παρουσία των ενδιάμεσων προϊόντων βιοσύνθεσης της μεθειονίνης παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 5-8. Η διάσπαση του OPP ήταν ταχεία στις υγρές καλλιέργειες παρουσία μεθειονίνης ή βιταμίνης B₁₂ και ολοκληρώθηκε σε 4 και 3 ημέρες αντίστοιχα (Διάγραμμα 5). Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση του OPP σε MSMN απουσία μεθειονίνης ή βιταμίνης B₁₂ (Διάγραμμα 5). Τέλος η προσθήκη ενδιάμεσων προϊόντων στην βιοσύνθεση της μεθειονίνης όπως homoserine, succinyl-homoserine, cystathionine αντί μεθειονίνης ή βιταμίνης B₁₂ δεν οδήγησε σε αποδόμηση του OPP (Διαγράμματα 6 - 8). Αντιθέτως στις καλλιέργειες που προστέθηκε εκτός της homocysteine και βιταμίνη B₁₂ παρατηρήθηκε αποτελεσματική αποδόμηση του OPP με ολοκλήρωση της αποδόμησης εντός 7 ημερών (Διάγραμμα 9).



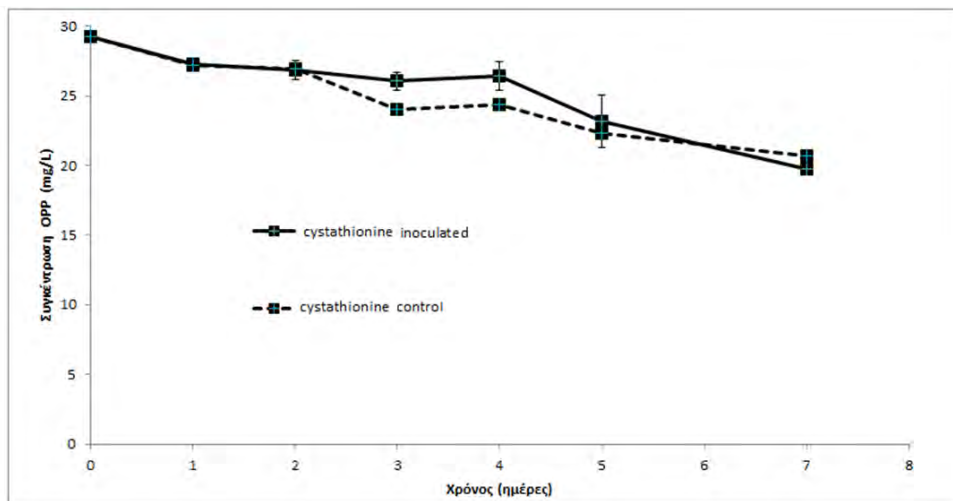
Διάγραμμα 5. Η αποδόμηση του OPP σε θρεπτικό μέσο MSMN παρουσία μεθειονίνης ή βιταμίνης B₁₂ ύστερα από εμβολιασμό (inoculated) ή όχι (control) με το βακτήριο *S. haloaromaticamans*. Παράλληλα παρουσιάζεται η αποδόμηση του OPP σε MSMN χωρίς προσθήκη μεθειονίνης ή βιταμίνης B₁₂. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.



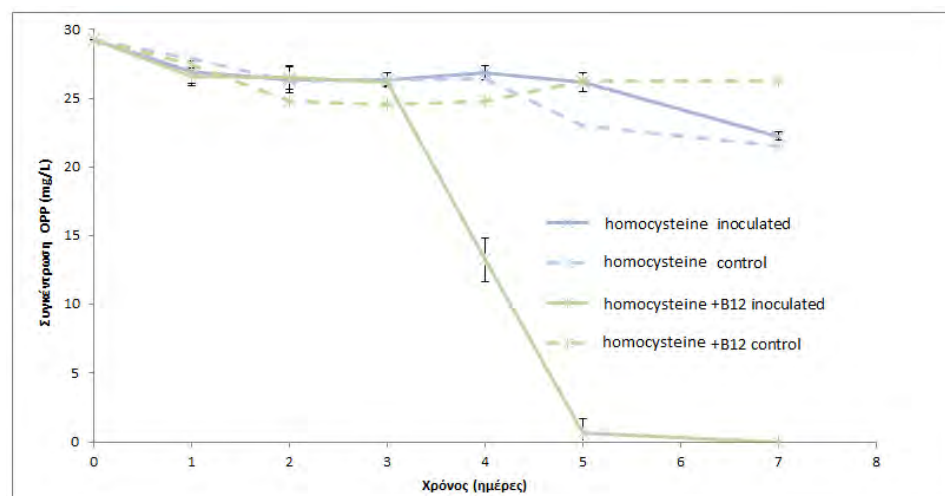
Διάγραμμα 6. Η αποδόμηση του OPP σε θρεπτικό μέσο MSMN παρουσία homoserine ύστερα από εμβολιασμό (inoculated) ή όχι (control) με το βακτήριο *S. haloaromaticamans*. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 7. Η αποδόμηση του OPP σε θρεπτικό μέσο MSMN παρουσία succinyl-homoserine ύστερα από εμβολιασμό (inoculated) ή όχι (control) με το βακτήριο *S. haloaromaticamans*. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



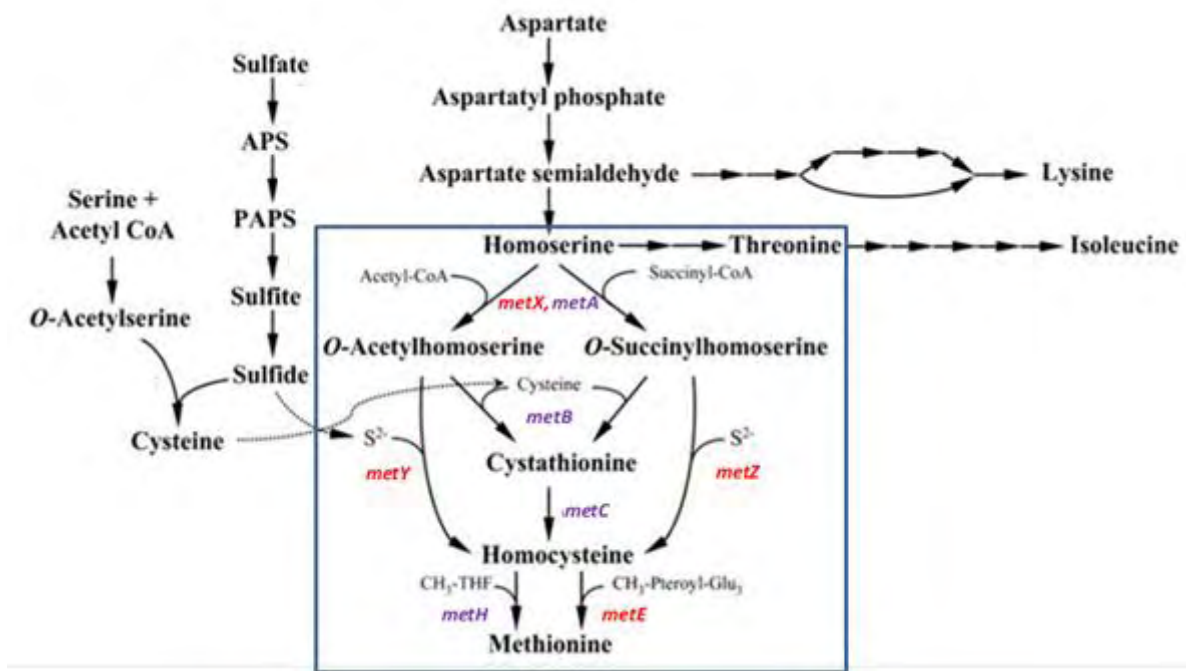
Διάγραμμα 8. Η αποδόμηση του OPP σε θρεπτικό μέσο MSMN παρουσία cystathionine ύστερα από εμβολιασμό (inoculated) ή όχι (control) με το βακτήριο *S. haloaromaticamans*. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 9. Η αποδόμηση του OPP σε θρεπτικό μέσο MSMN παρουσία homocysteine ή homocysteine + βιταμίνη B₁₂ ύστερα από εμβολιασμό (inoculated) ή όχι (control) με το βακτήριο *S. haloaromaticamans*. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

