



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Θέμα: «Μελέτη της SOS απόκρισης στο
αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zygomonas
mobilis*»**

Του υποψηφίου διδάκτορα

Ιωάννη Σαββάκη

BSc, MSc

ΑΘΗΝΑ 2019

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως.» (Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

Χρηματοδοτικοί φορείς της παρούσας διδακτορικής διατριβής:

1. Υποτροφία Μ. Μητσόπουλου από την Ακαδημία Αθηνών (2012-2015)



2. Πρόγραμμα "Συνεργασία 2011" (ΕΣΠΑ -Συμπράξεις Παραγωγικών και Ερευνητικών Φορέων σε Εστιασμένους Ερευνητικούς και Τεχνολογικούς Τομείς). θέμα "Ολοκληρωμένη Διεργασία Παραγωγής Βιοαιθανόλης από Ελληνική Λιγνινοκυτταρινούχα Βιομάζα [SIMPLE] (2015-2016)



3. Βραβείο Αριστείας ΙΚΥ/Siemens απονεμημένο στην Επικ. Καθ. Κ.Μ. Παππά από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (2016-2017)



Κύρια Επιβλέπουσα

Αικατερίνη Μαρία Παππά, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας , Ε.Κ.Π.Α.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Αικατερίνη Μαρία Παππά, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας , Ε.Κ.Π.Α.

Uldis Kalnenieks, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Λετονίας

Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Υπόλοιπα μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Κωνσταντίνος Ε. Βοργιάς, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας , Ε.Κ.Π.Α.

Δημήτριος Χατζηνικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Βασίλειος Κουβέλης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας , Ε.Κ.Π.Α.

Βασιλική Α. Οικονομίδου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Ευχαριστίες

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσά μου Αικατερίνη Μ. Παππά, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α. Όλα αυτά τα χρόνια, χωρίς την υπομονή της και επιμονή της, την υποστήριξή της (πνευματική και υλική), την καθοδήγησή της και τον άπειρο χρόνο που μου αφιέρωσε δεν θα είχα φτάσει σε αυτό το σημείο που βρίσκομαι. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω που με δέχτηκε στο εργαστήριό της από τα χρόνια της διπλωματικής εργασίας και που μου εμπιστεύτηκε τα θέματα της προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας και αυτής της διδακτορικής διατριβής. Μέσα από τον ίδιο χώρο θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου της, τους Παναγιώτη Πουλή, Χρήστο Σκρέκα, Έλενα Παππά, Βάλια Ταμπακοπούλου και Σταματίνα Ρούσσου για την βοήθειά τους και για αποτελέσματα που μου εμπιστεύτηκαν.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω το Joint Genome Institute των Η.Π.Α. και συγκεκριμένα την manager προγραμμάτων Christa Pennacchio και όσοι συμμετείχαν στην διεκπεραίωση του προγράμματος CSP_52 και στην αλληλούχηση RNA μέσω της οποίας πάρθηκε το ουσιαστικότερο κομμάτι των αποτελεσμάτων αυτής της διατριβής. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δημήτρη Χατζηνικολάου, Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α., για την βοήθειά του και την παροχή του εξοπλισμού αέριου χρωματογράφου και υγρού χρωματογράφου, που αξιοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της διατριβής, καθώς και χημειοστάτη που χρησιμοποιήθηκε για την συλλογή δειγμάτων για σκοπούς του προγράμματος CSP_52. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Robert Landick, Καθηγητή Βιοχημείας και Βακτηριολογίας του Πανεπιστημίου του Wisconsin, και τα μέλη του εργαστηρίου του και του GLBRC για την υποδοχή τους στα εργαστήρια και την βοήθειά τους στις απομονώσεις RNA και αναλύσεις των αποτελεσμάτων αλληλούχησης τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, Uldis Kalnenieks, Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας στο Πανεπιστήμιο Λετονίας και Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων για την καθοδήγηση και τις παρατηρήσεις τους κατά την διάρκεια της διατριβής. Ακόμη, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής για τις παρατηρήσεις τους και τις διορθώσεις τους.

Ξεχωριστά, ευχαριστώ τον Μιλτιάδη Τύπα, Ομότιμο Καθηγητή στον Τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, για τις συζητήσεις και υποδείξεις του από τα χρόνια της διπλωματικής μου εργασίας στον Τομέα έως και σήμερα.

Πριν το τέλος, θα ήθελα να αναγνωρίσω και να ευχαριστήσω ως χρηματοδοτικούς φορείς την Ακαδημία Αθηνών για την Υποτροφία Μ. Μητσόπουλου, το Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα "Συνεργασία-SIMPLE" και το ΙΚΥ για το Πρόγραμμα Αριστείας "IKY-SIEMENS".

Επειδή όλα αυτά τα χρόνια ήταν δύσκολα, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την συμπαράσταση και την υποστήριξη των γονιών μου και όλων αυτών των δικών μου ανθρώπων που ήταν κοντά μου όλα αυτά τα χρόνια και πίστευαν σε μένα και με στήριζαν.

Σας ευχαριστώ θερμά

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	i
Summary	iv
1. Εισαγωγή	1
1.1 Η SOS απόκριση	1
1.1.1 Γενικά στοιχεία της SOS απόκρισης	1
1.1.2. Ο μηχανισμός της SOS απόκρισης στο <i>E. coli</i>	1
1.1.3. LexA: ο καταστολέας του SOS συστήματος	3
1.1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά	3
1.1.3.2. Η δομή της LexA και ο μηχανισμός της αυτοπρωτεόλυσής της	3
1.1.4. RecA: η δεύτερη ρυθμιστική πρωτεΐνη του SOS συστήματος. Δομή και λειτουργίες της RecA	7
1.1.5. Το SOS σύστημα απόκρισης στο <i>E. coli</i> : τα SOS γονίδια και ο SOS χειριστής	10
1.1.6. Το SOS σύστημα απόκρισης σε άλλα βακτήρια	14
1.1.7. Το SOS σύστημα απόκρισης στα α-πρωτεοβακτήρια	16
1.2 Επιδιόρθωση του DNA	21
1.2.1 Τύποι σημειακών μεταλλαγών	21
1.2.2 Τρόποι πρόκλησης σημειακών μεταλλαγών	22
1.2.2.1 Αυθόρμητες μεταλλαγές	22
1.2.2.2 Επαγόμενες μεταλλαγές	22
1.2.3 Επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA	23
1.2.3.1 Άμεση αποκατάσταση βλαβών	25
1.2.3.1.1 Επιδιόρθωση από την DNA πολυμεράση	25
1.2.3.1.2 Επιδιόρθωση διμερών πυριμιδίνης	25
1.2.3.1.3 Επιδιόρθωση αλκυλιώσεων	26
1.2.3.2 Σύστημα επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης	26
1.2.3.3 Σύστημα επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων	27
1.2.3.4 Σύστημα επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων	28
1.2.3.5 Σύστημα επιδιόρθωσης με ομόλογο ανασυνδυασμό	29
1.3 <i>Zymomonas mobilis</i>	31
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά	31
1.3.2 Μεταβολισμός	32
1.3.3 Γονιδιωματική ανάλυση και μελέτη στο <i>Z. mobilis</i>	34
1.3.4 Κατασκευή στελεχών του <i>Z. mobilis</i>	36
1.3.5 Μελέτη της επιδιόρθωσης στο <i>Z. mobilis</i> και προκαταρκτικά αποτελέσματα παρούσας εργασίας	42
1.3.5.1 Μελέτη της μεταλλαξογένεσης και επιδιόρθωσης στο <i>Z. mobilis</i>	42
1.3.5.2 Προκαταρκτικά αποτελέσματα μελέτης του <i>recA</i> του <i>Z. mobilis</i> και ενδείξεις για το SOS σύστημα	43
1.4 Στόχοι της διδακτορικής διατριβής	44
2. Υλικά και Μέθοδοι	46
2.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια	46
2.2 Θρεπτικά υλικά	47

2.3 Αντιβιοτικά	48
2.4 Συνθήκες ανάπτυξης και αποθήκευσης στελεχών	48
2.5 Καμπύλες ανάπτυξης - Μέτρηση βιώσιμων μονάδων	50
2.6 Μεταλλαξογένεση στελεχών και καμπύλες βιωσιμότητας	50
2.6.1 Μεταλλαξογένεση με MMS	50
2.6.2 Ακτινοβόληση στελεχών με υπεριώδεις (UV) ακτινοβολία	50
2.7 Συζεύξεις	51
2.8 Μετασχηματισμοί	51
2.8.1 Μέθοδος θερμικής δοκιμασίας (μέθοδος CaCl ₂)	51
2.8.2 Μέθοδος ηλεκτροδιάτρησης	52
2.9 Απομονώσεις DNA	53
2.9.1 Πλασμιδιακές απομονώσεις	53
2.9.1.1 Πλασμιδιακή απομόνωση μικρής κλίμακας	53
2.9.1.2 Πλασμιδιακή απομόνωση μεσαίας κλίμακας	54
2.9.2 Απομόνωση ολικού DNA από κύτταρα <i>Z. mobilis</i>	54
2.10 Ηλεκτροφόρηση	55
2.11 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα	55
2.12 Απομόνωση και καθαρισμός ζώνης	55
2.13 Αντίδραση φωσφατάσης - λιγάσης	55
2.14 Μεταφορά DNA σε nylon μεμβράνες	56
2.15 Υβριδισμοί του DNA	56
2.16 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	56
2.17 Απομόνωση RNA	58
2.18 Αλληλούχηση RNA	60
2.19 Ενζυμική αντίδραση β-γαλακτοσιδάσης (αντίδραση κατά Miller)	61
2.20 Μέτρηση ποσοτήτων αιθανόλης με χρωματογραφικές μεθόδους	61
2.21 Εργαλεία και ιστοσελίδες για βιοπληροφορικές αναλύσεις	62
2.21.1 Σύνολα δεδομένων	62
2.21.2 Αλγόριθμοι και προγράμματα	62
2.21.3 Μέθοδοι και προγράμματα ανάλυσης αποτελεσμάτων αλληλούχησης	62
RNA	63
3. Αποτελέσματα	64
3.1 Μελέτη του CP4 <i>recA</i> στελέχους UA1	64
3.1.1 Σύντομη περιγραφή της κατασκευής του στελέχους UA1	64
3.1.2 Μοριακή μελέτη του γονιδιακής απαλοιφής του γονιδίου <i>recA</i> στο στέλεχος UA1	66
3.1.3. Μελέτη της σταθερότητας, ανάπτυξης και των αριθμών κυττάρων του UA1	70
3.1.4 Το πλασμιδιακό προφίλ του UA1 σε σύγκριση με του CP4	73
3.1.5 Μελέτη της βιωσιμότητας του UA1 παρουσία μεταλλαξογόνων παραγόντων	74
3.1.6 Μελέτη της δεκτικότητας του στελέχους UA1 σε φορείς κλωνοποίησης	75

3.1.6.1 Μελέτης της δεκτικότητας του στελέχους UA1 σε πειράματα μετασχηματισμού	76
3.1.6.2 Μελέτης της δεκτικότητας του στελέχους UA1 σε πειράματα σύζευξης	78
3.1.7. Μελέτη της ευαισθησίας του UA1 στο ναλιδιζικό οξύ	82
3.1.8. Μελέτη της έλλειψης λειτουργιών ομόλογου ανασυνδυασμού στο UA1	83
3.1.9. Μελέτη της παραγωγής αιθανόλης στο στέλεχος UA1	84
3.2 Κατασκευή ενός <i>Z. mobilis</i> CP4 <i>lexA</i> στελέχους	89
3.3 <i>In silico</i> πρόβλεψη μελών του SOS συστήματος στο <i>Z. mobilis</i>	93
3.3.1 Βιοπληροφορική αναζήτηση για πιθανά μέλη του SOS συστήματος στο γονιδίωμα του στελέχους CP4	93
3.3.2 Βιοπληροφορική αναζήτηση για γονίδια με τέλεια συντηρημένους SOS χειριστές στα χρωμοσώματα στελεχών του <i>Z. mobilis</i>	99
3.3.3 Βιοπληροφορική αναζήτηση για γονίδια με SOS χειριστές με μηδέν ή μία αλλαγή στα πλασμίδια στελεχών του <i>Z. mobilis</i>	101
3.4 Μεταγραφωματική ανάλυση των στελεχών <i>Z. mobilis</i> CP4 και UA1 σε SOS επαγόμενες συνθήκες	104
3.4.1 Συλλογή δειγμάτων των στελεχών CP4 και UA1 για αλληλούχηση RNA	104
3.4.2 Ανάπτυξη πρωτοκόλλων απομόνωσης RNA από κύτταρα στελεχών <i>Z. mobilis</i> για σκοπούς αλληλούχησης RNA	106
3.4.3 Ποιοτικός έλεγχος των αποτελεσμάτων αλληλούχησης και ποσοτικοποίηση των αλληλουχημένων μεταγράφων	113
3.4.4. Αντιστοίχιση των μεταγράφων με τα προβλεπόμενα γονίδια του γονιδιώματος του CP4	116
3.4.5. Σύγκριση μεταγραφωμάτων του CP4 και του UA1 παρουσία του μεταλλαξογόνου παράγοντα MMS	117
3.4.6 Μελέτη του προφίλ της έκφρασης των γονιδίων του CP4 υπό SOS επαγωγή	120
3.5 Εύρεση των μελών του SOS συστήματος στο <i>Z. mobilis</i> CP4	130
3.6 Μεταβολή της μεταγραφικής ισχύς ανάμεσα στα γονίδια-μέλη εντός συνεργιωμάτων	142
3.7 Εντοπισμός του SOS μοτίβου στο <i>Z. mobilis</i>	144
3.8 Επιβεβαίωση και σύγκλιση των <i>in silico</i> προβλέψεων SOS γονιδίων με τα αποτελέσματα της μεταγραφωματικής ανάλυσης	149
3.9 Μελέτη των υποκινητών των <i>recA</i> και <i>lexA</i> γονιδίων για χρήση τους ως μοντέλα αλληλεπίδρασης της LexA με SOS χειριστές	154
3.9.1. Κλωνοποίηση της ευρύτερης περιοχής του υποκινητή των <i>recA</i> και <i>lexA</i> γονιδίων από το στέλεχος CP4	154
3.9.2. <i>In vivo</i> μελέτη της ενεργότητας των υποκινητών των <i>recA</i> και <i>lexA</i> του CP4 εντός κυττάρων των <i>E. coli</i> DH5a και <i>A. tumefaciens</i> KYC55	156
3.9.3. <i>In vivo</i> μελέτη της αλληλεπίδρασης των υποκινητών των <i>recA</i> και <i>lexA</i> του CP4 με την πρωτεΐνη LexA του CP4 εντός κυττάρων του <i>E. coli</i> DH5a	157

3.9.4. <i>In vivo</i> μελέτη της αποκαταστολής των υποκινητών των <i>recA</i> και <i>lexA</i> του CP4 εντός κυττάρων <i>A. tumefaciens</i> KYC55	160
4. Συζήτηση	163
4.1 Μελέτη του CP4 <i>recA</i> στελέχους UA1	163
4.2 Προσπάθεια κατασκευής ενός CP4 <i>lexA</i> στελέχους	168
4.3 <i>In silico</i> πρόβλεψη μελών του SOS συστήματος στο <i>Z. mobilis</i>	169
4.4 Ποιοτικός έλεγχος των αποτελεσμάτων αλληλούχησης και ποσοτικοποίηση των αλληλουχημένων μεταγράφων	172
4.5 Σύγκριση μεταγραφωμάτων του CP4 και του UA1 παρουσία του μεταλλαξογόνου παράγοντα MMS	173
4.6 Μελέτη του προφίλ της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων του CP4 που ανταποκρίνονται υπό SOS επαγωγή	174
4.7 Επιδιορθωτικά γονίδια στο CP4	178
4.8 Το SOS συστήματος στο CP4	179
4.8.1 Τα μέλη του SOS συστήματος στο CP4	179
4.8.2 Το μοτίβο του SOS χειριστή στο CP4	185
4.9 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεταγραφωματικής ανάλυσης και των <i>in silico</i> αναλύσεων: σύγκλιση της βιοπληροφορικής πρόβλεψης μελών του SOS συστήματος με τη πειραματική προσέγγιση εύρεσης SOS γονιδίων	187
4.10 Χρήση των υποκινητών των <i>recA</i> και <i>lexA</i> γονιδίων του CP4 ως μοντέλα μελέτης της αλληλεπίδρασης μεταξύ της LexA και των SOS χειριστών	189
5. Παράρτημα	193
6. Βιβλιογραφία	335
7. Δημοσιεύσεις και Συνέδρια	373

Περίληψη

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής υπήρξε η μελέτη της SOS απόκρισης στο *Zyotomonas mobilis*. Η SOS απόκριση (SOS response) εκδηλώνεται στα βακτήρια σε καταστάσεις εκτεταμένης μεταλλαξογένεσης και πρόκλησης βλαβών στο DNA, και έγκειται στη συντονισμένη επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται κυρίως στην αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA ή στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ρυθμιστές των γονιδίων που επάγονται κατά την SOS απόκριση – των λεγόμενων SOS γονιδίων – είναι οι πρωτεΐνες RecA και LexA, από τις οποίες η πρώτη είναι η κύρια πρωτεΐνη του ομόλογου γενετικού ανασυνδυασμού και η δεύτερη ο μεταγραφικός καταστολέας όλων των SOS γονιδίων. Παρουσία βλαβών στο DNA, και δη μονόκλωνων αλυσίδων που προκύπτουν από θραύσεις, η RecA ενεργοποιείται και υποβοηθά τη LexA στην αυτοπρωτεόλυσή της. Αυτό έχει ως επακόλουθο την αποδέσμευση της τελευταίας από τις θέσεις πρόσδεσής της ανοδικά των SOS γονιδίων και την αποκαταστολή τους, συμπεριλαμβανομένων των ρυθμιστών *recA* και *lexA*. Η εκ νέου σύνθεση της LexA, όπως και η σταδιακή επιδιόρθωση των βλαβών, κατασιγάει την επαγωγή και επαναφέρει τον οργανισμό στην ιδιοστατική κατάσταση. Το SOS σύστημα έχει κατά κύριο λόγο μελετηθεί στο γ-πρωτεοβακτήριο *Escherichia coli*, αλλά στοιχεία του εύρους και των λειτουργιών του ανακαλύπτονται προσφάτως και σε άλλους οργανισμούς, όπως τα α-πρωτεοβακτήρια.

Το *Zyotomonas mobilis* είναι ζυμωτικό α-πρωτεοβακτήριο με έντονο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον εξαιτίας της ικανότητάς του για παραγωγή αιθανόλης με σχεδόν τέλειους ρυθμούς και αποδόσεις, καθώς και προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η δυνατότητα ζύμωσης υδρολυμάτων αμυλώδους ή αδρής βιομάζας καθιστούν προσφάτως τον οργανισμό αυτό εξαιρετικά σημαντικό στην παραγωγή βιοκαυσίμων (βιοαιθανόλης) πρώτης και δεύτερης γενιάς. Για τον λόγο αυτό, στο εργαστήριο μελετάται ο συγκεκριμένος οργανισμός σε επίπεδο γενετικό, γονιδιωματικό και κατασκευής στελεχών.

Η μελέτη του SOS συστήματος στο *Z. mobilis* ενδιέφερε στα πλαίσια της παρούσας έρευνας καθώς θα διαφώτιζε τη συμπεριφορά του οργανισμού σε συνθήκες μεταλλακτικού στρες και θα αναδείκνυε επίσης το πρώτο επαγωγίμο σύστημα γονιδίων που ουδέποτε έχει χαρακτηριστεί σ' αυτόν. Εργαλεία για τη μελέτη του SOS συστήματος κατά τη διατριβή αποτέλεσαν (α) ένα στέλεχος *recA* που δημιουργήθηκε με απαλοιφή του γονιδίου *recA* του βιομηχανικού στελέχους *Z. mobilis* CP4 και (β) βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων *recA* και *lexA* και των προβλεπόμενων προϊόντων τους, καθώς και ανάλυση των πρώτων αλληλουχημένων γονιδιωμάτων του *Z. mobilis* για ενδείξεις στοιχείων SOS-ρύθμισης, που πραγματοποιήθηκαν κατά την προπτυχιακή και μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία του υποψηφίου.

Στην παρούσα διατριβή, επεκτάθηκαν οι μελέτες στο κατασκευασμένο CP4 *recA* στέλεχος, το οποίο ονομάστηκε UA1. Επιβεβαιώθηκε με μοριακή ανάλυση η καθαρότητα και η μοναδικότητα της εισδοχής του γονιδίου *catE* (ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφαινικόλης), που είχε χρησιμοποιηθεί για τη γονιδιακή απαλοιφή του ενδογενούς *recA*, και διαπιστώθηκε η διατήρηση της ανθεκτικότητας του UA1 στη χλωραμφαινικόλη σε συνεχείς ανακαλλιέργειες άνευ πίεσης επιλογής, γεγονός που πιστοποιεί τον σταθερά μεταλλαγμένο του χαρακτήρα. Το UA1 μελετήθηκε επίσης ως προς τις παραμέτρους αύξησής του σε πλήρες και ελάχιστο θρεπτικό υλικό, σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, και παρουσία μεταλλαξογόνων, όπως υπερϊώδους ακτινοβολίας (UV) και μεθυλ-μεθανοσουλφονικού οξέως (MMS). Απεδείχθη εν γένει πιο αργό στην ανάπτυξη από το πατρικό, περισσότερο θνησιγενές σε φάση στασιμότητας και υπερευαίσθητο κατά πολλές τάξεις μεγέθους στα μεταλλαξογόνα. Τέλος, και σε πλήρη συμφωνία με τη φύση του *recA* γονοτύπου, το UA1 απεδείχθη ανίκανο να προβαίνει σε ομόλογο γενετικό ανασυνδυασμό.

Για να εξεταστεί εάν η υστέρηση στην ανάπτυξη του UA1 αντανακλά και σε ελαττωμένη παραγωγή αιθανόλης, η παραγωγή αυτού και του πατρικού στελέχους ελέγχθηκαν σε διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης με υγρή και αέριο χρωματογραφία. Και με τις δύο τεχνικές φάνηκε ότι το UA1 παράγει περίπου 3,5 φορές περισσότερη αιθανόλη από το

CP4 και η διαφορά αυτή είναι αξιοσημείωτα μεγαλύτερη (5,6 φορές) στη μέση εκθετική φάση αύξησης και όταν η παραγωγή ανάγεται προς τον αριθμό κυττάρων.

Για να διαφανεί, τέλος, η χρησιμότητα του στελέχους UA1 ως εργαλείου σε κατευθύνσεις γενετικής μηχανικής, ελέγχθηκε η δυνατότητά του να προσλαμβάνει DNA μέσω μετασχηματισμού και μέσω σύζευξης. Φάνηκε ότι μετασχηματίζεται με συχνότητες 4-10 φορές χαμηλότερες από το CP4 και συζεύγνεται με συχνότητες ίσες έως 10 φορές χαμηλότερες ανάλογα το παρακινούμενο πλασμίδιο, άρα είναι αρκούντως δεκτικό σε τροποποιήσεις που απαιτούν εισαγωγές γονιδίων.

Τα *recA* στελέχη των περισσότερων μικροοργανισμών είναι εξαιρετικά χρήσιμα σε κατευθύνσεις γενετικής μηχανικής, καθώς σταθεροποιούν και δεν ανακατατάσσουν το ξένο γενετικό υλικό που εισάγεται κατά τις τροποποιήσεις τους. Για τον λόγο αυτό, καθώς και για τις ιδιότητες που προαναφέρθηκαν, το UA1, ως το πρώτο *recA* αρνητικό στέλεχος του *Z. mobilis* που δημιουργήθηκε, προτάθηκε και έγινε δεκτό προς κατάθεση στην παγκόσμια τράπεζα μικροβιακών στελεχών ATCC (American Type Culture Collection) και έχει λάβει τον κωδικό AcqID-01168.

Για να εξακριβωθεί η ύπαρξη δικτύου SOS γονιδίων στο πατρικό του UA1 στέλεχος CP4, έγινε κατ' αρχήν υπολογιστική αναζήτηση γονιδίων που φέρουν συντηρημένους SOS χειριστές (SOS boxes), σύμφωνα με το α -πρωτεοβακτηριακό SOS μοτίβο (GTTCN₇GTTC ή GAACN₇GAAC) ανοδικά των γονιδίων. Η αναζήτηση κατέδειξε τέλειους χειριστές ανοδικά 10 χρωμοσωμικών γονιδίων και 1 πλασμιδιακού, και χειριστές με μία νουκλεοτιδική αλλαγή ανοδικά 58 και 9 γονιδίων, αντίστοιχα. Ανάμεσα σε αυτά εντοπίστηκαν εκτός από επιδιορθωτικά γονίδια, γονίδια μεταβολικά, δομικά, αναπνευστικά, ρυθμιστικά, κ.ά. Ανάλογες συντηρημένες αλληλουχίες χειριστών βρέθηκαν ανοδικά των ίδιων αλληλομόρφων όλων των στελεχών *Z. mobilis* subsp. *mobilis* που ελέγχθηκαν και των οποίων τα γονιδιώματα είναι πλέον γνωστά (ATCC 31821, ATCC 10988, ATCC 29191 και NCIMB 11163), ενώ διαφορές παρουσιάστηκαν όταν εξετάστηκε ο μοναδικός αλληλοουχρημένος αντιπρόσωπος του έτερου υποείδους του *Z. mobilis*, του *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* (ATCC 29192), ο οποίος φέρει κάποια κοινά και αρκετά καινούργια SOS γονίδια. Επίσης εντοπίστηκαν SOS γονίδια με 0-1 νουκλεοτιδική αλλαγή στον χειριστή τους στα πλασμίδια όλων των στελεχών, με τα περισσότερα τέτοια γονίδια να είναι στελεχοειδικά.

Η SOS επαγωγή μελετήθηκε διεξοδικά στα στελέχη UA1 και CP4 με αλληλούχηση του μεταγραφώματός τους κατόπιν πρόκλησης με το μεταλλαξογόνο MMS, σε κλίμακα συγκεντρώσεων από 0 ως 0,2 mM για το UA1 και ως 15 mM για το CP4, δηλαδή τέτοιας που να επιφέρει επαγωγή αλλά να αποτρέπει άνω της μίας δεκαδικής τάξης πτώση βιωσιμότητας για έκαστο στέλεχος. Για τους σκοπούς της μεταγραφωματικής ανάλυσης, αναπτύχθηκε τεχνική βέλτιστης απομόνωσης RNA από το *Z. mobilis*, ενώ τα δείγματα εστάλησαν προς δημιουργία βιβλιοθηκών και αλληλούχηση στο US DOE – Joint Genome Institute. Η ανάλυση των μεταγράφων απέδειξε ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες και στα δύο στελέχη μεταγράφεται το 97% των προβλεπόμενων κωδικοποιών γονιδίων του χρωμοσώματος και το 89% των πλασμιδίων. Σε επίπεδο διαφορικής έκφρασης και στις κοινές εφαρμοζόμενες συγκεντρώσεις του MMS, συνολικά 9 διαφορετικά γονίδια του UA1 και 67 του CP4, διαφορετικά από τα πρώτα, φάνηκαν να επάγονται ή καταστέλλονται. Ανάμεσα στα επαγόμενα γονίδια του CP4 συγκαταλέγονται τα επιδιορθωτικά *lexA*, *runA*, *runC*, που ομόλογά τους είναι SOS γονίδια σε άλλα βακτήρια. Στο UA1 κανένα επιδιορθωτικό γονίδιο δεν επάχθηκε, επιβεβαιώνοντας τον μόνιμα κατασταλαμένο φαινότυπό του. Το σύνολο των γονιδίων του CP4 που είχαν διαφορετική έκφραση σε συνθήκες SOS επαγωγής – το λεγόμενο SOS stimulon – φάνηκε να αριθμεί από 60 γονίδια στην χαμηλότερη συγκέντρωση του μεταλλαξογόνου έως 1.215 στην υψηλότερη (το 73% των μεταγραφόμενων γονιδίων). Χαρακτηριστικά υπερεκφραζόμενα γονίδια, συχνά συμμεταγραφόμενα, υπήρξαν επιδιορθωτικά, συγκρότησης φάγων, απόκρισης σε στρες και σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, ρυθμιστικά κ.ά., ενώ χαρακτηριστικά υποεκφραζόμενα ήταν γονίδια του μεταφραστικού μηχανισμού.

Για να βρεθεί το αυστηρώς νοούμενο SOS σύστημα στο *Z. mobilis* (: το SOS regulon σε αντιπαράθεση με το SOS stimulon), δηλαδή αυτό που ρυθμίζεται από τη LexA και τα γονιδιακά μέλη του οποίου φέρουν μοτίβα SOS χειριστών, αναζητήθηκε υπολογιστικά το

σύνολο των επιδιορθωτικών γονιδίων του CP4, καθώς τα τελευταία αποτελούν γνώμονα SOS γονιδίων σε όσους οργανισμούς έχουν μελετηθεί. Φάνηκε ότι ο οργανισμός φέρει 34 γονίδια ορθόλογα με καλά χαρακτηρισμένα των γ -πρωτεοβακτηρίων, εκ των οποίων τα 17 επάγονταν από το MMS ανεξαρτήτως συγκέντρωσης. Ανοδικά και των 17 εντοπίστηκαν μοτίβα SOS χειριστών με 0-3 νουκλεοτιδικές αλλαγές συγκριτικά με το τέλειο συναινετικό μοτίβο. Με βάση αυτό το κριτήριο χαλαρότητας του μοτίβου, αναζητήθηκαν τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια του CP4 στο σύνολο όλων που αντέδρασαν στο MMS και φέρουν ανάλογους SOS χειριστές. Εντοπίστηκαν 340 υπερεκφραζόμενα και 310 υποεκφραζόμενα γονίδια. Τα περισσότερα από αυτά, εκτός των επιδιορθωτικών που προαναφέρθηκαν, συμμετέχουν στην μεταφορά ουσιών, αναδίπλωση πρωτεϊνών, μεταβολισμό υδατανθράκων και αμινοξέων, παραγωγή ενέργειας και τη μεταφραστική μηχανή. SOS-ρυθμιζόμενα γονίδια εντοπίστηκαν και στα πλασμίδια και ευθύνονται για λειτουργίες όπως μετάθεση και τροποποίηση/περιορισμό του DNA ή συγκρότηση φάγων. Τα περισσότερα γονίδια αυτού του συνόλου πρώτη φορά αναφέρονται ως SOS γονίδια.

Ο εντοπισμός των SOS γονιδίων στο *Z. mobilis* βοήθησε στην εξεύρεση του ιδιαίτερου μοτίβου που χαρακτηρίζει έναν SOS χειριστή στον οργανισμό, μοτίβου, δηλαδή, που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γνώμονας στη βιοπληροφορική αναζήτηση SOS-ρυθμιζόμενων γονιδίων σε διαφορετικά στελέχη του οργανισμού ή να δια φωτίσει την SOS ρύθμιση στα α -πρωτεοβακτήρια εν γένει. Για τον σκοπό αυτό στοιχίστηκαν όλοι οι διαμορφωμένοι με τα άνω κριτήρια πιθανοί SOS χειριστές και φάνηκε ότι τα εσωτερικά TT ή AA δινουκλεοτίδια των GTTC ή GAAC επαναλαμβανόμενων τετραμερών των ολικών μοτίβων (GTTCN₇GTTC ή GAACN₇GAAC) είναι συντηρημένα άνω του 95% σε σχέση με τα εξωτερικά G και C των τετραμερών (συντήρηση 30-40%). Επιπλέον, παρατηρήθηκε τάση προτίμησης για βάσεις A/T τόσο στο N₇ εσωτερικό των μοτίβων όσο και εκατέρωθεν αυτών. Τέλος, βρέθηκε ότι το 87% των SOS μοτίβων εντοπίζεται έως 200 bp από τη μεταφραστική έναρξη του εκάστοτε γονιδίου.

Σε επίπεδο σύγκλισης των *in silico* προβλέψεων με τα πειραματικά αποτελέσματα της μεταγραφωμιακής ανάλυσης στην παρούσα εργασία, φάνηκε ότι οι βιοπληροφορικές προβλέψεις γονιδίων με SOS χειριστές με 0 ή 1 νουκλεοτιδική αλλαγή επιβεβαιώθηκαν κατά 91,7% και 53,5%, αντίστοιχα. Όμως, οι προβλέψεις κάλυψαν μόνο το 9,4% του συνόλου των γονιδίων που έφεραν SOS χειριστές με τα άνω κριτήρια και είχαν διαφορική έκφραση, καταδεικνύοντας έτσι ότι η πρόβλεψη για χειριστές με 0-1 αλλαγή, που είναι η ευρέως χρησιμοποιούμενη σε δημοσιεύσεις ερευνητών στον επιστημονικό χώρο, δεν επαρκεί.

Τέλος, στην εργασία αυτή, σημειώθηκε πρωταρχική μελέτη των υποκινητών των γονιδίων *recA* και *lexA* του CP4 ως μοντέλων μοριακής αλληλεπίδρασης της LexA πρωτεΐνης με τον SOS χειριστή. Για τον σκοπό αυτό κλωνοποιήθηκαν οι ευρύτερες περιοχές ανοδικά των γονιδίων *recA* και *lexA* σε πλασμίδιο ελέγχου μεταγραφικής ενεργότητας σταθερό σε α - και γ -πρωτεοβακτήρια, και εισήχθησαν τα κατασκευασμένα πλασμίδια σε κύτταρα (α) *E. coli*, που εξέφραζαν ή όχι *in trans* τη LexA του CP4 από φορέα υπερέκφρασης, και (β) *A. tumefaciens*, που εξέφραζαν *in trans* την οικεία χρωμοσωμική και ομόλογη με του *Z. mobilis*, LexA, εφόσον προσπάθειες να εισαχθούν στο ίδιο το *Z. mobilis* δεν τελεσφόρησαν. Οι υποκινητές αποδείχθηκαν ενεργοί και στους δύο ξενιστές με δυνατότερο αυτόν του *recA*. Η παρουσία της LexA του *Z. mobilis* στο *E. coli* οδήγησε σε καταστολή έως και ~60%, ενθαρρύνοντας το εγχείρημα της μελέτης μοριακών αλληλεπιδράσεων χειριστή – καταστολέα στον οργανισμό αυτό. Επίσης, στο *A. tumefaciens* και κατόπιν SOS επαγωγής, υπήρξε οριακή αποκαταστολή των υποκινητών, αναδεικνύοντας και πάλι ότι με βελτίωση του ετερόλογου αυτού συστήματος δύναται να πραγματοποιηθεί η επιθυμητή μελέτη.

Summary

The subject of this dissertation has been the study of the SOS response in *Zymomonas mobilis*. The SOS response is manifested in bacteria during conditions of extensive mutagenesis and DNA damage, and entails the coordinated induction of genes mainly involved in DNA repair and cell-cycle control. Regulators of genes expressed in SOS induction (the so-called SOS genes) are the proteins RecA and LexA, the first of which is the main homologous recombination protein and the second, the transcriptional repressor of all SOS genes. In presence of damaged DNA, and in specific ssDNA resulting from breaks, RecA is activated and assists LexA in its autocleavage and release from bound sites upstream from SOS genes. The last results in SOS-gene derepression, including that of genes coding for the SOS regulators. The gradual repair of lesions and the build-up of intact LexA stifle the response and restore the organism's constitutive state. The SOS system has been predominantly studied in the γ -proteobacterium *Escherichia coli*; however, elements of its constituents are being continuously discovered in other proteobacterial classes, such as the α -proteobacteria, and even other bacterial phyla.

Zymomonas mobilis is a fermentative α -proteobacterium with a considerable biotechnological impact due to its ability to produce ethanol at near perfect rates and yields, as well as other high-added-value products. Its ability to ferment starchy or lignocellulosic biomass hydrolysates has recently rendered the organism important for the production of first and second generation bioethanol. Our laboratory is working several decades now on *Z. mobilis* as a model organism and studies its genetics, genomics and amenability to strain engineering.

The study of the SOS system in *Z. mobilis* has been of interest in the laboratory as it addresses the capacity of the organism to withstand mutational stress. It also leads to the extrapolation and characterization of an inducible genetic system for this bacterium, for the first time. Preliminary results enabling the study of SOS in *Z. mobilis* in this work were: (a) the generation of a *recA* knock-out strain of the industrial strain CP4, and (b) bioinformatic analyses of the *recA* and *lexA* genes and their predicted protein products, as well as whole-genome searches for LexA binding motifs (SOS boxes) in available *Z. mobilis* genome sequences, which were obtained by the candidate during previous research.

In this doctoral thesis, the CP4 *recA* knock-out strain constructed in the laboratory, namely UA1, was further studied to a molecular and phenotypic level. The insertion of the chloramphenicol acetyltransferase gene, *catE*, into the native *recA* gene by means of allele exchange and double cross-over was confirmed by PCR and southern hybridizations. Additionally, the permanent resistance of UA1 to chloramphenicol, the insertional inactivation marker, was verified for many generations of UA1 growth without selection pressure, proving the stability of the insertion. UA1 was also studied for growth in complete and minimal medium, in aerobic and anaerobic conditions, and in the presence of mutagens such as ultraviolet light (UV) and the alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS). It was generally slower in growth than the parental strain, less viable at stationary phase, and many orders of magnitude more sensitive to the mutagens. Finally, and in accordance with its *recA* nature, UA1 was unable to perform homologous recombination.

In order to examine whether the slow growth of UA1 also led to reduced ethanol production, the latter was monitored for UA1 and the parental CP4, at different stages of growth, by both liquid and gas chromatography. Both analytical methods demonstrated that UA1 produces 3.5 times more ethanol than CP4, and this difference is notably greater (5.6 times) at mid-log phase and when cell numbers are taken into account.

Finally, to assess the usefulness of UA1 in genetic engineering applications, its ability to receive DNA via transformation and conjugation was tested. UA1 appeared to be transformed at frequencies 4- to 10-times lower than the parental CP4, while, as a conjugal transfer recipient, it appeared to be equally to 10-fold less permissive, depending on the plasmid transferred. The latter indicated that UA1 can sufficiently act as host for foreign gene introduction purposes.

recA-deficient strains of most microorganisms are extremely useful in genetic engineering endeavors, as they maintain the fidelity of the foreign genetic material introduced and eliminate homologous recombination-dependent rearrangements. Being the first *recA*-deficient *Z. mobilis* strain created, UA1 gained acceptance by the American Type Culture Collection (ATCC), receiving the temporary code number AcqID-01168.

In order to verify the existence of an SOS gene network in the parental to UA1 strain CP4, a computational search was performed for genes carrying conserved SOS boxes upstream from their transcriptional starts, i.e., boxes exhibiting the α -proteobacterial SOS motif (GTTCN₇GTTC or GAACN₇GAAC). The search resulted in the identification of perfect boxes upstream from 10 chromosomal and 1 plasmid genes, while boxes with one nucleotide mismatch were found upstream from 58 and 9 genes, respectively. Among these were DNA repair genes, metabolic, structural, respiratory, regulatory genes, and genes of other functions. Similar conserved operator sequences were found upstream from same alleles in all *Z. mobilis* subsp. *mobilis* strains tested – those whose genomes were to date known (ATCC 31821, ATCC 10988, ATCC 29191 and NCIMB 11163) – while differences were observed in the only sequenced representative of the *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* taxon (strain ATCC 29192), which was found to carry several genes in common with the subsp. *mobilis* strains, as well as new SOS genes. SOS genes preceded by boxes with 0-1 nucleotide mismatch were also detected in the plasmids of all strains, with most such genes notably being strain-specific.

The SOS induction was extensively studied in strains UA1 and CP4 via transcriptome sequencing. The strains were challenged with the mutagen MMS at concentrations ranging from 0 to 0.2 mM for UA1 and to 15 mM for CP4. These concentrations were chosen on grounds of being inductive, yet preventing survival drops of more than one order of magnitude in either case. For the transcriptomic analysis, an optimal RNA isolation protocol for *Z. mobilis* was developed and the samples sent for library construction and sequencing at the US DOE – Joint Genome Institute. Transcript analysis demonstrated that under normal conditions 97% of the predicted chromosome coding genes and 89% of plasmid genes are transcribed in both strains. In terms of differential expression, and at the low MMS concentrations employed for both strains, a total of 9 UA1 genes and 67 CP4 genes, different from those of UA1, appeared to be induced or suppressed. Among genes induced in CP4, present were the genes *lexA*, *ruvA*, and *ruvC*, which are known SOS genes in other bacteria. In UA1 no DNA repair gene was induced, confirming its permanently suppressed phenotype. The group of CP4 genes that exhibited differential expression under SOS induction – the so-called SOS stimulon – numbered from 60 genes at the lowest mutagen concentration to 1,215 at the highest (73% of transcribed genes). Typical over-expressed genes, often co-transcribed, were genes for DNA repair, phage assembly, stress response, antimicrobial resistance, and regulation, while characteristic under-expressed genes were those of the translation machinery.

To determine the strictly-sensed SOS system in *Z. mobilis*, e.g. the SOS (LexA) regulon within the SOS stimulon, the DNA repair genes of CP4 were sought computationally, since repair genes stand as archetypical SOS members in all organisms studied. It appeared that CP4 carries 34 DNA repair genes orthologous to well-characterized ones of the γ -proteobacteria, 17 of which were induced by MMS at any of the concentrations employed. Upstream from all 17 genes, SOS boxes were detected with 0 to 3 nucleotide mismatches compared to the perfect consensus motif. This finding trained the search for differentially expressed genes carrying similarly heterologous SOS boxes among all differentially expressed genes. 340 over-expressed and 310 under-expressed genes were detected, which apparently comprise the *Z. mobilis* SOS regulon. Apart from DNA repair genes, genes involved in transportation, protein folding, carbohydrate and amino acid metabolism, energy production and the translation machinery were encountered. SOS-regulated genes were also identified in the plasmids and found to be responsible for functions such as DNA transposition, DNA restriction and modification, and phage assembly. Most genes in this category are characterized as SOS-dependent for the first time.

The determination of SOS genes in *Z. mobilis* led to the discovery of the particular motif characterizing the SOS box in the organism. This motif can serve in bioinformatic searches for SOS-regulated genes in yet other *Z. mobilis* strains or even pose as paradigm for

SOS regulation in the α -proteobacteria in general. It appeared that in the *Z. mobilis* SOS-box motif, the internal TT/AA dinucleotides of the GTTC/GAAC tetramers of the GTTCN₇GTTC or GAACN₇GAAC motifs are over 95% conserved, in contrast to the outer G/Cs of the tetramers (30-40% conserved). In addition, a trend for A/T preference was observed both in the N7 spacers and in regions flanking the motif. Finally, it was found that 87% of SOS motifs are located up to 200 bp from translational starts of regulated genes.

Examining the convergence between the *in silico* predictions and the experimental results of the transcriptomic analysis in this study, it became apparent that the bioinformatic predictions for genes with SOS boxes bearing 0 or 1 nucleotide mismatch were 91.7% and 53.5% confirmed, respectively. However, these predictions accounted for only 9.4% of genes recognized in this work as SOS genes by means of both the computational and expression criteria set. Given that the search for boxes bearing 0 or 1 mismatch has been the norm in characterizing SOS genes in past literature, we strongly believe that a combinatorial approach such as the one herein is far more proficient in the extrapolation of entire regulons and the discovery of unpredicted gene members.

Finally, in this work, a preliminary study of the *Z. mobilis* *recA* and *lexA* promoters and their molecular interactions with LexA was conducted. For this purpose, the regions upstream from the CP4 *recA* and *lexA* genes were cloned into a transcriptional fusion vector stable in α - and γ -proteobacteria, and the constructs introduced into (i) *E. coli* cells expressing (or not) *in trans* the CP4 LexA from an overexpression vector, and (ii) *A. tumefaciens*, expressing its cognate chromosomal and homologous to that of *Z. mobilis*, LexA. These heterologous systems were used after initial attempts to introduce the transcriptional vectors to *Z. mobilis* failed. The promoters were active in both hosts, with that of *recA* (*PrecA*) proving to be far stronger. The presence of the *Z. mobilis* LexA in *E. coli* resulted in ~60% suppression of *PrecA*, encouraging the study of molecular operator-repressor interactions in this organism. Also, in *A. tumefaciens* and under SOS induction, there was marginal promoter derepression, again demonstrating the usefulness of such heterologous systems in this line of work.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή

1.1. Η SOS απόκριση

1.1.1. Γενικά στοιχεία της SOS απόκρισης

Για να επιβιώσουν τα βακτήρια στα διαφορετικά περιβάλλοντα, διαθέτουν συστήματα γονιδίων που επάγονται ή καταστέλλονται συντονισμένα ανάλογα με τις ανάγκες τους. Ένα από αυτά τα συντονισμένα συστήματα γονιδίων είναι η SOS απόκριση.

Η SOS απόκριση (SOS response) είναι ένα επαγόμενο σύστημα απόκρισης των βακτηρίων έναντι των βλαβών στο DNA. Οι πρώτες ενδείξεις βρέθηκαν στο *Escherichia coli* όπου παρατηρήθηκε επαγωγή προφάγων, νηματοποίηση των κυττάρων και μεταλλαξογένεση σε κύτταρα που είχαν ακτινοβοληθεί με UV (Weigle 1953, Hertman & Luria 1967, Green *et al.* 1969). Τα φαινόμενα αυτά συνδέθηκαν αργότερα με την ευαισθησία στελεχών, μεταλλαγμένων ως προς τα γονίδια *lexA* και *recA*, ως προς τη UV ακτινοβολία (Gudas & Pardee 1975), γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ενός συστήματος απόκρισης έναντι των βλαβών στο DNA (Radman 1975). Στα χρόνια που ακολούθησαν επιβεβαιώθηκε αυτή η υπόθεση και δείχθηκε ότι τα προϊόντα των γονιδίων *lexA* και *recA* ρυθμίζουν το σύστημα ενώ ταυτόχρονα τα ίδια τα γονίδια είναι μέλη του συστήματος (Witkin 1976, Little & Mount 1982).