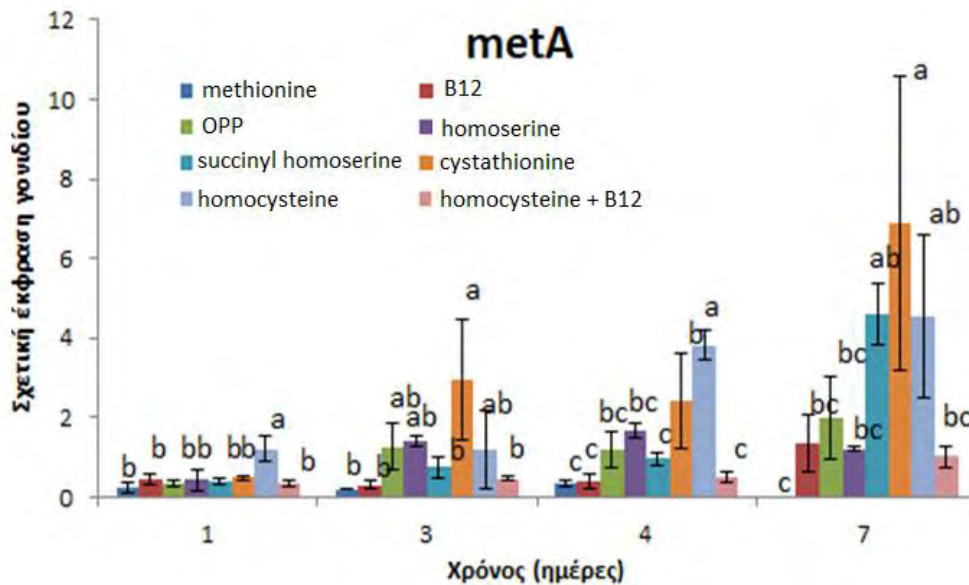
3.2.2 Έκφραση των γονιδίων *metA*, *metB*, *metC*, *metH1*

Στα Διαγράμματα 10-13 παρουσιάζεται το μοτίβο έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση της μεθειονίνης στις διάφορες μεταχειρίσεις στο Πείραμα 2. Για διευκόλυνση της παρουσίασης των αποτελεσμάτων στην Εικόνα 13 παρουσιάζεται το βιοσυνθετικό μονοπάτι της μεθειονίνης και η θέση των γονιδίων που μελετήθηκαν σε αυτό.



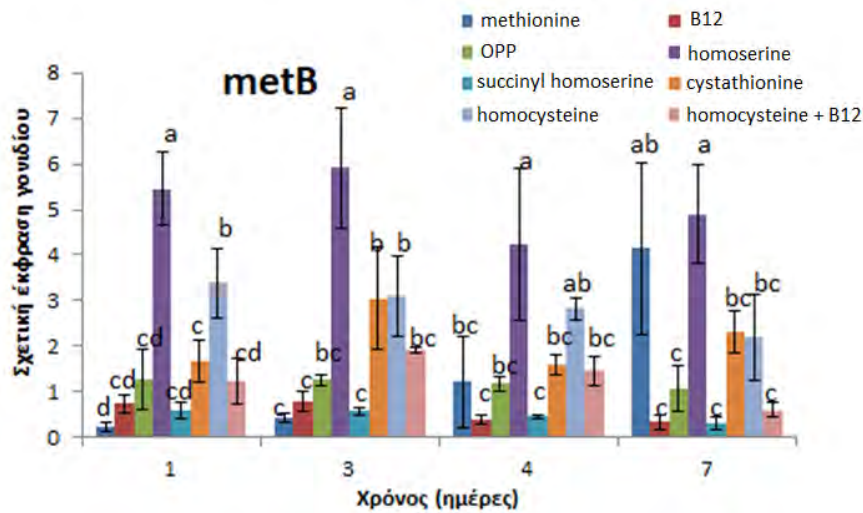
Εικόνα 13. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της μεθειονίνης και τα γονίδια που συμμετέχουν σε κάθε βήμα. Με μωβ χρώμα έχουν χρωματιστεί τα γονίδια που εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* και με κόκκινα τα γονίδια που δεν εντοπίστηκαν. Θα πρέπει να τονιστεί ότι το γονίδιο *metB* μπορεί να έχει και ρόλο *metZ* αλλά φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι εμφανίζει συγγένεια με τα *metB* γονίδια άλλων μικροοργανισμών.

Η έκφραση του γονιδίου *metA* εμφανίζει σημαντικά χαμηλά επίπεδα σε όλους τους χρόνους παρουσία μεθειονίνης, βιταμίνης B₁₂ ή homocysteine + βιταμίνης B₁₂, σε αντίθεση με τα succinyl-homoserine, cystathionine και homocysteine των οποίων η παρουσία οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *metA* ειδικότερα στους χρόνους 3 ως 7 ημέρες (Διάγραμμα 10). Η προσθήκη homoserine που αναφέρεται ως το κύριο υπόστρωμα του ενζύμου που κωδικοποιεί το *metA* γονίδιο δεν φαίνεται να ενεργοποιεί την αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου.