1.1.2. Ο μηχανισμός της SOS απόκρισης στο *E. coli*

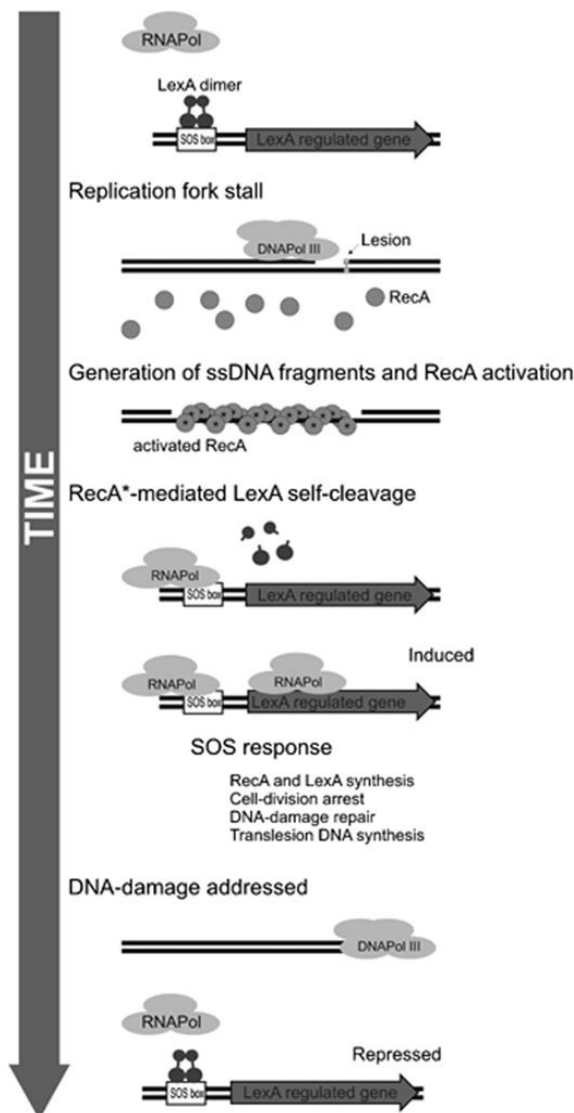
Η SOS απόκριση έχει μελετηθεί διεξοδικά στο *E. coli* (Walker 1984, d'Ari 1985, Shinagawa 1996). Δύο πρωτεΐνες ρυθμίζουν την SOS απόκριση: η LexA και η RecA. Η LexA είναι ο καταστολέας του συστήματος. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η LexA διμερίζεται και καταστέλλει τα μέλη του SOS συστήματος, τα SOS γονίδια, στα οποία συγκαταλέγονται τα γονίδια *recA* και *lexA*, καθώς και γονίδια που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση και αντιγραφή του DNA και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (Little & Mount 1982, Walker 1984, d'Ari 1985). Η καταστολή επιτυγχάνεται με την πρόσδεση του διμερούς της LexA σε ειδικές αλληλουχίες DNA που εντοπίζονται ανοδικά των SOS γονιδίων και ονομάζονται SOS χειριστές (SOS boxes, Little *et al.* 1981, Wertman & Mount 1985). Στο *E. coli* το διμερές LexA αναγνωρίζει και προσδέεται σε παλίνδρομη ακολουθία 16 βάσεων που ακολουθεί το μοτίβο CTGTN₈ACAG (Butala *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2010). Η πρόσδεση της LexA παρεμβαίνει στην δράση της RNA πολυμεράσης εμποδίζοντας την μεταγραφή των SOS γονιδίων.

Στον μηχανισμό της SOS απόκρισης (Εικόνα 1.1) η RecA λειτουργεί σαν αισθητήρας της απόκρισης. Παράγοντες που επάγουν την SOS απόκριση, όπως η UV ακτινοβολία, η μιτομυκίνη C και το MMS, προκαλούν βλάβες στο DNA, που οδηγούν στην συσσώρευση μονόκλωνων τμημάτων DNA. Η RecA εντοπίζει τα μονόκλωνα τμήματα DNA και προσδέεται σε αυτά σχηματίζοντας νουκλεοπρωτεϊνικά νημάτια (Sassanfar & Roberts 1990). Σε αυτή τη μορφή η RecA ενεργοποιείται και αποκτά ενεργότητα συμπρωτεάσης, η οποία επάγει την αυτοπρωτεόλυση της LexA (Little 1984). Η αυτοπρωτεόλυση της LexA έχει σαν συνέπεια την απομάκρυνση της από τα SOS γονίδια. Τελικά, όλα τα SOS γονίδια

1. Εισαγωγή

αποκαταστέλλονται με αποτέλεσμα την αντιμετώπιση των βλαβών στο DNA (Crowley & Courcelle 2002).

Η αποκαταστολή των SOS γονιδίων οδηγεί στην προγραμματισμένη έκφραση γονιδίων που στοχεύουν στην αντιμετώπιση των βλαβών στο DNA. Το προϊόν του SOS γονιδίου *ssb* προστατεύει μονόκλωνα τμήματα DNA ενώ τα προϊόντα των SOS γονιδίων *uvrA*, *uvrB*, *uvrD*, *recA*, *recN*, *ruvA* και *ruvB* αναλαμβάνουν την επιδιόρθωση των βλαβών μέσα από την επιδιόρθωση με εκτομή βάσης ή την επιδιόρθωση με ανασυνδυασμό (Walker 1984). Στα SOS γονίδια συγκαταλέγονται τα *polB*, *dinB*, *umuDC*, τα οποία κωδικοποιούν DNA πολυμεράσες επιρρεπείς στα λάθη που δρουν όταν έχει σταματήσει η αντιγραφή του DNA λόγω βλαβών που δεν έχουν επιδιορθωθεί (Napolitano *et al.* 2000, Jarosz *et al.* 2007). Παράλληλα, έως ότου αντιμετωπιστούν οι βλάβες, παρεμποδίζεται η κυτταρική διαίρεση μέσα από την δράση του SOS γονιδίου *sulA* (Trusca *et al.* 1998).



Μετά την αντιμετώπιση των βλαβών, μειώνονται τα επίπεδα των μονόκλωνων τμημάτων DNA και η RecA σταματάει να είναι στην ενεργοποιημένη της κατάσταση. Συνεπώς, τα επίπεδα της μη πρωτεολυμένης LexA ανεβαίνουν. Έτσι, η LexA επανακαταστέλλει τα SOS γονίδια, επιστρέφοντας το σύστημα στην ιδιοστατική του κατάσταση.

Εικόνα 1.1. Σχηματική αναπαράσταση της SOS επαγωγής στο *E. coli*. (Erill *et al.* 2007).

1. Εισαγωγή

1.1.3. LexA: ο καταστολέας του SOS συστήματος

1.1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Η LexA είναι ένας διμερής καταστολέας 22 kD. Ως γενικευμένος μεταγραφικός καταστολέας ρυθμίζει την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων τα οποία είναι διάσπαρτα σε όλο το βακτηριακό γονιδίωμα και συμμετέχουν σε διαφορετικές διεργασίες (Gottesman 1984, Martinez-Antonio & Collado-Videz 2003, Grainger & Busby 2008). Η επαγωγή των SOS γονιδίων που σε κανονικές συνθήκες καταστέλλει είναι αποτέλεσμα της αυτοπρωτεόλυσής της (βλ. παρακάτω για το μηχανισμό) και για αυτό η SOS απόκριση ανήκει στην κατηγορία των στρεσογόνων αποκρίσεων στις οποίες η μεταγραφή ρυθμίζεται από πρωτεόλυση. Ο μηχανισμός αυτοπρωτεόλυσής της κατατάσσει την LexA στις ενδοπεπτιδάσες σερίνης και την καθιστά πρότυπο για υπεροικογένεια πρωτεϊνών στην οποία συμπεριλαμβάνονται ο καταστολέας cI του φάγου λ, η UmuD της DNA πολυμεράσης V (PolV) και η MucA, που είναι όμοια με την UmuD. Χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών αυτής της υπεροικογένειας είναι ότι αυτοπρωτεολύονται με την βοήθεια της RecA, που συμμετέχει σαν συμπρωτεάση (Little 1984, Hauser *et al.* 1992, Butala 2009).

1.1.3.2. Η δομή της LexA και ο μηχανισμός της αυτοπρωτεόλυσής της

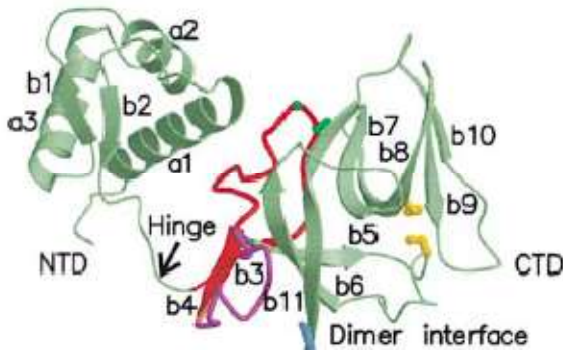
Η δομή της LexA του *E. coli* έχει λυθεί τόσο με NMR (Fogh *et al.* 1994) όσο και με κρυσταλλογραφία (Zhang *et al.* 2010). Η δομή της είναι αυτή που είναι υπεύθυνη τόσο για τον διμερισμό της και την καταστολή των SOS γονιδίων όσο και για την αποκαταστολή τους κατά την SOS απόκριση. Η LexA διπλώνει σε δύο ευδιάκριτες δομικές περιοχές (την αμινοτελική NTD και την καρβοξυτελική CTD) οι οποίες χωρίζονται μεταξύ τους με μία διασυνδετήρια "ευλύγιστη" περιοχή (hinge) (Εικόνα 1.2). Δύο μονομερή της LexA διμερίζονται στην CTD περιοχή προς τον σχηματισμό του διμερούς καταστολέα και προσδένονται στους SOS χειριστές με την NTD περιοχή (Εικόνα 1.3).

Ως πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών πρόσδεσης στο DNA που διαθέτουν μοτίβο έλικας-στροφής-έλικας με "φτερό" (winged Helix-Turn-Helix, wHTH, Schultz *et al.* 1991, Butala *et al.* 2009). Εκτός της LexA, άλλοι μεταγραφικοί καταστολείς που διαθέτουν το wHTH μοτίβο είναι οι εξής: ο BirA που ρυθμίζει την σύνθεση της βιοτίνης στο *E. coli* (Chakravartty & Cronan 2013), ο NrpR που ρυθμίζει την δέσμευση αζώτου στα Αρχαία (Lie *et al.* 2005), ο θερμοεπαγόμενος HrcA του *Thermotoga maritima* (Liu *et al.* 2005), ο MarR που ρυθμίζει την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά στο *E. coli* (Aleksun & Levy 1999) και ο SlyA που σχετίζεται με την παθογένεια στα εντεροβακτήρια (Spory *et al.* 2002, Wu *et al.* 2009). Στη LexA, όπως και στις προαναφερθείσες πρωτεΐνες, το μοτίβο αυτό εντοπίζεται στην αμινοτελική (NTD) περιοχή. Η NTD αποτελείται από 3 α-έλικες ακολουθούμενες από 2 αντιπαράλληλα β-πτυχωτά πεδία. Η δεύτερη και τρίτη έλικα είναι αυτές που σχηματίζουν το μοτίβο πρόσδεσης στο DNA έλικα-στροφή-έλικα (HTH) με την τρίτη έλικα να κάνει αναγνώριση και πρόσδεση στον SOS χειριστή στην μεγάλη αύλακα του DNA (Εικόνα 1.4). Επίσης, το "φτερό" της LexA στρέφεται προς την μικρή αύλακα του DNA, όπου εντοπίζονται τα μη συντηρημένα νουκλεοτίδια του SOS χειριστή. Το "φτερό" του ενός μονομερούς LexA έρχεται σε

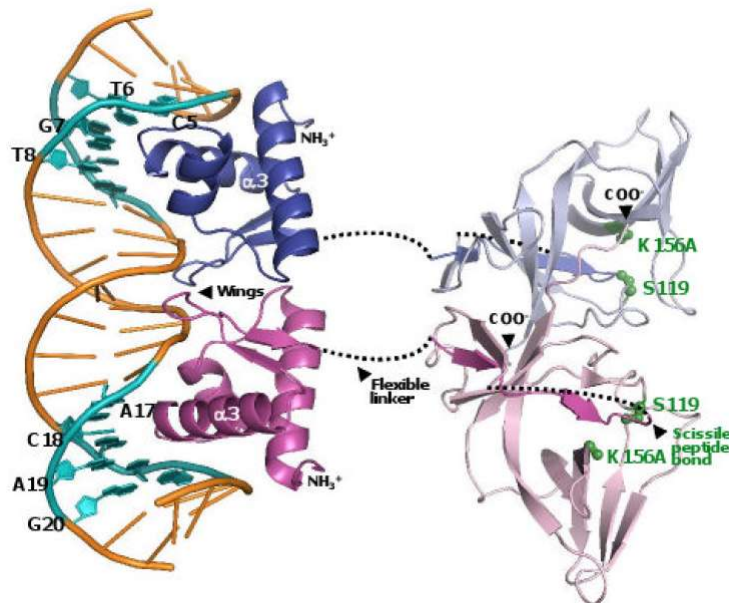
1. Εισαγωγή

επαφή με τις $\alpha 1$ και $\alpha 2$ έλικες της NTD του δεύτερου μονομερούς του διμερούς καταστολέα (Εικόνα 1.3), δημιουργώντας ένα υδρόφοβο πυρήνα στις υδρόφιλες επιφάνειες των δύο NTDs.

Η διασυνδετήριος περιοχή αποτελείται από 4 κατάλοιπα και είναι υδρόφιλη. Έχει δείχθει ότι είναι σημαντική για την συγκράτηση της NTD επικράτειας του ενός μονομερούς σε σταθερή απόσταση από την NTD επικράτεια του δεύτερου μονομερούς στον διμερή LexA καταστολέα (Oertel-Buchheit *et al.* 1993).

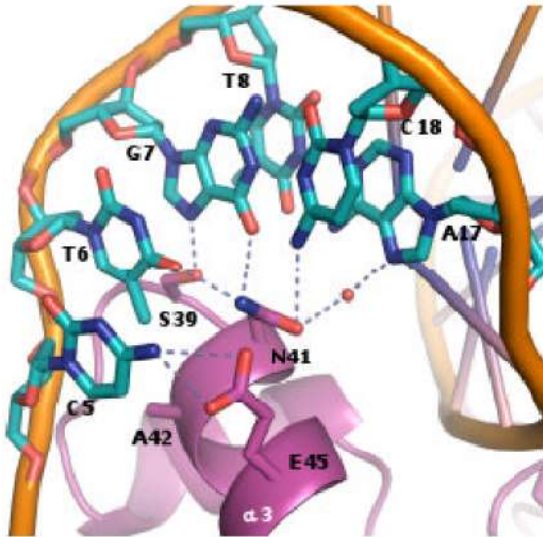


Εικόνα 1.2. Η δομή ενός μονομερούς της LexA. Φαίνεται η NTD, που έχει τρεις α έλικες για να προσδέεται στο DNA και δύο β κλώνους, η διασυνδετήριος περιοχή (*hinge*) για την ένωση των δύο επικρατειών και η CTD με 9 β κλώνους. (Luo *et al.* 2001). Κίτρινοι ράβδοι στην CTD: τα κατάλοιπα S119 και K156.



Εικόνα 1.3. Απεικόνιση ολόκληρης της δομής του διμερούς της LexA προσδεμένης σε SOS χειριστή (Zhang *et al.* 2010). Το ένα μονομερές χρωματίζεται μπλε και το δεύτερο ροζ, οι συντηρημένες βάσεις στον SOS χειριστή με κυανό χρώμα (η κάθε βάση αναγράφεται με μαύρο χρώμα και δίπλα αναγράφεται ο αριθμός της θέσης της) και το υπόλοιπο DNA με πορτοκαλί χρώμα. Η διασυνδετήριος περιοχή (*hinge*) δεν είχε συγκεκριμένη δομή και θέση για να επιτευχθεί η μοντελοποίησή της. Επίσης, στην εικόνα σημειώνονται η $\alpha 3$ έλικα και το «πτερό» (*wing*) της κάθε NTD και οι θέσεις διαφόρων μεταλλάξεων (πράσινα γράμματα) που χρειάστηκαν για την κρυστάλλωση και τελική μοντελοποίηση του συμπλόκου.

1. Εισαγωγή

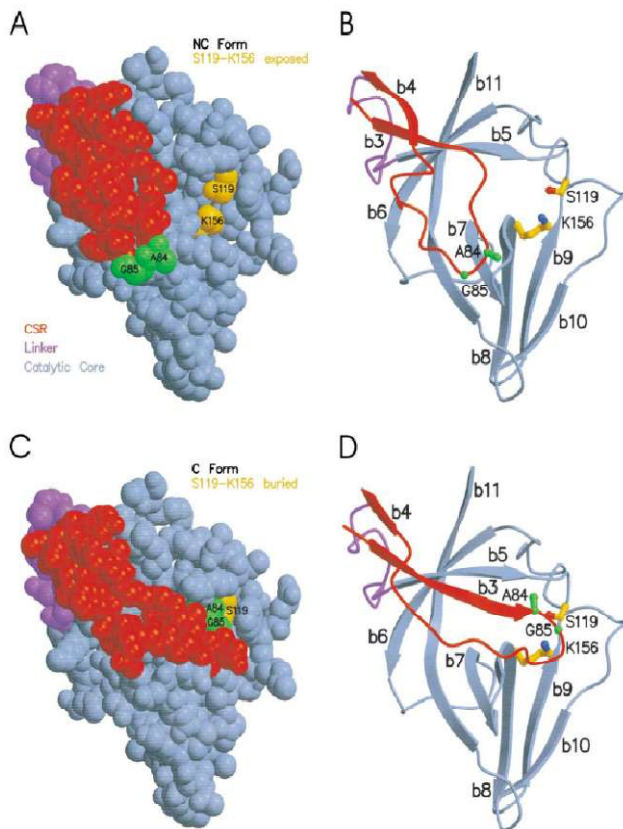


Εικόνα 1.4. Απεικόνιση της αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης της $\alpha 3$ έλικας (μοβ) με τις συντηρημένες βάσεις (μπλε) του SOS χειριστή (Zhang *et al.* 2010). Με κουκκίδες σημειώνονται οι υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων και ομάδων των νουκλεοτιδικών βάσεων.

Η CTD επικράτεια αποτελείται από β -πτυχωτά πεδία (Εικόνα 1.3). Περιέχει τα απαραίτητα κατάλοιπα τόσο για τον διμερισμό όσο και για την αυτοπρωτεόλυση. Ένα κατάλοιπο σερίνης (S119) και ένα κατάλοιπο λυσίνης (K156) είναι αυτά που καταλύουν την αυτοπρωτεόλυση της LexA με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν των ενδοπεπτιδασών σερίνης, παρόλο που δεν συμμετέχουν κατάλοιπα σερίνης, ιστιδίνης και ασπαρτικού όπως στον κλασικό μηχανισμό ενδοπεπτιδάσης σερίνης (Paetzel *et al.* 1998, Patricelli *et al.* 1999). Σαν διμερές διαθέτει δύο δομικές καταστάσεις: την κατάσταση NC, όπου η αυτοπρωτεόλυση παρεμποδίζεται, και την κατάσταση C, όπου η αυτοπρωτεόλυση πραγματοποιείται (Εικόνα 1.5). Η διαφορά μεταξύ των δύο καταστάσεων εντοπίζεται στη θέση που βρίσκεται η στροφή-υπόστρωμα. Στην NC κατάσταση, η στροφή-υπόστρωμα (ο δεσμός μεταξύ των καταλοίπων A84-G85) βρίσκεται απομακρυσμένη από τα καταλυτικά S119 και K156. Στην C κατάσταση, η στροφή-υπόστρωμα μετακινείται και έρχεται κοντά στα S119 και K156. Οι δύο καταστάσεις είναι ενεργειακά σταθερές και η μετάβαση από την μία στη άλλη μπορεί να γίνει τάχιστα. Οι λόγοι που σταθεροποιούν την NC κατάσταση, ώστε να είναι η επικρατέστερη εντός του κυττάρου μέχρι τη στιγμή της SOS απόκρισης, είναι οι εξής:

- η έκθεση υδρόφοβων καταλοίπων στον διαλύτη όταν γίνεται μετατόπιση της στροφής-υποστρώματος προς το ενεργό κέντρο κατά τη C κατάσταση
- ο ανταγωνισμός της στροφής-υποστρώματος με κανονικά διατεταγμένα μόρια διαλύτη
- η δημιουργία μιας διόγκωσης κατά τη C δομή
- η έκθεση της λυσίνης K156 στον διαλύτη. Η λυσίνη είναι πρωτονιωμένη στην ϵ -αμινομάδα της στην NC δομή, κάτι που ευνοεί ενεργειακά την έκθεσή της στον διαλύτη. Στην C δομή η λυσίνη κρύβεται από την στροφή-υπόστρωμα και το ενεργειακό κόστος του να «κρυφτεί» η ϵ -αμινομάδα της λυσίνης είναι σημείο ελέγχου για την αυτοπρωτεόλυση της LexA.

1. Εισαγωγή



Εικόνα 1.5. Απεικόνιση των δύο μορφών NC (εικόνες A και B – χωροπληρωτικά μοντέλα) και C (εικόνες C και D – αναπαράσταση με κορδέλες) της LexA (Luo *et al.* 2001). Με κόκκινο: η περιοχή της CTD όπου γίνεται η διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των καταλοίπων A84 και G85 (πράσινες σφαίρες και ράβδοι), μοβ: η συνδετική αλυσίδα μεταξύ της περιοχής που καταλύει την αντίδραση και του υποστρώματος, μπλε: η υπόλοιπη CTD που περιέχει τα κατάλοιπα S119 και K156 (κίτρινες σφαίρες και ράβδοι) που καταλύουν τη διάσπαση. Είναι φανερό η μετατόπιση του υποστρώματος από την NC στη C κατάσταση και η προώθηση των A84 και G85 προς το ενεργό κέντρο, που έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του δεσμού ανάμεσά τους.

Μετά τη αυτοπρωτεόλυση της LexA, πρωτεάσες του κυττάρου αναλαμβάνουν να διασπάσουν τα εναπομείναντα τμήματα της LexA που έχουν προκύψει από την αυτοπρωτεόλυσή της (Little 1983, Neher *et al.* 2003).

Για την μετάβαση από την NC στην C κατάσταση εντός του κυττάρου, συμβάλει η RecA. Συγκεκριμένα, η RecA και το μονόκλωνο DNA λειτουργούν σαν συμπαραγοντες για την αυτοπρωτεόλυση της LexA. Νουκλεοπρωτεϊνικά νημάτια σχηματίζονται μεταξύ μονομερών της RecA και μονόκλωνου DNA (Williams & Spengler 1986, DiCarua *et al.* 1990). Σε αυτή τη μορφή η RecA (ενεργοποιημένη RecA) λειτουργεί σαν συμπρωτεάση (Little 1991) και αλληλεπιδρά με την NC κατάσταση της LexA: η RecA προσφέρει έναν υδρόφιλο θύλακα, που αντισταθμίζει το ενεργειακό κόστος για να κρυφτεί η λυσίνη K156. Η λυσίνη αφαιρεί ένα πρωτόνιο από την σερίνη S119, κάνοντάς την νουκλεόφιλη, η οποία με την σειρά της καταλύει την αυτοπρωτεόλυση της LexA (Lin & Little 1989, Giese 2008). Μετά την αυτοπρωτεόλυση, αρκεί να αποκολληθεί μία από τις δύο NTD του διμερούς LexA από το DNA ώστε να απομακρυνθεί όλος ο καταστολέας (Zhang *et al.* 2010).

Με την αποκαταστολή των μελών του SOS συστήματος, ένα από τα πρώτα γονίδια που ξεκινούν να μεταγράφονται είναι και το γονίδιο *lexA*. Παρόλη την αυξημένη παραγωγή μονομερών LexA, η SOS απόκριση παραμένει ενεργοποιημένη γιατί παραμένει η RecA προσδεμένη σε μονόκλωνο DNA και, συνεπώς, ενεργοποιημένη. Η αυτοπρωτεόλυση της LexA επιτελείται συνεχώς, άρα είναι

1. Εισαγωγή

αδύνατος ο σχηματισμός του διμερούς καταστολέα, έως ότου γίνει αποκατάσταση των βλαβών στο DNA (Giese *et al.* 2008). Μετά την αντιμετώπιση των βλαβών, εξαλείφεται η ύπαρξη μονόκλωνου DNA, παύει να είναι ενεργοποιημένη η RecA και κατά συνέπεια τα ήδη παραγόμενα μόρια LexA διμερίζονται και καταστέλλουν την έκφραση των μελών του SOS συστήματος.

1.1.4. RecA: η δεύτερη ρυθμιστική πρωτεΐνη του SOS συστήματος. Δομή και λειτουργίες της RecA

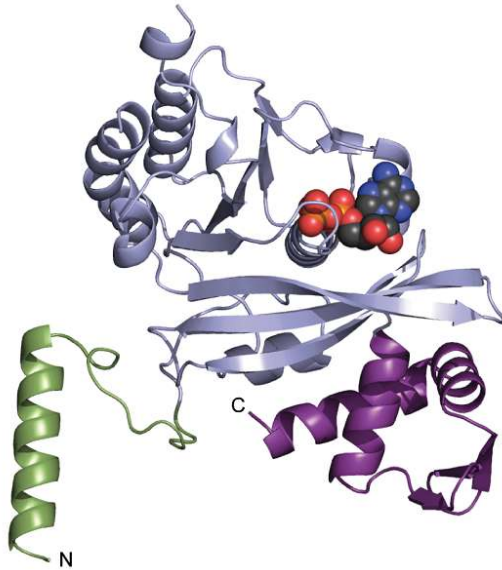
Η βακτηριακή RecA είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην υπερκοκογένεια των πρωτεϊνών ανασυνδυασμού, μέλη της οποίας εντοπίζονται σε όλα τα είδη των οργανισμών. Η ύπαρξή της ανακαλύφθηκε από τους Clark & Margulies που μελετούσαν μεταλλαγμένα στελέχη του *E. coli* που δεν μπορούσαν να προάγουν ομόλογο ανασυνδυασμό μετά από σύζευξη και δεν μπορούσαν να επιβιώσουν μετά από ακτινοβόληση με UV ακτινοβολία (Clark & Margulies 1965). Από τότε μέχρι σήμερα, έχει λυθεί η δομή της και έχουν μελετηθεί οι λειτουργίες της και οι ρόλοι της στο κύτταρο (Little & Gellert 1983, Kowalczykowski *et al.* 1994, Lusetti & Cox 2002, Cox 2003, Chen *et al.* 2008, McGrew & Knight 2003).

Η RecA (Εικόνα 1.6) είναι μία πρωτεΐνη εξαρτώμενη από ATP που προσδένει DNA καθώς και ATPάση εξαρτώμενη από DNA (Lusetti & Cox 2002). Διαθέτει αυτοτελείς λειτουργικές επικράτειες που συμμετέχουν στον πολυμερισμό της, στην πρόσδεση ATP και στην πρόσδεση DNA. Όσον αφορά την πρόσδεση του ATP, διαθέτει ένα Walker A μοτίβο, το οποίο συναντάται συχνά σε πρωτεΐνες που προσδένουν ATP και GTP, και ένα Walker B μοτίβο, το οποίο είναι σε περιοχή που αλληλεπιδρά με ιόντα Mg^{2+} που σχετίζονται με το προσδεμένο ADP (McGrew & Knight 2003). Επιπλέον, συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα της αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες-καταστολείς, που μπορούν να προάγουν την αυτοπρωτεόλυσή τους, όπως η LexA, και συμβάλουν στο να μεταβούν οι καταστολείς στην αυτοπρωτεολυτική τους κατάσταση (Luo *et al.* 2001, McGrew & Knight 2003). Διαφορετικά κατάλοιπα της αλληλεπιδρούν με την χαμηλής πιστότητας πολυμεράση V, που είναι βασικό μέλος της SOS απόκρισης στο *E. coli* και σε αυτήν οφείλεται η SOS μεταλλαξογένεση.

Η πρόσδεση του DNA είναι βασικό στάδιο για όλους τους ρόλους της RecA. Το πρώτο βήμα, που είναι και το πιο αργό, είναι η πρόσδεση ενός μονομερούς της RecA σε μονόκλωνο τμήμα DNA. Η RecA, ενώ μπορεί να προσδεθεί εναλλακτικά σε δίκλωνο DNA ή RNA (DiCarua *et al.* 1990, VanLoock *et al.* 2003), παρουσία ATP έχει αυξημένες δυνατότητες πρόσδεσης σε μονόκλωνο DNA. Από την στιγμή που το πρώτο μονομερές της RecA παρουσία ATP προσδεθεί στο μονόκλωνο τμήμα, σαν δεύτερο βήμα περισσότερα μονομερή προσδένονται τάχιστα στο DNA με κατεύθυνση 5' προς 3' (Cox 2003). Έτσι σχηματίζεται ένα νουκλεοπρωτεϊνικό νημάτιο RecA-DNA (Εικόνα 1.7) που έχει ελικοειδή μορφή και διαθέτει 6 μονομερή της RecA ανά στροφή DNA και 3 νουκλεοτίδια ανά μονομερές της RecA (VanLoock *et al.* 2003, Chen *et al.* 2008). Η κατάσταση όπου η RecA είναι προσδεμένη στο μονόκλωνο DNA παρουσία ATP αποτελεί την "ενεργοποιημένη" μορφή της RecA. Στην Εικόνα 1.7, εκτός του DNA και των 6 μονομερών της RecA, φαίνεται και η θέση που προσδένεται το ATP σε κάθε μονομερές. Στα πειράματα των Chen και

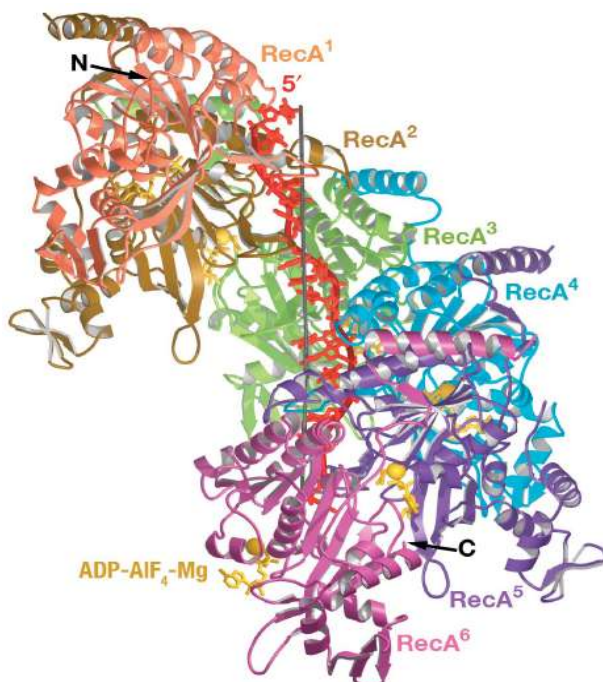
1. Εισαγωγή

συνεργατών χρησιμοποιήθηκε σαν τριφωσφορικό νουκλεοτιδικό ανάλογο το ADP-AIF₄-Mg που χρωματίζεται χρυσό στην Εικόνα 1.7.



Εικόνα 1.6. Δομή της πρωτεΐνης RecA. Με χωροπληρωτικό σχέδιο απεικονίζεται το προσδεμένο ADP (μετά από υδρόλυση του ATP). Το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο απεικονίζονται με πράσινο και μοβ χρώμα αντίστοιχα (Cox 2007).

Η RecA σαν πρωτεΐνη ανασυνδυασμού, προάγει τον ομόλογο ανασυνδυασμό στα βακτήρια. Στην "ενεργοποιημένη" της μορφή (RecA₆-ssDNA-ATP₆), αναζητά σε δίκλωνο DNA ομόλογη αλληλουχία με αυτή του μονόκλωνου τμήματος που είναι προσδεμένη. Ακολουθούν ζευγαρώματα βάσεων για "έλεγχο" συμπληρωματικότητας του μονόκλωνου DNA με το συμπληρωματικό κλώνο του ομόλογου δίκλωνου τμήματος, γιατί η ανταλλαγή αλυσίδων είναι αυστηρά ευαίσθητη στην ύπαρξη σωστών υδρογονικών δεσμών (Lusetti & Cox 2002, Chen *et al.* 2008). Μετά το ζευγάρωμα του μονόκλωνου τμήματος με το συμπληρωματικό του από το δίκλωνο, ακολουθεί η διείδυση του μονόκλωνου τμήματος, η εκτόπιση του δεύτερου κλώνου από το δίκλωνο τμήμα και η αντικατάστασή του από το μονόκλωνο τμήμα με κατεύθυνση 5' προς 3'.



Εικόνα 1.7. Η δομή του νουκλεοπρωτεϊνικού νηματίου που αποτελείται από 6 μόρια RecA και ένα τμήμα μονόκλωνου DNA. Τα μόρια της RecA χρωματίζονται από το πρώτο στο τελευταίο με τα εξής χρώματα: ροζ, καφέ, πράσινο, κυανό, μοβ, σκούρο μοβ. Το μονόκλωνο τμήμα DNA είναι μια αλληλουχία 18 θυμινών και ο σκελετός του έχει χρωματιστεί κόκκινος. Με χρυσό χρώμα συμβολίζεται το ADP-AIF₄-Mg (Chen *et al.* 2008).

1. Εισαγωγή

Για τον ρόλο του ATP, ήδη αναφέρθηκε ότι αυξάνει τη δυνατότητα πρόσδεσης της RecA σε μονόκλωνο DNA. Η RecA διαθέτει ένα πυρήνα ATPάσης και τον χρησιμοποιεί για να προσδέσει μονόκλωνο DNA με ένα ATP-εξαρτώμενο τρόπο (Story *et al.* 1992). Επιπλέον, η υδρόλυση του ATP δεν είναι αναγκαία για την ανταλλαγή κλώνων αλλά αυξάνει την ενεργότητα της RecA στην ανταλλαγή των κλώνων. Επίσης, δρώντας αλλοστερικά στην στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης, το ATP διευκολύνει τη διευθέτηση των μορίων DNA και την εξασφάλιση των σωστών ζευγαρωμάτων βάσεων (Cox 2003). Μετά την υδρόλυση ακολουθεί η ελάττωση συγγένειας της RecA στο υπόστρωμά της και αποδέσμευσή της από το ετεροδίκλωνο DNA (Chen *et al.* 2008).

Το νουκλεοπρωτεϊνικό νημάτιο δεν συμμετέχει μόνο στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Η RecA είναι η δεύτερη ρυθμιστική πρωτεΐνη του SOS συστήματος. Αλληλεπιδρά με τον διμερή καταστολέα LexA προσφέροντας έναν υδρόφιλο θύλακα ο οποίος βοηθά την LexA να αυτοπρωτεολυθεί και να αποκαταστεί τα SOS γονίδια (Little 1991). Αυτή η δράση "συμπρωτεάσης" της RecA δεν περιορίζεται μόνο στην LexA. Οι καταστολείς των φάγων λ και φ80 (Little & Mount 1982, Little 1984) ομοίως προσεγγίζονται από τη RecA για την επαγωγή της αυτοπρωτεόλυσής τους. Επιπλέον, η RecA συμμετέχει και στην ρύθμιση της SOS μεταλλαξογένεσης, όχι μόνο μέσω της ρύθμισης των SOS γονιδίων *umuDC* αλλά και στην δημιουργία της πολυμεράσης V. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με μονομερή μόρια της UmuD (Mustard & Little 2000) για να τα ενεργοποιήσουν, ομοίως μέσω αυτοπρωτεόλυσης, και να σχηματίσουν σε διμερή μορφή μαζί με τη UmuC την επιρρεπή σε λάθη πολυμεράση V (UmuD₂C). Έχει βρεθεί ότι η RecA επάγει πιο γρήγορα την αυτοπρωτεόλυση της LexA και πιο αργά την αυτοπρωτεόλυση των καταστολέων των φάγων και της UmuD (Slilaty *et al.* 1983). Με τη διαφορά ταχύτητας στην δράση συμπρωτεάσης θέτεται ένα "όριο" βλαβών στο DNA: κάτω από αυτό γίνεται επαγωγή του SOS συστήματος και επιδιόρθωση του DNA χωρίς επαγωγή φάγων και SOS μεταλλαξογένεση ενώ πέρα από αυτό, που σημαίνει ότι συνεχίζουν να υφίστανται εκτεταμένες βλάβες στο DNA, γίνεται επαγωγή των φάγων και επιτάσσεται η SOS μεταλλαξογένεση σαν λύση στην αντιμετώπιση των βλαβών.

Οι ρόλοι που διαδραματίζει η RecA μέσα στο βακτηριακό κύτταρο περιστρέφονται γύρω από τις λειτουργίες κατάλυσης του ομόλογου ανασυνδυασμού και συμπρωτεάσης. Ήδη αναλύθηκε ο ρόλος "συμπρωτεάσης" της RecA στην SOS απόκριση μέσω της συμμετοχής της στην αυτοπρωτεόλυση της LexA, στην επαγωγή φάγων και στην SOS μεταλλαξογένεση μέσω της συμμετοχής της στην δημιουργία της πολυμεράσης V. Επίσης σαν συμπρωτεάση συμμετέχει και σε φαινόμενα μετάθεσης. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η ενεργοποιημένη RecA επάγει τη μετάθεση του μεταθετού στοιχείου Tn5 (Kuan & Tessman 1992). Σαν κύρια πρωτεΐνη ομόλογου ανασυνδυασμού, συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού και συγκεκριμένα στο μονοπάτι RecBCD, για την επιδιόρθωση δίκλωνων σπασμάτων, και στο μονοπάτι RecF, για την επιδιόρθωση μονόκλωνων χασμάτων (βλ. παράγραφο 1.2.3.5). Επιπλέον, μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού, η RecA συμμετέχει και στον συζευκτικό ανασυνδυασμό (Clark *et al.* 1984), όπου το νεοεισερχόμενο DNA, που έχει μεταφερθεί συζευκτικά εντός του δέκτη, ενσωματώνεται μέσω του ανασυνδυασμού στο γονιδίωμα του ξενιστή (Lloyd & Buckman 1995, Kim *et al.* 2015). Η RecA έχει επίσης συνδεθεί και με την αντιγραφή του DNA και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. *recA*-μεταλλαγμένα στελέχη,

1. Εισαγωγή

ανίκανα για ανασυνδυασμό, παρουσίαζαν αδυναμία διαχωρισμού των θυγατρικών χρωμοσωμάτων (Zyskind *et al.* 1992). Οι Zyskind και συνεργάτες χρησιμοποιώντας αυτά τα στελέχη αναφέρουν ότι η RecA προσδένεται σε σημεία που έχει τερματίσει πρόωρα μία διχάλα αντιγραφής και προστατεύει την διχάλα μέχρι τον τερματισμό της αντιγραφής του DNA και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Τέλος, έχει βρεθεί ότι η RecA συμμετέχει και σε SOS-επαγόμενη αντιγραφή του DNA, που έχει ονομαστεί επαγόμενη σταθερή αντιγραφή του DNA-induced stable DNA replication (iSDR), που ξεκινά από δίκλιωνα σπασίματα (Kogoma 1997).

1.1.5. Το SOS σύστημα απόκρισης στο *E. coli*: τα SOS γονίδια και ο SOS χειριστής

Τα δύο πρώτα SOS γονίδια, τα *lexA* και *recA* τα οποία είναι και τα ρυθμιστικά γονίδια του συστήματος, αναγνωρίστηκαν από μεταλλαγμένα στελέχη του *E. coli*. Το ένα στέλεχος δεν εμφάνιζε τους φαινοτύπους (επαγωγή προφάγων, νηματοποίηση των κυττάρων και μεταλλαξογένεση) που αναμένονταν και δεν έδειχνε επαγωγή του *recA* γονιδίου του μετά από SOS επαγωγή (Mount *et al.* 1972, Gudas & Pardee 1975). Το στέλεχος αυτό, επειδή δεν έδειχνε επαγωγή ονομάστηκε *lexA*(Ind⁻) (εκ του non-Inducible SOS response) και έφερνε μεταλλαγές που οδηγούσαν στην αλλαγή των αμινοξικών κατάλοιπων στη θέση που γίνεται η αυτοπρωτεόλυση, με αποτέλεσμα αυτή να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί και άρα να μην υπάρχει αποκαταστολή. Αντιθέτως, το άλλο στέλεχος έδειχνε σταθερή έκφραση του *recA* γονιδίου είτε γινόταν επαγωγή του συστήματος είτε όχι (Mount 1977, Gudas & Mount 1977). Λόγω της έλλειψης ρύθμισης ονομάστηκε *lexA*(Def) (εκ του *lexA* deficient). Αντιστοίχως, *recA*⁻ στέλεχος δεν έδειχνε επαγωγή του *lexA* γονιδίου υπό SOS συνθήκες (Gudas & Pardee 1975). Αυτό το στέλεχος φέρνει απαλοιφές νουκλεοτιδίων εντός του πλαισίου ανάγνωσης με αποτέλεσμα να αλλάζει το πλαίσιο ανάγνωσης στο σημείο που αφορά τον διμερισμό της πρωτεΐνης. Έτσι, αδυνατούν να διμεριστούν τα παραγόμενα μόρια της LexA για να σχηματιστεί λειτουργικός καταστολέας. Αυτά τα μεταλλαγμένα στελέχη βοήθησαν στην έναρξη της κατανόησης του μηχανισμού του SOS συστήματος (Little & Mount 1982).

Στην συνέχεια εντοπίστηκαν αρκετά SOS γονίδια, τα επονομαζόμενα *din* γονίδια (*damage inducible*), με χρήση του γονιδίου *lacZ* ως γονιδίου αναφοράς έκφρασης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ο φάγος Mu1d (Ap, *lacZ*) για τυχαίες ενθέσεις στο χρωμόσωμα, που φέρει *lacZ* γονίδιο χωρίς υποκινητή. Όταν ο φάγος ενσωματωθεί σε τέτοια θέση που να βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός SOS χειριστή, δημιουργώντας μία *din::Mu1d* (Ap, *lacZ*) σύντηξη, τότε η έκφραση του *lacZ* επάγεται κατά την SOS επαγωγή. Με αυτόν τον τρόπο βρέθηκαν ως SOS γονίδια τα γονίδια *polB* και *dinB*, που κωδικοποιούν τις DNA πολυμεράσες II και IV αντίστοιχα, *uvrA*, *uvrB* και *uvrD*, που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA με εκτομή νουκλεοτιδίων, *sulA*, που σταματά των κυτταρικό κύκλο κατά την SOS απόκριση, *recN*, που συμμετέχει στην επιδιόρθωση με ανασυνδυασμό, *ruvAB*, που συμμετέχουν στη λύση των δομών Holliday μετά τον ομόλογο ανασυνδυασμό, και τα *dinF* και *dinD* (Kenyon & Walker 1980, Fogliano & Schendel 1981, Huisman & D'Arì 1981, Shurvinton & Lloyd 1982, Arthur & Eastlake 1983, Finch *et al.* 1985). Με την ίδια μέθοδο βρέθηκε ότι και γονίδιο που ελέγχει την λυσιγονικότητα του βακτηριοφάγου λ (*himA*) είναι SOS γονίδιο (Miller *et al.* 1981), καθώς και γονίδια πλασμιδίων του *E. coli* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ανάλογες με DNA πολυμεράση επιρρεπή σε λάθη

1. Εισαγωγή

(*mucAB* στο pKM101, Elledge & Walker 1983, *impCAB* στο TP110, Dowden *et al.* 1984).

Ένας από του πρώτους SOS φαινοτύπους ήταν η αυξημένη μεταλλαξογένεση σε κύτταρα *E. coli* που είχαν ακτινοβοληθεί από UV, η λεγόμενη SOS μεταλλαξογένεση (Weigle 1953, Kato & Shinoura 1977, Steinborn 1978). Κύρια αιτία αυτού του φαινοτύπου είναι η επιρρεπής σε λάθη πολυμεράση V, που κωδικοποιείται από το SOS συνεργίωμα *umuDC*. Βρέθηκε με αλληλούχηση και με μέθοδο προστασίας από την DNάση I ότι η LexA προσδένεται και ρυθμίζει την έκφραση του συνεργιώματος αυτού (Kitagawa *et al.* 1985). Όσον αφορά τα προϊόντα του συνεργιώματος, η ενεργοποιημένη RecA επάγει την αυτοπρωτεόλυση της UmuD παράγοντας την UmuD'. Η UmuC και ένα ομοδιμερές της UmuD' αλληλεπιδρούν για την δημιουργία της χαμηλής πιστότητας πολυμεράσης V (UmuD'₂C). Η πολυμεράση V είναι ικανή να πολυμερίσει νουκλεοτίδια απέναντι από βλάβες του DNA, οι οποίες εμποδίζουν τη δράση των υπολοίπων πολυμερασών και συνεπώς σταματούν την αντιγραφή του DNA. Η πολυμεράση V, όμως, έχει χαμηλή πιστότητα και επιπλέον δεν διαθέτει την επιδιορθωτική 3'-5' εξωνουκλεοτική ενεργότητα των πολυμερασών I και III, με αποτέλεσμα να εισάγει λανθασμένες βάσεις. Αυτή εισαγωγή λανθασμένων βάσεων, ώστε να συνεχίσει η αντιγραφή του DNA και να μην επέλθει θάνατος του κυττάρου, είναι και η αιτία της SOS μεταλλαξογένεσης.

Ένα ακόμη γονίδιο που προστέθηκε στην λίστα των SOS γονιδίων ήταν το γονίδιο *ssb*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί πρωτεΐνη που προσδένεται και προστατεύει μονόκλωνα τμήματα του DNA και συμμετέχει στην αντιγραφή, ανασυνδυασμό και επιδιόρθωση του DNA. Βρέθηκε ότι ο υποκινητής του ρυθμίζεται από την LexA και μπορεί να επάγει την έκφραση γονιδίου-αναφοράς ύστερα από επίδραση με UV ακτινοβολία και με μιτομυκίνη C.

Η εύρεση SOS γονιδίων επέφερε και την εύρεση της θέσης πρόσδεσης της LexA (την αλληλουχία του SOS χειριστή) στο *E. coli*. Χρήση απομονωμένης LexA πρωτεΐνης σε πειράματα προστασίας του DNA από DNάση, έδειξε τα σημεία που προσδένεται η LexA ανοδικά των *lexA*, *recA*, *uvrA*, *uvrB* και *sulA* (Walker 1982, Cole 1983). Στοίχιση των ευρισκόμενων ακολουθιών υπέδειξε το μοτίβο taCTGTatata-a-aCAGta (με κεφαλαία συμβολίζονται οι συντηρημένες βάσεις) να είναι το μοτίβο του χειριστή που αναγνωρίζει και προσδένεται η LexA (SOS μοτίβο). Αργότερα, πειράματα πρόσδεσης της LexA σε υποκινητές με πιθανούς SOS χειριστές (Lewis *et al.* 1994), καθώς και συνδυασμός *in silico* προβλέψεων με πειραματική επιβεβαίωσή τους (Fernandez de Henestrosa *et al.* 2000), εξέλιξαν το μοτίβο σε TACTG(TA)₅CAGTA. Η λύση και μελέτη της δομής του διμερούς καταστολέα προσδεμένου στον SOS χειριστή έδειξε ότι η τρίτη α έλικα, που ανήκει στο wHTH μοτίβο πρόσδεσης στο DNA στην NTD περιοχή της LexA, αλληλεπιδρά με τα 4 συντηρημένα νουκλεοτίδια CTGT/ACAG του χειριστή, διαμορφώνοντας το μοτίβο ως CTGTN₈ACAG (Butala *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2010).

Η εύρεση του SOS μοτίβου βοήθησε στην εύρεση περισσότερων SOS γονιδίων, πρώτα μέσω της αναζήτησης πιθανού SOS χειριστή ανοδικά του υποψηφίου γονιδίου και μετά με την επιβεβαίωση της επαγωγής του γονιδίου σε SOS απόκριση. Με αυτόν τον τρόπο βρέθηκαν ότι γονίδια κολισινών (Ebina *et al.* 1981, van den Elzen *et al.* 1982, Mankovich *et al.* 1984, Pugsley *et al.* 1985, Masaki & Ohta 1985) και τα γονίδια *dinI* (Yasuda *et al.* 1998) και *recX* (Stohl *et al.* 2003), τα οποία παρεμποδίζουν τις δράσεις συμπρωτεάσης και ανταλλαγής ομόλογων αλυσίδων της

1. Εισαγωγή

RecA αντίστοιχα (Yasuda *et al.* 1998, Venkatesh *et al.* 2002, Renzette *et al.* 2007), ρυθμίζονται από SOS χειριστές και δείχθηκε ότι η παραγωγή των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν αυξάνεται ύστερα από επίδραση με SOS επαγωγικούς παράγοντες.

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας επέτρεψε τόσο την *in silico* αναζήτηση SOS χειριστών με βάση το SOS μοτίβο σε ολόκληρο το γονιδίωμα του *E. coli* όσο και την αναζήτηση επαγόμενων γονιδίων ελέγχοντας ολόκληρο το γονιδίωμα του οργανισμού σε συνθήκες επαγωγής του SOS συστήματος. Μέσω βιοπληροφορικής αναζήτησης και σε πειράματα ελέγχου πρόσδεσης της LexA στους ευρισκόμενους πιθανούς SOS χειριστές, καθώς και σε πειράματα αναλύσεων κατά Northern, ο αριθμός των SOS γονιδίων ανέβηκε στα 32 (Fernandez de Henestrosa *et al.* 2000), στα οποία συμπεριλήφθηκε το γονίδιο *hokE*, ομόλογο με γονίδια σταθεροποίησης πλασμιδίων, το γονίδιο *dinS*, που κωδικοποιεί πιθανή τρανσποζάση, και το γονίδιο *molR*, που κωδικοποιεί πρωτεΐνη για την ρύθμιση του μεταβολισμού μολυβδαινίου. Έτσι, η SOS απόκριση φάνηκε ότι καλύπτει και άλλες λειτουργίες του κυττάρου πέραν της αντιμετώπισης βλαβών στο DNA. Ο συνδυασμός *in silico* αναζητήσεων με την τεχνολογία μικροσυστοιχιών επέτρεψε τον εντοπισμό επιπλέον 21 γονιδίων που φέρουν θέσεις πρόσδεσης της LexA και η έκφρασή τους επάγεται μετά από ακτινοβόληση με UV (Courcelle *et al.* 2001). Τα περισσότερα από αυτά είναι υποθετικά γονίδια, ξεχωρίζουν όμως τα γονίδια *ibpA* και *ibpB*, γονίδια πρωτεϊνών-συνοδών που επάγονται από το θερμικό σοκ, *lit*, γονίδιο πρωτεάσης που συμμετέχει στην άμυνα του κυττάρου έναντι φάγων, και *grxA*, γονίδιο γλουταρεδοξίνης. Να σημειωθεί, όμως, ότι σε άλλα πειράματα μικροσυστοιχιών, χρησιμοποιώντας είτε την UV ακτινοβολία (Quillardet *et al.* 2003) είτε την μιτομυκίνη C (Khil & Camerini-Otero 2002) σαν SOS επαγωγικό παράγοντα, δεν βρέθηκαν να επάγονται όλα τα SOS γονίδια που βρέθηκαν στις προηγούμενες εργασίες. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν 332 υπερεκφραζόμενα γονίδια μετά από επίδραση με μιτομυκίνη C (Khil & Camerini-Otero 2002), ανάμεσα στα οποία δεν ήταν τα 21 γονίδια που βρέθηκαν στην εργασία των Courcelle και συνεργατών. Στην εργασία των Quillardet και συνεργατών εντοπίστηκαν 268 υπερεκφραζόμενα γονίδια ύστερα από επίδραση με UV, όπου ανάμεσά τους "συμβατικά" SOS γονίδια ήταν μόνο 13 (*lexA*, *recA*, *recN*, *sulA*, *uvrB*, *ruvA*, DNA transocase *ftsK*, Antitoxin *dinJ*, *dinP* και τα άγνωστης λειτουργίας *yebG*, *ybfE*, *dinD*, *dinI*). Το σύνολο των SOS γονιδίων που έχουν εντοπιστεί στο *E. coli* και οι τρόποι με τους οποίους βρέθηκαν σημειώνονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1 Τα SOS γονίδια του *E. coli* και οι πειραματικές προσεγγίσεις που οδήγησαν στην εύρεσή τους

Γονίδια	Πειραματική προσέγγιση	Αναφορά
<i>Εύρεση μεμονωμένων γονιδίων</i>		
<i>polB</i> , <i>dinB</i> , <i>dinD2</i> , <i>dinF</i>	Έλεγχος έκφρασης (Εισδοχές με το Mu1d και έλεγχος ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης) παρουσία μιτομυκίνης C (MC)	Kenyon & Walker 1980
<i>uvrA</i>	Όπως πριν	Kenyon & Walker 1981
<i>uvrB</i>	Όπως πριν, παρουσία UV	Fogliano & Schendel 1981
<i>uvrD</i>	Όπως πριν, παρουσία MC	Arthur & Eastlake 1983

1. Εισαγωγή

<i>sfIA (sulA)</i>	Όπως πριν, παρουσία UV	Huisman & D'Ari 1981
<i>himA</i>	Όπως πριν	Miller <i>et al.</i> 1981
<i>ruvAB</i>	Όπως πριν, παρουσία MC και UV	Shurvinton & Lloyd 1982
Γονίδια κολισινών	Εντοπισμός SOS χειριστή εντός υποκινητή και έλεγχος επιπέδων πρωτεΐνης παρουσία και απουσία LexA ή παρουσία MC	Ebina <i>et al.</i> 1981 και 1982 (E1), van den Elzen <i>et al.</i> 1982 (DF13), Mankovich <i>et al.</i> 1984 (Ib), Pugsley <i>et al.</i> 1985 (E2), Masaki & Ohta 1985 (E3)
<i>ssb</i>	Μεταγραφική σύντηξη του υποκινητή με το <i>galK</i> και μέτρηση επιπέδων γαλακτοκινάσης παρουσία MC και UV	Brandsma <i>et al.</i> 1983
<i>mucAB</i> (pKM101)	Κατασκευή <i>muc-lacZ</i> συντήξεων και έλεγχος ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης παρουσία UV	Elledge & Walker 1983
<i>impCAB</i> (TP110)	Εισδοχές με το Mu1d και έλεγχος ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης παρουσία MC και UV	Dowden <i>et al.</i> 1984
<i>umuDC</i>	Προστασία από DnaseI (+/- LexA)	Kitagawa <i>et al.</i> 1985
<i>dinI</i>	Ανάλυση κατά Western σε κύτταρα ακτινοβολημένα με UV	Voloshin <i>et al.</i> 2000
<i>recX</i>	Ανάλυση κατά Western σε κύτταρα επωασμένα με MC	Stohl <i>et al.</i> 2003
<i>tisAB</i>	Μελέτη της έκφρασης παρουσία UV και έλεγχος πρόσδεσης LexA στον υποκινητή	Weel-Sneve <i>et al.</i> 2008
<i>intI</i>	<i>In silico</i> εύρεση SOS χειριστών ανοδικά του γονιδίου και έλεγχος πρόσδεσης LexA στον υποκινητή	Cambray <i>et al.</i> 2011
Αναζήτηση σε ολόκληρο το γονιδίωμα (<i>in silico</i> ή/και πειραματικά)		
<i>ysdAB, dinQ, hokE, ydjM, yjiW, ydjQ, dinS, molR, ybfE</i>	<i>In silico</i> αναζήτηση για SOS χειριστές. Ανάλυση κατά Northern σε κύτταρα επωασμένα με MC για έκφραση γονιδίων που έφεραν τέλειους SOS χειριστές	Fernandez de Henestrosa <i>et al.</i> 2000
<i>yafNOP, fur, fldA, ybiA, dinG, ybiB, ftsK, lolA, ycaJ, yceP, hlyE, ybjM, ybjQ, yebGFE, yeeA, sbmC, recN, smpA, yjfFG, smpB, dinF, yjbJ, borD, ybiN, grxA, yccS, yccF, ymfED, lit, glvGBC, ibpBA, yifLN, intE, ymfGHIJ, ycgH, ydeO, ydeTSR, arpB, ydiY,</i>	Μικροσυστοιχίες με RNA απομονωμένο από ακτινοβολημένα με UV κύτταρα και <i>in silico</i> ανάλυση υποκινητών	Courcelle <i>et al.</i> 2001

1. Εισαγωγή

<i>yoaAB, yegQ, ogrK, yqgCD, yhiJKL</i>		
332 επαγόμενα γονίδια	Μικροσυστοιχίες με RNA απομονωμένο από κύτταρα που είχαν επωαστεί σε μιτομυκίνη C	Khil & Camerini-Otero 2002
268 επαγόμενα γονίδια	Μικροσυστοιχίες με RNA απομονωμένο από ακτινοβολημένα με UV κύτταρα	Quillardet <i>et al.</i> 2003

Η εύρεση επιπλέον SOS γονιδίων στο *E. coli* διεύρυνε και την αντίληψη περί των λειτουργιών που ελέγχονται από την SOS απόκριση πέραν της επιδιόρθωσης και αντιγραφής του DNA. Ήδη αναφέρθηκε ότι από τους πρώτους φαινοτύπους της SOS απόκρισης ήταν η επαγωγή φάγων (Witkin 1976). Επιπλέον, αναφέρθηκε προηγουμένως η εύρεση γονιδίων κολισινών ως SOS γονίδια. Έχει βρεθεί ότι το συνεργίωμα *tisAB*, που παράγει πεπτίδιο τοξίνης, είναι επίσης SOS-ρυθμιζόμενο (Vogel *et al.* 2004, Weel-Sneve *et al.* 2008). Σημαντικό εύρημα ήταν ότι γονίδια ιντεγκρασών στο *E. coli*, καθώς και στα *Vibrio cholerae* και *Pseudomonas aeruginosa*, φέρουν SOS μοτίβα ανοδικά τους και είναι SOS-ρυθμιζόμενα (Guerin *et al.* 2009, Cambray *et al.* 2011, Hocquet *et al.* 2012). Το αποτέλεσμα είναι ότι κατά την SOS απόκριση αυξάνεται ο ανασυνδυασμός μεταθετών κασετών με τη δράση των ιντεγκρασών, και επιφέρονται ανθεκτικότητες σε αντιβιοτικά σε στελέχη φαινοτυπικά ευάλωτα. Ένας ακόμη SOS φαινότυπος είναι η αυξημένη εκτομή των στοιχείων TnI, Tn5 και Tn10 που παρατηρείται κατά την επίδραση με UV ακτινοβολία (Aleshkin *et al.* 1998). Η εύρεση SOS χειριστών του *E. coli* και σε άλλα γ-πρωτεοβακτήρια έδειξε ότι η δημιουργία βιοφίλμ στο *P. aeruginosa* (Gotoh *et al.* 2010) και η ανθεκτικότητα σε φθοροκινολόνες στο *Salmonella enterica* (Da Re *et al.* 2009) είναι LexA-ρυθμιζόμενα. Άλλες SOS-ρυθμιζόμενες λειτουργίες, πέρα από τις προαναφερθείσες, έχουν παρατηρηθεί στα Firmicutes όπου συμπεριλαμβάνουν τον έλεγχο νησίδων παθογένειας στο *Staphylococcus aureus* (Ubeda *et al.* 2007) και τη σποριογένεση και κινητικότητα στο *Clostridium difficile* (Walter *et al.* 2015).

1.1.6. Το SOS σύστημα απόκρισης σε άλλα βακτήρια

Η εύρεση και χαρτογράφηση *din* γονιδίων στο γονιδίωμα του *Bacillus subtilis* (Gillespie & Yasbin 1987) ήταν οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός SOS συστήματος στο είδος αυτό. Τόσο η εύρεση ομόλογης LexA πρωτεΐνης (Wojciechowski *et al.* 1991) όσο και η εύρεση 5 SOS-επαγόμενων γονιδίων στο *B. subtilis* (*lexA, recA, uvrB* και τα άγνωστης μέχρι στιγμής λειτουργίας *dinB* και *dinC*), με τη δημιουργία μεταγραφικών συντήξεων των υπό εξέταση γονιδίων με το *lacZ* γονίδιο (Cheo *et al.* 1991), με τη χρήση μεταλλαγμένων στελεχών και με μελέτη αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-υποκινητών (Haijema *et al.* 1996, Winterling *et al.* 1997), απέδειξαν την ύπαρξη της SOS απόκρισης στον οργανισμό αυτό καθώς και έδειξαν ότι η απόκριση μπορεί να επεκτείνεται και σε άλλα βακτήρια πέραν του *E. coli*. Όμως, το γεγονός ότι μόνο 3 γονίδια (*recA, lexA, uvrB*) ήταν ομόλογα με αντίστοιχα SOS γονίδια στο *E. coli*, καθώς και ότι το SOS μοτίβο στο *B. subtilis* είναι GAACN₄GTTC (Cheo *et al.* 1991) δείχνουν ότι η SOS απόκριση είναι διαφορετική από βακτήριο σε βακτήριο. Μετέπειτα μελέτες μικροσυστοιχιών και πρόσδεσης της LexA με υποκινητές στο *B. subtilis* ανέβασαν τον αριθμό των SOS γονιδίων στα 33 (Au *et al.* 2005), δείχνοντας ότι και τα *uvrA, uvrD, ruvAB, dnaE(dinB)* και *sulA* είναι

1. Εισαγωγή

SOS γονίδια στο *B. subtilis*, όπως και στο *E. coli*. Πάραυτα, εντοπίζονται και SOS γονίδια μοναδικά στο *B. subtilis*, όπως γονίδιο που συμμετέχει στην μεταφορά μεθυλομάδων, γονίδιο μεθυλοϋδρολάσης, γονίδιο ενδονουκλεάσης, γονίδιο πρωτεάσης και γονίδιο που συμμετέχει στην δημιουργία του κυτταρικού τοιχώματος. Το *B. subtilis* δεν είναι, όμως, το μοναδικό θετικό κατά Gram βακτήριο με SOS σύστημα απόκρισης.

Το *Mycobacterium tuberculosis* είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο στο οποίο εντοπίστηκε ομόλογη LexA πρωτεΐνη (Movahdzadeh *et al.* 1997). Η LexA του *M. tuberculosis* αναγνωρίζει και προσδένεται σε αλληλουχίες σχεδόν όμοιες με του SOS χειριστή στο *B. subtilis* που ακολουθούν το μοτίβο TCGAACN₄GTTCGA (Davis *et al.* 2002). Συνολικά 21 γονίδια έχουν βρεθεί, με *in silico* προβλέψεις και επιβεβαίωσή τους με μικροσυστοιχίες, να είναι SOS-ρυθμιζόμενα στο *M. tuberculosis*, στα οποία ανήκουν τα *lexA*, *recA*, *ruvAB*, *dnaE* (DNA polymerase III subunit alpha) όπως και στο *E. coli* (Davis *et al.* 2002). Όμως, εκτός των *ruvAB*, το *ruvC* γονίδιο βρέθηκε SOS-ρυθμιζόμενο στο *M. tuberculosis*, σε αντίθεση με το *E. coli*.

Η εύρεση του SOS συστήματος των *B. subtilis* και *M. tuberculosis* έδειξε τις διαφορές που μπορεί να υπάρχουν μεταξύ του συστήματος στο *E. coli* και στα Gram-θετικά βακτήρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το SOS μοτίβο: CTGTN₈ACAG για το *E. coli*, TCGAACN₄GTTCGA για τα δυο θετικά κατά Gram. Επιπλέον, τα SOS γονίδια του *E. coli* *recX* (ρυθμιστικό γονίδιο του ομόλογου ανασυνδυασμού), *dinI* και *umuDC* απουσιάζουν από το SOS σύστημα των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Φαίνεται ότι υπάρχει ένας κοινός πυρήνας SOS γονιδίων κοινός μεταξύ των βακτηρίων αλλά ότι επίσης κάθε σύστημα είναι προσαρμοσμένο στις ανάγκες του εκάστοτε βακτηρίου.

Το SOS μοτίβο του *B. subtilis* φαίνεται να είναι διαδεδομένο στα θετικά κατά Gram βακτήρια: έχει βρεθεί στα *Clostridium pefingens* (Johnston *et al.* 1997, Nuyts *et al.* 2001), *Clostridium difficile* (Walter *et al.* 2014), *Staphylococcus aureus* (Bisognano *et al.* 2004) και *Streptomyces rimosus* (Mikoc *et al.* 1997). Μάλιστα, στο *C. difficile* βρέθηκε ότι εκτός των *lexA*, *recA*, *ruvC* και *uvrB*, γονίδια μεταφορέων, σηματοδότησης, σποριογένεσης, ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, τοξινών και δημιουργίας βιοφίλμ συγκαταλέγονται στα SOS γονίδια του οργανισμού (Walter *et al.* 2014). Στο *Deinococcus radiodurans* έχουν βρεθεί δύο γονίδια ομόλογα με του *lexA*, αλλά το ένα από αυτά δεν αλληλεπιδρά με τη RecA (Sheng *et al.* 2004). Στον ίδιο οργανισμό έχουν γίνει *in silico* προβλέψεις για τον εντοπισμό SOS χειριστών στο γονιδιώμα του και έχουν βρεθεί ομόλογες θέσεις (με ομοιότητα 67-90%) ανοδικά γονιδίων ομόλογων με τα SOS γονίδια *lexA*, *recA*, *recN*, *ruvA*, *ruvB*, *ruvC* (Khan *et al.* 2008). Επιπλέον, το *Dehalococcoides ethinogenes* φαίνεται ότι διαθέτει το ίδιο μοτίβο με το *B. subtilis*, παρόλο που δεν ανήκει στα θετικά κατά Gram βακτήρια, αλλά η LexA του ρυθμίζει μόνο τα *uvrA* και *lexA* (Fernandez de Henestrosa *et al.* 2002). Άλλη μία κατηγορία με σχεδόν ίδιο μοτίβο (GTACN₄GTWC) είναι τα κυανοβακτήρια, με τη LexA να ρυθμίζει στα *Anabaena sp.* και *Nostoc punctiforme* τα *recA*, *lexA*, *ssb* και *uvrA*, ενώ στο *Synechocystis sp.* ρυθμίζει μόνο το γονιδίο της (Mazon *et al.* 2004).

Το SOS μοτίβο του *E. coli* εντοπίζεται και σε άλλα γ-πρωτεοβακτήρια (Garriga *et al.* 1992) αλλά υπάρχουν διαφορές στην ταυτότητα των SOS γονιδίων τους. Στο *Pseudomonas aeruginosa* εκτός των *lexA*, *recA*, *recN*, *recX*, *sula*, *yebG*,

1. Εισαγωγή

dinG (ATP-dependent DNA helicase) και *dnaE*, βρέθηκε και γονίδιο φωτολύσης (*phl*) να ανήκει στο SOS σύστημα (Cirz *et al.* 2006). Στο *P. fluorescens* εντοπίστηκαν ως SOS γονίδια τα *lexA*, *recA*, *recN*, *uvrA*, *dnaE*, που έχουν βρεθεί και στο *E. coli*, καθώς και γονίδιο εξωνουκλεάσης I, το *radA* και γονίδιο χημειοτάξης (Jin *et al.* 2007). Στο *Vibrio parahaemolyticus* βρέθηκε με πειράματα πρόσδεσης της LexA ότι ο καταστολέας αναγνωρίζει και προσδέεται στους υποκινητές των *lexA*, *recA*, *recG*, *topB* και σε γονίδιο ομόλογο με DNA ελικάσης (Sanchez-Alberola *et al.* 2012). Όμως, τα *Xanthomonas axonopodis* και *Xylella fastidiosa* διαθέτουν άλλο SOS μοτίβο (TTAGN₆TACTA) παρόλο που ανήκουν στα γ-πρωτεοβακτήρια (Camproy *et al.* 2002, Yang *et al.* 2002). Μάλιστα, στο *X. fastidiosa* φαίνεται ότι η LexA ρυθμίζει μόνο το γονίδιο της καθώς και το γονίδιο μιας DNA μεθυλάσης (Camproy *et al.* 2002).

Το μοτίβο των γ-πρωτεοβακτηρίων φαίνεται να επικρατεί και στα β-πρωτεοβακτήρια (Erill *et al.* 2003). Παράδειγμα από αυτήν την κλάση είναι το *Ralstonia solanacearum* στο οποίο η LexA φαίνεται ότι αναγνωρίζει το μοτίβο CTGTN₈ACAG αλλά έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει μόνο τα *lexA*, *recA* και *recN* μέχρι στιγμής (Erill *et al.* 2003). Σε ένα ακόμη β-πρωτεοβακτήριο, το *Burkholderia thailandensis*, συναντάται το ίδιο μοτίβο με του *E. coli* και βρέθηκαν ως SOS γονίδια τα *lexA*, *recA*, *uvrA*, *dnaE*, *dinB*, *recX*, καθώς και νέα γονίδια όπως γονίδια tRNA, γονίδιο quorum sensing, μαστιγίου, υδρατάσης και υδρολάσης (Ulrich *et al.* 2013).

Η ύπαρξη SOS συστήματος δεν είναι καθολικός κανόνας για όλα τα βακτήρια. Δεν έχουν εντοπιστεί γονίδια ομόλογα του *lexA* στα *Bacterioides* και στα ε-πρωτεοβακτήρια (Camproy *et al.* 2003 και 2005, Erill *et al.* 2003 και 2004). Επίσης, στο *Streptococcus pneumoniae*, παρόλο που ανήκει στα Firmicutes όπως το *B. subtilis*, λείπει *lexA*-ομόλογο γονίδιο (Erill *et al.* 2007). Παρόμοια περίπτωση ισχύει και για τα κυανοβακτήρια, όπου στα *Synechococcaceae* δεν έχει βρεθεί *lexA* γονίδιο και στο *Synechocystis sp.* η LexA του δεν έχει τα απαραίτητα κατάλοιπα για την αυτοπρωτεόλυσή της (Li *et al.* 2010). Επιπλέον, το γ-πρωτεοβακτήριο *Bruchnera sp.* και στέλεχος του *Mycobacterium (M. bovis BCG Russia)* είναι φυσικά *recA* βακτήρια (Shigenobu *et al.* 2000, Keller *et al.* 2008). Φαίνεται, λοιπόν, ότι δεν διαθέτουν όλα τα βακτήρια SOS σύστημα ή αν τυχόν διαθέτουν παρόμοιο σύστημα απόκρισης σε βλάβες του DNA δεν είναι το ίδιο με την SOS απόκριση του *E. coli*.

1.1.7. Το SOS σύστημα απόκρισης στα α-πρωτεοβακτήρια

Ξεχωριστή αναφορά θα γίνει για το SOS σύστημα των α-πρωτεοβακτηρίων, εφόσον στην κλάση αυτή ανήκει το βακτήριο *Zygomonas mobilis*, του οποίου η SOS απόκριση μελετήθηκε στην παρούσα εργασία.

Οι πρώτες ενδείξεις ύπαρξης SOS απόκρισης στα α-πρωτεοβακτήρια προήλθαν από την κατασκευή στελεχών μεταλλαγμένων ως προς τις λειτουργίες ομόλογου ανασυνδυασμού και την μελέτη αυτών. Το πρώτο στέλεχος ανήκε στο *A. tumefaciens* (Klarwijk *et al.* 1979), ενώ στη συνέχεια ακολούθησαν *recA* στελέχη των α-πρωτεοβακτηρίων *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospseudomonas viridis* και *Paracoccus denitrificans* (Πίνακας 1.2, Better & Helinski 1983, Croes *et al.* 1990, Selbitschka *et al.* 1991, Martinez-Salazar *et al.* 1991, Calero *et al.* 1994, Fernandez de Henestrosa & Barbe 1994, Fernandez de Henestrosa *et al.* 1997, Chen & Michel

1. Εισαγωγή

1998). Πρέπει να σημειωθεί ότι τα *recA*⁻ στελέχη ενώ κατασκευάζονταν και για την μελέτη του ομόλογου ανασυνδυασμού, της επιδιόρθωσης του DNA, της ρύθμισης του *recA* γονιδίου και της SOS απόκρισης, είναι χρήσιμα και για σκοπούς γενετικής μηχανικής. Όσον αφορά το τελευταίο, η χρησιμότητά τους έγκειται στο ότι δεν ανακατατάσσουν μέσω ανασυνδυασμού ξένα τμήματα DNA που τους εισάγονται, λόγω της απενεργοποίησης του γονιδίου της κύριας πρωτεΐνης του ομόλογου ανασυνδυασμού (Kurnit 1989, Cox 2007). Πάραυτα, από τα στελέχη του Πίνακα 1.2, μόνο τα *recA*⁻ στελέχη των *P. denitrificans* και *G. oxydans* μελετήθηκαν ως προς αυτήν την σκοπιά. Κοινό γνώρισμα, όμως, όλων αυτών των στελεχών ήταν η ευαισθησία τους σε SOS-επαγωγικούς μεταλλαζογόνους παράγοντες.

Πίνακας 1.2. *recA*⁻ στελέχη των α-πρωτεοβακτηρίων

Είδη α-πρωτεοβακτηρίων	Αναφορά
<i>Rhizobium meliloti</i>	Better & Helinski 1983, Selbitschka et al. 1991
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Farrand et al. 1989
<i>Azospirillum brasilense</i>	Croes et al. 1990
<i>Rhizobium phaseoli</i> ¹	Martinez-Salazar et al. 1991, Fernandez de Henestrosa & Barbe 1994
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	Selbitschka et al. 1991
<i>Brucella abortus</i>	Tatum et al. 1993
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ¹	Calero et al. 1994
<i>Paracoccus denitrificans</i> ^{1,2}	Fernandez de Henestrosa et al. 1997
<i>Rhodopseudomonas viridis</i>	Chen & Michel 1998
<i>Gluconobacter oxydans</i> ²	Liu et al. 1999
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Vial et al. 2004

¹: στελέχη που αξιοποιήθηκαν για τη μελέτη της SOS απόκρισης

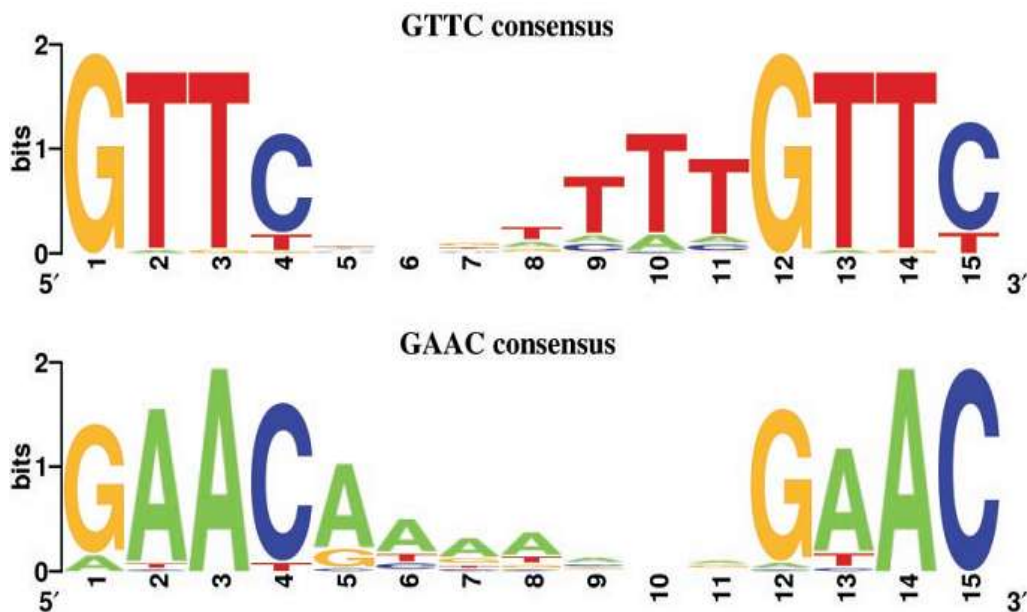
²: στελέχη που μελετήθηκαν ως δέκτες ξένου DNA

Παρόλο που βρέθηκε *recA* ομόλογο σε αντιπροσώπους των α-πρωτεοβακτηρίων, η έλλειψη ακολουθίας SOS χειριστή όμοιας είτε με του *E. coli* είτε με του *B. subtilis* υποδείκνυε διαφορετικό τρόπο ρύθμισης του γονιδίου. Μελέτη της έκφρασης και ρύθμισης του *recA* γονιδίου στα *R. phaseoli* και *R. sphaeroides* έδειξε ότι το προϊόν του ίδιου του γονιδίου είναι ρυθμιστικός παράγοντας της έκφρασής του (Calero et al. 1994, Fernández de Henestrosa & Barbe 1994). Οι Riera και συνεργάτες έδειξαν ότι τα *recA* των *A. tumefaciens*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* και *R. sphaeroides* χάνουν την ικανότητα της ρύθμισης και της επαγωγής τους εντός του *E. coli*, αλλά τα *recA* των *Rhizobiaceae* κρατούν αυτήν την ικανότητα εντός του *R. sphaeroides* και το αντίστροφο (Riera et al. 1994). Έτσι, διατυπώθηκε ότι τα *recA* γονίδια των α-πρωτεοβακτηρίων διαθέτουν SOS χειριστές κοινούς και αναγνωρίσιμους εντός της κλάσης και διαφορετικούς από αυτόν του *E. coli*.

Η εύρεση του SOS χειριστή των α-πρωτεοβακτηρίων έγινε πρώτα στα *Rhizobium etli* και *Rhodobacter sphaeroides*, όπου πειράματα πρόσδεσης πρωτεϊνών

1. Εισαγωγή

(από κυτταρικά εκχυλίσματα) στον φυσιολογικό υποκινητή του *recA*, και σε τροποποιημένες εκδόσεις του υποκινητή ύστερα από σημειακές μεταλλάξεις, κατέδειξαν ότι πιθανός καταστολέας αναγνωρίζει και προσδένεται σε ακολουθία GTTCN₇GTTC και GAACN₇GAAC (Tapias and Barbe 1998, Fernandez de Henestrosa *et al.* 1998). Το ίδιο μοτίβο εντοπίστηκε ανοδικά *recA* γονιδίων άλλων α-πρωτεοβακτηρίων αλλά και στην διαγονιδιακή περιοχή των αντιδιαμετρικά μεταγραφόμενων *uvrA-ssb* γονιδίων στο *Sinorhizobium meliloti* (Tapias and Barbe 1999). Έτσι, καθιερώθηκε αυτό το μοτίβο ως ο SOS χειριστής των α-πρωτεοβακτηρίων. Να σημειωθεί ότι σε σύγκριση με τους SOS χειριστές των *E. coli* και *B. subtilis* έχει μονό αριθμό ενδιάμεσων μη συντηρημένων νουκλεοτιδίων καθώς και δεν είναι παλίνδρομος. Ακολουθίες που ακολουθούσαν αυτό το μοτίβο εντοπίστηκαν ανοδικά και άλλων *recA* και *uvrA* γονιδίων στα *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus*, *Paracoccus denitrificans*, *Azospirillum lipoferum* και *Gluconobacter oxydans* (Labazi *et al.* 1999, del Rey *et al.* 1999, Dumay *et al.* 1999, Liu *et al.* 1999, Vial *et al.* 2004). Με βιοπληροφορική ανάλυση, αυτός ο SOS χειριστής εντοπίστηκε ανοδικά 9 διαφορετικών SOS ομόλογων γονιδίων (*recA*, *lexA*, *ssb*, *uvrA*, *uvrD*, *ruvC*, *dnaE*, *sulA*, *dinP*) σε 14 διαφορετικά α-πρωτεοβακτήρια, στοίχιση των οποίων ανέδειξε λεπτομερέστερα το SOS μοτίβο των α-πρωτεοβακτηρίων (Εικόνα 1.8, Erill *et al.* 2004).



Εικόνα 1.8. Το μοτίβο του SOS χειριστή στα α-πρωτεοβακτήρια, όπως εντοπίστηκε από ανάλυση υποκινητών SOS επιδιορθωτικών γονιδίων από διαφορετικά είδη α-πρωτεοβακτηρίων (Erill *et al.* 2004)

Η διερεύνηση της SOS απόκρισης συνέχισε με τη μελέτη του γονιδίου του καταστολέα LexA. Στο *R. sphaeroides* βρέθηκε ότι το γονίδιο *lexA* φέρει δύο αλληλεπικαλυπτόμενους SOS χειριστές (GAACN₇GAACN₇GAAC), όπου μεταλλάξεις στο πρώτο ή στο τρίτο GAAC δεν επηρεάζουν την SOS επαγωγή του γονιδίου. Επιπλέον, στο ίδιο βακτήριο επετεύχθη η κατασκευή ενός *lexA'* στελέχους (Tapias *et al.* 2000). Να σημειωθεί ότι λόγω της ύπαρξης του SOS γονιδίου *sulA* στο *E. coli* (γονιδίου καταστολής της κυτταρικής διαίρεσης), απαιτείται η ταυτόχρονη απενεργοποίησή του για την κατασκευή ενός βιώσιμου *E. coli lexA'* στελέχους.

1. Εισαγωγή

Όμως, στο *R. sphaeroides* δεν εντοπίστηκε ομόλογο *sulA* γονίδιο και δεν χρειάστηκε η απενεργοποίηση δεύτερου γονιδίου για την κατασκευή *lexA*⁻ στελέχους. Περεταίρω μελέτη του στελέχους αυτού έδειξε ότι η LexA του *R. sphaeroides* μπορεί να λειτουργήσει και σαν ενεργοποιητής της μεταγραφής του *recA* γονιδίου (Tariyas *et al.* 2002). Σε υψηλές συγκεντρώσεις η LexA καταστέλλει την RNA πολυμεράση. Όμως, σε μεσαία επίπεδα συγκεντρώσεων, η πρωτεΐνη λειτουργεί συνεργιστικά με την RNA πολυμεράση βοηθώντας την να προσδεθεί στον υποκινητή.

Συγκριτικά με το *E. coli*, λιγότερες έρευνες έχουν γίνει για τα υπόλοιπα μέλη του SOS συστήματος στα α-πρωτεοβακτήρια. Τα βασικά μέλη του SOS συστήματος στα α-πρωτεοβακτήρια είναι τα *recA*, *lexA*, *uvrA*, *ssb* και το συνεργίωμα *ruvCAB* (Erill *et al.* 2004 και 2007). Διεξοδική αναζήτηση SOS γονιδίων έχει γίνει στο *Caulobacter crescentus*. Με RT-PCR βρέθηκαν 35 SOS γονίδια, από τα οποία αυτά με γνωστή λειτουργία είναι τα *recA*, *lexA*, *uvrA*, *ssb*, *recN*, *ruvCAB*, *imuA* (συμμετέχει με την ImuB και DnaE2 στην προσπέραση λαθών), *dnaE*, *tag* (3-methyl adenine glycosylase), *uvrA*, *uvrC* και *comM* (competence protein) (da Rocha *et al.* 2008). Συνδυασμός *in silico* αναζητήσεων και πειραμάτων πρόσδεσης της LexA σε υποκινητές, κατέδειξε τα *lexA*, *ruvC*, *dinP*, *sulA*, *parE* (DNA topoisomerase 4 subunit B), *yigN* (DNA recombination protein), *dnaE*, *ispE* (4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase), και *comM* ως SOS γονίδια στο *Sinorhizobium meliloti* (Erill *et al.* 2004). Προσφάτως, δείχθηκε ότι το γονίδιο κινάσης ιστιδίνης *cckA* που παίζει ρόλο στη μεταγωγή σήματος στο *R. capsulatus* είναι SOS γονίδιο σε αυτό το βακτήριο (Kuchinski *et al.* 2016). Τα SOS γονίδια που έχουν εντοπιστεί στα α-πρωτεοβακτήρια και η πειραματική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώρισή τους δίνονται στον Πίνακα 1.3. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι στα α-πρωτεοβακτήρια δεν έχουν βρεθεί γονίδια ομόλογα με τα *umuDC* (PolV), τα οποία φαίνονται να περιορίζονται στα γ-πρωτεοβακτήρια (Eisen & Hanawalt 1999). Όμως, στην περίπτωση του *C. crescentus*, του οποίου η SOS απόκριση έχει μελετηθεί εκτενώς έχει βρεθεί ομόλογα των *imuA* και *imuB* (η οποία ανήκει στην κατηγορία των Υ-οικογένεια των πολυμερασών, όπως και η PolV) που χρειάζονται για την επιρρεπή σε λάθη επιδιόρθωση του DNA (Galhardo *et al.* 2005). Μάλιστα, τα προϊόντα και των δύο γονιδίων έχουν βρεθεί ότι συνεργάζονται με την DnaE2 στην επιδιόρθωση. Αυτά τα ευρήματα προκαλούν ερωτήματα που χρίζουν μελέτης ως προς την SOS μεταλλαξογένεση και τις SOS-επαγόμενες πολυμεράσες στην SOS απόκριση των α-πρωτεοβακτηρίων.

Πίνακας 1.3 Τα SOS γονίδια των α-πρωτεοβακτηρίων, τα είδη που ανήκουν και η πειραματική προσέγγιση που οδήγησε στην εύρεσή τους

Γονίδια	Οργανισμός	Πειραματική προσέγγιση	Αναφορά
<i>Εύρεση μεμονωμένων γονιδίων</i>			
<i>recA</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Κατασκευή <i>recA-lacZ</i> συντήξεων και έλεγχος ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης παρουσία MC	Calero <i>et al.</i> 1994
<i>recA</i>	<i>Rhizobium phaseoli</i>	Όπως πριν παρουσία MC και UV	Fernandez de Henestrosa & Barbe 1994
<i>recA</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>	Εντοπισμός SOS χειριστή με	Chen & Michel

1. Εισαγωγή

	<i>viridis</i>	αλληλούχηση, κατασκευή <i>recA</i> στελέχους και μελέτη της έκφρασης του γονιδίου παρουσία MMC και UV	1998
<i>recA</i>	<i>Rhizobium etli</i>	Διαδοχικές απαλοιφές και νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στον υποκινητή και χρήση <i>recA-lacZ</i> και έλεγχος ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης παρουσία MC, έλεγχος πρόσδεσης πρωτεΐνης-υποκινητή	Tapias <i>et al.</i> 1997, Tapias & Barbe 1998
<i>recA</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στον υποκινητή και έλεγχος πρόσδεσης πρωτεΐνης-υποκινητή	Tapias & Barbe 1998
<i>recA</i>	<i>Rhizobium meliloti</i>	Όπως πριν	Tapias & Barbe 1998
<i>recA, uvrA</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Διαδοχικές απαλοιφές και νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στον υποκινητή και χρήση <i>recA-lacZ</i> και <i>uvrA-lacZ</i> και έλεγχος ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης παρουσία MC και UV, έλεγχος πρόσδεσης πρωτεΐνης-υποκινητή	Fernandez de Henestrosa <i>et al.</i> 1998
<i>uvrA, ssb</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Όπως πριν παρουσία MC	Tapias & Barbe 1999
<i>recA, uvrA</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στον υποκινητή και χρήση <i>recA-lacZ</i> και <i>uvrA-lacZ</i> και έλεγχος ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης παρουσία MC	Labazi <i>et al.</i> 1999
<i>recA</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Εντοπισμός SOS χειριστή με αλληλούχηση, διαδοχικές απαλοιφές στον υποκινητή και χρήση <i>recA-lacZ</i> και έλεγχος ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης παρουσία MC	Dumay <i>et al.</i> 1999
<i>recA, uvrA</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Εντοπισμός SOS χειριστή με αλληλούχηση, Νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στον υποκινητή και έλεγχος πρόσδεσης πρωτεΐνης-υποκινητή	del Rey <i>et al.</i> 1999
<i>lexA</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Όπως πριν	Tapias <i>et al.</i> 2000
<i>recA</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Εντοπισμός SOS χειριστή με αλληλούχηση, κατασκευή <i>recA</i> στελέχους και μελέτη του παρουσία MMC και UV	Vial <i>et al.</i> 2004
<i>cckA</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Έλεγχος πρόσδεσης πρωτεΐνης-υποκινητή qRT-PCR στο φυσικό στέλεχος και σε <i>lexA</i> στέλεχος	Kuchinski <i>et al.</i> 2016

1. Εισαγωγή

<i>In silico</i> αναζήτηση γονιδιωμάτων για SOS χειριστές και πειραματική ανάλυση σε επιλεγμένα γονίδια			
<i>lexA, ruvC, dinP, sulA1, sulA2, parE, yigN, dnaE, ispE, comM</i> και 2 υποθετικά	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>In silico</i> ανάλυση για τον εντοπισμό τέλειων SOS χειριστών, έλεγχος πρόσδεσης πρωτεΐνης-υποκινητών γονιδίων που εντοπίστηκαν με την <i>in silico</i> ανάλυση	Erill <i>et al.</i> 2004
<i>recA, lexA, uvrA, ssb, recN, ruvCAB, imuA, tag, dnaE, uvrC, uvrA, recN, comM</i> και 23 υποθετικά γονίδια	<i>Caulobacter crescentus</i>	<i>In silico</i> ανάλυση για τον εντοπισμό τέλειων SOS χειριστών, έλεγχος έκφρασης γονιδίων που βρέθηκαν με την <i>in silico</i> ανάλυση σε RT-PCR	da Rocha <i>et al.</i> 2008

1.2 Επιδιόρθωση του DNA

Κατά την διάρκεια της ζωής των κυττάρων είναι απαραίτητο να εξασφαλίζεται η διατήρηση της γενετικής πληροφορίας και η σωστή μετάδοσή της σε θυγατρικά κύτταρα. Όμως, η ακεραιότητα του γενετικού υλικού βρίσκεται συνεχώς υπό απειλή. Αλλαγές στο DNA μπορεί να προκληθούν είτε μέσω σφαλμάτων κατά την αντιγραφή του, είτε μέσω αυθόρμητων χημικών μεταβολών, είτε ύστερα από επίδραση μεταλλαξογόνων παραγόντων (χημικών ουσιών ή ακτινοβολιών).