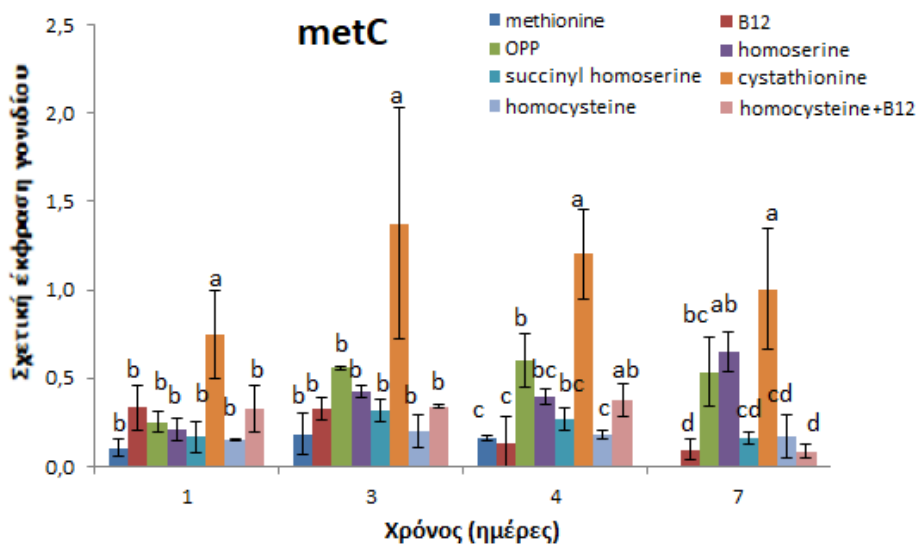
Διάγραμμα 10. Η έκφραση του γονιδίου *metA*, που είναι υπεύθυνο για την μετατροπή του homoserine σε O-succinyl-homoserine, σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* παρουσία μεθειονίνης, βιταμίνης B₁₂, homoserine, O-succinyl homoserine, cystathionine, homocysteine, homocysteine + βιταμίνης B₁₂ ή χωρίς την παρουσία κάποιων από τα παραπάνω. Σε όλες τις μεταχειρίσεις οι καλλιέργειες περιείχαν και OPP. Κάθε σημείο αποτελεί τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο ράβδοι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο α=0.05.

Η έκφραση του γονιδίου *metB* ήταν υψηλή καθόλη την διάρκεια του πειράματος παρουσία homoserine (κυρίως) και homocysteine (δευτερευόντως), ενώ αντίθετα χαμηλά επίπεδα έκφρασης καταγράφηκαν παρουσία βιταμίνης B₁₂, succinyl-homoserine και μεθειονίνη (Διάγραμμα 11). Η παρουσία O-succinyl homoserine που αναφέρεται μεταξύ των κυρίων υποστρωμάτων του ενζύμου που κωδικοποιείται από το *metB* γονίδιο δεν φαίνεται να ενεργοποιεί την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου που ήταν ιδιαίτερα χαμηλή σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις και δεν διέφερε σημαντικά από την μεταχείριση MSMN+OPP (Διάγραμμα 11).



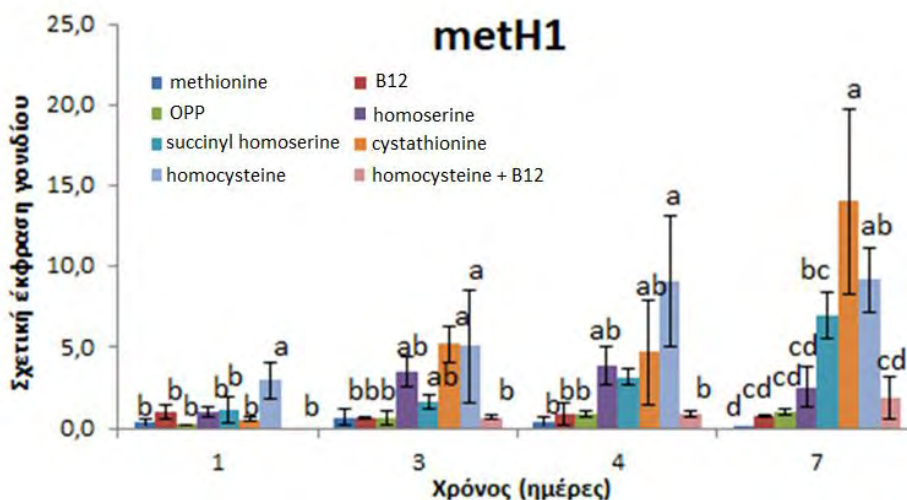
Διάγραμμα 11. Η έκφραση του γονιδίου *metB*, που είναι υπεύθυνο για την μετατροπή της O-succinyl-homoserine σε cystathionine, σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* παρουσία μεθειονίνης, βιταμίνης B₁₂, homoserine, O-succinyl homoserine, cystationine, homocysteine, homocysteine + βιταμίνης B₁₂ ή χωρίς την παρουσία κάποιων από τα παραπάνω. Σε όλες τις μεταχειρίσεις οι καλλιέργειες περιείχαν και OPP. Κάθε σημείο αποτελεί τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο ράβδοι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $\alpha=0.05$.

Η έκφραση του γονιδίου *metC* ήταν σημαντικά υψηλότερη καθόλη την διάρκεια του πειράματος παρουσία cystathionine σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις που εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου (Διάγραμμα 12). Και πάλι η προσθήκη μεθειονίνης και βιταμίνης B₁₂ οδήγησε σε χαμηλή έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος.



Διάγραμμα 12. Η έκφραση του γονιδίου *metC*, που είναι υπεύθυνο για την μετατροπή της cystathionine σε homoserine, σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* παρουσία μεθειονίνης, βιταμίνης B₁₂, homoserine, O-succinyl homoserine, cystationine, homocysteine, homocysteine + βιταμίνης B₁₂ ή χωρίς την παρουσία κάποιων από τα παραπάνω. Σε όλες τις μεταχειρίσεις οι καλλιέργειες περιείχαν και OPP. Κάθε σημείο αποτελεί τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο ράβδοι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $\alpha=0.05$.

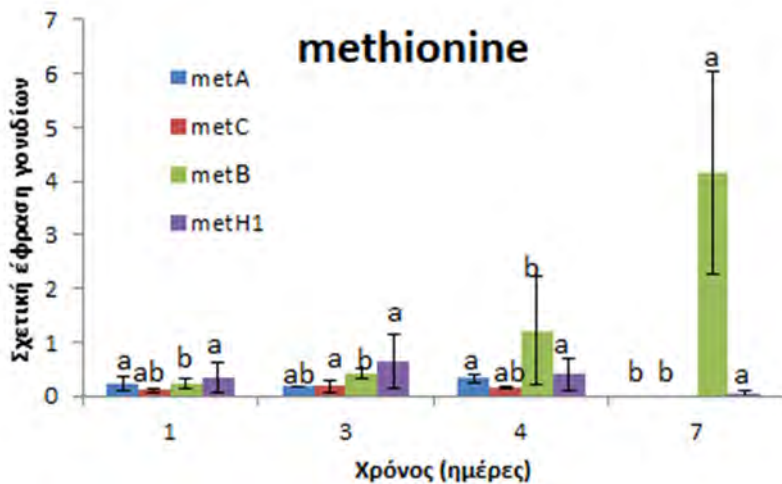
Η έκφραση του γονιδίου *methH1* ήταν σημαντικά υψηλότερη παρουσία cystathionine και homocysteine ενώ αντίθετα η προσθήκη μεθειονίνης και βιταμίνης B₁₂ οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου (Διάγραμμα 13). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σημαντικά χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου *methH1* όταν η παρουσία της homocysteine συνδυάστηκε με προσθήκη βιταμίνης B₁₂.