1.2.1 Τύποι σημειακών μεταλλαγών

Ένας τύπος μεταλλαγών είναι οι σημειακές μεταλλαγές. Σε αυτό το είδος μεταλλαγών ένα ζευγάρι βάσεων μπορεί να αλλάξει σε ένα άλλο. Έτσι, υπάρχουν οι μεταβάσεις, όπου μία πυριμιδίνη αντικαθίσταται από μία άλλη πυριμιδίνη ή εναλλακτικά μία πουρίνη αντικαθίσταται από μία άλλη πουρίνη (π.χ. αλλαγές GC σε AT), και οι μεταστροφές, όπου μία πουρίνη αντικαθίσταται από μία πυριμιδίνη ή αντίστροφα (π.χ. αλλαγή TA σε GC) (Freese 1959).

Εκτός την αλλαγή των βάσεων, ένας ακόμη τύπος σημειακών αλλαγών είναι η προσθήκη ή αφαίρεση βάσεων. Σε αυτήν την περίπτωση προστίθενται έξτρα βάσεις που δεν προϋπήρχαν στην αλυσίδα ή αντιστοίχως αφαιρούνται βάσεις που προϋπήρχαν. Αν αυτές οι μεταλλάξεις συμβούν εντός πλαισίου ανάγνωσης γονιδίου και προσθαφαιρεθούν λιγότερες ή περισσότερες από τρεις βάσεις (ή πολλαπλάσια των τριών), τότε μετατοπίζεται το πλαίσιο ανάγνωσης, με αποτέλεσμα να μεταφράζεται διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης και να τερματίζει σε λανθασμένο σημείο η μετάφραση.

1. Εισαγωγή

1.2.2 Τρόποι πρόκλησης σημειακών μεταλλαγών

1.2.2.1 Αυθόρμητες μεταλλαγές

Οι αυθόρμητες μεταλλαγές είναι οι μεταλλαγές που προκύπτουν φυσιολογικά, σε σύγκριση με τις επαγόμενες που προκύπτουν εξαιτίας της παρουσίας μεταλλαξογόνου παράγοντα.

Ένας τύπος αυθόρμητων μεταλλαγών είναι οι μεταλλαγές που προκύπτουν από σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA (Pray 2008). Μία περίπτωση τέτοιων σφαλμάτων είναι το λάθος ζευγάρωμα βάσεων. Κάθε βάση μπορεί να βρίσκεται σε εναλλακτική χημική μορφή που ονομάζεται ταυτομερές (ενολικές μορφές θυμίνης και γουανίνης, ιμινικές μορφές αδενίνης και κυτοσίνης). Κατά την αντιγραφή του DNA μπορεί να προκύψει ζευγάρωμα μιας βάσης με την ταυτομερική κατάσταση μιας δεύτερης βάσης. Στη συνέχεια θα δημιουργηθεί ένα ζεύγος βάσεων (T-G και A-C) που δεν θα είναι σύμφωνο με τους κανόνες συμπληρωματικότητας κατά Watson και Crick. Σαν αποτέλεσμα θα είναι η πρόκληση μετάπτωσης, η αλλαγή ζευγαριού GC σε AT ή αντίστροφα, σε επόμενο κύκλο αντιγραφής. Επίσης κατά την αντιγραφή μπορεί να προκληθούν μικρές προσθήκες ή ελλείψεις. Αυτές συμβαίνουν συνήθως σε περιοχές με επαναλήψεις όπου δύναται να δημιουργηθεί ένας βρόχος είτε στη μητρική αλυσίδα είτε στη νεοσυντιθέμενη με αποτέλεσμα η πολυμεράση είτε να παραλείψει τις βάσεις του βρόχου της μητρικής αλυσίδας είτε να προσθέσει επιπλέον βάσεις αντίστοιχα (Pray 2008).

Στις βάσεις μπορούν να συμβούν και αυθόρμητες χημικές μεταβολές (Griffiths *et al.* 2005). Μία από αυτές είναι η απουρινοποίηση όπου σπάει ο δεσμός μίας πουρίνης από το σάκχαρο δεοξυριβόζη και δημιουργείται μία απουρινική θέση. Χωρίς τη βάση στην απουρινική θέση του DNA, δεν μπορεί να καθοριστεί η ταυτότητα της νέας βάσης που θα εισαχθεί απέναντί της κατά την αντιγραφή. Μία άλλη χημική μεταβολή είναι η απαμίνωση, όπου αφαιρείται μία αμινομάδα από τη βάση. Η απαμίνωση της κυτοσίνης δημιουργεί μία ουρακίλη ενώ η απαμίνωση της 5-μεθυλοκυτοσίνης δημιουργεί μία θυμίνη. Το αποτέλεσμα είναι ότι απέναντι από τις απαμινωμένες κυτοσίνες ή μεθυλοκυτοσίνες τοποθετείται μία αδενίνη κατά την αντιγραφή οδηγώντας σε μεταπτώσεις (CG σε TA).

1.2.2.2 Επαγόμενες μεταλλαγές

Ένας από τους κύριους παράγοντες που επάγουν μεταλλάξεις είναι οι ακτινοβολίες. Η ιονίζουσα ακτινοβολία για παράδειγμα προκαλεί μεταλλαγές και μάλιστα συσσωρευτικές. Η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να δράσει άμεσα στο DNA, προκαλώντας μονόκλινα ή δίκλινα σπασίματα και σπασίματα βάσεων, ή έμμεσα δημιουργώντας ιόντα τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν βλάβες στο DNA (Desouky *et al.* 2015). Η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία επίσης επάγει μεταλλάξεις, και συγκεκριμένα φωτοχημικές αλλαγές στο DNA. Προκαλεί την δημιουργία χημικών δεσμών μεταξύ γειτονικών πυριμιδινών (Boyce & Howard-Flanders 1964), με πιο συχνά τα διμερή θυμίνης. Αυτά τα ζευγαρώματα προκαλούν διογκώσεις που παρεμποδίζουν την πολυμεράση να διαβάσει το διμερές με αποτέλεσμα να τοποθετεί λανθασμένες βάσεις απέναντι του.

Οι χημικοί μεταλλαξογόνοι παράγοντες είναι η δεύτερη μεγάλη κατηγορία μεταλλαξογόνων παραγόντων. Τα ανάλογα βάσεων ανήκουν σε αυτούς, τα οποία μοιάζουν με τις φυσιολογικές βάσεις, έχουν ταυτομερικές μορφές (όπως και οι

1. Εισαγωγή

βάσεις) και μπορούν να εισαχθούν στην θέση των φυσιολογικών βάσεων. Ένα παράδειγμα είναι η 5-βρομοουρακίλη (Rizki & Rizki 1969) η οποία μοιάζει με την θυμίνη και μπορεί να σχηματίσει υδρογονικούς δεσμούς με την αδενίνη αλλά και με την γουανίνη στην ταυτομερική της μορφή. Αν συμβεί η δεύτερη περίπτωση, θα υπάρξει μία σημειακή μεταλλαγή μετάπτωσης TA σε CG στο θυγατρικό DNA.

Άλλοι χημικοί παράγοντες είναι οι παράγοντες τροποποίησης βάσεων, οι οποίοι τροποποιούν τις δομές των βάσεων. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να προκαλέσουν απαμίνωση, υδροξυλίωση, αλκυλίωση ή οξειδωση. Παράδειγμα παράγοντα απαμίνωσης είναι το νιτρώδες οξύ (Verly & Lacroix 1975), το οποίο ενεργεί πάνω σε γουανίνη, κυτοσίνη και αδενίνη προκαλώντας μεταπτώσεις CG σε TA, στην περίπτωση της κυτοσίνης, και AT σε GC, στην περίπτωση της αδενίνης (στην περίπτωση της γουανίνης, την μετατρέπει σε ξανθίνη που έχει ίδιες ιδιότητες με την γουανίνη). Παράδειγμα παράγοντα υδροξυλίωσης είναι η υδροξυλαμίνη (Freese & Strack 1962), η οποία δρα στην κυτοσίνη προσθέτοντάς της μια υδροξυλομάδα. Η υδροξυλαμिनοκυτοσίνη που προκύπτει, σχηματίζει ζεύγη βάσεων μόνο με την αδενίνη, προκαλώντας μεταπτώσεις CG σε TA. Ιδιαίτερα αναφορά πρέπει να γίνει στον παράγοντα αλκυλίωσης MMS (methylmethane sulfonate) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Το MMS μεθυλιώνει πουρίνες και συγκεκριμένα στο N7 της δεοξυγουανοσίνης (δημιουργώντας τη 7-μεθυλγουανίνη) και στο N3 της δεοξυαδενοσίνης (δημιουργώντας την 3-μεθυλαδενίνη). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεταλλαγές κυρίως τύπου μεταβάσεων (Mackay *et al.* 1994, Grady & Ulrich 2007). Αρχικά, αυτή η δράση θεωρήθηκε ότι προκαλεί απευθείας θραύσεις διπλής έλικας DNA, επειδή τα κύτταρα με ομόλογο ανασυνδυασμό ήταν ιδιαίτερα ευάλωτα στις επιπτώσεις του MMS. Ωστόσο, πλέον έχει δειχθεί ότι σταματά τις θηλειές αντιγραφής. Κύτταρα με έλλειψη λειτουργιών ομόλογου ανασυνδυασμού εμφανίζουν δυσκολία στην επιδιόρθωση τέτοιων θηλειών αντιγραφής (Lundin *et al.* 2005). Ένας ακόμη παράγοντας τροποποίησης βάσεων είναι οι ενεργές ρίζες οξυγόνου που οξειδώνουν τις βάσεις προκαλώντας σημειακές μεταλλαγές. Παράδειγμα οξειδωσης βάσεων είναι η δημιουργία της 8-οξο-2-δεοξυγουανοσίνης, η οποία δημιουργεί ζεύγη βάσεων με την αδενίνη προκαλώντας στο τέλος μεταστροφές GC σε TA (Cheng *et al.* 1992, Cooke *et al.* 2003).

Τέλος, υπάρχουν χημικοί παράγοντες οι οποίοι παρεμβάλλονται εντός του DNA (Böhner & Hagen 1977). Ουσίες όπως η προφλαβίνη, η ακριδίνη και το βρωμιούχο αιθίδιο εισάγονται ανάμεσα σε γειτονικές βάσεις. Αν ο παράγοντας εισαχθεί ανάμεσα σε βάσεις της μητρικής αλυσίδας, τότε στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα θα προστεθεί μία επιπλέον βάση απέναντι στον παράγοντα, με αποτέλεσμα μια μεταλλαγή προσθήκης βάσεως. Αν ο παράγοντας εισαχθεί στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα στην θέση μίας βάσης που έπρεπε να προστεθεί, τότε θα δημιουργηθεί μια μεταλλαγή έλλειψης βάσεως.

1.2.3 Επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA

Προηγουμένως αναφέρθηκαν παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA, οι οποίοι αλλοιώνουν την γενετική πληροφορία. Όμως, είναι απαραίτητο για την επιβίωση και σωστή λειτουργία των κυττάρων να εξασφαλίζεται η ακεραιότητα του γενετικού υλικού. Για να αντιμετωπίζουν τις βλάβες στο DNA, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει συστήματα επιδιόρθωσης του DNA. Το *E. coli*, διαθέτει γονίδια επιδιόρθωσης (Πίνακας 1.4, Eisen & Hanawalt 1999) τα οποία ανήκουν σε

1. Εισαγωγή

διαφορετικά επιδιορθωτικά συστήματα, που το καθένα επιλύει διαφορετικού είδους βλάβες.

Πίνακας 1.4 Τα επιδιορθωτικά γονίδια και ο χαρακτηρισμός τους ανά επιδιορθωτικό σύστημα στο *E. coli* (βάσει Eisen & Hanawalt 1999)

Γονίδιο	Χαρακτηρισμός προϊόντος γονιδίου στο <i>E. coli</i>
Άμεση επιδιόρθωση	
<i>phr</i>	deoxyribodipyrimidine photolyase, FAD-binding
<i>ada</i>	fused DNA-binding transcriptional dual regulator/O6-methylguanine-DNA methyltransferase
<i>ogt</i>	O-6-alkylguanine-DNA:cysteine-protein methyltransferase
Επιδιόρθωση με εκτομή βάσεων	
<i>nth</i>	DNA glycosylase and apyrimidinic (AP) lyase (endonuclease III)
<i>alkA</i>	3-methyl-adenine DNA glycosylase II
<i>alkB</i>	oxidative demethylase of N1-methyladenine or N3-methylcytosine DNA lesions
<i>ung</i>	uracil-DNA-glycosylase
<i>mug</i>	G/U mismatch-specific DNA glycosylase
<i>fpg (mutM)</i>	formamidopyrimidine/5-formyluracil/ 5-hydroxymethyluracil DNA glycosylase
<i>mutY</i>	adenine glycosylase
<i>nei</i>	endonuclease VIII and 5-formyluracil/5-hydroxymethyluracil DNA glycosylase
<i>nfi</i>	endonuclease V
<i>nfo</i>	endonuclease IV with intrinsic 3'-5' exonuclease activity
<i>xthA</i>	exodeoxyribonuclease III
<i>tag</i>	3-methyl-adenine DNA glycosylase I, constitutive
Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίων	
<i>uvrA</i>	ATPase and DNA damage recognition protein of nucleotide excision repair excinuclease UvrABC
<i>uvrB</i>	exision nuclease of nucleotide excision repair, DNA damage recognition componen
<i>uvrC</i>	excinuclease UvrABC, endonuclease subunit
<i>uvrD</i>	DNA-dependent ATPase I and helicase II
<i>mfd</i>	transcription-repair coupling factor
Επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων	
<i>mutL</i>	methyl-directed mismatch repair protein
<i>mutS</i>	methyl-directed mismatch repair protein
<i>mutH</i>	methyl-directed mismatch repair protein
<i>vsr</i>	DNA mismatch endonuclease of very short patch repair
<i>uvrD</i>	DNA-dependent ATPase I and helicase II
<i>recJ</i>	ssDNA exonuclease, 5' --> 3'-specific
<i>sbcB (exoI)</i>	exodeoxyribonuclease I
<i>xseA</i>	exonuclease VII, large subunit
<i>xseB</i>	exonuclease VII small subunit
Επιδιόρθωση με ανασυνδυασμό	
<i>recA</i>	DNA recombination and repair protein; ssDNA-dependent ATPase;ATP-dependent homologous DNA strand exchanger; recombinase A; LexA autocleavage cofactor
<i>recX</i>	regulatory protein for RecA
<i>recB</i>	exonuclease V (RecBCD complex), beta subunit
<i>recC</i>	exonuclease V (RecBCD complex), gamma chain
<i>recD</i>	exonuclease V (RecBCD complex), alpha chain
<i>recF</i>	gap repair protein
<i>recJ</i>	ssDNA exonuclease, 5' --> 3'-specific
<i>recO</i>	gap repair protein

1. Εισαγωγή

<i>recR</i>	gap repair protein
<i>recN</i>	recombination and repair protein
<i>recQ</i>	ATP-dependent DNA helicase
<i>recE</i>	exonuclease VIII
<i>recT</i>	recombination and repair protein RecT
<i>sbcB (exoI)</i>	exodeoxyribonuclease I
<i>sbcC</i>	exonuclease, dsDNA, ATP-dependent
<i>sbcD</i>	exonuclease, dsDNA, ATP-dependent
<i>recG</i>	ATP-dependent DNA helicase
<i>ruvA</i>	component of RuvABC resolvosome, regulatory subunit
<i>ruvB</i>	ATP-dependent DNA helicase, component of RuvABC resolvosome
<i>ruvC</i>	component of RuvABC resolvosome, endonuclease
<i>rus</i>	endonuclease RUS
<i>ssb</i>	single-stranded DNA-binding protein
<i>radA (sms)</i>	DNA repair protein
Άλλα επιδιορθωτικά γονίδια	
<i>lexA</i>	SOS regulon transcription repressor
<i>umuC</i>	SOS mutagenesis
<i>umuD</i>	SOS mutagenesis
<i>polA</i>	DNA polymerase I
<i>polB</i>	DNA polymerase II
<i>polC/dnaE</i>	DNA polymerase III
<i>mutT</i>	dGTP-preferring nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase
<i>radC</i>	DNA repair protein RadC

1.2.3.1 Άμεση αποκατάσταση βλαβών

1.2.3.1.1 Επιδιόρθωση από την DNA πολυμεράση

Πρώτος έλεγχος και επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA κατά την αντιγραφή, που προκαλούνται από λάθος εισαγωγές της DNA πολυμεράσης, γίνεται από την ίδια την DNA πολυμεράση. Συγκεκριμένα, η DNA πολυμεράση I και η DNA πολυμεράση III διαθέτουν ενεργότητα εξωνουκλεάσης 3' προς 5'. Αυτή η ενεργότητα χρησιμοποιείται σε περίπτωση που εισαχθεί λάθος βάση κατά την αντιγραφή: κατά την διάρκεια του πολυμερισμού των νουκλεοτιδίων, σε περίπτωση που εισαχθεί λάθος βάση, το σφάλμα αναγνωρίζεται άμεσα, αφαιρείται το λανθασμένο νουκλεοτίδιο με την ενεργότητα εξωνουκλεάσης 3' προς 5' από την DNA πολυμεράση και συνεχίζει η αντιγραφή του DNA με την προσθήκη του σωστού νουκλεοτιδίου. Επιπλέον, αυτή η ενεργότητα μειώνει την συχνότητα σφάλματος της αντιγραφής από μία βάση ανά 10^3 νουκλεοτίδια, που είναι η συχνότητα λαθώς στο ζευγάριωμα βάσεων κατά την αντιγραφή, σε μία βάση ανά 10^7 με 10^8 νουκλεοτίδια (Lewin 2004).

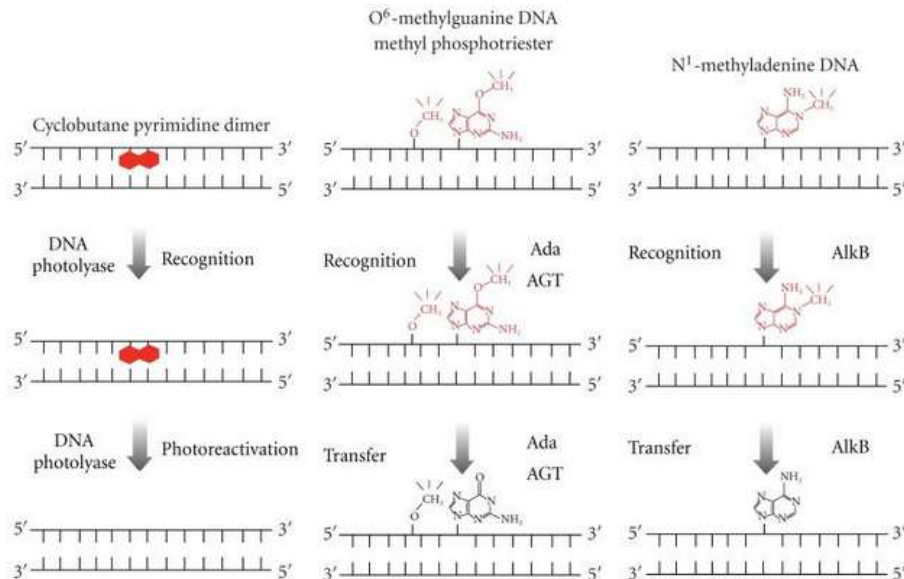
1.2.3.1.2 Επιδιόρθωση διμερών πυριμιδίνης

Τα διμερή πυριμιδίνης, που δημιουργούνται από το υπεριώδες φως διορθώνονται άμεσα από τις φωτολύασες (Εικόνα 1.9, αριστερό μονοπάτι), οι οποίες διαθέτουν δύο χρωμοφόρους συμπαραγόντες που δεσμεύουν την ενέργεια του φωτός για την άμεση επιδιόρθωση των διμερών (Sancar & Sancar 1988).

1. Εισαγωγή

1.2.3.1.3 Επιδιόρθωση αλκυλιώσεων

Αναφέρθηκε ότι η αλκυλίωση των βάσεων δημιουργεί τροποποιημένες βάσεις οι οποίες αλλοιώνουν την γενετική πληροφορία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι O^6 -μεθυλγουανίνη (Εικόνα 1.9, μεσαίο μονοπάτι) που προκαλεί μεταπτώσεις από GC σε AT. Η επιδιόρθωσή της γίνεται από ειδική αλκυλτρανσφεράση (O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase) οι οποίες μεταφέρουν την αλκυλομάδα σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης που διαθέτουν (Olsson & Lindahl 1980, Dempfle *et al.* 1982).



Εικόνα 1.9. Απεικόνιση των μοντέλων άμεσης επιδιόρθωσης του DNA. Αριστερά: το μοντέλο φωτοεπιδιόρθωσης με κύριο ένζυμο την φωτολυάση. Κέντρο: η επιδιόρθωση της O^6 -μεθυλγουανίνης από την αλκυλτρανσφεράση Ada. Δεξιά: η επιδιόρθωση της N^1 -μεθυλαδενίνης από την διοξυγενάση AlkB (Morita *et al.* 2010).

Δύο ακόμη τροποποιημένες βάσεις είναι οι N^1 -μεθυλαδενίνη και N^3 -μεθυκυτοσίνη. Η επιδιόρθωσή τους γίνεται από το μια διοξυγενάση, την AlkB (A-ketoglutarate-dependent dioxygenase) (Εικόνα 1.9, δεξί μονοπάτι) που οξειδώνουν την μεθυλομάδα χρησιμοποιώντας Fe^{2+} , O_2 και α -κετογλουταρικό (Trewick *et al.* 2002).

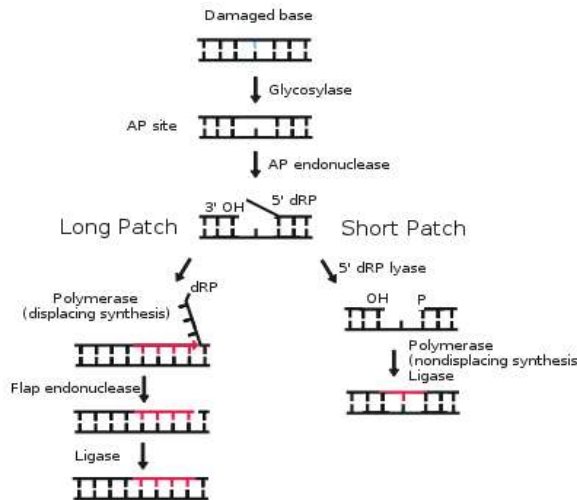
1.2.3.2 Σύστημα επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης

Αναφέρθηκαν βλάβες στο DNA που αφορούν αλλοιωμένες βάσεις αλλά και απουρινικές και απυριμιδινικές θέσεις. Τέτοιου είδους βλάβες μπορούν να διορθωθούν με το σύστημα επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης (Zharkov 2008, Krokan & Bjoras 2013).

Το σύστημα εκτομής βάσης (Εικόνα 1.10) διαθέτει DNA γλυκοζυλάσες που αναγνωρίζουν τις βάσεις που έχουν υποστεί βλάβες (Fromme *et al.* 2004). Οι γλυκοζυλάσες κόβουν τον N-γλυκοσιδικό δεσμό αφαιρώντας την αλλοιωμένη βάση και αφήνοντας μία απουρινική/απυριμιδική (AP) θέση. Η θέση αυτή αναγνωρίζεται από μια AP ενδονουκλεάση που κόβει αφήνοντας ένα 3'-OH άκρο και ένα 5'-δεοξυριβοφωσφορικό άκρο (Ischenko & Sarpaliev 2002, Motta *et al.* 2010). Σε αυτό

1. Εισαγωγή

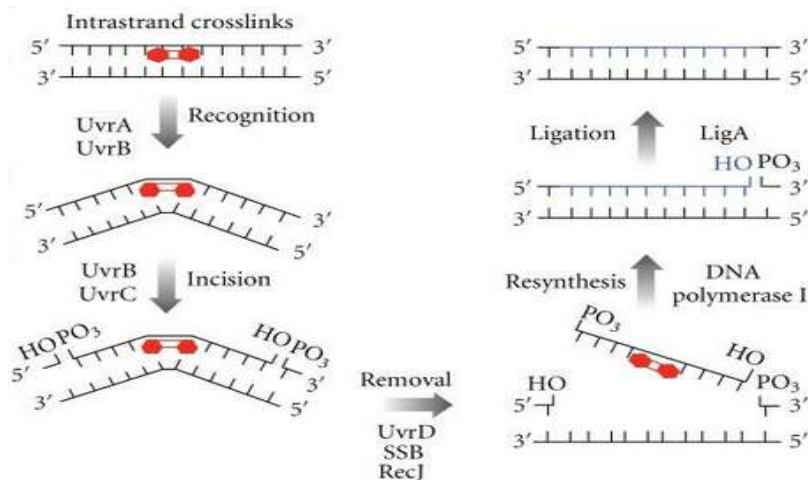
το σημείο μπορεί να δράσει μία δεοξυριβοφωσφοδιεστεράση (Εικόνα 1.10, δεξί μονοπάτι), η οποία αφαιρεί τη δεοξυριβόζη και αφήνει ένα 5'-PO₃ άκρο (Piersen *et al.* 2000). Έχοντας τα 3' και 5' άκρα ελεύθερα και μία κενή από νουκλεοτίδιο θέση, μπορεί με δράση πολυμεράσης και λιγάσης να προστεθεί το κατάλληλο νουκλεοτίδιο στην κενή θέση και να κλείσει το κενό. Αν δε δράσει η δεοξυριβοφωσφοδιεστεράση (Εικόνα 1.10, αριστερό μονοπάτι), τότε με δράση πολυμεράσης θα αρχίσει σύνθεση αλυσίδας DNA από το 3'-OH άκρο εκτοπίζοντας τη μονόκλωνη αλυσίδα με το 5'-δεοξυριβοφωσφορικό άκρο, η οποία αλυσίδα θα αφαιρεθεί με μία ενδονουκλεάση (Flap endonuclease) (Zharkov 2008).



Εικόνα 1.10. Γενικός μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης (Morita *et al.* 2010).

1.2.3.3 Σύστημα επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων

Ένα από τα σημαντικότερα συστήματα επιδιόρθωσης είναι το σύστημα επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων. Το σύστημα αυτό επιδιορθώνει ένα εύρος βλαβών που προκαλούνται από τη UV ακτινοβολία και από χημικούς παράγοντες. Αυτό το σύστημα απόκρισης αποτελείται από τα γονίδια *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* και *uvrD*, ανήκει στο SOS σύστημα και μάλιστα τα *uvrA*, *uvrB* και *uvrD* είναι από τα SOS γονίδια που αποκαταστέλλονται πρώτα κατά την SOS απόκριση (Janion 2008).



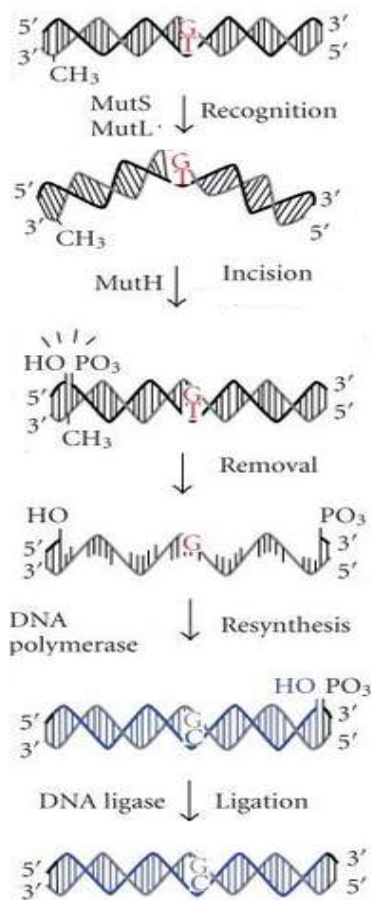
Εικόνα 1.11. Μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων (Morita *et al.* 2010).

1. Εισαγωγή

Η αναγνώριση και εκτομή γίνεται από τις UvrA, B και C (Εικόνα 1.11, Van Houten 1990, Truglio *et al.* 2006). Το σύμπλεγμα UvrA₂B αναγνωρίζει τα λάθη στο DNA και προσδέεται σε αυτά (Van Houten 1990). Μετά από υδρόλυση ATP, απομακρύνεται η UvrA και παραμένει γερά προσδεμένη η UvrB στο DNA (Moolenaar *et al.* 2000). Ακολουθεί η UvrC που προσδέεται σε αυτό το σύμπλεγμα UvrB-DNA και κόβει τον 5ο φωσφοδιεστερικό δεσμό από την 3'-μεριά της βλάβης και τον 8ο φωσφοδιεστερικό δεσμό από την 5'-μεριά της βλάβης (Orren & Sancar 1989, Verhoeven *et al.* 2000). Το μονόκλωνο τμήμα DNA που περιέχει τη βλάβη απομακρύνεται από την UvrD. Στο τέλος η πολυμεράση I συνθέτει νέο τμήμα DNA στη θέση του μονόκλωνου τμήματος που περιείχε την βλάβη και αφαιρέθηκε (Truglio *et al.* 2006).

1.2.3.4 Σύστημα επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων

Ένα ακόμη σύστημα επιδιόρθωσης λαθών είναι το σύστημα επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων που επιδιορθώνει αζευγάρωτες βάσεις ή βάσεις που έχουν ζευγαρώσει λάθος (Modrich 1989, Lahue & Modrich 1989, Lyer *et al.* 2006, Fukui 2010). Επειδή μπορεί να διορθώνει λάθη αντιγραφής, ανεβάζει την ακρίβεια της αντιγραφής τουλάχιστον κατά δύο με τρεις τάξεις μεγέθους (Schaaper 1993).



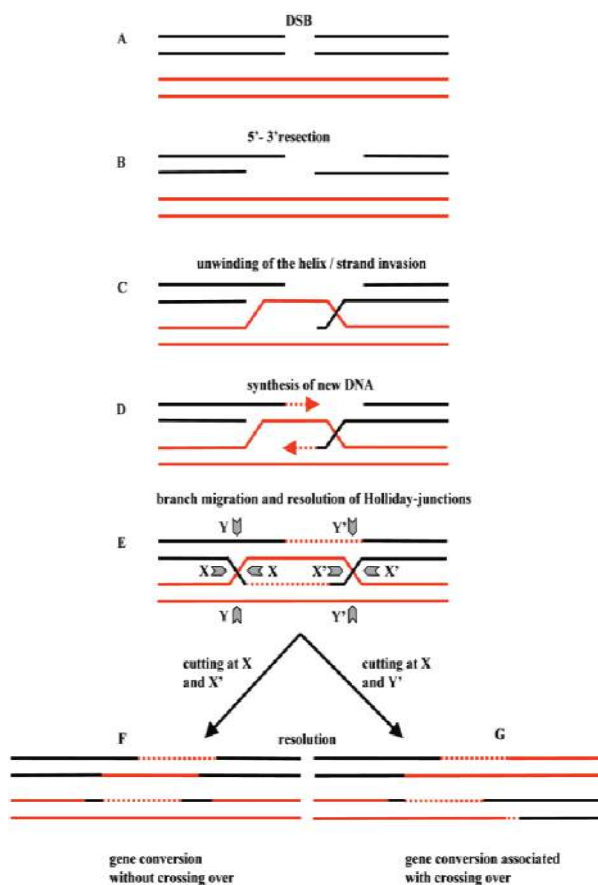
Εικόνα 1.12. Μηχανισμός επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων (Fukui 2010).

Στα πρώτα βήματα αυτής της επιδιόρθωσης (Εικόνα 1.12), ένα ομοδιμερές της MutS αναγνωρίζει και προσδέεται σε αταίριαστη βάση (Lamers *et al.* 2000, Obmolova *et al.* 2000). Μετά, ένα ομοδιμερές της MutL αναγνωρίζει και σταθεροποιεί το σύμπλεγμα της MutS με την αταίριαστη βάση ενώ στην συνέχεια ενεργοποιεί την MutH ενδονουκλεάση (Ban & Yang 1998). Η τελευταία με την σειρά της κόβει τον αμεθυλιωτο κλώνο (ο οποίος είναι ο νεοσυντιθέμενος κατά την αντιγραφή εφόσον δεν έχει προλάβει να μεθυλιωθεί) (Längle-Rouault *et al.* 1987). Στην συνέχεια, κυτταρική ελικάση και εξωνουκλεάση θα αφαιρέσουν τον κλώνο που κόπηκε από την MutH, ενώ η DNA πολυμεράση III και η λιγάση θα συνθέσουν νέο κλώνο στην κενή θέση (Mechanic *et al.* 2000, Burdett *et al.* 2001). Να σημειωθεί ότι υπάρχουν και βακτήρια που δεν διαθέτουν την MutH. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι αταίριαστες βάσεις αναγνωρίζονται από την MutS και το κόψιμο του κλώνου πραγματοποιείται από την MutL (Fukui 2010).

1. Εισαγωγή

1.2.3.5 Σύστημα επιδιόρθωσης με ομόλογο ανασυνδυασμό

Τα λάθη στο DNA μπορούν να σταματήσουν την πορεία αντιγραφής στον ένα κλώνο του DNA, αν δεν έχουν διορθωθεί πριν την έναρξη της αντιγραφής. Τέτοιες βλάβες μπορεί να δημιουργήσουν μονόκλωνα χάσματα. Επιπλέον, σπάσιμο στον ένα κλώνο του DNA μπορεί να καταλήξει στην δημιουργία δίκλωνου σπασίματος κατά την αντιγραφή. Για την επιδιόρθωση αυτών των βλαβών επιστρατεύεται η επιδιόρθωση με ομόλογο ανασυνδυασμό (Cox *et al.* 2000, Lusetti & Cox 2002). Το σημαντικότερο ένζυμο στην επιδιόρθωση μέσω ανασυνδυασμού είναι η RecA, η οποία εκτός του ότι προάγει τον ομόλογο ανασυνδυασμό, είναι ρυθμιστική πρωτεΐνη της SOS απόκρισης όπως προαναφέρθηκε, καθώς και το γονίδιό της είναι SOS-ρυθμιζόμενο. Άλλα δύο SOS γονίδια που συμμετέχουν και στην επιδιόρθωση μέσω ανασυνδυασμού είναι τα *ruvAB*, οι πρωτεΐνες των οποίων συμμετέχουν στην λύση των δομών Holliday που σχηματίζονται κατά τον ανασυνδυασμό.



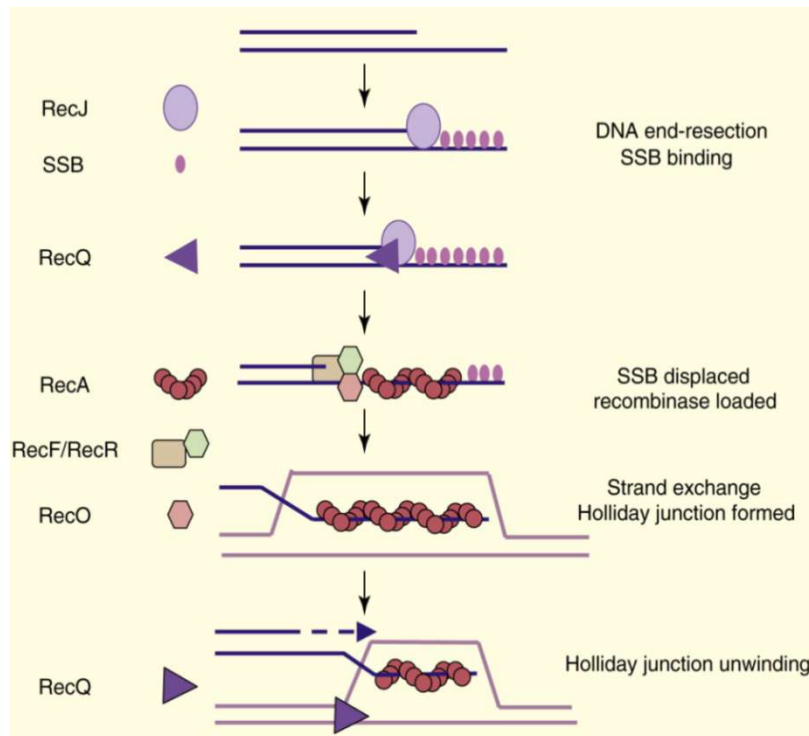
Το πιο σημαντικό κομμάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού είναι η ανταλλαγή κλώνων (Εικόνα 1.13). Για να επιτευχθεί αυτό, μονόκλωνο 3' άκρο του ενός κλώνου του DNA μετακινείται και διεισδύει στο ομόλογο δίκλωνο μόριο (Εικόνα 1.13 βήμα C). Από τα μονόκλωνα 3' άκρα (εκ των οποίων το ένα είναι αυτό που διείσδυσε στο ομόλογο τμήμα) γίνεται σύνθεση DNA με μήτρα το ομόλογο τμήμα στο οποίο έγινε η διείσδυση (Εικόνα 1.13 βήμα D). Έτσι, σχηματίζονται διακλαδώσεις Holliday (βήμα E). Ανάλογα με το πού θα γίνουν οι εγκοπές και η λύση της δομής Holliday θα δημιουργηθούν προϊόντα επιχιασμού ή όχι (Εικόνα 1.13 βήματα G και F αντίστοιχα).

Εικόνα 1.13. Διαδικασία ομόλογου ανασυνδυασμού (Bosch *et al.* 2002)

Στην περίπτωση των μονόκλωνων χασμάτων επιστρατεύονται οι RecFOR πρωτεΐνες (Εικόνα 1.14). Στην αρχή, η εξωνουκλεάση RecJ προσδένεται στο 5' άκρο του χάσματος και κινείται δρώντας με κατεύθυνση 5' προς 3'. Στο μονόκλωνο τμήμα προσδένονται μόρια της SSB για να το προστατεύσουν. Το σύμπλεγμα RecFR

1. Εισαγωγή

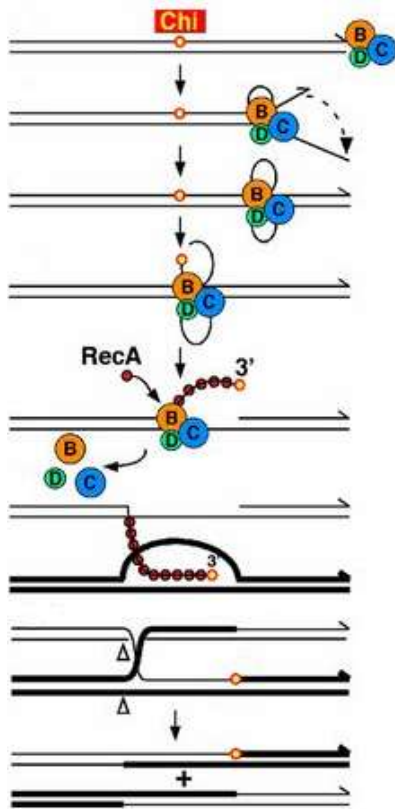
προσδένεται στο 3' άκρο του χάσματος (Rocha *et al.* 2005), ενώ η RecO απομακρύνει τα μόρια της SSB (Kowalczykowski *et al.* 1987, Sakai and Cox 2009). Τότε η RecR φορτώνει μόρια της RecA στο μονόκλωνο τμήμα (Morimatsu & Kowalczykowski 2003, Inoue *et al.* 2007). Το νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο RecA-μονόκλωνο DNA ανιχνεύει ομόλογη ακολουθία σε δίκλωνο DNA. Ακολουθεί αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στην περιοχή ομολογίας, εισβολή των άκρων και δημιουργία δομών Holliday. Με τις κατάλληλες πολυμεράσες, λιγάσες και ενδονουκλεάσες συμπληρώνεται το χάσμα, με βάση την συμπληρωματικότητα από το ομόλογο δίκλωνο τμήμα. Η δομή Holliday λύεται με την βοήθεια των RuvA και RuvB ελικάσων και της RuvC ενδοδοξυριβονουκλεάσης.



Εικόνα 1.14. Μηχανισμός επιδιόρθωσης μονόκλωνων χασμάτων με ομόλογο ανασυνδυασμό και τη χρήση του συμπλέγματος RecFOR (Hiom 2009).

Στην περίπτωση των δίκλωνων σπασμάτων, χρησιμοποιείται το σύμπλεγμα RecBCD (Εικόνα 1.15) που ξεκινάει από την άκρη και ξετυλίγει το DNA μέχρι να συναντήσει ειδικές αλληλουχίες που ονομάζονται Chi (που στο *E. coli* είναι GCTGGTGG) (Taylor *et al.* 1985). Τότε, κάνει ένα μονόκλωνο κόψιμο στο 3' άκρο σε σημείο που συναντάται η αλληλουχία Chi και συνεχίζει να ξετυλίγει αφήνοντας ένα μονόκλωνο 3' άκρο. Σε αυτό το άκρο φορτώνεται η RecA που στη συνέχεια προάγει τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Anderson & Kowalczykowski 1997).

1. Εισαγωγή



Εικόνα 1.15. Μηχανισμός επιδιόρθωσης δίκλωνων σπασιμάτων με ομόλογο ανασυνδυασμό και τη χρήση του συμπλέγματος RecBCD (Amundsen et al. 2016).

1.3 *Zymomonas mobilis*

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το *Zymomonas mobilis* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο που προσελκύει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας αλλά και της βιομηχανίας παραγωγής βιοκαυσίμων. Ο λόγος που προκαλεί ενδιαφέρον αυτό το βακτήριο είναι η σχεδόν τέλεια απόδοσή του σε παραγωγή αιθανόλης και η ελάχιστη συσσώρευση βιομάζας.

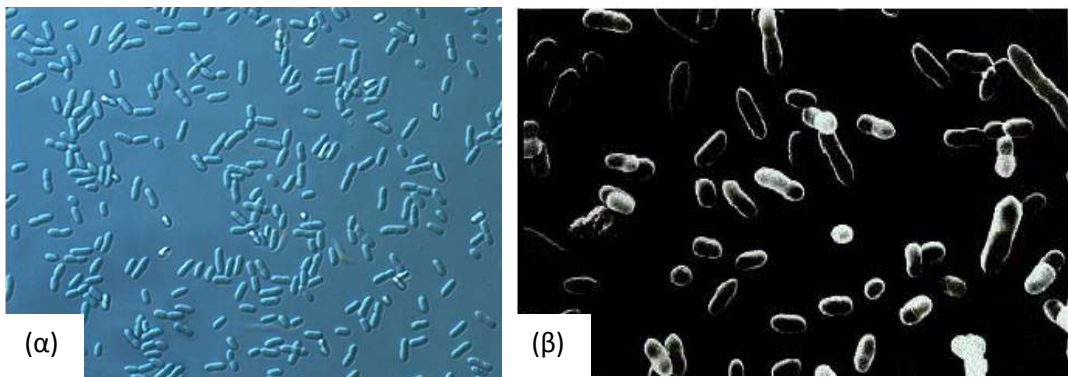
Το *Zymomonas mobilis* περιγράφηκε πρώτη φορά όταν βρέθηκε να αλλοιώνει την ποιότητα του μηλίτη οίνου ("αρρώστια" του μηλίτη, cider sickness) επειδή προκαλούσε δευτερογενή ζύμωση του ποτού που οφειλόταν σε πιθανή μόλυνση των φρούτων (Barker & Hillier 1912). Απομονώθηκε από τη ζύμωση χυμού άγαβης προς παρασκευή του παραδοσιακού μεξικάνικου ποτού pulque και ονομάστηκε *Terrobacterium mobile* (Lindner 1928). Στις μέρες μας κατατάσσεται στην κλάση των α -πρωτεοβακτηρίων, στην τάξη των *Sphingomonadales* και στην οικογένεια των *Sphingomonadaceae*. Ανήκει στο γένος *Zymomonas* με ένα είδος (*Zymomonas mobilis*) και τρία υποείδη (*Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis*, *Zymomonas mobilis* subsp. *pomaceae*, *Zymomonas mobilis* subsp. *francensis*) (Swings & De Ley 1977, Coton et al. 2005).

Τα κύτταρα του *Zymomonas* έχουν σχήμα βακίλων μήκους 2 έως 6 μm και πλάτους 1 έως 1.5 μm (Εικόνα 1.16). Διαθέτουν 1 έως 4 πολικά μαστίγια, ως εκ τούτου είναι κινητικά, και μερικές φορές συναντώνται σε μορφές ζευγών, ροζέτας ή

1. Εισαγωγή

αλυσίδων. Σε στερεό θρεπτικό σχηματίζουν αποικίες φακοειδείς με άκρο στην κορυφή, γυαλιστερές, χρώματος λευκού ή κρεμώδους και μεγέθους 1 έως 2 mm μετά από 2 μέρες ανάπτυξη στους 30°C (Swings & De Ley 1977).