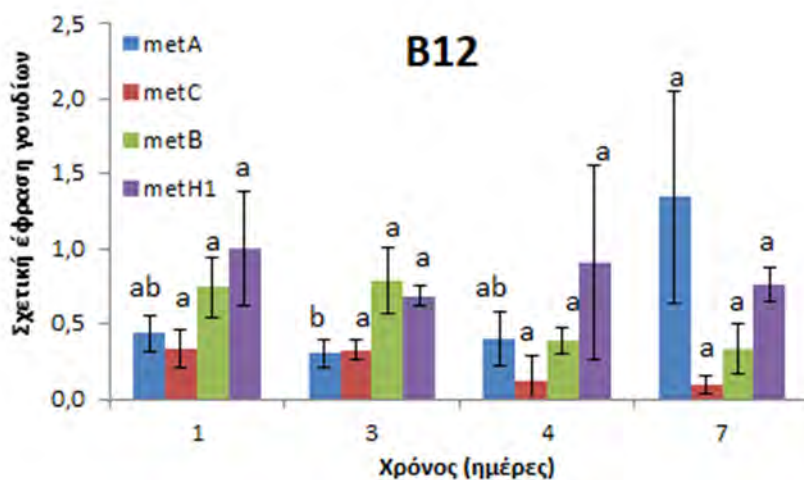
Διάγραμμα 13. Η έκφραση του γονιδίου *methH1*, που είναι υπεύθυνο για την μετατροπή της homocysteine σε methionine, σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* παρουσία μεθειονίνης, βιταμίνης B₁₂, homoserine, O-succinyl homoserine, cystathionine, homocysteine, homocysteine + βιταμίνης B₁₂ ή χωρίς την παρουσία κάποιων από τα παραπάνω. Σε όλες τις μεταχειρίσεις οι καλλιέργειες περιείχαν και OPP. Κάθε σημείο αποτελεί τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο ράβδοι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $\alpha=0.05$.

Εκτός των παραπάνω παρουσιάζεται και η διακύμανση της έκφρασης των διαφόρων γονιδίων στον χρόνο σε κάθε μεταχείριση ξεχωριστά στα Διαγράμματα 14-21. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η προσθήκη μεθειονίνης οδήγησε γενικά σε μειωμένη έκφραση των περισσότερων γονιδίων που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση της μεθειονίνης με μοναδική εξαίρεση το γονίδιο *metB* του οποίου η έκφραση αυξήθηκε σημαντικά στις 7 ημέρες, διάστημα που είχε ολοκληρωθεί και η αποδόμηση του OPP (Διάγραμμα 14). Στις καλλιέργειες που προστέθηκε βιταμίνη B₁₂ δεν παρατηρήθηκε κάποιο ξεκάθαρο χρονο-εξαρτώμενο πρότυπο στην έκφραση των τεσσάρων *met* γονιδίων (Διάγραμμα 15). Στις καλλιέργειες που δεν προστέθηκε κάποια ουσία παρά μόνο το OPP, η έκφραση των γονιδίων ήταν επίσης χαμηλή με τα γονίδια *metC* και κυρίως το *methH1* να εμφανίζουν αυξημένη έκφραση με την πάροδο του χρόνου σε αντίθεση με τα άλλα δύο γονίδια των οποίων η έκφραση παρέμεινε σταθερή στο χρόνο (Διάγραμμα 16). Παρουσία homoserine καταγράφηκε μια αύξηση στην έκφραση των γονιδίων *metA*, *metC*, *methH1* με την πάροδο του χρόνου, ενώ η έκφραση του γονιδίου *metB* ήταν η υψηλότερη μεταξύ των υπολοίπων γονιδίων και παρέμεινε σταθερά υψηλή σε όλη την διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 17). Παρουσία succinyl homoserine και cystathionine καταγράφηκε μια σημαντική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *metA* και *methH1* με την πάροδο του χρόνου (σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στις 7 ημέρες), ενώ αντίθετα η έκφραση των γονιδίων *metC* και *metB* παρέμεινε σταθερά σε χαμηλά επίπεδα καθόλη την διάρκεια του πειράματος (Διαγράμματα 18 και 19). Παρουσία homocysteine παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *metA* και *methH1* με την πάροδο του χρόνου με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης να καταγράφονται στις 7 ημέρες (Διάγραμμα 20). Αντίθετα τα

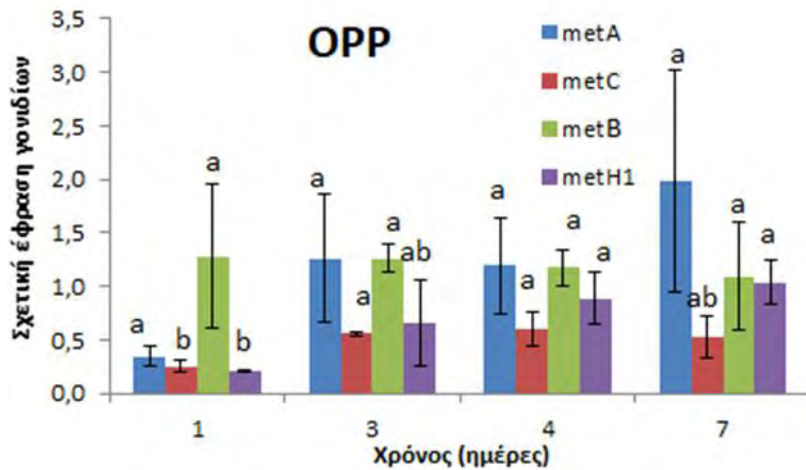
γονίδια *metB* και *metC* εμφάνισαν σταθερή έκφραση καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος. Όταν στην ίδια μεταχείριση (δηλαδή παρουσία homocysteine) προστέθηκε βιταμίνη B₁₂ καταγράφηκαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης όλων των γονιδίων παρουσία. Μεταξύ των γονιδίων που μελετήθηκαν τα *metH1* και *metA* εμφάνισαν και πάλι σταδιακή αύξηση της έκφρασης του με τον χρόνο σε αντίθεση με το *metC* του οποίου η έκφραση εμφάνισε μια σημαντική μείωση στις 7 ημέρες.



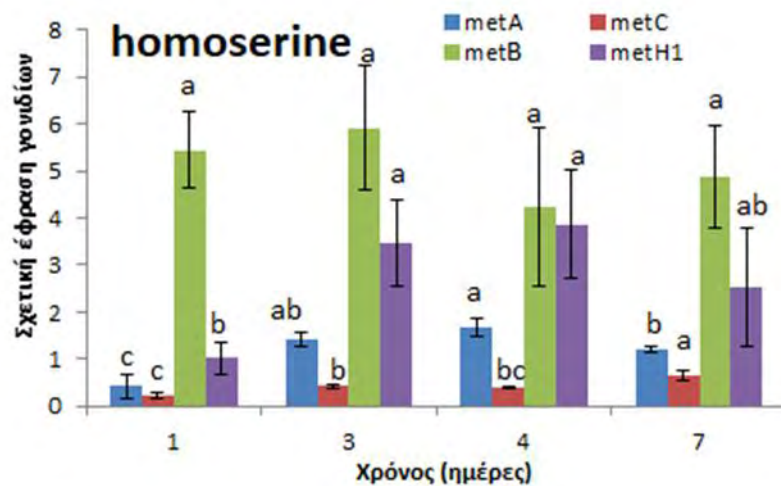
Διάγραμμα 14. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *metA*, *metC*, *metB*, *metH1* στο χρόνο σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* σε MSMN+OPP παρουσία μεθειονίνης. Κάθε μέτρηση είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε ράβδοι με τα ίδια γράμματα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $\alpha=0.05$.