Σαν οργανισμός, θεωρείται μικροαερόφιλος και όχι αυστηρά αναερόβιος. Αναπτύσσεται σε ένα εύρος θερμοκρασίας 28°C με 30°C, παρ' όλο που λίγα στελέχη του ενδέχεται να αναπτύσσονται και σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, και σε ένα εύρος pH 3.5 με 7.5, με ιδανικότερες τιμές μεταξύ 5 και 7. Καταβολίζει γλυκόζη, φρουκτόζη και σουκρόζη, αν και η περίοδος προσαρμογής του σε θρεπτικό με σουκρόζη διαφέρει μεταξύ των στελεχών του (Viikari & Berry 1988). Μπορεί να μεγαλώνει σε συγκέντρωση γλυκόζης 25% w/v (Kluuyver & Horpenbrouwers 1931), ενώ κάποια στελέχη του αντέχουν σε συγκεντρώσεις γλυκόζης έως 40% w/v (δεδομένα εργαστηρίου, Savvides *et al.* 2000). Μπορεί να παράγει και να αντέξει συγκεντρώσεις αιθανόλης έως 11% σε συνεχείς καλλιέργειες και 16% σε batch καλλιέργειες (Rogers *et al.* 2007) αλλά τότε εμφανίζει ανάσχεση της ανάπτυξής του λόγω μη σύζευξης (uncoupling) του καταβολισμού και της κυτταρικής ανάπτυξης. Παράγει λιπαρά οξέα με μακριές αλυσίδες και οπανοειδή (βακτηριακά στερεοειδή) εξαιτίας της αύξησης της ρευστότητας της λιπιδικής διπλοστοιβάδας ύστερα από αλληλεπίδρασή της με την παραγόμενη αιθανόλη (Ingram 1976, Carey & Ingram 1983, Wang *et al.* 2016a).



Εικόνα 1.16. (α) Φωτογραφία μικροσκοπίου διαφορικής συμβολής (κατά Nomarski) από κύτταρα του *Z. mobilis* ZM4 (*jgi.doe.gov*, αρχείο εργαστηρίου), και (β) φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης από κύτταρα του CP4 (*tSPACE.library.utoronto.ca*)

1.3.2 Μεταβολισμός

Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα του *Zymomonas mobilis* είναι οι αποδόσεις της αιθανολοπαραγωγής του, που τις στηρίζει στον μεταβολισμό του. Καταβολίζει γλυκόζη προς παραγωγή αιθανόλης σε ρυθμούς μεγαλύτερους από την κοινή ζύμη (*Saccharomyces cerevisiae*), σε σχεδόν τέλεια τελική ποσότητα (0,49 με 0,50 g αιθανόλης/g γλυκόζης), με ελάχιστη συσσώρευση βιομάζας, και την ταυτόχρονη παραγωγή άλλων βιομηχανικώς αξιοποιήσιμων προϊόντων (λεβάνη, σορβιτόλη, φαινυλοακετυλοκαρβινόλη) (Rogers *et al.* 2007).

1. Εισαγωγή

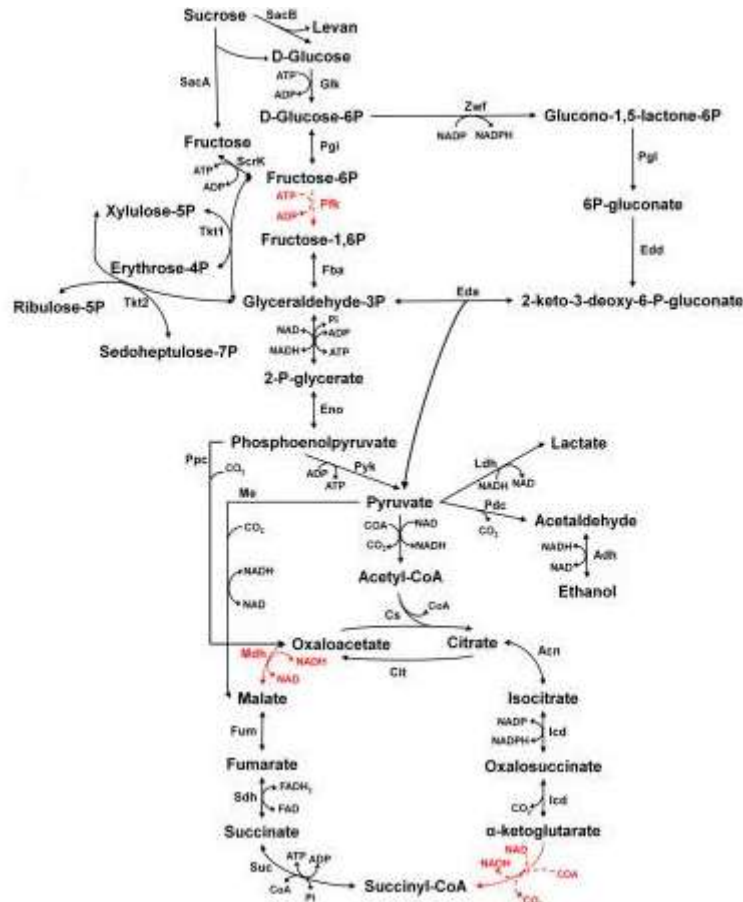
Το μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas δεν λειτουργεί στο *Zymomonas* λόγω έλλειψης του ενζύμου 6-φωσφοφρουκτοκινάση, αφήνοντας το μονοπάτι Entner-Doudoroff (Εικόνες 1.17) με την συνύπαρξη των ενζύμων πυροφωσφορική αποκαρβοξυλάση και αλκοολική αφυδρογονάση για παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και αιθανόλης (Gibbs & De Moss 1954, Dawes *et al.* 1966, Hoppner & Doelle 1983). Το μονοπάτι Entner-Doudoroff εντοπίζεται μόνο σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα Αρχαία και τα γένη των Gram⁻ βακτηρίων *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter* και *Agrobacterium* (σπάνια συναντάται σε Gram⁺ βακτήρια). Οι οργανισμοί που αξιοποιούν το μονοπάτι Entner-Doudoroff δεν διαθέτουν όλα τα ένζυμα της γλυκόλυσης ενώ χρησιμοποιούν τα ένζυμα 6-φωσφογλυκονική αφυδρογονάση και 2-κετο-3-δεοξυφωσφογλυκονική αλδολάση για δημιουργία πυροσταφυλικού από γλυκόζη. Η ενεργειακή απόδοση του μονοπατιού είναι 1 μόριο ATP, 1 μόριο NADH και 1 μόριο NADPH ανά μόριο γλυκόζης (σε αντίθεση με την γλυκόλυση που παράγονται 2 μόρια ATP και 2 μόρια NADH ανά μόριο γλυκόζης). Τα προϊόντα του μονοπατιού είναι λιγότερα από 2 mol CO₂ και 1.5 με 1.9 mol αιθανόλης ανά mol εξόζης, με ρυθμό τρεις έως πέντε φορές ταχύτερο από αυτόν της ζύμης (Rogers *et al.* 1982), οδηγώντας σε υψηλή απόδοση σε αιθανόλη, CO₂, ATP και θερμότητα (περίπου 98%) και χαμηλή απόδοση σε βιομάζα (περίπου 2%). Από το μονοπάτι παράγονται συμπληρωματικά σε μικρές ποσότητες ακετυλομεθυλοκαρβινόλη, οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ και ακεταλδεΐδη, στην οποία οφείλεται και η χαρακτηριστική μυρωδιά και γεύση της χαλασμένης μύρας (Millis 1956, Ault 1965).

Εκτός από γλυκόζη, το *Z. mobilis* μπορεί να καταβολίσει και φρουκτόζη. Η φρουκτόζη φωσφορυλιώνεται από τη φρουκτοκινάση που έχει μεγάλη ειδικευση στη φρουκτόζη και στο ATP, ενώ καταστέλλεται παρουσία γλυκόζης και 6-φωσφορικής γλυκόζης. Σε συνεχείς καλλιέργειες με φρουκτόζη σαν πηγή άνθρακα η απόδοση σε αιθανόλη είναι χαμηλότερη (90%) λόγω δημιουργίας των παραπροϊόντων μαννιτόλης και γλυκερόλης (Viikari & Korhola 1986, Panesar *et al.* 2006).

Το *Zymomonas mobilis* διαθέτει επιπλέον τα ένζυμα λεβανосуκράση, ιμπερτάση και οξειδοαναγωγή γλυκόζης-φρουκτόζης, με το πρώτο να παράγει λεβάνη, το δεύτερο να διασπά την σουκρόζη (Εικόνα 1.21) σε γλυκόζη και φρουκτόζη και το τρίτο να καταλύει την ταυτόχρονη οξειδοαναγωγή των δύο εξοζών σε γλυκονικό οξύ και σορβιτόλη (Swings & De Ley 1977, Sprenger 1996, Bai *et al.* 2008).

Όσον αφορά τις πηγές αζώτου, το *Z. mobilis* μπορεί να καταβολίσει ασπαρτικό, γλουταμικό και γλουταμίνη, ενώ πρόσφατα αποδείχθηκε ότι μπορεί να χρησιμοποιεί και αέριο άζωτο (Kremer *et al.* 2015). Ως πηγές θείου και φωσφόρου, καταβολίζει και ενσωματώνει ευρύ φάσμα οργανικών και ανόργανων μορίων, με εξαίρεση το πυροφωσφορικό και το τριοπολυφωσφορικό (Bochner *et al.* 2010). Αναπτύσσεται παρουσία οξυγόνου (Belaich & Senez 1965), όμως, η παραγωγή ακεταλδεΐδης αυξάνεται. Ο λόγος είναι ότι αυξάνεται η ενεργότητα της NADH οξειδάσης με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαθεσιμότητα σε NADH που χρειάζεται η αλκοολική αφυδρογονάση. Έτσι, σε αερόβιες συνθήκες, παράγει αυξημένες ποσότητες ακεταλδεΐδης και ακετόνης (Viikari 1986, Wecker & Zall 1987, Tanaka *et al.* 1990, Kalnenieks *et al.* 2006) και μειωμένες ποσότητες αιθανόλης (το 1/3 της αντίστοιχα παραγόμενης σε αναερόβιες συνθήκες) (Kluyver & Hoppenbrouwer 1931, Lindner 1928).

1. Εισαγωγή



Εικόνα 1.17. Ο κεντρικός μεταβολισμός του *Zymomonas mobilis* (Lee et al. 2010). Συμπεριλαμβάνει το μονοπάτι Entner-Doudoroff, τη διάσπαση της σουκρόζης και τον ελλιπή κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων. Με κόκκινο σημειώνονται τα ένζυμα που απουσιάζουν.

1.3.3 Γονιδιωματική ανάλυση και μελέτη στο *Z. mobilis*

Πρώτο στέλεχος που αλληλουχήθηκε ήταν το ZM4 (ATCC 31821) (Seo et al. 2005), του οποίου η κατάθεση βελτιώθηκε στη συνέχεια (Yang et al. 2009). Από την αλληλούχηση του στελέχους έλειπαν οι αλληλουχίες των πλασμιδίων οι οποίες ολοκληρώθηκαν πρόσφατα (Yang et al. 2018). Μετά την πρώτη δημοσίευση του χρωμοσώματος του ZM4, ακολούθησαν οι ολοκληρωμένες αλληλουχίσεις των φυσικών στελεχών NCIMB 11163, ATCC 29191, ATCC 29192, ATCC 10988 και CP4, που έγιναν σε συνεργασία του εργαστηρίου μας με το JGI (Kouvelis et al. 2009, 2011, 2014, Yang et al. 2009 και 2018, Pappas et al. 2011, Desiniotis et al. 2012, Πίνακας 1.5). Επίσης, σε draft μορφή κατατέθηκαν τα εκκριτικά μεταλλαγμένα παράγωγα του ZM4, ATCC 31822 και ATCC 31823 (Zhao et al. 2012, 2016). Το γονιδίωμα του CP4, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, έχει χρωμόσωμα μεγέθους 1.998.637 βάσεων και 5 πλασμίδια μεγέθους 36.892, 33.915, 32.400, 30.952 και 30.440 βάσεων αντίστοιχα. Περιέχει 1.857 γονίδια πρωτεϊνών, 48 γονίδια tRNA και 6 γονίδια rRNA οργανωμένα σε 2 μονάδες. Η ύπαρξη των αλληλουχιών των γονιδιωμάτων συνέβαλε σημαντικά στη μελέτη του οργανισμού και έκανε

1. Εισαγωγή

δυνατή τη σύγκριση μεταξύ των στελεχών. Παράδειγμα τέτοιων συγκρίσεων αφορά στα πολύ όμοια μεταξύ τους CP4 και ZM4: τα δύο στελέχη μοιάζουν κατά 99% στις συντηνικές περιοχές του γονιδιώματός τους, με αυτό του CP4 να είναι μικρότερο κατά 57,7 kb, όμως 4 περιοχές συνολικού μήκους 20,4 kb και 18 γονίδια εντός αυτών είναι μοναδικά στο CP4 ενώ 15 περιοχές συνολικού μήκους 74,6 kb και 58 γονίδια εντός αυτών είναι μοναδικά στο ZM4 (Kouvelis *et al.* 2014). Φαίνεται ότι το στέλεχος ATCC 29192, που ανήκει στο υποείδος *pomaceae*, είναι το λιγότερο όμοιο με τα υπόλοιπα αλληλουχημένα στελέχη, που ανήκουν στο υποείδος *mobilis* (73% νουκλεοτιδική ομοιότητα με το ZM4).

Πίνακας 1.5 Τα αλληλουχημένα φυσικά στελέχη του *Z. mobilis*, το μέγεθος των χρωμοσωμάτων και πλασμιδίων τους και οι κωδικοί τους στην GenBank

Στέλεχος	Κωδικός GenBank χρωμοσώματος (μέγεθος)	Κωδικός GenBank πλασμιδίων (μέγεθος)	Αναφορά αλληλούχισης
<i>Z. mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i>			
CP4	NC_022900 (2.1 Mb)	NC_022901 (36.9 Kb) NC_022913 (33.9 Kb) NC_022902 (32.4 Kb) NC_022903 (30.9 Kb) NC_022910 (30.4 Kb)	Kouvelis <i>et al.</i> 2014
ATCC 31821 (ZM4)	NC_006526.2 (2.0 Mb)	NZ_CP023716 (32.8Kb) NZ_CP023717 (33.0 Kb) NZ_CP023718 (36.5Kb) NZ_CP023719 (39.3Kb)	Yang <i>et al.</i> 2009 και 2018
ATCC 10988	NC_017262 (2.1 Mb)	NC_017180 (32.4 Kb) NC_017183 (32.3 Kb) NC_017181 (31.7 Kb) NC_017184 (18.5 Kb) NC_017182 (4.0 Kb) NC_017185 (2.8 Kb) NC_011363 (1.7 Kb) NC_005701 (1.7 Kb)	Pappas <i>et al.</i> 2011
NCIMB 11163	NC_013355.1 (2.2 Mb)	NC_013356 (53.4 Kb) NC_013357 (40.8 Kb) NC_013358 (4.6 Kb) NC_019019 (1.6 Kb)	Kouvelis <i>et al.</i> 2009
ATCC 29191	NC_018145 (2.0 Mb)	NC_018146 (18.4 Kb) NC_018147 (14.9 Kb) NC_018148 (13.7 Kb)	Desiniotis <i>et al.</i> 2012
<i>Z. mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i>			
ATCC 29192	NC_015709.1 (2.0 Mb)	NC_015715 (37.4 Kb) NC_015716 (34.2 Kb)	Kouvelis <i>et al.</i> 2011

Για την καλύτερη κατανόηση των δικτύων των γονιδίων και του μεταβολισμού έχει αναλυθεί το μεταγραφικό προφίλ στελεχών του *Z. mobilis* σε πειράματα μικροσυστοιχιών. Συγκεκριμένα, έχει αναλυθεί το μεταγράφομα του στελέχους ZM4 σε αερόβια και αναερόβια ζύμωση, και σε συνθήκες στρες παρουσία φουρφουράλης, αιθανόλης, οξικού νατρίου και φαινυλαλδεϋδης (Yang *et al.* 2009, He *et al.* 2012a και 2012b, Yang *et al.* 2013, Yang *et al.* 2014a, Yi *et al.* 2015). Φάνηκε ότι γονίδια που συμμετέχουν στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, στον μεταβολισμό του DNA και στην μεταφραστική μηχανή δείχνουν να είναι τα γονίδια που έχουν συχνά διαφορετική έκφραση σε στρεσογόνες συνθήκες. Επιπλέον, έχουν

1. Εισαγωγή

μελετηθεί και τα μεταγραφώματα παράγωγων στελεχών του ZM4 σε μικροσυστοιχίες. Το μεταγράφομα του ZM4/AcR (μεταλλαγμένου στελέχους ανθεκτικού σε οξικό οξύ, Joachimsthal *et al.* 1998) έχει μελετηθεί συγκριτικά με το πατρικό του στέλεχος αλλά και παρουσία οξικού νατρίου (Yang *et al.* 2010 και 2014a). Έχει διερευνηθεί η επίδραση του οξικού οξέος στο στέλεχος 8b (Mohagheghi *et al.* 2004) με πηγές άνθρακα την γλυκόζη, ξυλόζη ή συνδυασμό των δύο (Yang *et al.* 2014b), διαφωτίζοντας τις επιπτώσεις που έχει παρουσία οξικού οξέος και της ξυλόζης στο μεταγραφικό προφίλ του στελέχους. Ακόμη, συγκρίθηκε το εκκριτικό στέλεχος ZM401 (Lee *et al.* 1982) με το πατρικό στέλεχος ZM4 σε μικροσυστοιχίες (Jeon *et al.* 2012). Ένας διαφορετικός τρόπος που αξιοποιήθηκε μεταγραφωματική ανάλυση σε συνδυασμό με υπολογιστικές προβλέψεις ήταν στη μελέτη μικρών sRNAs στον οργανισμό. Παρατηρήθηκαν sRNAs που έχουν διαφορετική έκφραση σε στρες παρουσία αιθανόλης και σε αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες (Cho *et al.* 2014).

Η συσσώρευση δεδομένων από την ανάλυση γονιδιωμάτων και μεταγραφωμάτων του οργανισμού, σε συνδυασμό με τα κατάλληλα βιοπληροφορικά εργαλεία, έχει καταστήσει δυνατή την δημιουργία μεταβολικών μοντέλων. Τα μοντέλα αυτά βοηθούν στην πρόβλεψη των επιπτώσεων των τροποποιήσεων στον μεταβολισμό του οργανισμού και υπολογίζουν εκείνες τις τροποποιήσεις που ενδείκνυνται για την επιθυμητή διεύρυνση. Έχουν ήδη κατασκευαστεί αρκετά μεταβολικά μοντέλα του *Z. mobilis* (Atlintas *et al.* 2006, Lee *et al.* 2010, Widiastuti *et al.* 2011, Pentjuss *et al.* 2013, Rutkis *et al.* 2013, Kalnenieks *et al.* 2014). Τα μοντέλα αυτά εξομοιώνουν σε ειδικά προγράμματα στον υπολογιστή τον μεταβολισμό του οργανισμού και τις αλλαγές σε αυτόν παρουσία και απουσία οξυγόνου, ύστερα από τον καταβολισμό διαφορετικών υποστρωμάτων (γλυκόζη, ξυλόζη) καθώς και τις αλλαγές που μπορεί να γίνουν για την παραγωγή επιθυμητών προϊόντων (γλυκίνη, ηλεκτρικό, γλουταμινικό) ή την βελτίωση των αποδόσεων του.

Προσφάτως βρέθηκε ότι το ZM4 διαθέτει CRISPR-Cas σύστημα τύπου I-F (Dong *et al.* 2016) με 6 *cas* γονίδια και 3 θέσεις CRISPR. Τα CRISPR-Cas συστήματα μπορούν να αξιοποιηθούν σαν εργαλείο σε γονιδιωματικές μελέτες οργανισμών. Φαίνεται όμως ότι ακόμη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί το σύστημα του *Z. mobilis* για να στοχεύσει σημεία στο χρωμόσωμά του, αν και είναι αποτελεσματικό εναντίον τεχνητών πλασμιδίων. Παρά ταύτα, χρησιμοποιήθηκε ξένο CRISPR σύστημα (του *Streptococcus pyogenes*) για την εξάλειψη 2 πλασμιδίων του ZM4 (Cao *et al.* 2017).

1.3.4 Κατασκευή στελεχών του *Z. mobilis*

Λόγω των πλεονεκτικών ρυθμών και αποδόσεων του *Z. mobilis* στην παραγωγή αιθανόλης, ενδιαφέρει να αξιοποιηθεί ο οργανισμός στην βιομηχανία παραγωγής βιοκαυσίμων. Ήδη έχουν υπάρξει έρευνες πάνω στην ζύμωση υποστρωμάτων, που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης, από φυσικού τύπου στελέχη του *Z. mobilis*. Έχει παρατηρηθεί (Bringer *et al.* 1984, Roosaran *et al.* 1985, Rogers *et al.* 2007) ότι το ZM4 αγγίζει το 95% των θεωρητικών αποδόσεων σε παραγωγή αιθανόλης, σε σύγκριση με το *Saccharomyces uvarum* που έφτασε στο 90%. Το ZM4 έχει αποδείξει τις αυξημένες ζυμωτικές του ικανότητες και στη ζύμωση υδρολυμάτων αμυλούχων αποβλήτων (Davis *et al.* 2006). Επιπλέον μελέτες έχουν γίνει και στην ζύμωση μελάσας, η οποία παράγεται από την

1. Εισαγωγή

κατεργασία ζάχαρης και είναι από τα φτηνά υποστρώματα για παραγωγή αιθανόλης (Park & Baratti 1991, Panesar *et al.* 2006). Σε τέτοιες μελέτες φάνηκε ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων προκαλούν προβλήματα στις ζυμωτικές αποδόσεις του οργανισμού.

Όμως, ο οργανισμός υστερεί ιδιοτήτων που είναι επιθυμητές στην βιομηχανία, π.χ. διαθέτει περιορισμένο εύρος σακχάρων που καταβολίζει. Για την αξιοποίηση του οργανισμού, χρειάστηκε να κατασκευαστούν διαφορετικά στελέχη, με επιθυμητές ιδιότητες (π.χ. θερμοανθεκτικότητα, οσμοανθεκτικότητα, καταβολισμός πεντοζών κ.ά.) και με διαφορετικές προσεγγίσεις, που παρουσιάζονται στην συνέχεια.

Για τις πρώτες κατασκευές στελεχών χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαξογόνοι παράγοντες (MNNG, UV ακτινοβολία, καφεΐνη). Έτσι, δημιουργήθηκαν στελέχη οσμοανθεκτικά (Park & Baratti 1991, Savvides *et al.* 2000), θερμοανθεκτικά (Sreekumar *et al.* 1991), ανθεκτικά σε οξύ (Joachimsthal *et al.* 1998, Tao *et al.* 2005), σε ακεταλδεΐδη (Wecker & Zall 1987), σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και αλάτων (Skotnicki *et al.* 1982, Rogers *et al.* 1984), στελέχη που παρήγαγαν περισσότερη λεβάνη (Muro *et al.* 2000) αλλά και αυξότροφα στελέχη (Goodman *et al.* 1982, Estevez *et al.* 1997, Pappas *et al.* 1997). Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταλλαγμένου στελέχους με δυνατότητες αξιοποίησης στην βιομηχανία είναι το ZM4/AcR (Joachimsthal *et al.* 1998). Το στέλεχος αυτό κατασκευάστηκε ύστερα από χρήση MNNG, είναι ανθεκτικό σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξικού οξέος και χρησιμοποιήθηκε σαν βάση για την κατασκευή των στελεχών ZM4/Ac^R(pZB5) και ZM4/Ac^R(pZB5, pJX1) που καταβολίζουν ξυλόζη και είναι ανθεκτικά στο οξικό οξύ (Jeon *et al.* 2002 και 2005). Πέρα από την χρήση μεταλλαξογόνων παραγόντων, έχουν χρησιμοποιηθεί και μεταθετά στοιχεία, όπως τα Tn5, Tn501 και mini Mu (Pappas *et al.* 1997). Μάλιστα, ο mini Mu συνέτεινε στην παραγωγή ποικιλίας αυξότροφων στελεχών (Pappas 2011), ενώ το Tn5 χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή θερμοανθεκτικού στελέχους που καταβολίζει γλυκόζη και ξυλόζη (Jia *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2013). Προσφάτως, το Tn5 χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή στελέχους με βελτιωμένη παραγωγή λιπαρών οξέων (Wang *et al.* 2016a) και για την κατασκευή στελέχους ανθεκτικού στις υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων (Wang *et al.* 2016b). Ένας ακόμη τρόπος δημιουργίας αξιοποιήσιμων στελεχών είναι η προσαρμοστική εξέλιξη που αξιοποιήθηκε στη δημιουργία στελεχών ανθεκτικών σε ανασταλτικούς παράγοντες (Shui *et al.* 2015) καθώς και στελεχών με βελτιωμένες αποδόσεις καταβολισμού σακχάρων για παραγωγή αιθανόλης (Agrawal *et al.* 2011, Dunn & Rao 2015, Mohagheghi *et al.* 2015).

Ένα από τα μειονεκτήματα του οργανισμού είναι το περιορισμένο εύρος των υποστρωμάτων που καταβολίζει. Πάνω σε αυτό έχουν κατασκευαστεί στελέχη που τους έχουν εισαχθεί γονίδια καταβολισμού λακτόζης (Buchholz *et al.* 1989, Lodge *et al.* 1992) και μαννόζης (Weisser *et al.* 1996). Λόγω της ύπαρξης ξυλόζης και αραβινόζης στις υδρολυμένες λιγνινοκυτταρινούχες βιομάζες, που χρησιμοποιούνται σαν υποστρώματα στην βιομηχανία παραγωγής αιθανόλης, αρκετές εργασίες στόχευσαν στην κλωνοποίηση γονιδίων καταβολισμού αυτών των πεντοζών, μιας και δεν διαθέτει αντίστοιχα γονίδια το *Zygomonas*. Οι πρώτες προσπάθειες κλωνοποίησης γονιδίων καταβολισμού ξυλόζης από *Xanthomonas* XA1-1 και *Klebsiella pneumoniae*, δεν είχαν το επιθυμητό αποτέλεσμα (Liu *et al.* 1988, Feldmann *et al.* 1992) Στο NREL κατασκευάστηκε στέλεχος του CP4 που πέτυχε παραγωγή αιθανόλης από καταβολισμό ξυλόζης. Κλωνοποιήθηκε εντός του CP4 το pZB5, πλασμίδιο που έφερε τα γονίδια καταβολισμού ξυλόζης του *E. coli* υπό την ρύθμιση

1. Εισαγωγή

υποκινητών του *Z. mobilis* (Zhang *et al.* 1995). Παρόμοια δουλειά έγινε και για την κατασκευή στελέχους που καταβολίζει αραβινόζη (Deanda *et al.* 1996). Όμως, σε αυτά τα στελέχη τα γονίδια καταβολισμού πεντοζών βρίσκονταν σε πλασμίδια με δείκτες ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, των οποίων η προσθήκη σε μεγάλης κλίμακας ζυμώσεις δεν είναι οικονομικά συμφέρουσα. Για αυτό κατασκευάστηκαν τα στελέχη 8b και AX101 που έφεραν ενσωματωμένο στο χρωμόσωμά τους τα γονίδια καταβολισμού ξυλόζης και αντίστοιχα τα γονίδια καταβολισμού αραβινόζης και ξυλόζης (Mohagheghi *et al.* 2002 και 2004). Επιτομή εισαγωγών γονιδίων ενδιαφέροντος στο *Z. mobilis* παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.6.

Πίνακας 1.6 Ενδεικτικά γονίδια που έχουν εισαχθεί σε στέλεχη του *Z. mobilis*

Γονίδια	Οργανισμοί προέλευσης των γονιδίων	Στέλεχη <i>Z. mobilis</i> όπου εισήχθησαν τα γονίδια	Αναφορά
Κυτταρινολυτικά ένζυμα	<i>Cellulomonas uda</i>	CP4	Misawa <i>et al.</i> 1988
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CP4	Lejeune <i>et al.</i> 1988
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	ATCC 10988	Brestic-Goachet <i>et al.</i> 1989
	<i>Xanthomonas albilineans</i>	ZM6100	Su <i>et al.</i> 1989
	<i>Acetobacter xylinum</i>	IFO 13756	Okamoto <i>et al.</i> 1994
	<i>Ruminococcus albus</i>	ATCC 29191	Yanase <i>et al.</i> 2005
	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	ATCC 39676	Linger <i>et al.</i> 2010
	<i>Bacillus polymyxa</i>	ZM4	Luo & Bao 2015
Αμυλάσες	<i>Bacillus licheniformis</i>	ZM4	Brestic-Goachet <i>et al.</i> 1990
	<i>Aspergillus awamori</i>	ATCC 29191	He <i>et al.</i> 2009
	<i>Bacillus subtilis</i>	ZM4 και ATCC 29191	Wang <i>et al.</i> 2012
Συνεργίωμα λακτόζης και γαλακτόζης	<i>Escherichia coli</i>	B4286	Lodge <i>et al.</i> 1992
	<i>E. coli</i>	CP4	Buchholz <i>et al.</i> 1989
Ισομεράση φωσφομαννόζης (<i>pmi</i>)	<i>E. coli</i>	CP4	Weisser <i>et al.</i> 1996
Ισομεράση D-ξυλόζης (<i>xylA</i>), περμεάση D-ξυλόζης και ξυλοκινάση (<i>xylB</i>)	<i>Xanthomonas</i> XA1-1	ATCC 29191	Liu <i>et al.</i> 1988
<i>xylA</i> και <i>xylB</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	CP4	Feldmann <i>et al.</i> 1992
<i>xylA</i> , <i>xylB</i> , τρανσαλδολάση (<i>talB</i>), τρανσκετολάση (<i>tktA</i>)	<i>E. coli</i>	CP4	Zhang <i>et al.</i> 1995
	<i>E. coli</i>	ZM4/Ac ^R	Jeon <i>et al.</i> 2005
	<i>E. coli</i>	ZM4	Mohagheghi <i>et al.</i> 2004
<i>xylA</i> , <i>xylB</i> , <i>tkt</i> , <i>tal</i> , <i>pmi</i>	<i>E. coli</i>	ATCC 29192	Yanase <i>et al.</i> 2012
Ισομεράση L-αραβινόζης (<i>araA</i>), L-ριβουλοκινάση (<i>araB</i>), επιμεράση 5-φωσφορικής ριβουλόζης (<i>araD</i>), <i>tktA</i> , <i>talB</i>	<i>E. coli</i>	ATCC 39676	Deanda <i>et al.</i> 1996
<i>xylAB</i> , <i>araBAD</i> , <i>talB</i> , <i>tktA</i>	<i>E. coli</i>	206C	Mohagheghi <i>et al.</i> 2002
Αμινοτρασφεράση	<i>E. coli</i> (<i>yfdZ</i> , <i>metB</i>)	CP4	Jia <i>et al.</i> 2013

1. Εισαγωγή

(<i>yfdZ</i>), συνθετάση κυσταθειόνης (<i>metB</i>), πρωτεΐνη heat shock (HSP), <i>xylA</i> , <i>xylB</i> , <i>tkl</i> , <i>tal</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i> (HSP)		
συνθετάση ακετολακτόνης (<i>als</i>), αποκαρβοξυλάση ακετολακτόνης (<i>aldC</i>), αφυδρογονάση βουτανοδιόλης (<i>bdh</i>)	<i>Enterobacter cloacae</i> (<i>aldC</i> , <i>bdh</i>) <i>Bacillus subtilis</i> (<i>als</i>)	9C	Yang <i>et al.</i> 2016b
<i>irrE</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>	10232	Zhang <i>et al.</i> 2010b
proton buffering peptide (<i>cbpA</i>)	<i>E. coli</i>	CP4	Baumler <i>et al.</i> 2006
NAD-εξαρτώμενη φορμική αφυδρογονάση	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ZM4	Dong <i>et al.</i> 2013
<i>xylA</i> , <i>xylB</i> , <i>tklA</i> , <i>talB</i> , θειοεστεράση (<i>tesA</i>), <i>hsp</i> , άκυλ-CoA αναγωγή, άκυλ-CoA-διακυλγλυκερολ-άκυλοτρανσφεράση (<i>WS/DGAT</i>), <i>yfdZ</i> , <i>metB</i>	<i>E. coli</i> (<i>xylA</i> , <i>xylB</i> , <i>tklA</i> , <i>talB</i> , <i>yfdZ</i> , <i>metB</i>), <i>Acinetobacter bayly</i> (<i>tesA</i> , <i>WS/DGAT</i>), <i>Pyrococcus furiosus</i> (HSP)	ZM4	Wang <i>et al.</i> 2016a

Η προκατεργασία που περνά η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα για την δημιουργία του υδρολύματός της απελευθερώνει ουσίες που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του οργανισμού. Επομένως, ήταν σημαντικό να κατασκευαστούν στελέχη που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε τέτοιους παρεμποδιστές. Ένας από αυτούς είναι το οξικό οξύ. Ήδη αναφέρθηκε η δημιουργία στελέχους ανθεκτικού στο οξικό οξύ με χρήση MNNG (ZM4/AcR, Joachimsthal *et al.* 1998), στο οποίο εισήχθη πλασμίδιο που επιφέρει ικανότητα καταβολισμού ξυλόζης (Jeon *et al.* 2002), ενώ ανθεκτικό στέλεχος σε οξικό οξύ και φουρφουράλη κατασκευάστηκε μέσω προσαρμοστικής εξέλιξης (Shui *et al.* 2015). Για αυτό, εισήχθη γονίδιο φορμικής αφυδρογονάσης του *S. cerevisiae* υπό τον έλεγχο του υποκινητή Pgap στο ZM4 και είχε σαν αποτέλεσμα την δημιουργία στελέχους που παρήγαγε αιθανόλη από υδρολύματα καλαμποκιού, τα οποία περιείχαν φορμικό οξύ, φουρφουράλη και 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (Dong *et al.* 2013). Ακόμη, στελέχη που έφεραν μεταλλαγμένο το γονίδιο του σίγμα παράγοντα της RNA πολυμεράσης έδειξαν υψηλή πρόσληψη γλυκόζης και παραγωγή αιθανόλης παρουσία φουρφουράλης (Tan *et al.* 2015).

Ένας σημαντικός στόχος στη βελτιστοποίηση του *Z. mobilis* για οικονομικότερη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης είναι η απόκτηση της ικανότητας διάσπασης πολυσακχαριτών. Ιδανικό είναι ο ζυμωτικός οργανισμός να μπορεί από μόνος του να διασπά τους πολυσακχαρίτες στα μονομερή τους, τα οποία και θα καταβολίζει προς παραγωγή αιθανόλης. Διαφορετικά γονίδια κυτταρινασών από τα *Cellulomonas uda*, *Pseudomonas fluorescences*, *Erwinia chrysanthemi*, *Xanthomonas albilineans* εισήχθησαν στο *Z. mobilis*, τα οποία μεν εκφράζονταν αλλά η ενεργότητα κυτταρινάσης ήταν χαμηλή λόγω προβλημάτων στην έκκριση του ενζύμου (Misawa *et al.* 1988, Lejeune *et al.* 1988, Brestic-Goachet *et al.* 1989, Su *et al.* 1989). Χρήση πεπτιδίων έκκρισης του ίδιου του *Z. mobilis* έλυσε αυτό το πρόβλημα, μία λύση που αξιοποιήθηκε σε κυτταρινολυτικά γονίδια του *Acidothermus cellulolyticus* (Linger *et al.* 2010) και σε γονίδιο του *Bacillus polymyxa* (Luo & Bao 2015). Πέρα από γονίδια κυτταρινασών, γονίδια αμυλασών έχουν επίσης εισαχθεί στο *Z. mobilis* από το

1. Εισαγωγή

Aspergillus awamori (He *et al.* 2009) και το *Bacillus subtilis* (Wang *et al.* 2012). Οι προσπάθειες αυτές οδήγησαν επιτυχώς στην παραγωγή αιθανόλης από άμυλο.

Τροποποιημένα στελέχη του οργανισμού έχουν αξιοποιηθεί και στην παραγωγή άλλων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας εκτός της αιθανόλης. Ένα από αυτά τα προϊόντα είναι η σορβιτόλη, και ως προς αυτό, κατασκευάστηκε στέλεχος παράγωγο του ZM4 που υπερεκφράζει το γονίδιο της οξειδοαναγωγής γλυκόζης-φρουκτόζης και παράγει περισσότερη σορβιτόλη (Liu *et al.* 2010). Ένα άλλο προϊόν που ενδιαφέρει την βιομηχανία είναι η λεβάνη: ένας πολυσακχαρίτης που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων σαν σταθεροποιητής και γαλακτοματοποιητής καθώς και λόγω των υποχοληστερολεμικών ιδιοτήτων που έχει, στην βιομηχανία καλλυντικών λόγω των ιδιοτήτων για ενυδάτωση και για ανακούφιση της ερεθισμένης επιδερμίδας και στην φαρμακοβιομηχανία σαν υλικό επίστρωσης (Combie 2006, Kang *et al.* 2009, Zannini *et al.* 2015). Οι Senthikumar και συνεργάτες κατασκεύασαν στέλεχος παράγωγο του ATCC 10988 που έχει απενεργοποιημένο το γονίδιο *sacC* με αποτέλεσμα να παράγει περισσότερη λεβάνη (Senthikumar *et al.* 2004). Διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος κατασκεύασαν οι Seo και συνεργάτες όπου απενεργοποίησαν τα γονίδια *pdC* και *ldhA* στο ZM4 με αποτέλεσμα στο μεταλλαγμένο στέλεχος να τροποποιείται ο μεταβολισμός και να παράγεται ηλεκτρικό (Seo *et al.* 2007). Μεγάλη αλλαγή στον μεταβολισμό του οργανισμού επέφερε και η εργασία των Yang και συνεργατών, που κατασκεύασαν στέλεχος βασισμένο στο 8b (ZM4 παράγωγο που καταβολίζει ξυλόζη) το οποίο παράγει 2,3-βουτανοδιόλη από ξυλόζη και γλυκόζη. Η 2,3-βουτανοδιόλη είναι χημικό που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία πλαστικών και καυσίμων. Το στέλεχος που κατασκευάστηκε φέρει συνδυασμούς γονιδίων από *Enterobacter cloacae*, *Bacillus licheniformis* και *Bacillus subtilis*, εκφραζόμενων από υποκινητές του *Z. mobilis*, που ευθύνονται για τη συγκρότηση του μονοπατιού προς παραγωγή του τελικού προϊόντος (Yang *et al.* 2016b).

Εκτός της εισαγωγής γονιδίων, κατασκευή στελεχών επιτεύχθηκε σε λιγότερες περιπτώσεις ως τώρα και μέσω απαλοιφής (knock-out) γονιδίων με αντικατάσταση αλληλομόρφου (allele exchange) ή ανασυνδυασμό ειδικής θέσης (site specific recombination system) (Πίνακας 1.7). Χαρακτηριστικά παραδείγματα του πρώτου αποτελέσαν στελέχη που δημιουργήθηκαν για τη μελέτη της αναερόβιας ανάπτυξης και του οξειδωτικού στρες, και ως προς αυτό, απενεργοποιήθηκαν τα γονίδια της NADH-αφυδρογονάσης τύπου II και της αλκοολικής αφυδρογονάσης II (παραγωγή στελεχών *Dndh* και *DadhB*), όπου εκτιμήθηκαν οι δράσεις των ενζύμων αλλά και η παραγωγή αιθανόλης σε συνθήκες αεροβίωσης ή μη (Kalnenieks *et al.* 2006 και 2008). Στην ίδια κατεύθυνση, και με σκοπό τη μελέτη της πρόσληψης οξυγόνου από τον οργανισμό και την αποτοξίνωση από το H₂O₂, τρία άλλα στελέχη δημιουργήθηκαν μέσω γονιδιακής απαλοιφής των γονιδίων του κυτοχρώματος b (*cytB*), της υπομονάδος II της οξειδάσης του κυτοχρώματος bd (*cydB*) και της καταλάσης (*kat*) (στελέχη Δ *cytB*, Δ *cydB* και Δ *kat* – Strazdina *et al.* 2012).

Οι Yang και συνεργάτες δημιούργησαν επίσης μεταλλαγμένα στελέχη απενεργοποιώντας το γονίδιο *nhaA* (μεταφορέας νατρίου-πρωτονίων), προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος του στην ανθεκτικότητα προς το οξικό νάτριο, και το *hfg* (RNA chaperone). Το στελέχη εμφάνισαν μειωμένη ανοχή σε οξικό, βανιλίνη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλφουρφουράλη, χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης και χαμηλότερους αριθμούς κυττάρων, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή των knock-outs στην αντίσταση έναντι των παραπάνω αναστολέων (Yang *et al.* 2010). Δύο ακόμη

1. Εισαγωγή

στελέχη που κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν σε συνθήκες στρες ήταν στελέχη με απενεργοποιημένο το γονίδιο της οξειδοαναγωγιάσης γλυκόζης – φρουκτόζης (*Δgfo*, Sootsuwan *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013), που οδηγεί σε κατάπαυση της παραγωγής σορβιτόλης. Από αυτά φάνηκε ότι η έλλειψη σορβιτόλης συνδέεται με μειωμένη ανάπτυξη και παραγωγή αιθανόλης σε υψηλές θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις αιθανόλης και γλυκόζης, υποδεικνύοντας τη σημασία της σορβιτόλης στα διάφορα είδη στρες.

Εκτός από την κατασκευή knock-out στελεχών με σκοπό την μελέτη της συμπεριφοράς των υπό μελέτη γονιδίων σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης, έχουν κατασκευαστεί και knock-out στελέχη που παρείχαν χρήσιμες ιδιότητες και ήταν ιδιαίτερα αξιοποιήσιμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν στελέχη που κατασκεύασαν οι Kerr και συνεργάτες οι οποίοι απενεργοποίησαν τρία γονίδια: ένα που αφορούσε του τύπου IV περιοριστικό σύστημα (*Zmrr*) και δύο που αφορούσαν τύπου I περιοριστικό σύστημα τροποποίησης (R) και αναγνώρισης (S). Το στέλεχος *ΔZmrr* έδειξε αυξημένες αποδόσεις μετασχηματισμού μέσω ηλεκτροδιάτρησης με μεθυλιωμένο DNA και το *ΔS* με μη μεθυλιωμένο DNA αντίστοιχα. Αντιθέτως, το *ΔR* δεν παρουσίασε καθόλου αυξημένες αποδόσεις μετασχηματισμού. Στέλεχος που παράγει αυξημένη λεβάνη έχει κατασκευαστεί με την απενεργοποίηση του γονιδίου εξωκυτταρικής σουκράσης (*sacC*, Senthilkumar *et al.* 2003). Απενεργοποίηση του γονιδίου της οξειδοαναγωγιάσης γλυκόζης-φρουκτόζης (*gfo*) που προαναφέρθηκε, οδήγησε στην δημιουργία στελεχών που παράγει περισσότερη αιθανόλη έχοντας τη σουκρόζη σαν πηγή άνθρακα (Wang *et al.* 2013). Όσον αφορά το τελευταίο στέλεχος, πρέπει να σημειωθεί ότι η εναλλακτική μέθοδος απενεργοποίησης γονιδίων που χρησιμοποιήθηκε ήταν μέσω του Flp-FRT συστήματος ανασυνδυασμού ειδικής θέσης (Flp-FRT site-directed recombination technology). Το σύστημα αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε οργανισμούς όπως το *Z. mobilis*, που εμφανίζει ανθεκτικότητα σε αρκετά αντιβιοτικά και περιορίζει το φάσμα δεικτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη στόχευση γονιδίων μέσω απαλοιφών με γονίδια ανθεκτικότητας, κυρίως όταν έχουν προηγηθεί τέτοιες επεμβάσεις. Το ίδιο σύστημα χρησιμοποιήθηκε και για την κατασκευή στελεχών με απενεργοποιημένο το γονίδιο της D-γαλακτικής αφυδρογονάσης (*ldhA*) (Zou *et al.* 2012).

Πίνακας 1.7. Γονίδια στελεχών του *Z. mobilis* που απενεργοποιήθηκαν για την κατασκευή μεταλλαγμένων στελεχών και ιδιότητες των τελευταίων

Γονίδιο-στόχος	Στέλεχος <i>Z. mobilis</i>	Αποτέλεσμα	Αναφορά
extracellular sucrase (<i>sacC</i>)	ATCC 10988	Αυξημένη παραγωγή λεβάνης, μειωμένη παραγωγή αιθανόλης	<i>Senthilkumar et al. 2003</i>
alcohol dehydrogenase (<i>adh</i>)	ATCC 29191	Λιγότερη συσσώρευση βιομάζας, μικρότερος ρυθμός πρόσληψης γλυκόζης και μικρότερες αποδόσεις παραγωγής αιθανόλης	<i>Kalnenieks et al. 2006</i>
NADH : CoQ oxidoreductase (<i>ndh</i>)	ATCC 29191	Αυξημένη αερόβια αύξηση	<i>Kalnenieks et al. 2008</i>
sodium-proton antiporter (<i>nhaA</i>)	ZM4	Ανάπτυξη παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων NaAc	<i>Yang et al. 2010</i>
RNA chaperone <i>hfq</i>	ZM4	Ευαισθησία σε οξικό, βανιλίνη, φουρφουράλη και	<i>Yang et al. 2010</i>

1. Εισαγωγή

		υδροξυμεθυλφουρφουράλη	
Γονίδια αναγνώρισης και μεθυλοτρανσφεράσης σε περιοριστικό σύστημα, <i>mrr</i>	ZM4	Αυξημένες αποδόσεις μετασχηματισμού με μεθυλιωμένο και αμεθυλιωτο DNA	<i>Kerr et al. 2011</i>
D-lactate dehydrogenase (<i>ldhA</i>)	ZM4	Μειωμένος ρυθμός παραγωγής γαλακτικού	<i>Zou et al. 2012</i>
υπομονάδα b κυτοχρώματος (<i>cytB</i>), υπομονάδα II του κυτοχρώματος bd (<i>cydB</i>), catalase (<i>kat</i>)	ATCC 29191	Δ <i>cytB</i> και Δ <i>cydB</i> : μειωμένη αναπνευστική ικανότητα σε αναερόβια ανάπτυξη <i>Δkat</i> : ευαισθησία στο υπεροξείδιο	<i>Strazdina et al. 2012</i>
glucose-fructose oxidoreductase (<i>gfo</i>)	ZM4	Καμία παραγωγή σορβιτόλης. Βελτιωμένη παραγωγή αιθανόλης με σουκρόζη σαν πηγή άνθρακα. Μειωμένη παραγωγή αιθανόλης σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.	<i>Wang et al. 2013</i>
glucose-fructose oxidoreductase (<i>gfo</i>)	TISTR548	Μειωμένη ανάπτυξη των κυττάρων, μειωμένη παραγωγή αιθανόλης και πρωτεϊνοσύνθεσης υπό οσμωτικό στρες, heat stress και στρες αιθανόλης	<i>Sootsuwan et al. 2013</i>

1.3.5. Μελέτη της επιδιόρθωσης στο *Z. mobilis* και προκαταρκτικά αποτελέσματα παρούσας εργασίας

1.3.5.1 Μελέτη της μεταλλαξογένεσης και επιδιόρθωσης στο *Z. mobilis*

Πρωταρχική μελέτη της απόκρισης του *Z. mobilis* στο μεταλλαξογόνο στρες έγινε δια μέσου μελέτης της μεταλλαξογένεσης στα φυσικά στελέχη CP4, NCIMB 11163 και ATCC 10988, υπό επίδραση των αλκυλιωτικών παραγόντων MNNG και EMS, και υπερϊώδους ακτινοβολίας (Tyras & Galani 1992). Φάνηκε ότι το MNNG είναι πιο αποτελεσματικό από τους άλλους δύο παράγοντες, αναδεικνύοντας ταυτοχρόνως την ύπαρξη ισχυρών επιδιορθωτικών μηχανισμών που αποκαθιστούν βλάβες συναρτήσει της φύσης του παράγοντα.

Στη συνέχεια απομονώθηκαν μεταλλαγμένα στελέχη (*invs*) που ήταν ευαίσθητα στην υπεριώδη (UV) ακτινοβολία (Tyras & Galani 1992, Vartholomatos *et al.* 1993, Μπελετσιώτης 2003). Βρέθηκε ότι 2 από αυτά τα στελέχη ήταν μεταλλαγμένα στα γονίδια *invrA* και *invrB* αντίστοιχα (Μπελετσιώτης 2003). Απομόνωση και αλληλούχηση των *invrA* και *invrB* γονιδίων έδειξαν ότι έχουν ομολογία με αντίστοιχα γονίδια άλλων α-πρωτεοβακτηρίων αλλά και με του *E. coli*, και ότι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν φέρουν τις απαραίτητες δομικές επικράτειες για την επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, απομονώθηκε και αλληλουχήθηκε το *invrD* γονίδιο το οποίο, παρόλο που δεν είχε ομολογία με το ομόλογο του *E. coli*, έδειχνε αναπλήρωση της ευαισθησίας *invrD* στελέχους του *E. coli* παρουσία UV ακτινοβολίας ή MMS (Μπελετσιώτης 2003).

1. Εισαγωγή

Ένα ακόμη επιδιορθωτικό γονίδιο που απομονώθηκε και μελετήθηκε ήταν το *recA* (Μπελετσιώτης 2003). Στοιχίσεις της αλληλουχίας της κωδικής περιοχής του γονιδίου ανέδειξαν την ομολογία του με ορθόλογα άλλων πρωτεοβακτηρίων, άρα και την πιθανή λειτουργικότητά του. Μελέτη της έκφρασής του σε αναλύσεις κατά Northern έδειξε ότι αυτή επάγεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του MMS. Τέλος, κλωνοποίησή του στο *recA* στέλεχος του *E. coli* DH5α έδειξε την μερική ανόρθωση της ευαισθησίας του DH5α σε UV ακτινοβολία και MMS, δύο μεταλλαξογόνους παράγοντες που επάγουν την SOS απόκριση.

1.3.5.2 Προκαταρκτικά αποτελέσματα μελέτης του *recA* του *Z. mobilis* και ενδείξεις για το SOS σύστημα

Στα πλαίσια της πτυχιακής διπλωματικής εργασίας του συγγραφέα μελετήθηκε κλώνος του εργαστηρίου που έφερε μέσω *in vitro* μετάθεσης εισδοχή γονιδίου ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη (*catE*) εντός κλωνοποιημένου τμήματος του γονιδίου *recA* του στελέχους CP4. Η εισδοχή του *catE* αποδείχτηκε ότι ήταν στη βάση 157 του πλαισίου ανάγνωσης του *recA* (βλ. και Αποτελέσματα 3.1). Η ευρύτερη περιοχή της *recA::catE* κατασκευής υποκλωνοποιήθηκε και εισήχθη σε κύτταρα CP4. Προέκυψαν 23 μετασηματισμένες αποικίες, ανθεκτικές στη χλωραμφαινικόλη (Cm^R), που σε περαιτέρω ανακαλλιέργειες αποδείχθηκαν ευαίσθητες στην UV (Σαββάκης 2009, εργασία BSc). Τρεις από αυτές επέδειξαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία και ως στελέχη μελετώνται περαιτέρω στην παρούσα εργασία. Αυτό με τον πιο επαναλαμβανόμενο φαινότυπο ευαισθησίας ονομάστηκε UA1.

Η ευρύτερη περιοχή του *recA* γονιδίου του CP4 είχε αλληλουχηθεί στο εργαστήριο και κατατεθεί στη GenBank (Κ. Παππά 2004, κωδικός AY101392 – αδημοσίευτα αποτελέσματα). Φάνηκε ότι περιέχει 2 συντηγμένους SOS χειριστές α-πρωτεοβακτηρίων 103 βάσεις ανοδικά της μεταφραστικής έναρξης: έναν τέλεια συντηρημένο χειριστή που μοιράζεται το δεύτερο GTTC του με έναν χειριστή που έχει 8 αντί για 7 μη συντηρημένα νουκλεοτιδία ($GTTCN_7GTTCN_8GTTC$). Επιπλέον, σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα *recA* και *lexA* του ZM4 με τα ομόλογα του *E. coli* κατέδειξε την ύπαρξη συντηρημένων περιοχών που είναι απαραίτητες για την πρόσδεση του DNA, τον ανασυνδυασμό και την αλληλεπίδραση με τη LexA, όσον αφορά την RecA, και τον διμερισμό και την αυτοπρωτεόλυση, όσον αφορά τη LexA (Σαββάκης 2011, εργασία MSc).

Υστερα από τον εντοπισμό SOS χειριστών α-πρωτεοβακτηρίων ανοδικά των *recA* και *lexA*, έγινε αναζήτηση πιθανών SOS χειριστών στα έως τότε αλληλουχημένα χρωμοσώματα των στελεχών ZM4 και NCIMB 11163 (Σαββάκης 2011, εργασία MSc). Εντοπίστηκαν τέλεια συντηρημένοι SOS χειριστές ανοδικά 11 γονιδίων στο ZM4 και 10 γονιδίων στο NCIMB 11163, συμπεριλαμβανομένων των *recA* και *lexA*, καθώς και χειριστές με μία νουκλεοτιδική αλλαγή ανοδικά 82 γονιδίων στο ZM4 και 85 στο NCIMB 11163. Ανάμεσα στα γονίδια με χειριστές με μία αλλαγή εντοπίστηκαν τρία επιδιορθωτικά γονίδια, τα *uvrA*, *uvrC* και *recJ*, ενώ τα υπόλοιπα συμμετείχαν σε διεργασίες όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, η βιοσύνθεση λιπιδίων, η ανθεκτικότητα σε οργανικούς παράγοντες κ.ά. Ακόμη, 29 προβλεπόμενα συνεργιώματα στο ZM4 και 32 στο NCIMB 11163 πιθανόν να επιδέχονται SOS ρύθμισης λόγω της ύπαρξης πιθανού SOS χειριστή ανοδικά του πρώτου γονιδίου του κάθε πιθανού συνεργιώματος (Savvakis & Pappas 2011).

1. Εισαγωγή

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός SOS συστήματος στο *Z. mobilis* με τις ομόλογες RecA και LexA να φέρουν τα απαραίτητα στοιχεία για τη ρύθμιση του συστήματος. Επιπλέον, μέσα από την ύπαρξη συντηρημένων SOS χειριστών σκιαγραφούνται τα μέλη του συστήματος με πρώτα από όλα και κύρια τα ίδια τα *recA* και *lexA*. Εκτός, όμως, των δύο ρυθμιστικών γονιδίων, φαίνεται ότι δύναται ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων να ρυθμίζεται από τις RecA/LexA, γονίδια επιδιορθωτικά καθώς και γονίδια που καλύπτουν και άλλες λειτουργίες του κυττάρου πέραν της επιδιορθωσης.

1.4 Στόχοι της διδακτορικής διατριβής

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη του SOS συστήματος στο *Zyotomonas mobilis* Λεπτομερέστερα:

α) Ενδιέφερε να μελετηθεί διεξοδικά το CP4 *recA*⁻ στέλεχος UA1 σε μοριακό και φαινοτυπικό επίπεδο. Ήταν απαραίτητο να επιβεβαιωθεί η διακοπή του *recA* γονιδίου από το *catE* αλλά και το μονοσήμαντο αυτής της εισδοχής. Ενδιέφεραν επίσης η εξακρίβωση της σταθερότητας του στελέχους καθώς και τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξής του συγκριτικά με το πατρικό στέλεχος CP4. Λόγω του ότι απενεργοποιήθηκε το *recA* γονίδιο, διερευνήθηκε ο βαθμός ευαισθησίας του στελέχους στους μεταλλαξογόνους και SOS-επαγωγικούς παράγοντες UV και MMS αλλά και αυτή καθ' αυτή η αδυναμία του ως προς τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Εφόσον τα *recA*⁻ στελέχη των μικροοργανισμών είναι χρήσιμα για σκοπούς γενετικής μηχανικής καθώς δεν ανακατατάσσουν ξένα τμήματα DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, ελέγχθηκε η δεκτικότητα του UA1 ως προς την εισαγωγή ξένων πλασμιδίων μέσω σύζευξης και μετασχηματισμού. Τέλος, λόγω των αιθανολοπαραγωγικών ικανοτήτων του *Z. mobilis*, ελέγχθηκε αν έχει επηρεαστεί η ικανότητα του UA1 για παραγωγή αιθανόλης συγκριτικά με το CP4.

β) Ενδιέφερε να προβλεφθούν τα μέλη του SOS συστήματος στο *Z. mobilis*. Έγινε προσπάθεια εντοπισμού των πιθανών SOS γονιδίων σε αλληλουχημένα χρωμοσώματα και πλασμίδια μέσω της αξιοποίησης βιοπληροφορικών εργαλείων αναζήτησης αλληλουχιών χειριστή. Ο εντοπισμός αυτών των γονιδίων θα βοηθούσε στην εύρεση των κυτταρικών διεργασιών που συντονίζονται από τις RecA/LexA για την επιβίωση του οργανισμού όταν βρεθεί σε SOS-επαγωγικές συνθήκες, αλλά και στη συγκριτική μελέτη του συστήματος ανάμεσα στα στελέχη. Εκτενέστερες προβλέψεις έγιναν στο CP4 εφόσον ήταν το κατεξοχήν μελετούμενο στέλεχος της παρούσας εργασίας, στο οποίο ακολούθησε και μεταγραφωματική ανάλυση (βλ. επόμενο).

γ) Στοχεύτηκε να εντοπιστεί το σύνολο των γονιδίων που επάγονται κατά την SOS απόκριση (SOS stimulon) και των γονιδίων που φέρουν SOS χειριστή και ρυθμίζονται από τις RecA/LexA (SOS regulon) στο *Z. mobilis*. Ο στόχος αυτός επιδιώχθηκε μέσω μεταγραφωματικής ανάλυσης των στελεχών CP4 και UA1 σε SOS-επαγωγικές συνθήκες. Άξιζε επίσης να φανεί το εύρος της SOS απόκρισης: ποιες κυτταρικές λειτουργίες αλλάζουν και πώς κατά την διάρκεια της απόκρισης. Με κατάλληλη γονιδιωματική ανάλυση, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του μεταγραφικού προφίλ και με τις *in silico* προβλέψεις, αναζητήθηκαν τα SOS γονίδια. Τα αποτελέσματα αυτής της αναζήτησης όχι μόνο θα καταδείκνυαν την ταυτότητα των γονιδίων, το μέγεθος του SOS συστήματος και τις διεργασίες που ρυθμίζει στον οργανισμό, αλλά θα βοηθούσαν και στην επιβεβαίωση ή/και διόρθωση των

1. Εισαγωγή

βιοπληροφορικών προβλέψεων, μέσα από την ανακάλυψη και άλλων μη προβλεπόμενων SOS γονιδίων.

δ) Άμεση συνέπεια των παραπάνω ήταν να εντοπιστεί η ακριβής αλληλουχία του SOS μοτίβου για το *Z. mobilis*. Η εύρεση του μοτίβου θα βοηθούσε στο να φανεί οποιαδήποτε προτίμηση βάσεων στην αλληλουχία του SOS χειριστή στον οργανισμό. Η πληροφορία αυτή, εξαγόμενη από τις *in silico* αναλύσεις και από προγράμματα στοιχίσεων αλληλουχιών χειριστών, θα εμπλούτιζε την υπάρχουσα γνώση όχι μόνο για το *Z. mobilis*, αλλά και για τα α-πρωτεοβακτήρια εν γένει. Και, τέλος,

ε) Επιδιώχτηκε πρωταρχική μοριακή ανάλυση της δομής ενδεδειγμένων περιοχών υποκινητή που φέρουν τέλεια συντηρημένους SOS χειριστές των α-πρωτεοβακτηρίων. Ως προς αυτό, δημιουργήθηκαν *in vivo* συστήματα ελέγχου μεταγραφικής ενεργότητας, τα οποία θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν τόσο για τη μελέτη της καταστολής των περιοχών υποκινητή από την LexA, όσο και για τη μελέτη της αποκαταστολής σε επαγωγικές συνθήκες. Για τα πειράματα αυτά, κλωνοποιήθηκε και υπερεκφράστηκε η LexA. Εκ παραλλήλου, έγινε προσπάθεια για την κατασκευή ενός *lexA'* στελέχους, η οποία ωστόσο δεν ευόδωσε.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Τα βακτηριακά στελέχη και τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στους Πίνακες 2.1 και 2.2 αντίστοιχα.

Πίνακας 2.1. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Βακτηριακά στελέχη	Γονότυπος	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>Zymomonas mobilis</i>		
CP4	Wild Type	Yablonski <i>et al.</i> 1988
UA1	CP4 <i>recA::catE</i>	Σαββάκης 2009
<i>Escherichia coli</i>		
DH5a	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169(φ80lacZΔM15)</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan 1985
RW96	<i>recA718</i> , <i>sulA211</i> , <i>thr1</i> , <i>leuB6</i> , <i>Δ(gpt-proA)62</i> , <i>hisG4</i> , <i>argE3</i> , <i>thi1</i> , <i>galK2</i> , <i>ara14</i> , <i>xyl5</i> , <i>mtl1</i> , <i>tsx33</i> , <i>rpsL31</i> , <i>supE44</i> , <i>Δ(umuDC)595::cat</i>	Ho <i>et al.</i> 1993
S17.1	<i>E. coli</i> 294, <i>pro</i> , <i>res</i> , <i>mod</i> ⁺ , <i>RP4</i> 2- <i>Tc::Mu-Km::Tn7</i>	Simon <i>et al.</i> 1983
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
KYC55	R10, octopine-type, Ti ⁻ , Km ^r	Cho <i>et al.</i> 1997

Πίνακας 2.2. Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Πλασμίδια	Περιγραφή	Αναφορά
pBluescript II KS	Ap ^r , ColE1 replicon	Stratagene
pRK2013	Km ^r , TraP, ColE1 replicon	Figurski & Helinski 1979
pSUP203	Ap ^r , Cm ^r , Tc ^r , ColE1 replicon, <i>oriT</i> (RP4)	Simon <i>et al.</i> 1983
pUA8	Ap ^r , Cm ^r , παράγωγο του pSUP203 με κλωνοποιημένο τμήμα 8 kb του 32.6-kb πλασμιδίου του CP4, pZMO6, στην <i>Bam</i> HI θέση του γονιδίου <i>tetA</i> (Tc ^r)	Παππά 1997
pUC4K	Ap ^r , Km ^r gene cartridge, ColE1 replicon	Pharmacia Biotech
pUC4-C	Ap ^r , Cm ^r , παράγωγο του pUC4K με αντικατάσταση του γονιδίου <i>aphA1</i>	Παππά Ε. (αδημοσίευτα)

2. Υλικά και Μέθοδοι

	με το <i>catE</i> , το οποίο πάρθηκε σαν PCR-προϊόν 850 bp από το pBR325	αποτελέσματα) – παρούσα εργασία
pUC4-T	Ap ^r , Tc ^r , παράγωγο του pUC4K με αντικατάσταση του γονιδίου <i>aphA1</i> με το <i>tetA</i> , το οποίο πάρθηκε σαν PCR-προϊόν 1365 bp από το pBR325	Παππά Ε. (αδημοσίευτα αποτελέσματα) – παρούσα εργασία
pSUP203-K	Ap ^r , Cm ^r , Km ^r , παράγωγο του pSUP203 με προσθήκη του <i>aphA1</i> (Km ^r) στη <i>SalI</i> θέση του γονιδίου <i>tetA</i> (απενεργοποίηση Tc ^r)	Παρούσα εργασία
pUA8-K	Ap ^r , Cm ^r , Km ^r , όπως pUA8 με προσθήκη του <i>aphA1</i> (Km ^r) στη <i>SalI</i> θέση του γονιδίου <i>tetA</i>	Παρούσα εργασία
pBBR1MCS	Cm ^r , pBBR1 replicon	Kovach <i>et al.</i> 1994
pBBR1MCS-K	Cm ^r , Km ^r , όπως pBBR1MCS με προσθήκη του <i>aphA1</i> (Km ^r) στη <i>SalI</i> θέση του MCS	Παρούσα εργασία
pSUP104	Tc ^r , Cm ^r , RSF10101 replicon	Priefer <i>et al.</i> 1985
pVK1	Ap ^r , παράγωγο του pBluescript με κλωνοποιημένο το <i>oriT</i> (RP4), ως 348-bp προϊόν ενίσχυσης, εντός των θέσεων <i>HindIII-EcoRI</i> του MCS	Κουμπενά 2010
pGS3, pGS7	Ap ^r , Cm ^r , παράγωγα του pVK1 με κλωνοποίηση <i>EcoRV</i> τμήματος, που περικλείει <i>recA::catE</i> ένθεση, στην <i>SmaI</i> περιοριστική θέση	Παρούσα εργασία

Συντομογραφίες αντιβιοτικών:

Ap: Αμπικιλίνη, Km: Καναμυκίνη, Cm: Χλωραμφαινικόλη, Tc: Τετρακυκλίνη

2.2 Θρεπτικά υλικά

Για το *Z. mobilis* χρησιμοποιούνταν πλήρες (CM) και ελάχιστο θρεπτικό υλικό (MM) (Galani *et al.* 1985, Pappas 2011). Για 1 l CM χρειάζονταν 20 gr γλυκόζης, 1 gr (NH₄)₂SO₄, 1 gr KH₂PO₄, 0.5 gr MgSO₄(7H₂O) και 5 gr yeast extract (Oxoid). Για 1 l MM χρειάζονταν 20 gr γλυκόζης, 1 gr (NH₄)₂SO₄, 1 gr KH₂PO₄, 1 gr K₂HPO₄(3H₂O), 0.5 gr MgSO₄(7H₂O), 10 gr NaCl και 0.5*10⁻³ gr παντοθενικό οξύ.

Τα στελέχη του *E. coli* αναπτύσσονταν σε θρεπτικό Luria-Bertani (LB) (Sambrook & Russell 2001). Για 1 l LB χρειάζονταν 10 gr τρυπτόνης, 5 gr NaCl και 5 gr yeast extract.

Για το *A. tumefaciens* χρησιμοποιούνταν τα θρεπτικά υλικά LB και AT. 1 l από AT φτιαχόταν με ανάμειξη 50 ml AT Buffer 20x, 50 ml AT Salts 20x και 12.5 ml 40% (w/v) γλυκόζη σε dH₂O. Για 1 l AT buffer 20x χρειάζονταν 214 gr KH₂PO₄ και ρύθμιση του pH στο 7.3 με στερεό KOH. Για 1 l AT salts 20x χρειάζονταν 214 gr KH₂PO₄, 1.56 gr MgSO₄(7H₂O), 0.152 gr CaCl₂, 0.1 gr FeSO₄(7H₂O), 0.044 gr MnSO₄(H₂O) και 0.04 gr (NH₄)₂SO₄.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Για στερεά θρεπτικά υλικά, προστίθεντο 1.5% (w/v) άγαρ στα αντίστοιχα υγρά θρεπτικά υλικά πριν την αποστείρωσή τους.

Για κατασκευή στερεών θρεπτικών με X-Gal, 4 ml από διάλυμα 2% (w/v) X-Gal προστίθεντο σε 1 l θρεπτικού υλικού, που προοριζόταν για την κατασκευή στερεών θρεπτικών υλικών. Η προσθήκη γινόταν μετά την αποστείρωση του θρεπτικού υλικού και εφόσον είχε κρυώσει, πριν την εξάπλωσή του σε τρυβλία Petri.

Ως επί το πλείστον, τα στερεά χημικά που χρησιμοποιούνταν ήταν των εταιρειών Sigma, Serva, Merck, Fluka, Applichem, BDH και Scharlau, εκτός του yeast extract των πειραμάτων φυσιολογίας και δειγματοληψιών μεταγραφωματικής ανάλυσης, που ήταν της Oxoid.

2.3 Αντιβιοτικά

Η χρήση των αντιβιοτικών προϋπέθετε τη δημιουργία ενός αρχικού stock διαλύματος αντιβιοτικού σύμφωνα με ενδεδειγμένα εργαστηριακά πρωτόκολλα (Sambrook and Russell 2001). Τα stock διαλύματα αποθηκεύονταν στους 4°C για φύλαξη μικρής διάρκειας, εκτός των χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη που αποθηκεύονταν στους -20°C. Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών στα εκάστοτε στερεά και υγρά θρεπτικά υλικά, ανάλογα με το είδος του βακτηρίου, δίνονται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3. Διαλύτης, θερμοκρασία αποθήκευσης και συγκεντρώσεις των χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών ανά οργανισμό.

Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση stock (mg/ml)	Διαλύτης	Φύλαξη (°C)	Επιλογή σε <i>E.coli</i> (µg/ml)	Επιλογή σε <i>Z. mobilis</i> (µg/ml)	Επιλογή σε <i>A. tumefaciens</i> (µg/ml)
Αμπικιλίνη	100	dH ₂ O	4°C	100	-	-
Καναμυκίνη	100	dH ₂ O	4°C	50	175	50
Στρεπτομυκίνη	100	dH ₂ O	4°C	50	-	-
Τετρακυκλίνη	10	EtOH/H ₂ O (1:1)	-20°C	12,5	25	-
Χλωραμφαινικόλη	30	100% EtOH	-20°C	30	120	-
Ναλιδιξικό οξύ	10	dH ₂ O (+1-2 στ. NaOH 1N)	4°C	-	5	-
Σπεκτινομυκίνη	100	dH ₂ O	4°C	-	200	200

2.4 Συνθήκες ανάπτυξης και αποθήκευσης στελεχών

Zymomonas mobilis

Στελέχη του *Z. mobilis* αναπτύσσονταν στους 30°C. Για μικροαερόφιλη ανάπτυξη, χρησιμοποιούνταν universal δοχεία σε 90% – 95% πληρότητα και μπουκάλια τύπου Schott με βιδωτό πώμα, με υγρό θρεπτικό όγκου ίσου με τον όγκο του μπουκαλιού και κλεισμένα με το πώμα σε μισή στροφή πριν τη σφράγιση του. Για αερόβιες συνθήκες, χρησιμοποιούνταν κωνικές φιάλες με υγρό θρεπτικό στο 1/5 του όγκου τους και υπό ανάδευση στις 150 rpm. Σε πειραματική διάταξη που είχε σκοπό την μελέτη της αιθανολοπαραγωγικότητας 5 στελεχών του *Z. mobilis* (βλ. Αποτελέσματα Παράγραφος 3.1.9), φιαλίδια με βιδωτό πώμα χωρητικότητας 100 ml

2. Υλικά και Μέθοδοι

συμπληρώθηκαν στο ~95% της χωρητικότητάς τους με CM που περιείχε 4% αντί για 2% (w/v) γλυκόζη, εμβολιάστηκαν, σφραγίστηκαν και επώαστηκαν σε αναδευόμενο κλίβανο στους 30°C και στις 150 rpm. Με ένεση συλλεγόταν δείγμα από την κάθε καλλιέργεια στις 0, 10 και 16 ώρες επώασης.

Μονή αποικία χρησιμοποιούνταν για εμβολιασμό προκαλλιέργειας, που περιείχε 3 ml CM θρεπτικού σε δοκιμαστικό σωλήνα. Η προκαλλιέργεια, στο τέλος της εκθετικής της φάσης, χρησιμοποιούνταν για εμβολιασμό νέας καλλιέργειας με εμβόλιο 0.1% (v/v) για CM ή 1% (v/v) για MM.

Τρυβλία πετρί με στερεό CM θρεπτικό επωάζονταν 3 με 4 μέρες ώστε να αναπτυχθούν εμφανείς αποικίες (~1-1.5 mm) του στελέχους CP4 και 5 με 6 μέρες για το UA1.

Escherichia coli

Τα στελέχη του *E. coli* αναπτύσσονταν στους 37°C. Υγρές καλλιέργειες επωάζονταν σε κωνικές φιάλες με υγρό θρεπτικό στο 1/5 του όγκου τους και υπό ανάδευση στις 80 rpm, για ολονύκτια ανάπτυξη, ή στις 180 rpm, για ανάπτυξη εντός της ημέρας (για δειγματοληψίες τέλους εκθετικής με αρχή στασιμότητας). Το εμβόλιο προερχόταν από μονή αποικία ή ήταν 0.1% (v/v) από φρέσκια προκαλλιέργεια.

Εμφανείς αποικίες σε στερεά θρεπτικά υλικά λαμβάνονταν μετά από ολονύχτια επώαση.

Agrobacterium tumefaciens

Υγρές καλλιέργειες *A. tumefaciens* αναπτυσσόταν στους 28°C. Επωάζονταν σε κωνικές φιάλες με υγρό θρεπτικό στο 1/5 του όγκο τους και υπό ανάδευση στις 100 rpm, για ολονύκτια ανάπτυξη, ή στις 180 rpm, για ανάπτυξη μες στην ημέρα.

Για προκαλλιέργεια, 10 ml υγρή καλλιέργειας εμβολιαζόταν με μονή αποικία και επωαζόταν για 24 ώρες. Η προκαλλιέργεια χρησιμοποιούνταν για εμβολιασμό υγρής καλλιέργειας. Με 4% (v/v) εμβόλιο, η υγρή καλλιέργεια έφτανε στο τέλος της εκθετικής φάσης μετά από περίπου 16 ώρες επώασης υπό ανάδευση.

Εμφανείς αποικίες σε στερεά θρεπτικά υλικά λαμβάνονταν μετά από 3 με 4 μέρες ανάπτυξης στους 30°C.

Αποθήκευση στελεχών

Στερεά θρεπτικά υλικά, μετά την ανάπτυξη αποικιών σε αυτά, φυλάσσονταν στους 4°C για περίπου 4 βδομάδες. Για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, τα στελέχη φυλάσσονταν από υγρή καλλιέργεια στο τέλος της εκθετικής φάσης με αρχή στασιμότητας σε ειδικά πλαστικά φιαλίδια με βιδωτό πώμα (cryovials) όγκου 1,8 ml προσθέτοντας γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 25% (v/v). Τα φιαλίδια αυτά φυλάσσονταν βραχυπρόθεσμα στους -20°C (για στελέχη *E. coli* και *Z. mobilis*) ή μακροπρόθεσμα στους -80°C (για στελέχη *E. coli*, *Z. mobilis* και *A. tumefaciens*).

2.5 Καμπύλες ανάπτυξης - Μέτρηση βιώσιμων κυττάρων

Για τις καμπύλες ανάπτυξης λαμβάνονταν μετρήσεις οπτικής πυκνότητας ανά τακτά χρονικά διαστήματα από 1 ml καλλιέργειας. Η οπτική πυκνότητα μετριούνταν στα 600 nm (O.D.₆₀₀) στο φωτόμετρο Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech).

Μέτρηση βιώσιμων κυττάρων πραγματοποιούνταν με την μέθοδο των δεκαδικών αραιώσεων σε πλάκες μικροτιτλοδότησης αποστειρωμένες σε UV (παραμονή 10 min υπό τη λάμπα του laminaar flow του εργαστηρίου). 20 μl από υγρή καλλιέργεια αναδιλύονταν σε 180 μl φυσικού ορού (0.9% (w/v) NaCl) και επιτελούνταν διαδοχικές αραιώσεις του εναιωρήματος μέχρι την επιθυμητή αραιώση κυττάρων. Για καταμετρήσεις κυττάρων, δείγματα 20 μl από την κάθε αραιώση τοποθετούνταν ως σταγόνα σε στερεό θρεπτικό υλικό και επωάζονταν μέχρις ανάπτυξης των αποικιών.

Για τον έλεγχο της σταθερότητας του στελέχους UA1, πραγματοποιούνταν καλλιέργειες του στελέχους σε 2 δοκιμαστικούς σωλήνες με πλήρες υγρό θρεπτικό υλικό CM, στον έναν παρουσία και στον άλλον απουσία του επιλεκτικού δείκτη (χλωραμφαινικόλη). Μετά από το πέρας 9-10 γενιών, γινόταν ανακαλλιέργεια (0.1 % (v/v) εμβόλιο) από το κάθε σωλήνα σε ίδιο θρεπτικό υλικό με αντίστοιχη επιλογή, καθώς και μέτρηση βιώσιμων κυττάρων σε στερεά υλικά μετά και άνευ επιλογής. Η διαδικασία (ανακαλλιέργειες και μέτρηση βιώσιμων κυττάρων) επαναλαμβάνονταν κάθε 9-10 γενιές.

2.6 Μεταλλαξογένεση στελεχών και καμπύλες βιωσιμότητας

Τα πρωτόκολλα των μεταλλαξογενέσεων βασίστηκαν σε ενδεδειγμένα πρωτόκολλα του εργαστηρίου (Tyraς & Galani 1992, Μπελετσιώτης 2003) και εκτελέστηκαν όπως περιγράφονται στην συνέχεια.

2.6.1 Μεταλλαξογένεση με MMS

Κύτταρα υγρών καλλιεργείων *Z. mobilis* μέσης εκθετικής φάσης (O.D.₆₀₀ 0.8-1.0) συλλέγονταν με φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο Eppendorf 5424 (9000 rpm, 1 λεπτό) για όγκους του 1 ml ή HERMLE Z 206 A (6000 rpm, 8 λεπτά) για όγκους των 10 ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αναδιλύονταν σε ίσο με τον αρχικό όγκο υγρού προθερμασμένου CM, που έφερε την επιθυμητή συγκέντρωση MMS, και επωάζονταν στους 30°C στατικά για 60 λεπτά. Μετά την επώαση, τα κύτταρα συλλέγονταν με φυγοκέντρηση, ξεπλένονταν 2 φορές με φυσικό ορό (0.9% (w/v) NaCl) και αναδιλύονταν σε φυσικό ορό (ίσον όγκο με τον αρχικό). Ακολουθούσε μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Για την κατασκευή καμπύλης βιωσιμότητας, γινόταν εις τριπλούν επανάληψη της διαδικασίας για κάθε συγκέντρωση του MMS.

2.6.2 Ακτινοβόληση στελεχών με υπεριώδη (UV) ακτινοβολία

Από καλλιέργειες στελεχών *Z. mobilis* με O.D.₆₀₀~0.4, λαμβάνονταν 2 ml και αναδιλύονταν σε 18 ml φυσικό ορό (NaCl 0.9%) μέσα σε αποστειρωμένο πλαστικό τρυβλίο. Σε κλωβό UV-ακτινοβόλησης με λάμπα UV General Electric G15TB εκπομπής 254 nm και ενέργειας ιονισμού 12 J/m², εναποθέτονταν το εναιώρημα σε απόσταση 20 cm και ακολουθούσε ακτινοβόληση για τους ενδεδειγμένους χρόνους. Μετά το πέρας της επιθυμητής χρονικής διάρκειας έκθεσης, συλλέγονταν δείγματα 0.5 ml για μετρήσεις βιωσιμότητας (με μάρτυρα, αυτόν της καλλιέργειας πριν την

2. Υλικά και Μέθοδοι

έναρξη της ακτινοβόλησης). Για την κατασκευή καμπυλών βιωσιμότητας, έγιναν εις τριπλούν επαναλήψεις της διαδικασίας για κάθε χρόνο ακτινοβόλησης.

2.7 Συζεύξεις

Οι βακτηριακές συζεύξεις γίνονταν πάνω σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης σύμφωνα με πρωτόκολλο του εργαστηρίου (Pappas *et al.* 1997, Pappas 2011). Όλες οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιούνταν στην φυγόκεντρο Eppendorf centrifuge 5424.

- Συλλέγονταν δείγματα καλλιιεργειών (συνήθως 1 ml) δότη και δέκτη, O.D.₆₀₀ ~0.8 για στελέχη *Z. mobilis* και ~1.2 για στελέχη *E. coli*, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται αναλογία κυττάρων δότη:δέκτη ~1:3 με 1:4.

- Τα δείγματα φυγοκεντρούνταν ήπια (9000 rpm για 30 sec). Απορρίπτονταν το υπερκείμενο, τα κύτταρα ξεπλένονταν με φυσικό ορό NaCl 0.9% (w/v) και επαναλαμβανόταν η φυγοκέντρωση.

- Το κυτταρικά ιζήματα αναδιαλύονταν στην ελάχιστη ποσότητα φυσικού ορού που απέμενε μετά την απόρριψη υπερκειμένου (~50μL). Γινόταν συνένωση ιζημάτων και τοποθέτηση του μίγματος σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (Sartorius) σε στερεό θρεπτικό υλικό κατάλληλο για τον δέκτη.

- Ακολουθούσε επώαση για 3 ώρες στη θερμοκρασία που αναπτύσσεται ο δέκτης.

- Μετά την επώαση, επαναιωρούνταν τα κύτταρα του φίλτρου σε 1 ml φυσικού ορού και γίνονταν μετρήσεις των αριθμών τους σε κατάλληλα στερεά θρεπτικά υλικά (επιλεκτικά για δότη, δέκτη και μετασυζευγμένα). Προς σύγκριση, μετρήσεις αριθμών κυττάρων γίνονταν και σε δείγματα καλλιιεργειών δότη και δέκτη πριν την σύζευξη.

2.8 Μετασηματισμοί

2.8.1 Μέθοδος θερμικής δοκιμασίας (μέθοδος CaCl₂)

Οι μετασηματισμοί με την μέθοδο της θερμικής δοκιμασίας έγιναν βάσει του ενδεδειγμένου πρωτοκόλλου των Sambrook & Russell 2001, περιλαμβάνοντας τροποποιήσεις.

Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων *E. coli*:

Όλες οι φυγοκεντρήσεις γίνονταν με την φυγόκεντρο HERMLE Z 206 A σε ψυχρό θάλαμο και οι χειρισμοί στον πάγο.

- Καλλιέργεια 50 – 100 ml συνήθως και O.D.₆₀₀~0,3 φυγοκεντρούνταν στις 6000 rpm για 8 min.

- Τα κύτταρα αναδιαλύονταν σε διάλυμα CaCl₂ 0.1M όγκου ίσου με το 1/2 της καλλιέργειας.

- Γινόταν επώαση των αναδιαλυμένων κυττάρων στον πάγο για 2 έως 20 ώρες (ολονύκτια επώαση).

- Ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 8 min.

- Τα κύτταρα αναδιαλύονταν σε διάλυμα 0.1M CaCl₂, 20% γλυκερόλης, σε 20X συμπύκνωση, και αποθηκεύονταν σε aliquots των 0.2 ml στους -80°C.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιούνταν η ακόλουθη διαδικασία θερμικής δοκιμασίας:

- Σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* που παρασκευάζονταν ως άνω προστίθετο DNA (συνήθως 100-200 ng). Γινόταν ανάδευση με χτυπήματα στην βάση του σωλήνα erppendorf και επώαση στον πάγο για μισή ώρα.

- Το δείγμα τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 43.5°C για 1 min και μετά στον πάγο για 2 min (θερμική δοκιμασία 4°C - 43.5°C - 4°C).

- Προστίθεντο 1 ml υγρού LB και ακολουθούσε επώαση σε thermoblock στους 37°C για 1 ώρα.

- Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα επιστρώνονταν σε τρυβλία επιλογής.

2.8.2 Μέθοδος ηλεκτροδιάτρησης

Όλες οι φυγοκεντρήσεις γίνονταν με την φυγόκεντρο HERMLE Z 206 A σε ψυχρό θάλαμο και οι χειρισμοί στον πάγο.

Η προετοιμασία των δεκτικών κυττάρων για καλλιέργεια *E. coli* γινόταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας BTX Inc ενώ για καλλιέργεια *Z. mobilis* ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Καλλιέργεια σε O.D.₆₀₀~0.5 φυγοκεντρούνταν στις 6000 rpm για 8 min, και τα κύτταρα αναδιαλύονταν σε παγωμένο απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό όγκου ίσου με τον αρχικό όγκο της καλλιέργειας.

- Τα αναδιαλυμένα κύτταρα φυγοκεντρούνταν στις 6000 rpm για 8 min, και επαναδιαλύονταν σε παγωμένο απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό όγκου ίσου με τον μισό (1/2) όγκο της αρχικής καλλιέργειας.

- Επανάληψη του προηγούμενου σταδίου.

- Φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 8 min και αναδιάλυση κυττάρων σε παγωμένο απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό όγκου ίσου με τον 1/50 όγκο της αρχικής καλλιέργειας.

- Φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 8 min και αναδιάλυση κυττάρων σε παγωμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (v/v) και σε 500X συμπύκνωση. Τα αναδιαλυμένα κύτταρα φυλάσσονταν σε δείγματα (aliquots) των 40 μL στους -80°C.

Ως συσκευή ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιούνταν η BTX Electro Cell Manipulator 600 της εταιρείας BTX Inc με κυβέττες διακένου 1 mm της ίδιας εταιρείας. Για την ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων επιλέγονταν οι εξής ρυθμίσεις: High Voltage (2.5 kV) mode, αντίσταση 129 Ω και τάση 1.4 kV.

DNA προς μετασχηματισμό, αναδιαλυμένο σε απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό όγκου 1 έως 5 μL, προστίθετο στα aliquots των δεκτικών κυττάρων. Η διαδικασία ηλεκτροδιάτρησης στη συνέχεια, τόσο για μετασχηματισμό κυττάρων *Z. mobilis* όσο και *E. coli*, ήταν αυτή που περιγράφεται στο πρωτόκολλο της εταιρείας για μετασχηματισμό *E. coli*, με τη διαφορά ότι η ανάνηψη κυττάρων *Z. mobilis* μετά την ηλεκτροδιάτρηση γινόταν σε υγρό θρεπτικό CM προθερμασμένο στους 30°C και με παραμονή των κυττάρων 3 ώρες στους 30°C (thermoblock ή κλίβανο). Μετά την ανάνηψη, τα κύτταρα επιστρώνονταν σε επιλεκτικά στερεά θρεπτικά υλικά.

2.9 Απομονώσεις DNA

2.9.1 Πλασμιδιακές απομονώσεις

Πλασμιδιακές απομονώσεις από καλλιέργειες *E. coli*, τόσο μικρής όσο και μεσαίας κλίμακας, γίνονταν βάσει καθιερωμένων πρωτοκόλλων (Sambrook & Russell 2001) και πρωτοκόλλων της εταιρείας Macherey-Nagel, με χρήση των οικείων kits (NucleoSpin Plasmid και NucleoSpin Xtra Midi). Απομονώσεις από *Z. mobilis* γίνονταν βάσει προηγούμενων αναφορών (Pappas 2011) και πρωτοκόλλων του εργαστηρίου.

Οι φυγοκεντρήσεις στις μικρής κλίμακας πλασμιδιακές απομονώσεις γίνονταν σε μικροφυγόκεντρο Eppendorf 5424, και στις αντίστοιχες μεσαίας κλίμακας στην ψυχόμενη υπερφυγόκεντρο RC5C της Sorvall Instruments της εταιρείας DuPont, χρησιμοποιώντας την κεφαλή SS34.

2.9.1.1 Πλασμιδιακή απομόνωση μικρής κλίμακας

- Καλλιέργεια όγκου συνήθως 2 ml για στελέχη *E. coli* ή 6 ml για στελέχη *Z. mobilis* φυγοκεντρώνταν (12000 rpm, 1 min) και απομακρυνόταν το υπερκείμενο.
- Το ίζημα αναδιαλύονταν σε 100 μ L GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris·Cl pH 8.0 25 mM) με ήπιο πιπετάρισμα.
- Προσθέτονταν 200 μ L από το διάλυμα SolIII (0.2 N NaOH, 1% SDS – αν επρόκειτο για λύση κυττάρων *Z. mobilis*, τότε το SolIII είχε ως διαλύτη TE₅₀ αντί νερού). Γίνονταν 3-4 αναστροφές του σωλήνα eppendorf και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου ελάχιστη ως 1-1.5 min (αναλόγως της διαύγασης του λύματος).
- Προσθήκη 200 μ L από το SolIII (60 ml από 5 M potassium acetate, 11.5 ml από glacial acetic acid, 2.5 ml από H₂O). Γίνονταν 3-4 βίαιες αναστροφές και προαιρετικά επώαση στον πάγο για 2 με 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 12000 rpm και διατήρηση υπερκειμένου.
- Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου (διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογίες 25:24:1). Ανάμιξη με vortex μέχρι ομογενοποίησης (5-10 sec). Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000 rpm. Διατήρηση της υδατικής φάσης και επανάληψη των οργανικών εκχυλίσεων μέχρις εξαλείψεως της μεσόφασης (οι επόμενες φυγοκεντρήσεις ήταν 5-λεπτες).
- Προσθήκη στην υδατική φάση ίσου όγκου διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), καλή ανάμιξη των φάσεων με 5-6 αναστροφές και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 12000 rpm. Διατήρηση της υδατικής φάσης.
- Καταβύθιση του DNA με προσθήκη 0.8 ή 2.5 όγκων ισοπροπανόλης ή αιθανόλης, αντίστοιχα. Ήπια ανάδευση με 3-4 αναστροφές και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 12000 rpm.
- Απόρριψη υπερκειμένου, ξέπλυμα ιζήματος με 70% αιθανόλη (~0.5 ml) και απόρριψη ξεπλύματος.
- Στέγνωμα του ιζήματος στον αέρα ή σε thermoblock (65°C) και αναδιάλυση σε 10-20 μ L TE₁₀ (ή TE₅₀ για απομονώσεις DNA από *Z. mobilis* που δεν προορίζονταν για ενζυμικές κατεργασίες), και προσθήκη διαλύματος RNάσης σε τελική συγκέντρωση 20 μ g/ml ή 50 μ g/ml για απομόνωση από *E. coli* ή *Z. mobilis*, αντίστοιχα.

2. Υλικά και Μέθοδοι

- Επώαση στους 65°C για 20 λεπτά προς απενεργοποίηση νουκλεασών, με 2-3 σύντομες αναδεύσεις στο ενδιάμεσο.

2.9.1.2 Πλασμιδιακή απομόνωση μεσαίας κλίμακας (100 ml καλλιέργειας)

- Καλλιέργεια 100 ml φυγοκεντρίοταν στις 7000 rpm για 7 λεπτά.
- Αναδιάλυση του ιζήματος με 2 ml διαλύματος GET (συστάσεις διαλυμάτων ως άνω, **2.9.1.1**).
- Προσθήκη 4 ml διαλύματος SolIII, ήπια ανάμειξη με 3-4 αναστροφές και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να διαυγάσει το λύμα (από ελάχιστα έως 5-10 λεπτά).
- Προσθήκη 4 ml παγωμένου SolIII, ανάμειξη με 3-4 απότομες αναστροφές και επώαση στον πάγο για 15 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C.
- Φιλτράρισμα υπερκειμένου με 3 φύλλα γάζας σε νέο σωλήνα Sorvall.
- Καταβύθιση του DNA με προσθήκη 0.8 όγκων ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C.
- Ξέπλυμα του ιζήματος με 70% αιθανόλη (δυναμική φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C για σταθεροποίηση του ιζήματος).
- Στέγνωμα του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου, με αναστροφή των σωλήνων και στύπωμα σε χαρτί, και αναδιάλυση σε 1.4 ml TE₁₀ η TE₅₀ με RNάση, αναλόγως του οργανισμού (βλ. **2.9.1.1**).
- Διαχωρισμός του διαλύματος σε σωλήνες erpendorf (από 700 μL στο καθένα) και οργανικές εκχυλίσσεις (όπως **2.9.1.1**).
- Καταβύθιση του DNA με προσθήκη 0.1 όγκου διαλύματος άλατος (NaCl 5M ή NaAc 3M) και 0.8 όγκων ισοπροπανόλης. Ήπια ανάδευση με 3-4 αναστροφές και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 12000 rpm.
- Αναδιάλυση ιζήματος σε TE₁₀ ή ενίοτε TE₅₀ για *Z. mobilis* (30-50 μL), δυναμική προσθήκη RNάσης, και επώαση στους 65°C για 20 λεπτά (βλ. **2.9.1.1**).