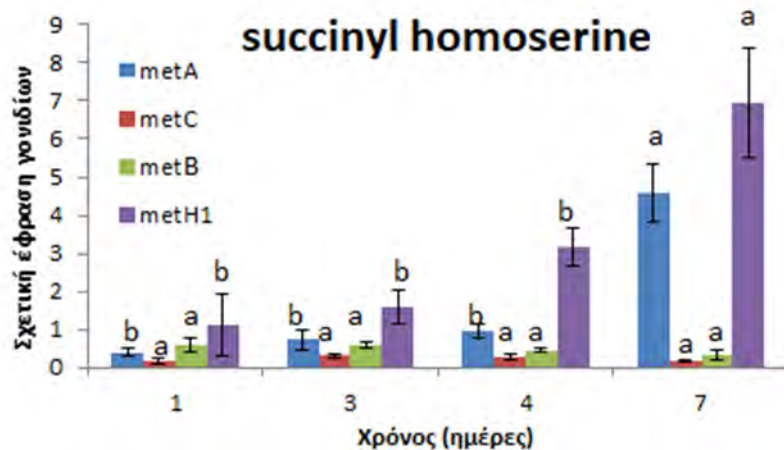
Διάγραμμα 15. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *metA*, *metC*, *metB*, *metH1* στο χρόνο σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* σε MSMN+OPP παρουσία βιταμίνης B₁₂. Κάθε μέτρηση είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε ράβδοι με τα ίδια γράμματα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $\alpha=0.05$.



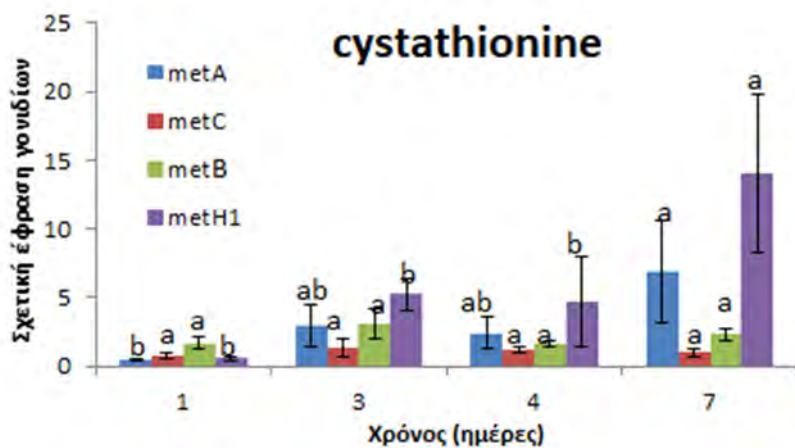
Διάγραμμα 16. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *metA*, *metC*, *metB*, *metH1* στο χρόνο σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* σε MSMN+OPP. Κάθε μέτρηση είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση. Για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε ράβδοι με τα ίδια γράμματα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $\alpha=0.05$.



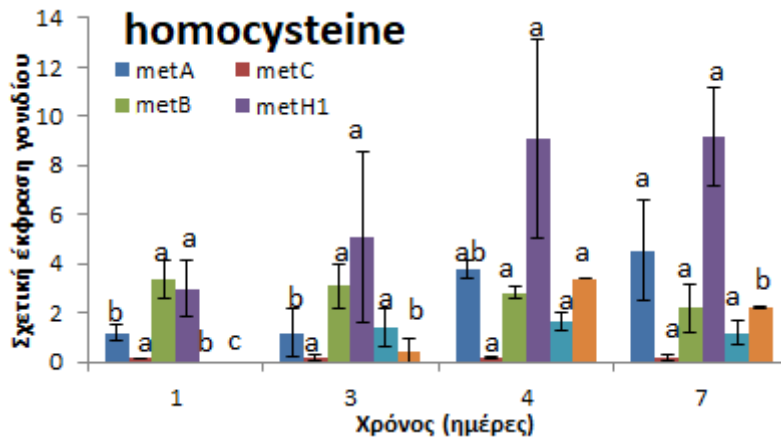
Διάγραμμα 17. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *metA*, *metC*, *metB*, *metH1* στο χρόνο σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* σε MSMN+OPP παρουσία homoserine. Κάθε μέτρηση είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση. Για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε ράβδοι με τα ίδια γράμματα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $\alpha=0.05$.



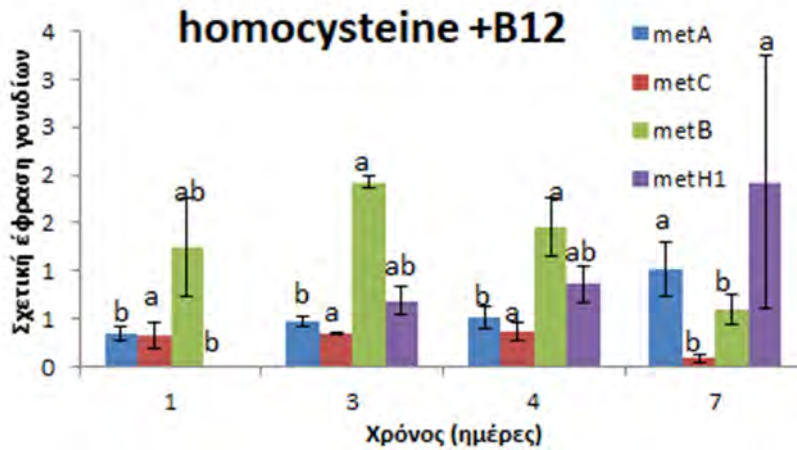
Διάγραμμα 18. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *metA*, *metC*, *metB*, *meth1* στο χρόνο σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* σε MSMN+OPP παρουσία O-succinyl homoserine. Κάθε μέτρηση είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση. Για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε ράβδοι με τα ίδια γράμματα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $\alpha=0.05$.



Διάγραμμα 19. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *metA*, *metC*, *metB*, *meth1* στο χρόνο σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* σε MSMN+OPP παρουσία cystathionine. Κάθε μέτρηση είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση. Για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε ράβδοι με τα ίδια γράμματα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $\alpha=0.05$.



Διάγραμμα 20. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *metA*, *metC*, *metB*, *meth1* στο χρόνο σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* σε MSMN+OPP παρουσία homocysteine. Κάθε μέτρηση είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση. Για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε ράβδοι με τα ίδια γράμματα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $\alpha=0.05$.



Διάγραμμα 21. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *metA*, *metC*, *metB*, *meth1* στο χρόνο σε καλλιέργειες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* σε MSMN+OPP παρουσία homocysteine + βιταμίνης B₁₂. Κάθε μέτρηση είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση. Για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε ράβδοι με τα ίδια γράμματα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $\alpha=0.05$.