2.9.2 Απομόνωση ολικού DNA από κύτταρα *Z. mobilis*

Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA του *Z. mobilis* γινόταν σύμφωνα με πρωτόκολλο του εργαστηρίου (Pappas *et al.* 1997). Οι φυγοκεντρήσεις γίνονταν στην φυγόκεντρο Eppendorf 5424.

- 1.5 έως 5.0 ml καλλιέργειας μέσης προς τέλους εκθετικής φάσης φυγοκεντρούνταν σε 9.000 rpm για 1 min και απομακρυνόταν το υπερκείμενο.
- Τα κύτταρα αναδιαλύονταν με πιπεταρίσματα σε 200 μL TAE 1X (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA).
- Προσθήκη 400 μL διαλύματος Kado Lysis (Tris·Cl 50 mM, 3% SDS, ρύθμιση του διαλύματος σε pH 12.6). Ανάμειξη με αναστροφές και επώαση για 15 λεπτά στους 65°C.
- Προσθήκη 50 μL από το SolIII (βλ. **2.9.1.1**) και 600 μL διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου (διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής σε αναλογίες 25:24:1). Ανάμειξη με vortex μέχρις ομογενοποίησης του διαλύματος (5-10 sec). Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά και μετά φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στις 12000 rpm. Κρατιόταν το υπερκείμενο. Επαναλαμβάνονταν εκχυλίσσεις με διάλυμα

2. Υλικά και Μέθοδοι

φαινόλης/χλωροφορμίου και φυγοκέντρωση τόσες φορές ώστε να μην υπάρχει μεσόφαση.

- Προσθήκη διπλάσιου όγκου αιθανόλης 100% σε θερμοκρασία δωματίου, αναστροφές και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 12000 rpm. Απομάκρυνση αιθανόλης.

- Ξέπλυμα του DNA με 500 μL αιθανόλης 70%. Απομάκρυνση αιθανόλης. Στέγνωμα και προσθήκη 30-50 μL TE_{10} και RNάσης σε τελική συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Επώαση στους 65°C για 20 λεπτά, με σύντομες αναδεύσεις στο ενδιάμεσο.

2.10 Ηλεκτροφόρηση

Στις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιούνταν πηκτώματα αγαρόζης με συγκέντρωση αγαρόζης 0.8% (w/v) και βρωμιούχου αιθιδίου 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Σαν ρυθμιστικό διάλυμα στις ηλεκτροφορήσεις και στην κατασκευή του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιόταν διάλυμα TAE συμπύκνωσης 1X (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) (Sambrook & Russell 2001).

Οι ηλεκτροφορήσεις DNA γίνονταν σε συσκευή Consort E835 και με εφαρμογή τάσης 2-5 V/cm, για ηλεκτροφόρηση εντός της μέρας, ή 0.5 V/cm, για ολονύκτιες ηλεκτροφορήσεις. Οι ηλεκτροφορήσεις RNA γίνονταν σε συσκευή E-C Apparatus VWR105 σε τάση 10 V/cm με χρήση tank MiniboatTM. Δείκτες μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιούνταν ήταν οι 1 kb ladder (#SM0311) και $\lambda/\text{HindIII}$ (#SM0101) της εταιρείας Fermentas. Η αποτύπωση του πηκτώματος γινόταν σε συσκευή καταγραφής και φωτογράφησης UVP White/UV Transilluminator.

2.11 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα

Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιούνταν ήταν από τις εταιρείες New England Biolabs, Fermentas, Takara και Boehringer Mannheim. Οι περιοριστικές αντιδράσεις γίνονταν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των αντίστοιχων εταιρειών χρησιμοποιώντας 2-3 μονάδες ενζυμικής ενεργότητας (units) ανά μg DNA και όγκο αντίδρασης 20 με 50 μL , κατά περίπτωση, και τους ενδεδειγμένους χρόνους και θερμοκρασίες.

Περιοριστικοί και πλασμιδιακοί χάρτες που απεικονίζονται στην παρούσα εργασία γίνονταν με χρήση του προγράμματος γραφικών Savvy 0.1 (<https://www.bioinformatics.org/savvy/>).

2.12 Απομόνωση και καθαρισμός ζώνης

Για απομόνωση ζωνών που είχαν προέλθει μετά από πέψεις μορίων DNA, χρησιμοποιείτο το kit Nucleospin Extract II με το αντίστοιχο πρωτόκολλο της εταιρείας Macherey-Nagel. Οι ζώνες λαμβάνονταν συχνά μετά από ολονύκτια ηλεκτροφόρηση για καλύτερο διαχωρισμό.

2.13 Αντίδραση φωσφατάσης - λιγάσης

Για αποφωσφορυλιώσεις άκρων γραμμικών τμημάτων DNA χρησιμοποιούνταν το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIP) των εταιρειών Boehringer Mannheim ή NEB συνήθως, με προσθήκη 0.5 unit ανά μg γραμμικού DNA και βάσει των οδηγιών των εταιρειών ή καθιερωμένων

2. Υλικά και Μέθοδοι

πρωτοκόλλων (Sambrook & Russell 2001). Η επώαση γινόταν για 2-2.5 ώρες στους 37°C, ενώ μετά ακολουθούσε απενεργοποίηση του ενζύμου στους 85°C για 15 λεπτά.

Για αντιδράσεις συγκόλλησης τμημάτων DNA χρησιμοποιόταν η T4 λιγάση της εταιρείας Invitrogen συνήθως, σε ποσότητες 0.5 έως 1 unit ανά αντίδραση, και βάσει των οδηγιών της εταιρείας. Η επώαση γινόταν συνήθως ολονύκτια στους 16°C (για κολλώδη άκρα μπορούσε να γίνει εντός 3-4 ωρών).

2.14 Μεταφορά DNA σε nylon μεμβράνες

Οι μεταφορές κατά Southern εφαρμόστηκαν για χρωμοσωμικά DNAs στελεχών του *Z. mobilis* κομμένα με το ένζυμο *Nsi*I. Τα πηκτώματα όπου ηλεκτροφορούνταν τα κομμένα DNAs ήταν πηκτώματα αγαρόζης 0.8% (w/v) και οι ηλεκτροφορήσεις ολονύκτιες (τροφοδοτικό Consort E835). Για τις μεταφορές χρησιμοποιούνταν η συσκευή εφαρμογής κενού VacuGene XL της Pharmacia LKB, με κενό στα 45 με 50 mbar. Ακολουθείτο το πρωτόκολλο μεταφοράς της ίδιας εταιρείας. Τα φίλτρα που χρησιμοποιούνταν ήταν θετικά φορτισμένες nylon μεμβράνες της εταιρείας Roche Applied Science.

2.15 Υβριδισμοί του DNA

Οι διαδικασίες προϋβριδισμού, υβριδισμού και ανίχνευσης του σήματος γίνονταν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα και τα αντιδραστήρια του DIG DNA Labeling and Detection Kit της εταιρείας Roche Applied Science. Σαν ιχνηθέτες χρησιμοποιήθηκαν οι επονομαζόμενοι *ZmrecA*, *catE* και *aphA1*. Ο ιχνηθέτης *ZmrecA* είχε κατασκευαστεί στο εργαστήριο για τον υβριδισμό του *recA* γονιδίου του *Z. mobilis* (Μπελετσιώτης 2003) και βασίστηκε σε προϊόν PCR ενίσχυσης 558 βάσεων, εντοπιζόμενο 225 βάσεις από την μεταφραστική έναρξη του *recA* γονιδίου του CP4. Ο ιχνηθέτης *catE* κατασκευάστηκε από PCR-προϊόν μήκους 657 bp χρησιμοποιώντας εκκινητικά νουκλεοτίδια που υβριδοποιούνται στην αρχή και στο τέλος της κωδικής περιοχής του γονιδίου ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη *catE* του πλασμιδίου pBR325 (Μπελετσιώτης 2003). Ο *aphA1* κατασκευάστηκε από *Sal*I-τμήμα 1252 bp του πλασμιδίου pUC4K (Pharmacia Biotech), που φέρει το γονίδιο *aphA1* του μεταθετού στοιχείου Tn903 και προσδίδει ανθεκτικότητα σε καναμυκίνη. Η κατασκευή των ιχνηθετών έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του DIG DNA Labeling and Detection Kit. Οι προϋβριδισμοί και οι ολονύκτιοι υβριδισμοί επωάζονταν σε σωλήνες Hybaid στον αντίστοιχο κλίβανο στους 68°C, η δε ανίχνευση σήματος βάσει επίσης του πρωτοκόλλου της εταιρείας.

2.16 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιούνταν με την χρήση των αντιδραστηρίων του Hifi Kapa PCR kit, της εταιρίας Kapa Biosystems. Σε όλες της αντιδράσεις, προτιμούνταν πρωτόκολλο hot start PCR.

Τα πειράματα της PCR γίνονταν στον θερμικό κυκλοποιητή Techne Genius Thermal Cycler 96x0.2ml w Hot Top. Οι αντιδράσεις των ενισχύσεων ξεκινούσαν με αρχικό βήμα αποδιάταξης στους 94°C για 3 min. Πριν το τελείωμα του βήματος, προστίθετο η πολυμεράση. Στην συνέχεια ακολουθούσαν 30 κύκλοι που περιλάμβαναν αποδιάταξη στους 94°C για 1 min, υβριδισμό των εκκινητικών νουκλεοτιδίων σε θερμοκρασία κατάλληλη για το ζευγάρι των εκκινητών (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) για 1 min, και επιμήκυνση στους 72°C για 2.5

2. Υλικά και Μέθοδοι

min όσον αφορά στην ενίσχυση των *recA* και *lexA* γονιδίων ή για 1 min, όσον αφορά στους ευρύτερους υποκινητές των *recA* και *lexA* γονιδίων. Στο τέλος γινόταν τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min, ακολουθούμενη από την ψύξη των δειγμάτων στους 4°C μέχρι την απομάκρυνση τους από τον κυκλοποιητή.

Οι αλληλουχίες των εκκινητικών νουκλεοτιδίων που κατασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία δίνονται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4. Εκκινητικά νουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Όνομασία εκκινητικού νουκλεοτιδίου	Αλληλουχία (5'→3')	Χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση:
RecA5	CTTCATGCTGTTCCGG	Υβριδοποιούνται στις θέσεις -89 και +1194 αντίστοιχα από την μεταφραστική έναρξη του <i>recA</i> γονιδίου του CP4 και ενισχύουν τμήμα 1283 bp που περιλαμβάνει τον υποκινητή και όλη την κωδική περιοχή του <i>recA</i> για σκοπούς κατασκευής και μελέτης CP4 <i>recA</i> στελέχους
RecA6	AGCCCTGAATATGCCGC	
GS1-F	AAGAATTCGACGTGCCAGTCAAGTT	Υβριδοποιούνται στις θέσεις -221, +907 και +84 αντίστοιχα από την μεταφραστική έναρξη του <i>lexA</i> γονιδίου του CP4 και ενισχύουν (GS1-F & GS1-R2) τμήμα 322 bp του χειριστή και υποκινητή του <i>lexA</i> για μεταγραφική σύντηξη με το <i>lacZ</i> γονίδιο, και τμήμα 1128 bp (GS1-F & GS1-R) που περιλαμβάνει τον χειριστή, τον υποκινητή και όλη την κωδική περιοχή του <i>lexA</i> γονιδίου του CP4 με σκοπό την μελέτη της ενεργότητας του υποκινητή, των στοιχείων ρύθμισης του χειριστή και αλληλεπίδρασης των στοιχείων αυτών με το προϊόν του <i>lexA</i> γονιδίου
GS1-R	AATCTGCAGCTGCCAAGAGTGAAATC	
GS1-R2	TATCTGCAGTCAAGGGCGAGTTTCATT	
GS2-F	AAGAATTCACCGGATCAGGCA	Υβριδοποιούνται στις θέσεις -264 και +77 αντίστοιχα από την μεταφραστική έναρξη του <i>recA</i> γονιδίου του CP4 και ενισχύουν τμήμα 341 bp του χειριστή και υποκινητή του <i>recA</i> γονιδίου για μεταγραφική σύντηξη με το <i>lacZ</i> γονίδιο με σκοπό την μελέτη της ενεργότητας του υποκινητή και στοιχείων ρύθμισης του χειριστή
GS2-R	AATCTGCAGAAACGCGCTTCAAGGG	
CS-F1	GATTGCTAGCATGCTGACGCGCAAG	Υβριδοποιούνται στις θέσεις +0 και +660 αντίστοιχα από την μεταφραστική έναρξη του <i>lexA</i> γονιδίου του CP4 και ενισχύουν
CS-R	TTGAAATTCATTTACTTAATAGCGCCGT	

2. Υλικά και Μέθοδοι

		τμήμα 660 bp που περιλαμβάνει όλη την κωδική περιοχή του <i>lexA</i> γονιδίου με σκοπό την παροχή της LexA πρωτεΐνης
--	--	--

Η ακριβής χρήση του κάθε εκκινητικού νουκλεοτιδίου περιγράφεται αναλυτικά στα σημεία των Αποτελεσμάτων που χρησιμοποιήθηκε.

2.17 Απομόνωση RNA

Διαφορετικά πρωτόκολλα απομόνωσης RNA δοκιμάστηκαν στο εργαστήριο για την εκτέλεση του προγράμματος CSP_52 "Resequencing *Zymomonas mobilis* industrial strain ZM4. Sequencing *Zymomonas mobilis* transcriptomes" σε συνεργασία με το Joint Genome Institute, του Υπουργείου Ενέργειας των Η.Π.Α. Στα πλαίσια αυτά, έγιναν απομονώσεις RNA με την χρήση των kits Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel), mirVana (Ambion) και Totally RNA (Ambion), ακολουθώντας το ενδεδειγμένο πρωτόκολλο του εκάστοτε kit.

Το πλέον αποτελεσματικό πρωτόκολλο απομόνωσης RNA για κύτταρα *Z. mobilis* βασίστηκε στο πρωτόκολλο Simple Phenol Method των Atshan *et al.* 2012 και τροποποιήθηκε κατάλληλα για κύτταρα *Z. mobilis*. Το πρωτόκολλο ήταν το εξής:

- Συλλέγονταν κυτταρικά δείγματα από 10 ml καλλιέργειας του επιθυμητού στελέχους *Z. mobilis* στις επιθυμητές συνθήκες και φάση ανάπτυξης*. Στη περίπτωση που η απομόνωση συνεχιζόταν άμεσα, τα κύτταρα αναδιαλύονταν με προσθήκη 300 μ L DEPC-H₂O και πιπετάρισμα. Στην περίπτωση που τα κύτταρα φυλάσσονταν για μελλοντική απομόνωση, εγκλείονταν σε 200 μ L RNAlater (Ambion) και καταψύχονταν στους -80°C έως την στιγμή της απομόνωσης του RNA. Κύτταρα εγκλεισμένα σε RNAlater, έβγαιναν από τους -80°C, παρέμεναν στον πάγκο για περίπου 1 min και φυγοκεντρούνταν στις 9000 rpm για 1 min. Αφαιρούνταν το RNAlater με tip και προστίθεντο 300 μ L DEPC-H₂O για την αναδιάλυση των κυττάρων.
- Προσθέτονταν 300 μ L acid phenol:chlorophorm 5:1 (pH 4.5, Ambion) και γινόταν vortex για 10 sec (μέχρι γαλακτοματοποίησης). Ακολουθούσε επώαση για 30 min στους 70°C σε θερμομπλόκ. Επαναλαμβανόταν η διαδικασία του vortex για 10 sec μετά από 15 min επώασης και στο τέλος της επώασης.
- Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min και διατηρείτο η υδατική φάση.
- Ακολουθούσε επώαση με DNase (προϊόν του DNA Free kit, Ambion - προσθέτονταν 0.5 μ L). Επώαση στους 37°C σε θερμομπλόκ για 20 min.
- Προσθέτονταν 300 μ L phenol:chl:IAA 25:24:1. Γινόταν vortex μέχρι γαλακτοματοποίησης και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min. Εάν υπήρχε μεσόφαση, συνεχίζονταν οι εκχυλίσεις στην υδατική φάση με ph:chl:IAA μέχρις ότου να μην εμφανιζόταν μεσόφαση.
- Προσθέτονταν 300 μ L chl:IAA 24:1. Γινόταν vortex και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 min.
- Προσθέτονταν 750 μ L αιθανόλης 100%, κατεψυγμένης στους -20°C, και 30 μ L NaAc 3 M pH 5.2**. Γινόταν ανάδευση με 5-6 αναστροφές και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm στους 20°C για 10 min. Απορριπτόταν το υπερκείμενο.
- Προσθέτονταν 200 μ L αιθανόλης 70% κατεψυγμένης στους -20°C και γινόταν φυγοκέντρηση στις 12000 rpm στους 20°C για 5 min. Απορριπτόταν το υπερκείμενο. Το ξέπλυμα με αιθανόλη επαναλαμβανόταν μια δεύτερη φορά.

2. Υλικά και Μέθοδοι

- Το καπάκι από τον σωλήνα erppendorf αφηνόταν ανοικτό έως ότου το ίζημα στεγνωνόταν. Προσθέτονταν 100 μ L DEPC-H₂O, γίνονταν χτυπήματα ανάδευσης στον σωλήνα erppendorf και το διάλυμα επωαζόταν στους 65°C για 20 min (με περιοδικά χτυπήματα ανάδευσης). Για τον υπολογισμό της ποσότητας και καθαρότητας του RNA, ακολουθούσε φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 260 nm και 280 nm στο φωτόμετρο Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) και ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 0.8% (w/v). Για την παρασκευή του gel ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιούνταν TAE 1X κατεργασμένο με DEPC (Sigma), βάσει των οδηγιών της εταιρείας Sigma.

Στην περίπτωση απομόνωσης RNA από το εκκριτικό στέλεχος ZM401, * γίνονταν 1-2 ξεπλύματα με STE και ** προστίθεντο 200 μ L NaCl 5 M αντί των 30 μ L NaAc 3 M (Fang *et al.* 1992).

Σε επιλεγμένα δείγματα RNA μετρήθηκε η ποσότητά τους και η ποιότητά τους στον bioanalyzer Experion της BIO-RAD που διατίθεται στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών με την βοήθεια της δρ. Α. Δουλγεράκη.

Όλες οι απομονώσεις RNA από τα δείγματα που στάλθηκαν για RNA αλληλούχηση στα εργαστήρια του JGI, στα πλαίσια του προγράμματος CSP_52, έγιναν στα εργαστήρια του Wisconsin Energy Institute στο Madison, WI. Για τον σκοπό αυτό μεταφέρθηκαν σε ξηρό πάγο τα κύτταρα όλων των δειγμάτων καλλιέργειών που είχαν συλλεχθεί και αποθηκευτεί σε RNAlater (βλ. άνω) και επαν-αποθηκεύτηκαν μέχρι αναλύσεώς τους σε βαθειά κατάψυξη του φιλοξενούντος εργαστηρίου. Επί πλέον, για τις διαδικασίες που περιγράφονται κάτω, χρησιμοποιούνταν φυγόκεντρος Eppendorf 5424, το speedvac Thermo Savant SPD1010 και το Thermo NanoDrop 1000 για μετρήσεις ποσότητας και ποιότητας των δειγμάτων RNA μετά την απομόνωση.

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στα εργαστήρια του W.E.I. αποτελεί μια τροποποιημένη έκδοση του πρωτοκόλλου των Rhodius & Gross (Rhodius & Gross 2011) και είναι το εξής:

- Δείγματα κυττάρων κατεψυγμένων στους -80°C σε RNAlater (βλ. άνω) αποψύχονταν για λιγότερο από 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγόκεντρούνταν στις 9000 rpm για 1 min. Αφαιρούνταν το υπερκείμενο.
- Το ίζημα αναδιαλύονταν σε 1.2 ml διαλύματος που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS), αιθανόλη και φαινόλη, το οποίο παρασκευαζόταν με τον εξής τρόπο: αναμιγνύονταν 62.5 μ L φαινόλης (από διάλυμα φαινόλης εξισορροπημένη με 10 mM Tris HCl, pH 8.0 και με 1 mM EDTA) και 1187.5 μ L αιθανόλης, και αυτά τα 1.25 ml 95%EtOH/5%Phe προσθέτονταν σε 10 ml διαλύματος PBS. Επανάληψη φυγόκεντρησης 9000 rpm για 1 min και απομάκρυνση υπερκειμένου.
- Ακολουθούσε αναδιάλυση του ιζήματος σε 450 μ L TE₁₀.
- Προσθέτονταν 44 μ L 3M NaOAc pH 5.2 και 550 μ L όξινης φαινόλης-χλωροφορμίου pH 4.5 (Ambion). Γινόταν vortex μέχρι ομογενοποίησης και ακολουθούσε επώαση σε προθερμασμένο θερμομπλόκ στους 65°C για 6 min. Το vortex επαναλαμβανόταν κάθε λεπτό κατά την διάρκεια της επώασης.

2. Υλικά και Μέθοδοι

- Επώαση στο πάγο για 5 min. Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm στους 4 °C για 10 min. Κρατιόταν η υδατική φάση.
- Στη συνέχεια προσθέτονταν 550 μ L χλωροφορμίου και γινόταν φυγοκέντρηση στις 14000 rpm στους 4°C για 10 min. Κρατιόταν η υδατική φάση (~450 μ L) και χωριζόταν ισομερώς σε 2 σωλήνες erpendorf.
- Σε κάθε σωλήνα erpendorf προσθέτονταν 0.1 μ L (22.5 μ L) 3M NaOAc pH 5.2 και ~2.5 μ L (570 μ L) αιθανόλη. Ακολουθούσε επώαση στους -80°C για 30 min.
- Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 14000 rpm στους 4°C για 25 min. Τα ίζημα ξηραίνονταν με 70% αιθανόλης (14000 rpm στους 4 °C για 5 min). Μετά γινόταν ξήρανση σε speedvac για 5 min.
- Το ίζημα σε κάθε σωλήνα erpendorf αναδιαλυόταν σε 92.5 μ L DEPC-H₂O και τα δύο διαλύματα συνενώνονταν. Προσθέτονταν 2 μ L RNasin (Promega), 20 μ L 10x DNase buffer I και 1 μ L rDNase I (Ambion). Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 45 min.
- Ακολουθούσαν 4 εκχυλίσεις: μία με διάλυμα φαινόλης, μία με διάλυμα φαινόλης:χλωροφορμίου 1:1 και δύο με διάλυμα χλωροφορμίου. Για την κάθε εκχύλιση γινόταν vortex μέχρι ομογενοποίησης, φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 5 min.
- Στο υδατικό υπερκείμενο προσθέτονταν 0.1 και 2.5 μ L 3M NaOAc pH 5.2 και αιθανόλη, αντίστοιχα. Επώαση στους -80°C για 30 min. Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm στους 4°C για 25 min. Το ίζημα και ξηραίνονταν με 750 μ L 70% αιθανόλης (14000 rpm στους 4 °C για 5 min), και ξηραίνονταν σε speedvac για 5 min.
- Το ίζημα αναδιαλυόταν σε 20 μ L DEPC-H₂O. Ακολουθούσε μέτρηση της ποσότητας του RNA σε nanodrop της εταιρείας Agilent και ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 1.5%.

2.18 Αλληλούχηση RNA

3 μ g από τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν βάσει των άνω (βλ. 2.17), στάλθηκαν για αλληλούχηση στο JGI σε ειδική πλάκα μικροτιλοδότησης (κωδικός πλάκας 27-94292, κωδικοί δειγμάτων 76680 ως το 76749). Η πλάκα μικροτιλοδότησης κλείστηκε με ξηρό πάγο σε θερμοπροστατευτικό κουτί από φελιζόλ το οποίο στάλθηκε στο JGI.

Στα εργαστήρια του JGI, 100 ng RNA χρησιμοποιήθηκαν από το κάθε δείγμα για την κατασκευή βιβλιοθηκών. Πρώτα, χρησιμοποιήθηκε το kit Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) της Illumina για την αφαίρεση του rRNA. Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το kit TruSeq Stranded Total RNA HT της Illumina για την κατασκευή των βιβλιοθηκών, με τους χειρισμούς να έχουν εκτελεστεί με την βοήθεια του ρομποτικού συστήματος PerkinElmer Sciclone NGS robotic liquid handling system.

Οι βιβλιοθήκες ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το Biosystem's next-generation sequencing library qPCR kit (KAPA) και την πλατφόρμα LightCycler 480 real-time PCR (Roche). Στη συνέχεια, οι ποσοτικοποιημένες βιβλιοθήκες χωρίστηκαν σε ομάδες των 8 και προετοιμάστηκαν για αλληλούχηση χρησιμοποιώντας το TruSeq paired-end cluster kit v4 (Illumina) και το Illumina's cBot. Για την αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκε ο αλληλουχητής Illumina HiSeq2500 και το kit HiSeq TruSeq SBS sequencing kit v4 (Illumina).

2. Υλικά και Μέθοδοι

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αναρτήθηκαν σε βάση του JGI (genome.jgi.doe.gov) όπου έχουν ομαδοποιηθεί ανά στέλεχος: project ID 1020422 για τα δείγματα του ZM4, 1020425 για τα ZM401, 1020428 για τα CP4 και 1020431 για τα UA1.

2.19 Ενζυμική αντίδραση β-γαλακτοσιδάσης (αντίδραση κατά Miller)

Για την μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης, γινόταν αντίδραση Miller (Miller 1972) σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Σε σωλήνα erpendorf τοποθετούνταν 150 μL από την επιθυμητή καλλιέργειας στην επιθυμητή φάση ανάπτυξης.
- Προστίθεντο 600 μL από buffer Z, 37.5 μL διαλύματος SDS 0.05% (v/v) και 37.5 μL χλωροφορμίου. Ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση με vortex μέχρις ομογενοποιήσεως.
- Προστίθεντο 75 μL OPNG (από stock 4 mg/mL φυλαγμένο στους 4°C και προστατευμένο από το φως με αλουμινοχαρτο). Γινόταν έναρξη χρονομέτρησης και παρατήρηση της αύξησης του κίτρινου χρωματισμού του διαλύματος.
- Με την σταθεροποίηση κίτρινου χρώματος προστίθεντο 450 μL Na_2CO_3 1 M και ανάδευση με vortex για τον τερματισμό της αντίδρασης. Σημειωνόταν ο χρόνος της αντίδρασης.
- Ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 3 min στις 10000 rpm στη φυγόκεντρο Eppendorf 5424. Συλλεγόταν το υπερκείμενο και φωτομετρήονταν στα 420 nm (για τυφλό χρησιμοποιούνταν dsH_2O).

Ο υπολογισμός των μονάδων β-γαλακτοσιδάσης γινόταν με τον τύπο:

$$\text{Μονάδες ενεργότητας } \beta\text{-γαλακτοσιδάσης} = 1000 \cdot \text{O.D.}_{420} / (\text{O.D.}_{600} \cdot t \cdot F)$$

όπου O.D._{420} η τιμή φωτομέτρησης του δείγματος στα 420 nm, O.D._{600} η τιμή φωτομέτρησης της καλλιέργειας που πάρθηκε το δείγμα για την αντίδραση, t ο χρόνος αντίδρασης σε min και F =όγκος (σε mL) δείγματος που πάρθηκε από την καλλιέργεια των κυττάρων προς το άθροισμα των όγκων (σε mL) του δείγματος από την καλλιέργεια και του διαλύματος buffer Z.

Για την κατασκευή του buffer Z, χρησιμοποιούνταν τα ακόλουθα στις ακόλουθες τελικές συγκεντρώσεις: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ σε τελική συγκέντρωση 0.06 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ σε 0,04 M, KCl σε 0.01 M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ σε 1 mM και β-μερκαπτοαιθανόλη σε 0.05 M. Το pH του διαλύματος ρυθμιζόταν στο 7.0 και αποθηκεύονταν στους 4°C.

2.20 Μέτρηση ποσοτήτων αιθανόλης με χρωματογραφικές μεθόδους

Για μετρήσεις ποσοτήτων αιθανόλης σε καλλιέργειες στελεχών *Z. mobilis*, συλλέγονταν δείγματα υπερκειμένων των καλλιεργειών κατόπιν στις 7000 rpm για 7 λεπτά από διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης και ανεπτυγμένων βάσει των καθιερωμένων συνθηκών (βλ. 2.4). Τα υπερκείμενα φιλτραριζόνταν με φίλτρα της εταιρείας Sartorius Stedim Biotech με διάμετρο πόρου 0.2 μm και αποθηκεύονταν στους -20°C. Οι μετρήσεις ποσοτήτων αιθανόλης γίνονταν με αέρια και υγρή χρωματογραφία (HPLC και GC), και χρήση των του Επίκουρου Καθηγητή Δ. Χατζηνικολάου στον Τομέα Βοτανικής, Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ. Ο υγρός χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Agilent, με ανιχνευτή πολωμένου φωτός (RI, refractive index) της εταιρείας Hewlett Packard. Η στήλη που

2. Υλικά και Μέθοδοι

χρησιμοποιήθηκε ήταν η Ultra Aqueous C18 της εταιρείας Restek, με διάμετρο 4.6 mm και διάμετρο σφαιριδίων αδρανούς υλικού 5 μm. Σαν κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 2.5 και με ρυθμό ροής 1.5 mL/min. Ο αέριος χρωματογράφος ήταν ο Perkin-Elmer Autosystem XL, με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας, και στήλη η Supelcowax-10 column (60 m μήκος, 0.53 mm διάμετρος) με ήλιο σαν αέριο μεταφοράς.

2.21 Εργαλεία και ιστοσελίδες για βιοπληροφορικές αναλύσεις

2.21.1 Σύνολα δεδομένων

Σε αυτήν την εργασία αντλήθηκαν δεδομένα γονιδιωματικών αναλύσεων με βάση τις κατατεθειμένες από το εργαστήριό μας αλληλουχίες γονιδιωμάτων στελεχών του *Z. mobilis*, με κωδικούς GenBank τους ακόλουθους:

- για το CP4
 - χρωμόσωμα: NC_022900.1
 - πλασμίδια: NC_022901.1, NC_022902.1, NC_022903.1, NC_022910.1, NC_022913.1
- για το ZM4
 - χρωμόσωμα: NC_006526.2
- για το NCIMB 11163
 - χρωμόσωμα: NC_013355.1
 - πλασμίδια: NC_013356.1, NC_013357.1, NC_013358.1, NC_019019.1
- για το ATCC 10988
 - χρωμόσωμα: NC_017262.1
 - πλασμίδια: NC_017180.1, NC_017181.1, NC_017182.1, NC_017183.1, NC_017184.1, NC_017185.1, NC_011363.1, NC_005701.1
- για το ATCC 29191
 - χρωμόσωμα: NC_018145.1
 - πλασμίδια: NC_018146.1, NC_018147.1, NC_018148.1
- για το ATCC 29192
 - χρωμόσωμα: NC_015709.1
 - πλασμίδια: NC_015715.1, NC_015716.1

Ένα ακόμη σύνολο αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν αυτό της αλληλούχησης RNA, που μπορεί να ανευρεθεί σε ιστοσελίδα του JGI*, με χρήση κωδικών του εργαστηρίου.

(*genome.jgi.doe.gov/portal/ResZymscriptomes_2/ResZymscriptomes_2.info.html)

2.21.2 Αλγόριθμοι και προγράμματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Altschul *et al.* 1990). Οι ρυθμίσεις του τέθηκαν σε μη επαναλαμβανόμενες βάσεις δεδομένων (non redundant), εισάγοντας συγκεκριμένα σαν οργανισμό το *Z. mobilis*, ενώ οι υπόλοιπες ρυθμίσεις κρατήθηκαν στις προτεινόμενες (default).

Η εύρεση και απεικόνιση πιθανών νουκλεοτιδικών μοτίβων κατόπιν πολλαπλών στοιχίσεων DNA αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το διαδικτυακό εργαλείο WebLogo 3 (Crooks *et al.* 2004, weblogo.threeplusone.com). Στην γραφική

2. Υλικά και Μέθοδοι

απεικόνιση των αποτελεσμάτων του WebLogo, χρησιμοποιήθηκε τόσο η πιθανότητα εύρεσης (probability) του κάθε νουκλεοτιδίου, όπου ο κάθετος άξονας έχει μέγιστη τιμή το 1, όσο και τα bits, όπου ο κάθετος άξονας είναι λογαριθμικός, έχει μέγιστη τιμή για νουκλεοτιδικά μοτίβα το 2 και το κάθε νουκλεοτίδιο έχει μέγεθος ανάλογο με το πόσο συντηρημένο ήταν στην εκάστοτε θέση.

Επίσης, η αναζήτηση συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδικών μοτίβων σε μία συλλογή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα FITOM (Erill & O'Neill 2009, compbio.umbc.edu/9466/). Στο πρόγραμμα εισήχθηκαν αρχεία γονιδιωμάτων με επισημάνσεις (annotations), ώστε να προσδιοριστεί η θέση του κάθε πιθανού μοτίβου με γνώμονα τη θέση και την ταυτότητα του κοντινότερου γονιδίου. Σαν μοτίβα στο πρόγραμμα εισήχθηκαν τα GTTCNNNNNNNGTTC και GAACNNNNNNNGAAC.

2.21.3 Μέθοδοι και προγράμματα ανάλυσης αποτελεσμάτων αλληλούχησης RNA

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης RNA στα εργαστήρια του JGI, όπως προέκυψαν από τον αλληλουχητή HiSeq 2500 (Illumina), ήταν σε αρχεία της μορφής fastq. Τα αρχεία αυτά φιλτραρίστηκαν και οι ψευδείς αλληλουχίες (artifact sequences) αφαιρέθηκαν με την χρήση του εργαλείου BBDuk (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>, με τις ρυθμίσεις kmer=25 και phred trimming method Q10). Τα τελικά αποτελέσματα αναρτήθηκαν σε βάση του JGI (genome.jgi.doe.gov) όπου ομαδοποιήθηκαν σε κωδικούς project ανά στέλεχος: project ID 1020422 για τα δείγματα του στελέχους ZM4, 1020425 για του ZM401, 1020428 για του CP4 και 1020431 για του UA1 (βλ. και **2.18**).

Ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων με τον αγωγό πακέτων GLSeq (Moskvin *et al.* 2015, όλα τα λογισμικά πακέτα που αναφέρονται παρακάτω περικλείονται στο GLSeq). Αξιολογήθηκε η ποιότητα των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης του RNA και εντοπίστηκε ο βαθμός συσχέτισης ανάμεσα στο κάθε δείγμα και το αντίγραφο του (duplicate) αξιοποιώντας εντολές που συμπεριλαμβάνονται στον GLSeq. Μετά τον έλεγχο ποιότητας, ακολούθησε η στοίχιση των αλληλουχιών στο μεταγράφομα του εκάστοτε στελέχους με το πακέτο BW-HTSeq (Li & Durbin 2009, Anders *et al.* 2015). Η έκφραση του γονιδίου μετρήθηκε με το λογισμικό πακέτο RSEM (Li & Dewey 2011). Τέλος, με το πακέτο EBSeq (Leng *et al.* 2013) βρέθηκαν ποια γονίδια εμφανίζουν διαφορική έκφραση.

Για την κατασκευή των heatmaps χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο GiTools (Perez-Llamas & Lopez-Bigas 2011) σύμφωνα με τις οδηγίες στην ιστοσελίδα του εργαλείου (<http://www.gitools.org/home>).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

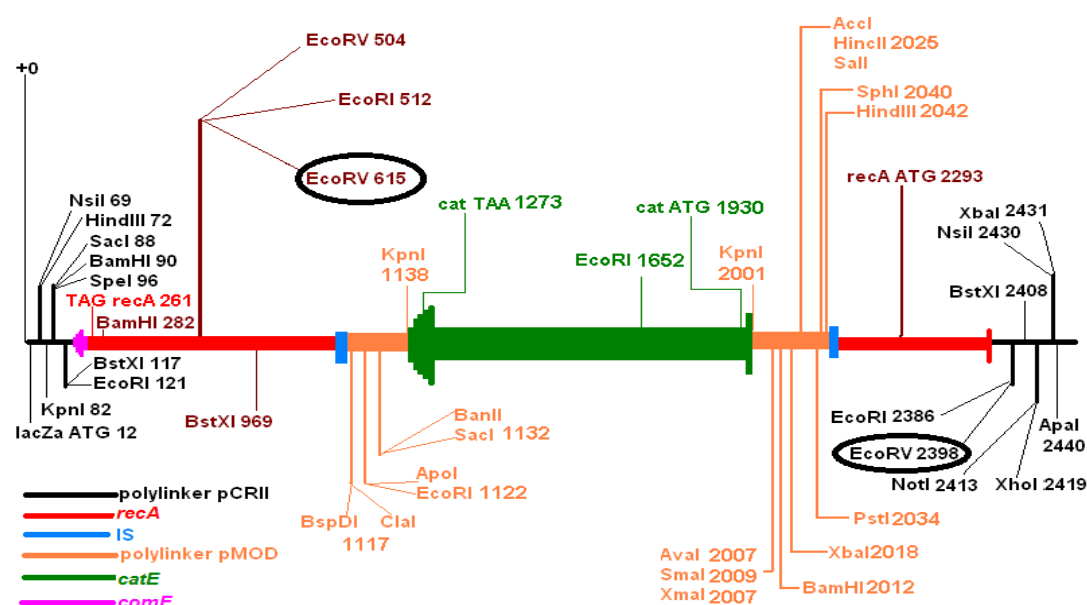
3. Αποτελέσματα

3.1 Μελέτη του CP4 *recA* στελέχους UA1

3.1.1 Σύντομη περιγραφή της κατασκευής του στελέχους UA1

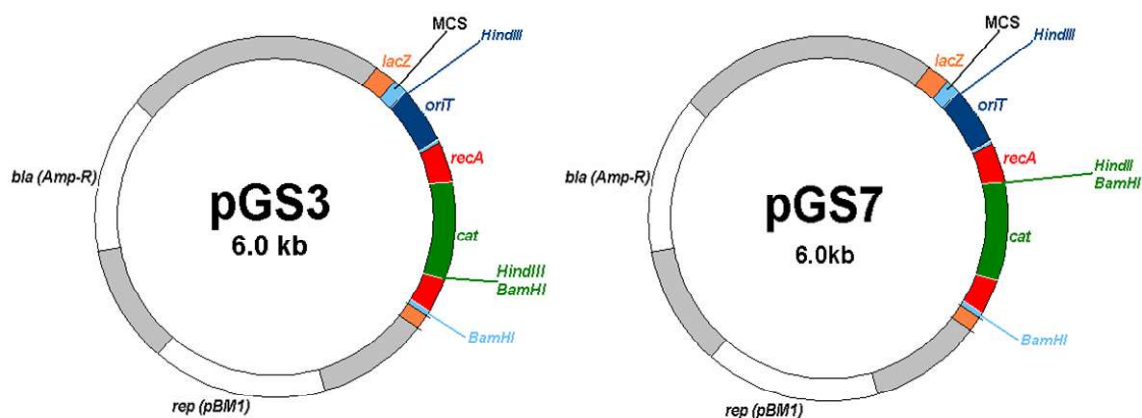
Για μελετηθεί η SOS απόκριση στο *Z. mobilis* και να αποκτηθεί ένα χρήσιμο στέλεχος ως γενετικό εργαλείο, κατασκευάστηκε ένα *recA* στέλεχος του οργανισμού (Σαββάκης 2009).

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή (βλ. παράγραφο 1.3.5.1), απομονώθηκε κλώνος που διατίθεται στο εργαστήριο και έφερε κλωνοποιημένο στο γονίδιο *recA* από το στέλεχος CP4 και εντός αυτού εισδοχή κασέτας ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη (*catE*). Η ένθεση της *catE* κασέτας επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση, με τη συνεργασία του Δρ. Α. Κριμιτζά, και εντοπίστηκε 157 bp καθοδικά της μεταφραστικής έναρξης του *recA* γονιδίου (Εικόνα 3.1.1). *EcoRV* τμήμα που περικλείει την *recA::catE* ένθεση κλωνοποιήθηκε στην *SmaI* περιοριστική θέση του φορέα pVK1. Το pVK1 είναι πλασμίδιο που έχει προέλθει από το ασταθές για το *Z. mobilis* pBluescript με κλωνοποίηση ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις *HindIII* και *EcoRI* τμήματος 331 bp από το πλασμίδιο RP4. Το τμήμα αυτό είναι η *oriT* περιοχή του RP4 και ως εκ τούτου καθιστά το pVK1 ικανό να μεταφέρεται με επιβοηθούμενη σύζευξη. Η κλωνοποίηση του *EcoRV* τμήματος εντός του pVK1 δημιούργησε τα πλασμίδια pGS3 και pGS7 (Εικόνα 3.1.2). Η διαφορά των δύο πλασμιδίων είναι ο προσανατολισμός του *recA::catE* τμήματος. Οι δύο κατασκευές είχαν εισαχθεί επιτυχώς σε κύτταρα CP4 με μετασχηματισμό μέσω ηλεκτροδιάτρησης (Σαββάκης 2009).



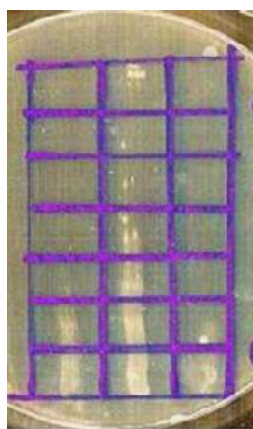
Εικόνα 3.1.1. Χάρτης από μέρος του κλώνου που φέρει το *recA* γονίδιο (κόκκινο) και εντός αυτού την ένθεση κασέτας ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη (πράσινο) (Σαββάκης 2009). Κυκλώνονται οι *EcoRV* περιοριστικές θέσεις που οριοθετούν το *EcoRV* τμήμα το οποίο κλωνοποιήθηκε στο pVK1, δημιουργώντας τα πλασμίδια pGS3 και pGS7.

3. Αποτελέσματα



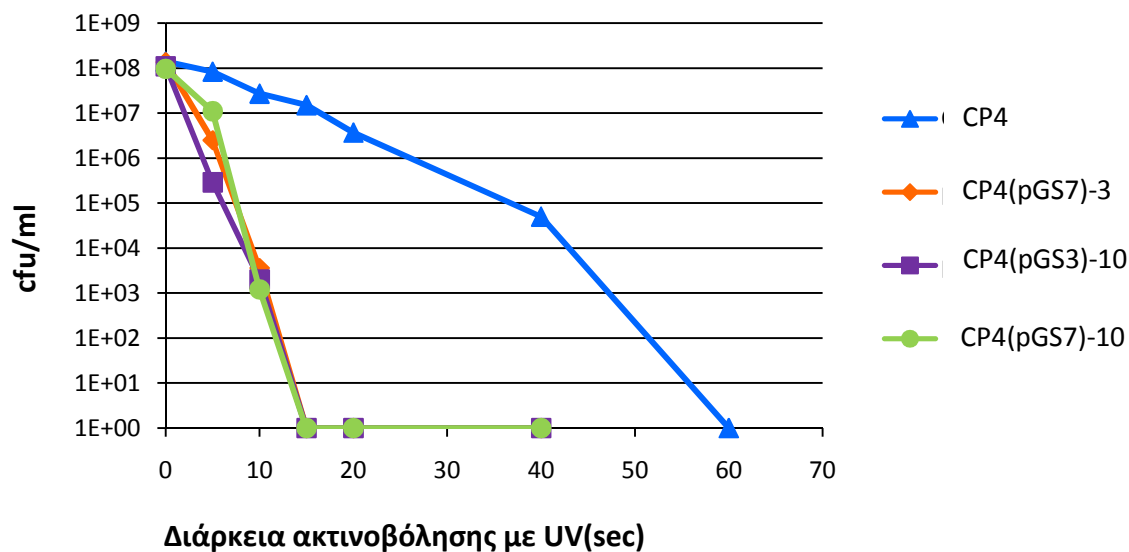
Εικόνα 3.1.2. Οι χάρτες των πλασμιδίων *pGS3* και *pGS7*. Σημειώνονται οι περιοριστικές θέσεις *HindIII* και *BamHI*, που καταδεικνύουν τις διαφορετικές φορές εισδοχής της ένθεσης. Ανοιχτό μπλε: ο πολυσύνδεσμος (MCS) του *pBluescript*, σκούρο μπλε: η περιοχή *oriT* από το *RP4*, κόκκινο χρώμα: το κλωνοποιημένο *recA* από το *CP4*, πράσινο: η ένθεση *catE*.

Η ευαισθησία αποικιών μετασχηματισμένων για τα *pGS3* και *pGS7* *CP4(pGS3)* και *CP4(pGS7)* ελέγχθηκε με ακτινοβολία τρυβλίων και με βήμα 5 sec στην επίδραση της UV (Εικόνα 3.1.3). Απομονώθηκαν τρία στελέχη, τα επονομαζόμενα *CP4(pGS3)-10*, *CP4(pGS7)-3* και *CP4(pGS7)-10*, που εμφάνιζαν την μεγαλύτερη ευαισθησία, και μελετήθηκαν περαιτέρω σε έλεγχο ακτινοβολίας καλλιιεργειών (βλ. Υλικά και Μέθοδοι 2.6.2, Εικόνα 3.1.4). Το στέλεχος με τα πιο σταθερά επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα, *CP4(pGS7)-10*, ονομάστηκε *UA1* (Σαββάκης 2009).