4. Συζήτηση

Η εκτεταμένη χρήση του OPP από τις βιομηχανίες συσκευασίας φρούτων οδηγεί στην υποβάθμιση του περιβάλλοντος και την απειλή των υποστηριζόμενων μικροοργανισμών. Η αποτελεσματικότερη μέθοδος απομάκρυνσης του OPP από το περιβάλλον αποτελεί η βιοαποικοδόμηση. Το βακτήριο *Sphingomonas haloaromaticamans* διαθέτει την ικανότητα αποδόμησης του OPP. Πειραματικά αποτελέσματα απέδειξαν πως το βακτήριο είναι αυξοτροφικό στη μεθειονίνη χωρίς όμως αυτό να επιβεβαιώνεται από την γονιδιωματική ανάλυση όπου το βακτήριο φαίνεται να κατέχει το ελάχιστο των γονιδίων που απαιτείται για να βιοσυνθέσει μεθειονίνη. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό που προέκυψε από την γονιδιωματική ανάλυση του βακτηρίου είναι ότι στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της μεθειονίνης δεν υπάρχει μη εξαρτώμενη της βιταμίνης B₁₂ συνθάσης της μεθειονίνης καθιστώντας απαραίτητη την παρουσία βιταμίνης B₁₂ για τη βιοσύνθεση του συγκεκριμένου αμινοξέος. Περαιτέρω γονιδιωματικές αναλύσεις που εστίασαν στην βιοσύνθεση της βιταμίνης B₁₂ έδειξαν ότι το συγκεκριμένο βακτήριο δεν είχε την ικανότητα να βιοσυνθέσει *de novo* βιταμίνη B₁₂ λόγω της έλλειψης γονιδίων που απαιτούνται για τη σύνθεση του κορρινικού δακτυλίου της βιταμίνης. Οπότε η βιταμίνη B₁₂ πιθανόν αποτελεί το κλειδί για τον αυξοτροφισμό του βακτηρίου στη μεθειονίνη. Γι' αυτό στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκε αρχικά η υπόθεση ότι η βιταμίνη B₁₂ είναι υπεύθυνη για τον αυξοτροφισμό του βακτηρίου στη μεθειονίνη και κατά συνέπεια περιορίζει την αποικοδομητική ικανότητα του βακτηρίου έναντι του OPP. Τα αποτελέσματα των Πειραμάτων 1 και 2 επιβεβαιώνουν την υπόθεση αυτή καθώς το βακτήριο κατάφερε να αποδομεί επιτυχώς το μυκητοκτόνο μόνο όταν στο θρεπτικό μέσο υπήρχε μεθειονίνη ή βιταμίνη B₁₂, ανεξάρτητα με την παρουσία άλλων συμπαραγόντων. Η προσθήκη ενδιαμέσων προϊόντων της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης δεν κατάφερε να επαναφέρει την αποδομητική ικανότητα του βακτηρίου καταδεικνύοντας ότι το μονοπάτι βιοσύνθεσης της μεθειονίνης είναι λειτουργικό μόνο παρουσία βιταμίνης B₁₂, εξωγενώς προσφερόμενη στο βακτήριο.

Το φαινόμενο του αυξοτροφισμού δεν είναι σπάνιο στη φύση αντιθέτως ο αυξοτροφισμός είναι μια εξελικτική στρατηγική βελτιστοποίησης για τη μείωση βιοσυνθετικών φορτίων σε έναν οργανισμό, καθώς προωθεί συνεργατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών μελών - βακτηρίων μιας μικροβιακής κοινότητας (Mee et al., 2014). Έτσι, περίπλοκες διαδικασίες όπως η αποικοδόμηση ενός οργανικού ρύπου βασίζεται στις συνδυαστικές εργασίες που επιτελούν οι συμμετέχοντες πληθυσμοί της μικροβιακής κοινότητας (division in labor) (Brenner et al., 2008). Στη μελέτη του Sørensen et al. (2002) το στέλεχος *Sphingomonas* sp. απεδείχθη ικανό για την αποικοδόμηση του ζιζανιοκτόνου isoproturon όταν συνκαλλεργήθηκε με βακτήριο που του παρείχε απαραίτητα αμινοξέα, όπως η μεθειονίνη. Επίσης στη μελέτη των Öhneby et al. (2014) βακτήριο του γένους *Sphingobium* sp. ήταν ικανό να διασπά το ζιζανιοκτόνο MCPA όταν καλλιεργήθηκε με μεθειονίνη και αργινίνη ή με συγκεκριμένα βακτήρια που του παρείχαν τα απαραίτητα αμινοξέα.

Η βιοσύνθεση της βιταμίνης B₁₂ αποτελεί ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο μονοπάτι που περιλαμβάνει περίπου 30 γονίδια και αποτελεί μια ιδιαίτερα κοστοβόρα βιοσυνθετική οδό που απαντάται μόνο στα βακτήρια και στα αρχαία (Roth et al., 1996). Χαρακτηριστικό είναι ότι περίπου το 1% του γονιδιώματος βακτηρίων που συνθέτουν *de novo* βιταμίνη B₁₂ συμμετέχει στο συγκεκριμένο βιοσυνθετικό μονοπάτι (Roth et al., 1993). Μόνο ένας μικρός αριθμός βακτηρίων κατέχει την ικανότητα να βιοσυνθέσει πλήρως την βιταμίνη B₁₂ και στο πλαίσιο της κατανομή εργασίας (division of labour) παρέχει την βιταμίνη B₁₂ σε άλλους μικροοργανισμούς με τους οποίους συμβιώνει (Romine et al., 2017). Χαρακτηριστικά παραδείγματα της συνεργιστικής αυτής σχέσης μεταξύ μικροοργανισμών για την παροχή βιταμίνης B₁₂ αποτελούν: (α) συμβίωση μεταξύ αλγών που εμφανίζουν αυξοτροφισμό στην βιταμίνη B₁₂ και βακτηρίων που συνθέτουν βιταμίνη B₁₂, όπως το

Mesorhizobium loti (Croft et al., 2005 & Kazamia et al., 2012) (β) συμβίωση μεταξύ αναερόβιων βακτηρίων *Dehalococcoides*, τα οποία αποκομίζουν ενέργεια μέσω οξείδωσης H_2 και αναγωγής οργανοαλογονομένων οργανικών ρύπων, και βακτηρίων όπως το *Desulfovibrio vulgaris* και άλλα βακτήρια που έχουν την ικανότητα να βιοσυνθέτουν βιταμίνη B_{12} και έτσι να καλύπτουν τον αυτοτροφισμό των *Dehalococcoides* σε βιταμίνη B_{12} (Men et al., 2012 & hug et al., 2012).

Εκτός των παραπάνω μελετήθηκε και η έκφραση των γονιδίων του μεταβολικού μονοπατιού βιοσύνθεση της μεθειονίνης παρουσία διαφόρων συμπαραγόντων και των ενδιάμεσων προϊόντων του συγκεκριμένου βιοσυνθετικού μονοπατιού. Ένα από τα ποιά ενδιαφέροντα συμπεράσματα ήταν η γενικότερη καταστολή της έκφρασης των γονιδίων *metA*, *metB*, *metC* και *metH* όταν προστέθηκε μεθειονίνη στο θρεπτικό μέσο. Η συγκεκριμένη παρατήρηση είναι σύμφωνη με προηγούμενες μελέτες (Hwang et al., 2002; Lee & Hwang 2003) που έχουν δείξει επίσης ότι το βιοσυνθετικό μονοπάτι της μεθειονίνης ενεργοποιείται σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας του αμινοξέος (Auger et al., 2002). Από την άλλη μεριά η προσθήκη βιταμίνης B_{12} διατήρησε χαμηλά τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *metA*, *metB*, *metC*, *metH1*. Η μη ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *metH1* παρουσία βιταμίνης B_{12} αποτελεί έκπληξη αν αναλογιστούμε την έλλειψη στο γονιδίωμα του βακτηρίου της αντίστοιχης μη εξαρτώμενης της βιταμίνης B_{12} συνθάσης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη βιταμίνης B_{12} σε καλλιέργειες *Salmonella* sp. οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *metE* που κωδικοποιεί την μη εξαρτώμενη της βιταμίνης B_{12} συνθάση της μεθειονίνης σε αντίθεση με το γονίδιο *metH* που ενεργοποιείται (Mares et al., 1992). Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να εστιάσουν στην διερεύνηση του συγκεκριμένου ευρήματος.

Ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι η προσθήκη cystathionine και homocysteine οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *metC* και *metH* που κωδικοποιούν την β-λυάση της cystathionine και την εξαρτώμενη της βιταμίνης B_{12} συνθάση της μεθειονίνης κάτι που ήταν αναμενόμενο λόγω του ότι τα συγκεκριμένα μόρια αποτελούν υποστρώματα των συγκεκριμένων ενζύμων. Αντίθετα δεν συνέβη το ίδιο με το *metA* και το *metB* για τα οποία η προσθήκη των υποστρωμάτων τους homoserine και O-succinyl homoserine δεν προκάλεσαν ενεργοποίηση των συγκεκριμένων ενζύμων καταδεικνύοντας ένα διακριτό και διαφορετικό μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης αυτών των γονιδίων έναντι των *metC* και *metH*. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων βιοσύνθεσης της μεθειονίνης είναι πολύπλοκη και επηρεάζεται και από γονίδια που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση άλλων αμινοξέων της ομάδας του ασπαρτικού οξέος, όπως η λυσίνη και η θρεονίνη (Lee & Hwang et al., 2003).

Μελλοντικά σχέδια

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσα διατριβής θα μπορούσαν να διερευνηθούν περαιτέρω:

(α) το εύρος συγκεντρώσεων βιταμίνης B_{12} που μπορούν να καλύψουν τις ανάγκες του βακτηρίου *S. haloaromaticamans* για την αποδόμηση του OPP

(β) ο ρόλος του μονοπατιού διάσωσης της βιταμίνης B_{12} και εάν παράγωγα της κοβαλαμίνης μπορούν να καλύψουν τις ανάγκες του βακτηρίου για βιταμίνη B_{12}

(γ) να επιβεβαιωθεί η συνεργασία μεταξύ του *S. haloaromaticamans* και βακτηρίων που παρέχουν βιταμίνη B_{12} σε πειράματα συνεργισμού.

5. Βιβλιογραφία

- Alaminos M, Ramos JL. (2001). The methionine biosynthetic pathway from homoserine in *Pseudomonas putida* involves the *metW*, *metX*, *metZ*, *metH* and *metE* gene products. *Arch Microbiol.* 176(1-2):151-4.
- Andersen GL, Beattie GA, Lindow SE. (1998). Molecular characterization and sequence of a methionine biosynthetic locus from *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol.* 180(17):4497-507.
- Appel, K.E. (2000). The carcinogenicity of the biocide *ortho*-phenylphenol. *Arch Toxicol.* 74(2):61-71.
- Auger S, Yuen WH, Danchin A, Martin-Verstraete I. (2002). The *metIC* operon involved in methionine biosynthesis in *Bacillus subtilis* is controlled by transcription antitermination. *Microbiology.* 148(2):507-18.
- Besil N, Pérez-Parada A, Cesio V, Varela P, Rivas F, Heinzen H. (2016). Degradation of imazalil, *ortho*-phenylphenol and pyrimethanil in *Clementine mandarins* under conventional postharvest industrial conditions at 4°C. *Food Chem* 194:1132-7.
- Brenner K1, You L, Arnold FH. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol.* 26(9):483-9.
- Coelhan M, Bromig KH, Glas K, Roberts AL. (2006). Determination and levels of the biocide *ortho*-phenylphenol in canned beers from different countries. *J Agric Food Chem.* 54(16):5731-5.
- Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, WarrenMJ, Smith AG. (2005). Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature.* 438(7064):90-3.
- Debussche L, Thibaut D, Cameron B, Crouzet J, Blanche F. (1993). Biosynthesis of the corrin macrocycle of coenzyme B₁₂ in *Pseudomonas denitrificans*. *J Bacteriol.* 175(22):7430-40.
- Escalante-Semerena JC. (2007). Conversion of cobinamide into adenosylcobamide in bacteria and archaea. *J Bacteriol.* 189(13):4555-60.
- Fan C, Bobik TA. (2008). The PduX enzyme of *Salmonella enterica* is an L-threonine kinase used for coenzyme B₁₂ synthesis. *J Biol Chem.* 283(17):11322-9.
- Fang H, Kang J, and Zhang D. (2017). Microbial production of vitamin B₁₂: a review and future perspectives. *Microb Cell Fact.* 16: 15.
- Ferla MP, Patrick WM. (2014). Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiology.* 160(8):1571-84.
- Fogolino M, Borne F, Bally M, Ball G, Patte JC. (1995). A direct sulfhydrylation pathway is used for methionine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 141 (2):431-9.
- Glaeser SP and Kampfer P. (2014). The family *Sphingomonadaceae*. In the Prokaryotes. Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E and Thomson F. (eds). Springer Berlin Heidelberg, 641-707.
- Gophna U, Baptiste E, Doolittle WF, Biran D, Ron EZ. (2005). Evolutionary plasticity of methionine biosynthesis. *Gene* 1(355):48-57.

- Gordon R. O. Campbell, Michiko E. Taga, Kavita Mistry, Javier Lloret, Peter J. Anderson, John R. Roth, and Graham C. Walker. (2006). *Sinorhizobium meliloti bluB* is necessary for production of 5,6-dimethylbenzimidazole, the lower ligand of B₁₂. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(12): 4634–4639.
- Gottschalk Ch, Libra JA and Saupe A. (2010). *Ozonation of Water and Waste Water*. (2nd edition). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Gropper SS, Smith JL, Groff JL. (2007). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. (4^η έκδοση). USA: Wadsworth.
- Hacham Y, Gophna U, Amir R. (2003). *In vivo* analysis of various substrates utilized by cystathionine gamma-synthase and O-acetylhomoserinesulphhydrylase in methionine biosynthesis. *Mol Biol Evol*. 20(9):1513-20.
- Hazra AB, Tran JL, Crofts TS, Taga ME. (2013). Analysis of substrate specificity in CobT homologs reveals widespread preference for DMB, the lower axial ligand of vitamin B₁₂. *Chem Biol*. 20(10):1275-85.
- Hazra AB, Han AW, Mehta AP, Mok KC, Osadchiy V, Begley TP, Taga ME. (2015). Anaerobic biosynthesis of the lower ligand of vitamin B₁₂. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(34):10792-7.
- Hauben L, Vauterin L, Swings J and Moore ERB. (1997). Comparison of 16s Ribosomal DNA Sequences of All *Xanthomonas* Species. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 328-335.
- Howard PH, Boethling RS, Jarvis WF, Meylan WM, Michalenko EM. (1991). *Handbook of environmental degradation rates*. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan.
- Hwang B1, Yeom HJ, Kim Y, Lee HS. (2001). *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulfhydrylation pathways for methionine biosynthesis. *J Bacteriol*. 184(5):1277-86.
- Kazamia E, Czesnick H, Nguyen TT, Croft MT, Sherwood E, Sasso S et al. (2012). Mutualistic interactions between vitamin B₁₂-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environ Microbiol* 14(6):1466-76.
- Lee HS and Hwang BJ. (2003). Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulfhydrylation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 62(5-6):459-67.
- Lehninger. (1992). *Principles of biochemistry*. (4^η έκδοση). USA: W.H. Freeman and Company.
- Leyn SA, Suvorova IA, Kholina TD, Sherstneva SS, Novichkov PS, Gelfand MS, and Rodionov DA. (2014). Comparative Genomics of Transcriptional Regulation of Methionine Metabolism in Proteobacteria. *PLoS One*. 9(11): e113714.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. 64:795–799.
- Mares R, Urbanowski ML, Stauffer GV. (1992). Regulation of the *Salmonella typhimurium metA* gene by the MetR protein and homocysteine. *J Bacteriol*. 174(2):390-7.

- Martens JH, Barg H, Warren MJ, Jahn D. (2002). *Microbial production of vitamin B₁₂*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 58(3):275-85.
- Mee MT, Collins JJ, Church GM, Wang HH. (2014). Syntrophic exchange in synthetic microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(20):E2149-56.
- Men Y, Feil H, VerBerkmoes NC, Shah MB, Johnson DR, Lee PK, West KA, Zinder SH, Andersen GL, Alvarez-Cohen L. (2012). Sustainable syntrophic growth of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 with *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and *Methanobacterium congolense*: global transcriptomic and proteomic analyses. *ISME J* 6(2):410-21.
- Moore S, Warren MJ. (2012). The anaerobic biosynthesis of vitamin B₁₂. *Biochem Soc Trans*. 40(3):581-6.
- Moore TC, Newmister SA, Rayment I, Escalante-Semerena JC. (2012). Structural insights into the mechanism of four-coordinate Cob(II)alamin formation in the active site of the *Salmonella enterica* ATP:Co(I)rrinoid adenosyltransferase enzyme: critical role of residues Phe91 and Trp93. *Biochemistry*. 51(48):9647-57.
- Moore SJ, Lawrence AD, Biedendieck R, Deery E, Frank S, Howard MJ, Rigby SE, Warren MJ. (2013). Elucidation of the anaerobic pathway for the corrin component of cobalamin (vitamin B₁₂). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(37):14906-11.
- Olak-Kucharczyk M, Miller JS and Ledakowicz S. (2012). Ozonation Kinetics Of o-phenylphenol in Aqueous Solutions. *The Journal of the International Ozone Association* 34(4):300-305.
- Olak-Kucharczyk M, Bizukojc M, Ledakowicz S. (2015). Transformation of Phenylphenol Isomers by UVC Irradiation in Aqueous Solution. *J. Adv. Oxid. Technol*. 2(18).
- Raux 1, Schubert HL, Warren MJ. (2000). Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂): a bacterial conundrum. *Cell Mol Life Sci*. 57(13-14):1880-93.
- Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS. (2003). Comparative genomics of the vitamin B₁₂ metabolism and regulation in prokaryotes. *J Biol Chem*. 278(42):41148-59.
- Roessner CA, Williams HJ, Scott AI. (2005). Genetically engineered production of 1-desmethylcobyrinic acid, 1-desmethylcobyrinic acid a,c-diamide, and cobyrinic acid a,c-diamide in *Escherichia coli* implies a role for CbiD in C-1 methylation in the anaerobic pathway to cobalamin. *J Biol Chem*. 280(17):16748-53.
- Romine MF, Rodionov DA, Maezato Y, Anderson LN, Nandhikonda P, Rodionova IA, Carre A, Li X, Xu C, Clauss TR, Kim YM, Metz TO, Wright AT. (2017). Elucidation of roles for vitamin B₁₂ in regulation of folate, ubiquinone, and methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(7):E1205-E1214.
- Romine MF., Rodionov DA., Maezato Y., Osterman AL., Nelson WC. (2017). Underlying mechanisms for syntrophic metabolism of essential enzyme cofactors in microbial communities. *ISME J* 11(6):1434-1446.
- Roth JR, Lawrence JG, Bobik TA. (1996). Cobalamin (coenzyme B₁₂): Synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol* 50:137-181.

- Roth J R, Lawrence J G, Rubenfield M, Kieffer-Higgins S, and Church G M. (1993). Characterization of the cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 175(11): 3303–3316.
- Önneby K, Håkansson S, Pizzul L, Stenström J. (2013). Reduced leaching of the herbicide MCPA after bioaugmentation with a formulated and stored *Sphingobium* sp. *Biodegradation.* 25(2):291-300.
- Ortho-phenylphenol. (n.d.). The Human Metabolome Database: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0032582>
- Perruchon C, Vasileiadis S, Rousidou C, Papadopoulou ES, Tanou G, Samiotaki M, Garagounis C, Molassiotis A, Papadopoulou KK, Karpouzas DG. (2017). Metabolic pathway and cell adaptation mechanisms revealed through genomic, proteomic and transcription analysis of a *Sphingomonas haloaromaticamans* strain degrading ortho-phenylphenol. *Sci Rep.* 12;8(1):4599.
- Perruchon C, Patsioura V, Vasileiadis S, Karpouzas DG. (2016). Isolation and characterisation of a *Sphingomonas* strain able to degrade the fungicide ortho-phenylphenol. *Pest Manag Sci.* 72(1):113-24.
- Sørensen SR, Ronen Z, Aamand J. (2002). Growth in coculture stimulates metabolism of the phenylurea herbicide isoproturon by *Sphingomonas* sp. strain SRS2. *Appl Environ Microbiol.* 68(7):3478-85.
- Sørensen SR, Ronen Z, Aamand J. (2002). Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon. *Appl Environ Microbiol.* 67(12):5403-9.
- Taga ME, Larsen NA, Howard-Jones AR, Walsh CT, Walker GC. (2007). BluB cannibalizes flavin to form the lower ligand of vitamin B₁₂. *Nature.* 446(7134):449-53.
- Taté R, Riccio A, Caputo E, Iaccarino M, Patriarca EJ. (1998). The *Rhizobium etli metZ* gene is essential for methionine biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact.* 12(1):24-34.
- Vitreschak AG., Rodionov DA, Mironov AA, and Gelfand MS. (2003). Regulation of the vitamin B₁₂ metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. *RNA.* 2003 Sep; 9(9): 1084–1097.
- Yan J, Im J, Yang Y, Löffler FE. (2013). Guided cobalamin biosynthesis supports *Dehalococcoides mccartyi* reductive dechlorination activity. *Phil Trans R Soc B* 368(1616):20120320.
- Zayas CL, Escalante-Semerena JC. (2007). Reassessment of the late steps of coenzyme B₁₂ synthesis in *Salmonella enterica*: evidence that dephosphorylation of adenosylcobalamin-5'-phosphate by the CobC phosphatase is the last step of the pathway. *J Bacteriol.* 189(6):2210-8.