Εικόνα 3.1.3. Έλεγχος της ευαισθησίας μετασχηματισμένων *CP4(pGS3)-10* (αριστερό streak) και *CP4(pGS7)-10* (δεξί streak) αποικιών σε ακτινοβολία τρυβλίων με UV. Στο κέντρο έχει τοποθετηθεί streak του *CP4* και εκατέρωθέν του streaks από τις μετασχηματισμένες αποικίες. Το τρυβλίο ακτινοβολήθηκε από 0 έως 30 sec (κάτω και πάνω μέρος του τρυβλίου αντίστοιχα) και με βήμα 5 sec.

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.1.4. Μελέτη βιωσιμότητας του στελέχους CP4 και των μετασηματισμένων στελεχών CP4(pGS3)-10, CP4(pGS7)-3 και CP4(pGS7)-10 σε ακτινοβόληση με UV. Άξονες x'x: αριθμοί κυττάρων που επιβιώνουν, y'y: η διάρκεια ακτινοβόλησης σε δευτερόλεπτα

3.1.2 Μοριακή μελέτη του γονιδιακής απαλοιφής του γονιδίου *recA* στο στέλεχος UA1

Για να μελετηθεί μοριακά η τύχη του *recA* γονιδίου στα UA1, CP4(pGS3)-10 και CP4(pGS7)-3, έγινε ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) του *recA* γονιδίου χρησιμοποιώντας τα εκκινητικά νουκλεοτίδια RecA5 και RecA6 (βλ. Υλικά και Μέθοδοι Πίνακας 2.4, Εικόνα 3.1.5) και DNA από το στέλεχος CP4 (μάρτυρας) και από τα 3 προαναφερθέντα μετασηματισμένα στελέχη. Ενίσχυση του φυσικού *recA* γονιδίου με τα RecA5 και RecA6 δίνει σαν αποτέλεσμα ζώνη μεγέθους 1283 bp (Εικόνα 3.1.5). Το αποτέλεσμα της ενίσχυσης στο CP4 έδειξε την αναμενόμενη ζώνη των 1283 bp (Εικόνα 3.1.6). Στην περίπτωση των τριών μετασηματισμένων στελεχών παρουσιάστηκε μία ζώνη μεγέθους 2258 bp, η οποία είναι αυξημένη κατά 975 bp σε σύγκριση με την ζώνη του *recA* στο CP4, όσο είναι και το μέγεθος της ένθεσης του *catE* εντός του *recA* (Εικόνα 3.1.6).

Στην συνέχεια, και για να επιβεβαιωθεί η περίπτωση διπλού επιχιασμού μεταξύ της *recA::catE* κατασκευής και του φυσικού *recA* γονιδίου, έγιναν υβριδισμοί κατά Southern χρησιμοποιώντας *NsiI*-κομμένα χρωμοσωμικά DNAs από το CP4 και τα 3 στελέχη και ως ιχνηθέτες (βλ. Υλικά και Μέθοδοι 2.15) τα *ZmrecA*, pBluescript και *catE* ξεχωριστά (Εικόνες 3.1.7 και 3.1.8). Με χρήση του *ZmrecA* σαν ιχνηθέτη, παρουσιάστηκαν στα 3 μετασηματισμένα στελέχη ζώνες προσαυξημένες, σε σύγκριση με του CP4, κατά τόσο όσο η ένθεση του *catE* (Εικόνα 3.1.7). Με χρήση του pBluescript σαν ιχνηθέτη, που είναι ο σκελετός των φορέων που έφεραν το *recA::catE*, δεν εντοπίστηκαν ζώνες υβριδισμού (Εικόνα 3.1.8). Με χρήση του *catE* σαν ιχνηθέτη, ζώνες υβριδισμού εντοπίστηκαν μόνο στα 3 *recA* στελέχη και σε μονή ζώνη για το κάθε στέλεχος (Εικόνα 3.1.8). Επομένως, επιβεβαιώθηκε η σταθερότητα

3. Αποτελέσματα

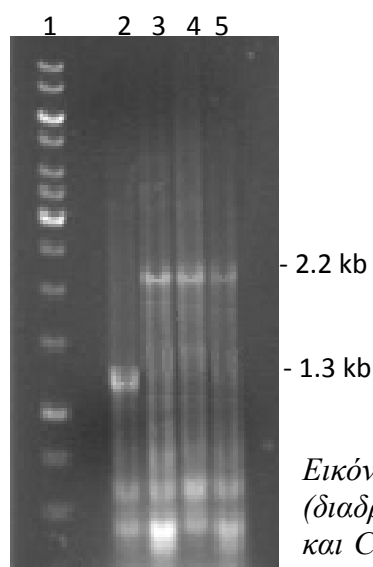
της ένθεσης του *catE* εντός *recA* στα τρία *recA*⁻ στελέχη, χωρίς εκ παραλλήλου συμβάντα εισδοχής του φορέα στο χρωμόσωμα ή εισαγωγής του *catE* σε άλλο σημείο στο χρωμόσωμα.

```

CTGTTTTTCAGCTTTCTCGGTAGTAGAAAAACAAGTTTTTAAATTCGTTCAGTTAAGACTT      60
                                     RecA5 →
GCTATTCTGTTTCTGCTCTCTATGTTACCTTATGTTCTTCATGCTGTTCCGGTATATTC      120
GACGCAATCCTGACATTATGCCGGTTGATGCCTTAAGAGAGACGTTATAGGAGAAGGGG      180
    recA
GTAGCGATGGCTCCGCAAAAATAAGGTTACGACTTCCGGTAAGGATAATAATATGGACAAG..    240
    M A P Q N K V T T S G K D N N M D K
..ACGGCTGAAATTGCCGACGAAATGCTGGATCCATCTATCCCTGAAGATTAGGTTTTTTGAC 1260
T A E I A D E M L D P S I P E D *
CAAAAATCTAATCTTGAAAAGAGGTCAGTTTTTATCTGACCTCTTTTTTGTATTGATTCAT    1320
    comF                                     ← RecA6
CAGTAAAATGGAAAAGATCAGCATCATTAAAAAATGCCTTGAAGCGGCATATTCAGGGCT    1380

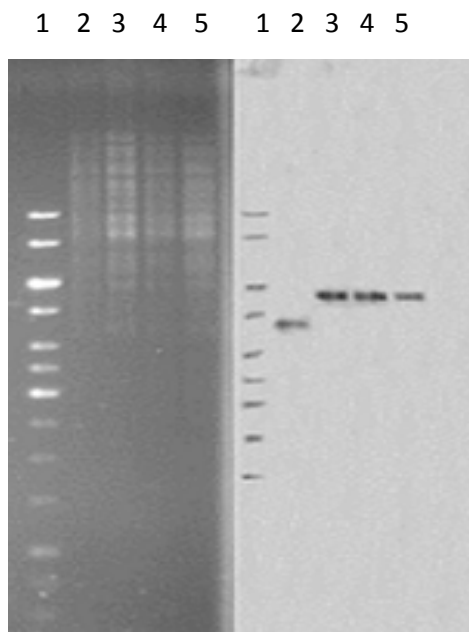
```

Εικόνα 3.1.5. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής του χρωμοσώματος του CP4 που περιέχει το *recA* γονίδιο. Με μαύρο κουτί υποδεικνύεται η μεταφραστική έναρξη του *recA* γονιδίου και με γκρι η μεταφραστική έναρξη του *comF* γονιδίου. Με κώδικα του ενός γράμματος κάτω από την κωδική περιοχή του *recA* δίνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα της *RecA* πρωτεΐνης (*=λήξη μετάφρασης). Με βέλη και υπογράμμιση δείχνονται οι περιοχές που υβριδίζουν τα εκκινητικά νουκλεοτίδια *RecA5* και *RecA6*. Για συντομία, έχει παραληφθεί η περιοχή από τη βάση 241 έως τη βάση 1199.

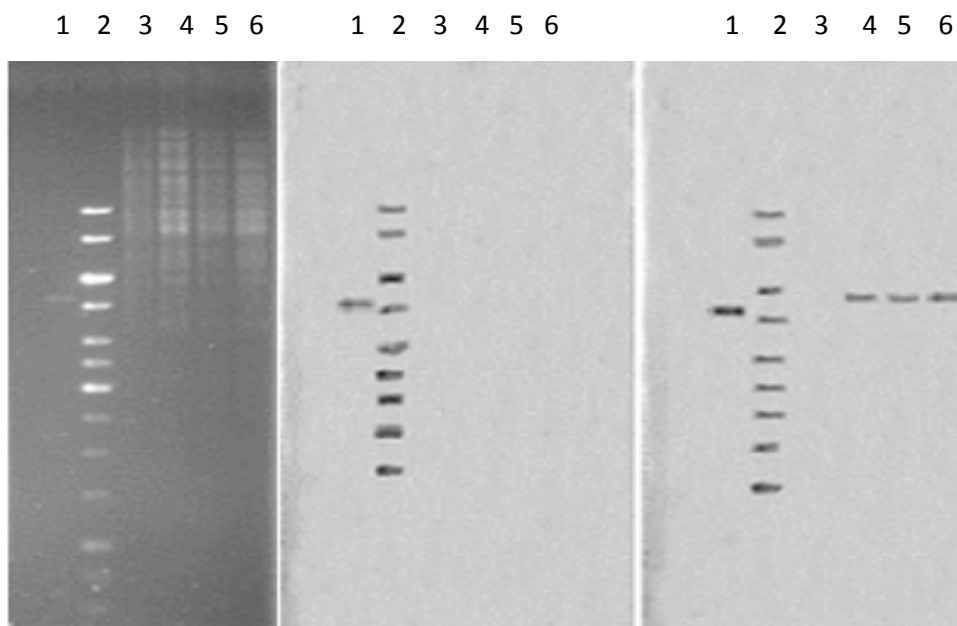


Εικόνα 3.1.6. Ενίσχυση με PCR του *recA* γονιδίου στο CP4 (διαδρομή 2), UAI (διαδρομή 3), CP4(pGS3)-10 (διαδρομή 4) και CP4(pGS7)-3 (διαδρομή 5) του UAI (διαδρομές 4 και 5). Διαδρομή 1: 1 kb ladder (Fermentas)

3. Αποτελέσματα



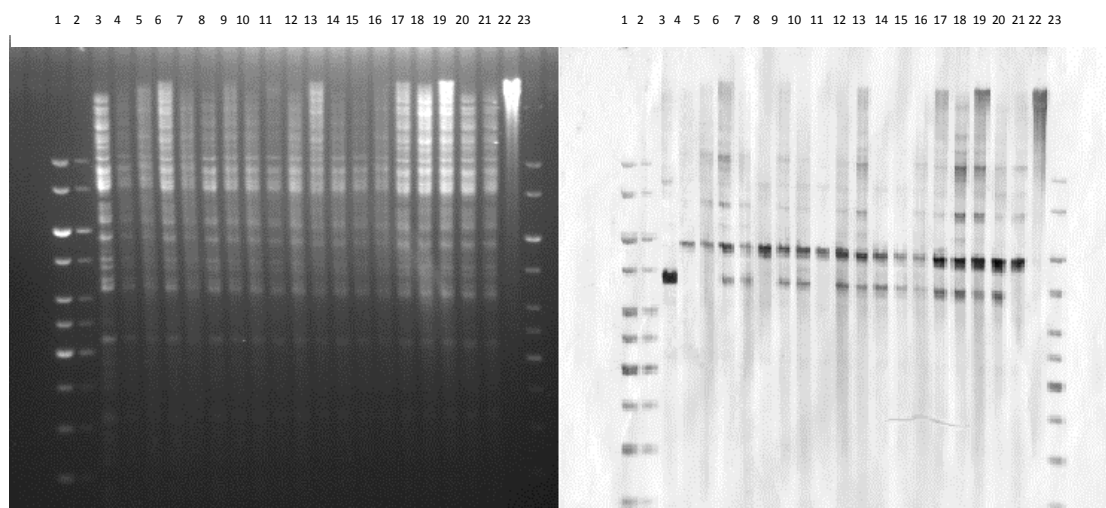
Εικόνα 3.1.7. Περιοριστική ανάλυση και υβριδισμός κατά Southern σε *NsiI*-κομμένα ολικά DNAs από το CP4 (διαδρομή 2), UAI (διαδρομή 3), CP4(pGS3)-10 (διαδρομή 4) και CP4(pGS7)-3 (διαδρομή 5). Διαδρομή 1: 1 kb ladder (Fermentas). Σαν ιχνηθέτης χρησιμοποιήθηκε το *recA*.



Εικόνα 3.1.8. Περιοριστική ανάλυση και υβριδισμός κατά Southern σε *NsiI*-κομμένα ολικά DNAs από το CP4 (διαδρομή 3), UAI (διαδρομή 4), CP4(pGS3)-10 (διαδρομή 5) και CP4(pGS7)-3 (διαδρομή 6). Διαδρομή 1: πλασμίδιο βασισμένο στο pBluescript που φέρει το *recA::catE*. Διαδρομή 2: 1 kb ladder (Fermentas). Σαν ιχνηθέτης χρησιμοποιήθηκε ο pBluescript (μεσαίος υβριδισμός) και το *catE* (υβριδισμός δεξιά).

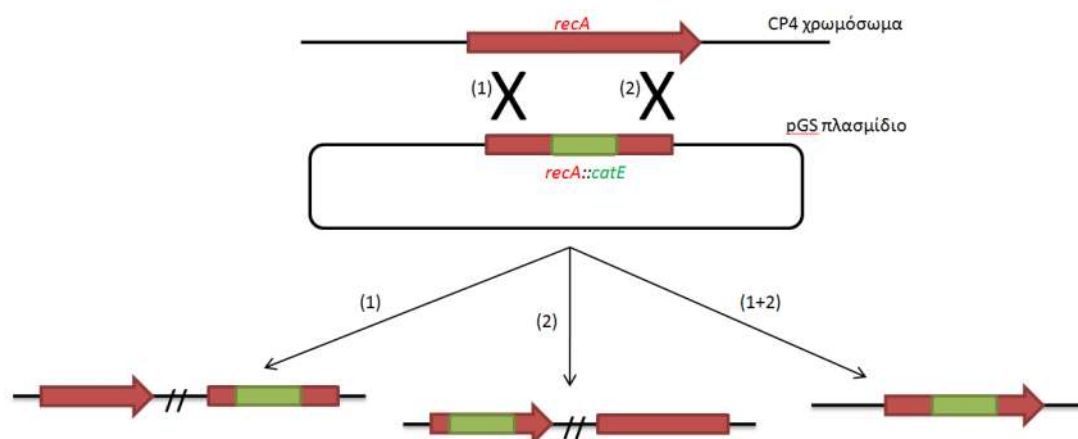
3. Αποτελέσματα

Η εισαγωγή του *recA::catE* εντός κυττάρων του CP4 με ηλεκτροδιάτρηση είχε αποδώσει 19 μετασηματισμένα στελέχη, ανθεκτικά σε χλωραμφαινικόλη και ευαίσθητα στην UV ακτινοβολία (Σαββάκης 2009). Σε υβριδισμό κατά Southern σε *NsiI*-κομμένα ολικά DNAs των μετασηματισμένων στελεχών (Εικόνα 3.1.9), χρησιμοποιώντας το *recA* γονίδιο σαν ιχνηθέτη, δείχθηκε ότι σε 5 από τα 19 (28%) των μετασηματισμένων στελεχών παρατηρήθηκε μία ζώνη υβριδισμού και στα υπόλοιπα δύο ζώνες υβριδισμού. Η *NsiI* κόβει εκατέρωθεν του *recA* στο CP4. Στην περίπτωση διπλού επιχιασμού, εισάγεται η κασέτα *catE* εντός του *recA* που υποδηλώνεται με την παρουσία μίας ζώνης υβριδισμού αυξημένη κατά 975 bp σε σύγκριση με τον μάρτυρα (όσο το μέγεθος του *catE*) εφόσον δεν υπάρχει *NsiI* θέση εντός του *catE* (Εικόνα 3.1.9, διαδρομές 4, 5, 8, 11 και 21). Αντιθέτως, όταν το *recA::catE* εισαχθεί στο χρωμόσωμα του CP4 με μονό επιχιασμό, εισάγεται μία έξτρα *NsiI* περιοριστική θέση. Πέψη των DNAs των αντίστοιχων στελεχών με *NsiI* απελευθερώνει δύο τμήματα DNA: ένα που θα έχει το *recA* γονίδιο και ένα που θα έχει το γονίδιο με την ένθεση του *catE* (Εικόνα 3.1.10).



Εικόνα 3.1.9. Περιοριστική ανάλυση και υβριδισμός κατά Southern σε *NsiI*-κομμένα ολικά DNAs από το CP4 και από μετασηματισμένα *Cm^r* στελέχη. Στις διαδρομές 1, 2 και 23 έχει τοποθετηθεί ladder 1kb (Fermentas). Στην διαδρομή 3 παρουσιάζεται το φυσικό στέλεχος CP4. Στις διαδρομές 4-22 παρουσιάζονται τα μετασηματισμένα στελέχη (στην διαδρομή 4 το UA1, 5 το CP4(pGS7)-3 και 11 το CP4(pGS3)-10). Ως ιχνηθέτης χρησιμοποιήθηκε ο *ZmrecA*.

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.1.10. Περιπτώσεις μονού (περίπτωση 1 αριστερά και 2 μέση) και διπλού επιχιασμού (περίπτωση 1+2 δεξιά) μεταξύ της *recA::catE* κατασκευής και του *recA* γονιδίου στο χρωμόσωμα του CP4. *recA* με κόκκινο χρώμα, *catE* με πράσινο χρώμα. Στις περιπτώσεις του μονού επιχιασμού (Campbell integrations) έχουμε την ύπαρξη της *recA::catE* εισδοχής στο χρωμόσωμα του CP4 μαζί με το *recA* γονίδιο το οποίο είτε θα διαθέτει λειτουργικό πλαίσιο ανάγνωσης (περίπτωση επιχιασμού 1) είτε όχι (περίπτωση επιχιασμού 2). Στην περίπτωση του διπλού επιχιασμού (περίπτωση 1+2) έχουμε διακοπή του *recA* γονιδίου από το *catE*.

3.1.3 Μελέτη της σταθερότητας και των παραμέτρων αύξησης καλλιέργειών του UA1

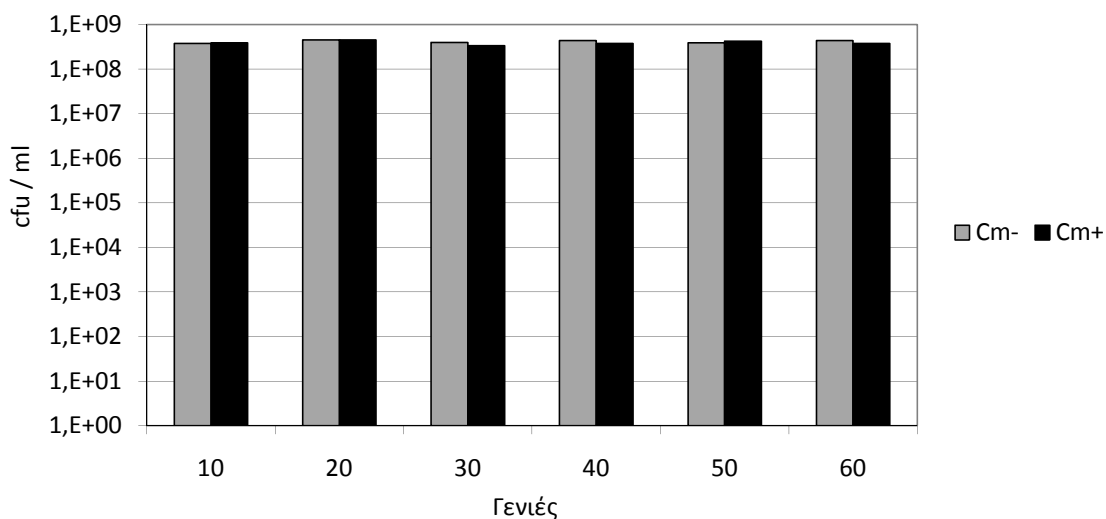
Στη συνέχεια στόχος ήταν να ελεγχθεί αν το στέλεχος UA1 είναι σταθερό ή επανέρχεται στο φυσικό τύπο αποβάλλοντας την εισδοχή του γονιδίου *catE*. Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι Παράγραφο 2.5 και τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στην Εικόνα 3.1.11.

Παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος είναι 100% σταθερό και διατηρεί την ανθεκτικότητα σε χλωραμφαινικόλη απουσία επιλογής για πάνω από 50 γενιές.

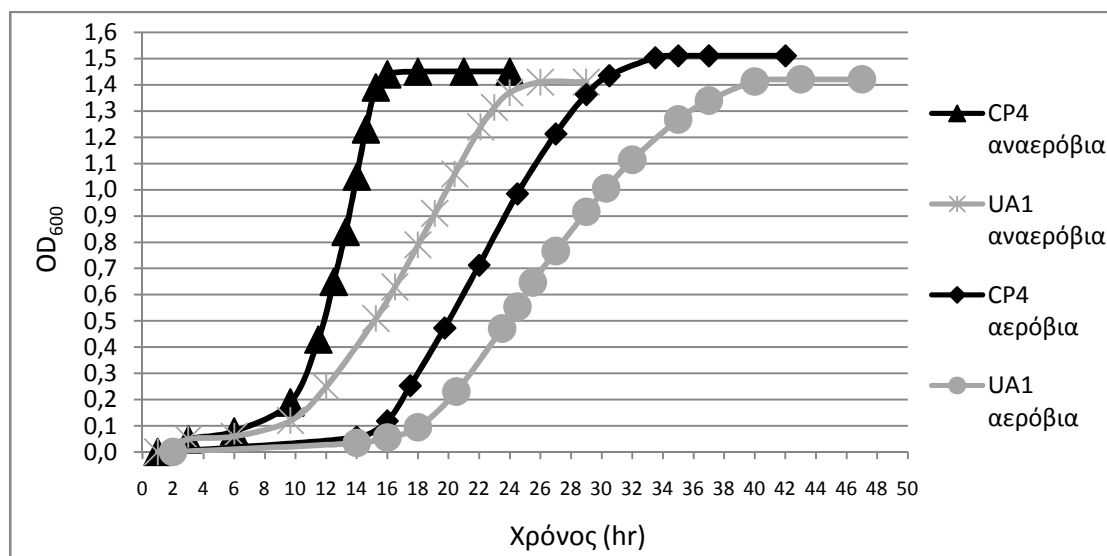
Στην συνέχεια, μελετήθηκε η αύξηση του στελέχους UA1 σε σύγκριση με του CP4 σε ασυνεχείς καλλιέργειες (batch) και διαφορετικές συνθήκες: αερόβια και αναερόβια ανάπτυξη σε πλήρες θρεπτικό υλικό CM και αναερόβια αύξηση σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό MM (Εικόνες 3.1.12 και 3.1.13 αντίστοιχα).

Σε όλες τις συνθήκες ανάπτυξης που δοκιμάστηκαν, το UA1 είχε πιο αργή ανάπτυξη από το πατρικό CP4. Συγκεκριμένα, το CP4 σε αναερόβιες συνθήκες με πλήρες θρεπτικό εμφάνισε χρόνο διπλασιασμού 1.9 ώρες ενώ αντίστοιχως το UA1 4.3 ώρες. Σε αερόβιες συνθήκες, το CP4 εμφάνισε χρόνο 4.8 ώρες ενώ το UA1 6.5 ώρες, και σε αναερόβιες με ελάχιστο θρεπτικό οι χρόνοι ήταν 6 ώρες και 9 ώρες αντίστοιχα.

3. Αποτελέσματα

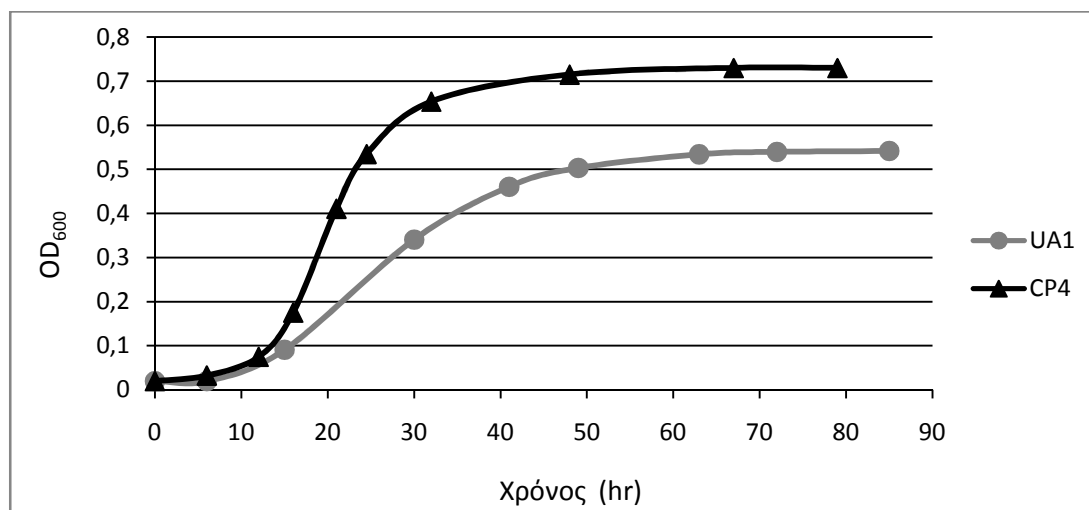


Εικόνα 3.1.11. Αριθμοί κυττάρων UAI ανά ml καλλιέργειας σε συνεχείς ανακαλλιέργειες του στελέχους σε θρεπτικό υλικό CM με (μαύρες μπάρες) και χωρίς (γκρι) επιλογή σε χλωραμφαινικόλη (Cm).



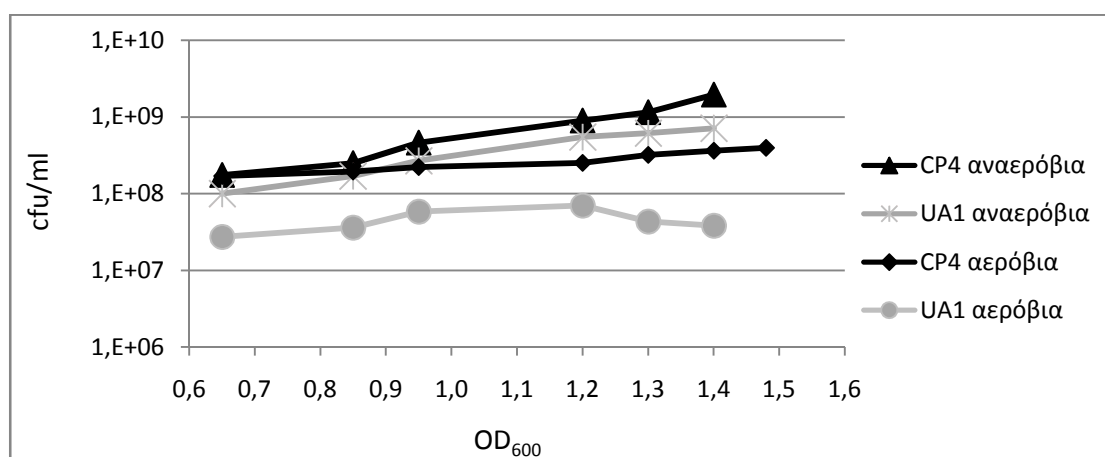
Εικόνα 3.1.12. Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών CP4 (μαύρες καμπύλες) και UA1 (γκρι) σε αναερόβιες (τρίγωνο: CP4, X: UA1) και αερόβιες (κόννος: CP4, κύκλος: UA1) ασυνεχείς καλλιέργειες με πλήρες θρεπτικό υλικό CM.

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.1.13. Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών CP4 (μαύρη) και UA1 (γκρι) σε αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες με ελάχιστο θρεπτικό υλικό MM.

Παράλληλα, ελέχθησαν οι αριθμοί των κυττάρων των δύο στελεχών σε ασυνεχείς καλλιέργειες αερόβιας και αναερόβιας ανάπτυξης με πλήρες θρεπτικό υλικό CM (Εικόνα 3.1.10).



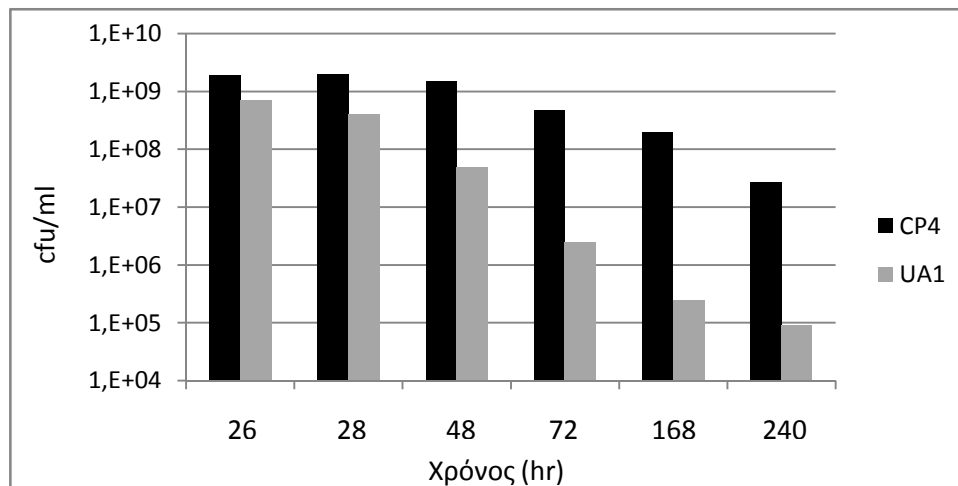
Εικόνα 3.1.14. Αριθμοί κυττάρων ανά ml καλλιέργειας για τα στελέχη CP4 (μαύρες καμπύλες) και UA1 (γκρι) σε διαφορετικές OD₆₀₀ από αναερόβιες (τρίγωνο: CP4, X: UA1) και αερόβιες (κώνος: CP4, κύκλος: UA1) ασυνεχείς καλλιέργειες με πλήρες θρεπτικό υλικό CM.

Οι αριθμοί των κυττάρων του UA1 είναι χαμηλότεροι από του CP4: από 1.8 (OD₆₀₀: 0.6) έως 3 φορές (OD₆₀₀: 1.4) χαμηλότεροι σε αναερόβιες καλλιέργειες και από 4 (OD₆₀₀: 0.9) έως 10 φορές (OD₆₀₀: 1.4) χαμηλότεροι σε αερόβιες καλλιέργειες

Παρατηρήθηκε ότι ανακαλλιέργειες του UA1 με εμβόλιο 0,1% w/w από προκαλλιέργειες που είχαν φτάσει σε προχωρημένη στασιμότητα, καθυστερούσαν αρκετά να εισέλθουν στην εκθετική φάση, σε σύγκριση με καλλιέργειες που το

3. Αποτελέσματα

εμβόλιο προερχόταν από προκαλλιέργεια σε εκθετική φάση. Το ίδιο φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση του CP4. Για αυτό το λόγο, έγινε μέτρηση κυττάρων σε αναερόβιες καλλιέργειες CP4 και UA1 με πλήρες θρεπτικό υλικό από την φάση στασιμότητας και σε προχωρημένη στασιμότητα (Εικόνα 3.1.11).



Εικόνα 3.1.15. Αριθμοί κυττάρων ανά ml καλλιέργειας για τα στελέχη CP4 (μαύρες μπάρες) και UA1 (γκρι) σε προχωρημένη στασιμότητα. Στον άξονα x'x δηλώνονται οι ώρες ανάπτυξης από τον εμβολιασμό των καλλιεργειών.

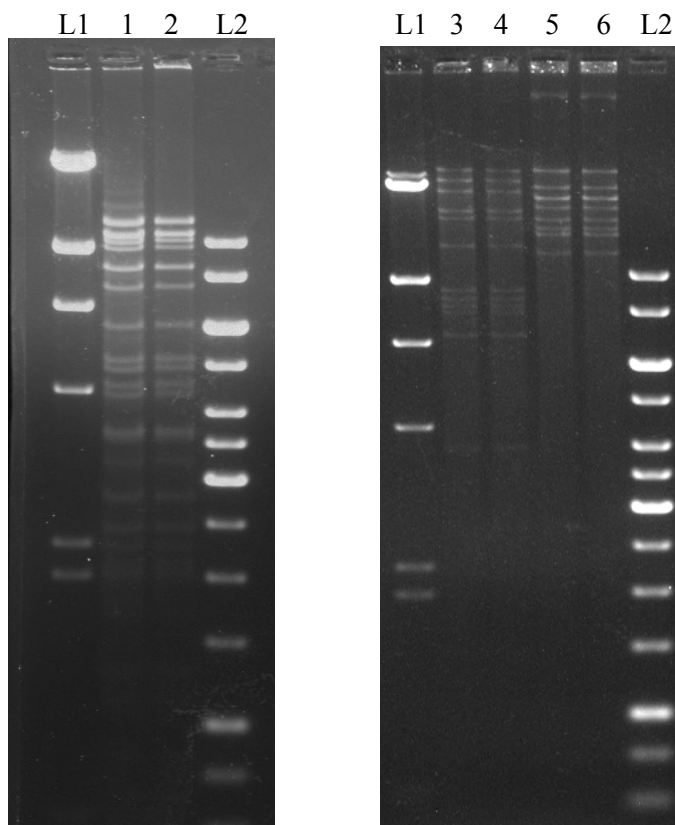
Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα του UA1 είναι λιγότερο βιώσιμα από αυτών του CP4 σε παρατεταμένη στασιμότητα. Ήδη 4 ώρες μετά την είσοδο στην στασιμότητα (28 ώρες) στο UA1 εμφανίζεται πτώση στο ~60% του αριθμού των κυττάρων, και 24 ώρες μετά οι αριθμοί του UA1 έχουν πέσει μία δεκαδική τάξη, ενώ του CP4 παραμένουν σχεδόν ίδιοι. 2 μέρες μετά την έναρξη στασιμότητας, ενώ το UA1 έχει σημειώσει πτώση 2 δεκαδικών τάξεων, συγκριτικά το CP4 σημειώνει πτώση στο ~20% .

3.1.4 Το πλασμιδιακό προφίλ του UA1 σε σύγκριση με του CP4

Για να ελεγχθεί ότι το πλασμιδιακό προφίλ του UA1 είναι ίδιο με του πατρικού στελέχους CP4, έγινε πλασμιδιακή απομόνωση από τα στελέχη CP4 και UA1 και πέψη του πλασμιδιακού DNA με τρία διαφορετικά ένζυμα (Εικόνα 3.1.16).

Παρατηρήθηκε με τα περιοριστικά πρότυπα τριών διαφορετικών πέψεων ότι το πλασμιδιακό προφίλ του UA1 είναι το ίδιο με του πατρικού στελέχους CP4.

3. Αποτελέσματα

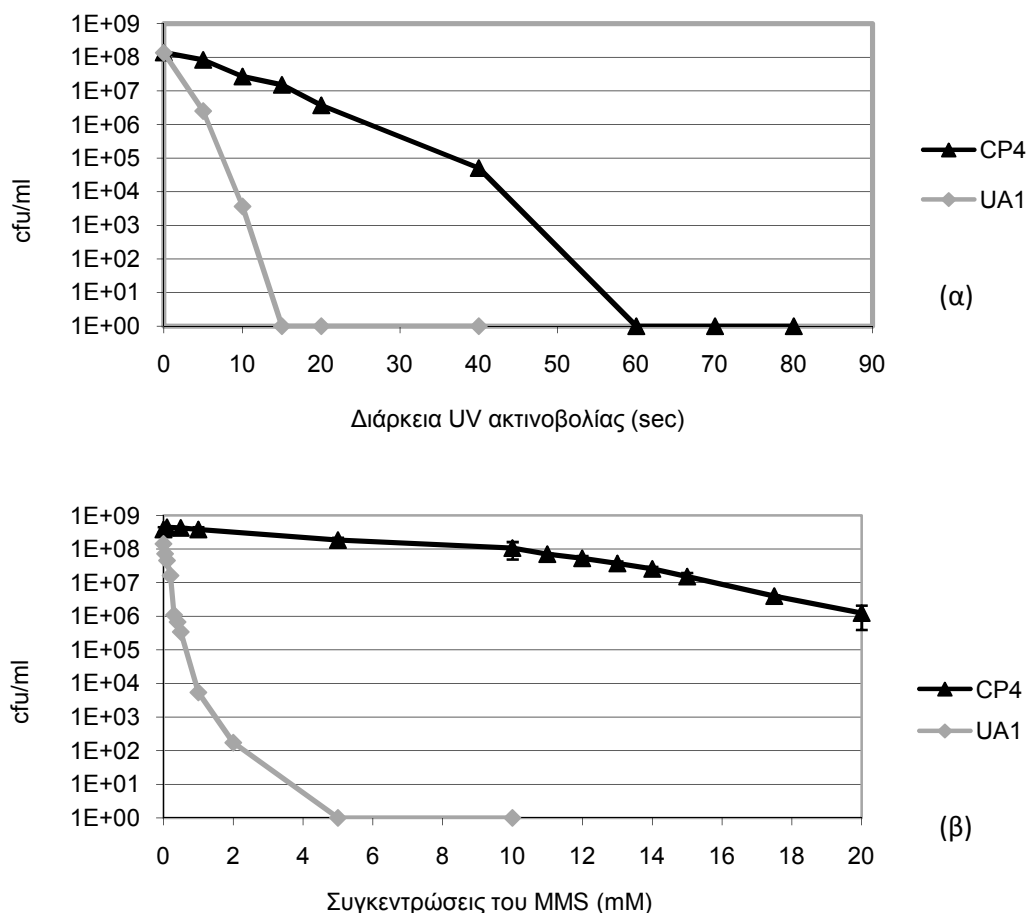


Εικόνα 3.1.16. Περιοριστική ανάλυση των πλασμιδιακών DNAs του CP4 (διαδρομές 1, 3 και 5) και UA1 (διαδρομές 2, 4 και 6). L1: λHindIII ladder (Fermentas), L2: δείκτης 1 kb ladder (Fermentas), διαδρομές 1 και 2: EcoRI πέψεις, 3 και 4: KpnI πέψεις, 5 και 6: SacII πέψεις.

3.1.5 Μελέτη της βιωσιμότητας του UA1 παρουσία μεταλλαξογόνων παραγόντων

Τα *recA* στελέχη είναι ευαίσθητα σε μεταλλαξογόνους παράγοντες, όπως η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία και ο αλκυλιωτικός παράγοντας MMS, δύο παράγοντες που επάγουν και την SOS απόκριση στα βακτήρια (Radman 1975, Witkin 1976, d' Aji 1985, Kowalczykowski et al. 1994). Για να ελεγχθεί αν το UA1 στέλεχος είναι ευαίσθητο σε αυτούς τους μεταλλαξογόνους παράγοντες, έγινε δοκιμασία των στελεχών CP4 και UA1 σε αυξανόμενες δόσεις UV ακτινοβολίας και σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις MMS (Εικόνα 3.1.13).

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.1.17. Καμπύλες μεταλλαξογένεσης των στελεχών CP4 (μαύρη καμπύλη) και UA1 (γκρι) υπό την επίδραση UV ακτινοβολίας (α) και του αλκυλιωτικού μεταλλαξογόνου παράγοντας MMS (β).

Από τις καμπύλες μεταλλαξογένεσης φάνηκε η μεγάλη ευαισθησία του UA1 στους δύο μεταλλαξογόνους παράγοντες. Στην UV ακτινοβολία, οι αριθμοί κυττάρων του UA1 εμφανίζουν πτώση 5 δεκαδικών τάξεων στα πρώτα 10 δευτερόλεπτα ενώ πεθαίνουν στα 15 δευτερόλεπτα ακτινοβολίας. Αντιθέτως, οι αριθμοί κυττάρων του CP4 εμφανίζουν πτώση μία δεκαδικής τάξης στα 15 δευτερόλεπτα και θάνατο στα 60 δευτερόλεπτα ακτινοβολίας. Αντιστοίχως για την επίδραση με MMS, οι αριθμοί κυττάρων του UA1 εμφανίζουν πτώση 6 δεκαδικών τάξεων στα 2 mM MMS και πεθαίνουν στα 5 mM MMS, ενώ οι αριθμοί κυττάρων του CP4 δείχνουν πτώση 2 δεκαδικών τάξεων στην μέγιστη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (20 mM MMS).

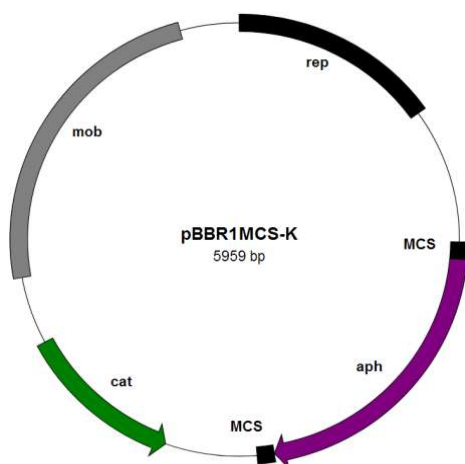
3.1.6 Μελέτη της δεκτικότητας του στελέχους UA1 σε φορείς κλωνοποίησης

Τα *recA*⁻ στελέχη αξιοποιούνται για σκοπούς γενετικής μηχανικής εφόσον δεν προκαλούν ανακατατάξεις ξένων τμημάτων DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Bolivar *et al.* 1977, Radding 1978, Kowalczykowski *et al.* 1994). Για να μπορεί να αξιοποιηθεί ομοίως το UA1, ενδιέφερε να δειχθεί αν και πόσο εύκολα μπορεί να προσλάβει φορείς κλωνοποίησης και εισαγωγή γονιδίων που καθιερωμένα χρησιμοποιούνται στο *Z. mobilis*.

3. Αποτελέσματα

3.1.6.1 Μελέτης της δεκτικότητας του στελέχους UA1 σε πειράματα μετασχηματισμού

Για την μελέτη της δεκτικότητας του UA1, αξιοποιήθηκε ο φορέας pBBR1MCS (Kovach *et al.* 1994). Ο pBBR1MCS είναι φορέας ευρέος φάσματος ξενιστών μεγέθους 4,7 kb, διαθέτει *mob* περιοχή για την συζευκτική παρακίνησή τους καθώς και *lacZa* γονίδιο με πολυσύνδεσμο (polylinker). Έχει αποδειχθεί στο εργαστήριό μας ότι εισέρχεται σε κύτταρα στελεχών του *Z. mobilis* με μεγάλη συχνότητα μετασχηματισμού και είναι σχετικά σταθερός στον οργανισμό (Tampakoroulou *et al.*, MBK6 Conference 2015). Σαν δείκτη επιλογής φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη, που το έκανε ακατάλληλο για χρήση σε πειράματα με το UA1, εφόσον το στέλεχος διαθέτει την εν λόγω ανθεκτικότητα (ένθεση του *catE* εντός του *recA*). Για να υπάρξει δυνατότητα επιλογής του pBBR1MCS εντός του UA1, έγινε κλωνοποίηση του γονιδίου *aphA1*, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα σε καναμυκίνη και προέρχεται από το μεταθετό στοιχείο Tn903, το οποίο γονίδιο ελήφθη σαν *SalI*-τιμήμα 1252 bp από το pUC4K (Pharmacia Biotech) και εισήχθη στην *SalI* περιοριστική θέση του πολυσύνδεσμου του pBBR1MCS (Εικόνα 3.1.18).



Εικόνα 3.1.18. Χάρτης του πλασμιδίου pBBR1MCS-K (6 kb). Διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη (*cat*, πράσινο), ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη (*aph*, μοβ), περιοχή παρακίνησης από *TraP*-τύπου συζευκτικά πλασμίδια (*mob*, γκρι), περιοχή αναδιπλασιασμού (*rep*, μαύρο) και πολυσύνδεσμο (*MCS*).

Επειδή το *Z. mobilis* εμφανίζει μερική ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη συναρτήσει της συγκέντρωσης αυτής ή του πληθυσμού των κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν μετασχηματισμοί του CP4 και UA1 μέσω ηλεκτροδιάτρησης σε κλίμακα συγκεντρώσεων της καναμυκίνης ως προς τη μείωση των υποβάρων (Πίνακας 3.1.1).

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.1.1. Αριθμοί μετασηματισμένων κυττάρων CP4 και UA1 και υποβάθρων σε πειράματα μετασηματισμού μέσω ηλεκτροδιάτρησης με 100 ng του φορέα pBBR1MCS-K και επιλογή σε διαφορετικές συγκεντρώσεις καναμυκίνης

Συγκέντρωση καναμυκίνης (μg/ml)	CP4		UA1	
	Μετασηματισμένα κύτταρα (κύτ./ml)	Υπόβαθρα (κύτ./ml)	Μετασηματισμένα κύτταρα (κύτ./ml)	Υπόβαθρα (κύτ./ml)
100	$4,83 \times 10^4$	$2,20 \times 10^3$	$3,35 \times 10^3$	$1,00 \times 10^2$
125	$7,00 \times 10^4$	$2,80 \times 10^2$	$1,82 \times 10^3$	$1,40 \times 10^2$
150	$4,95 \times 10^4$	$6,00 \times 10^1$	$5,88 \times 10^3$	$4,00 \times 10^1$
175	$4,00 \times 10^4$	$3,00 \times 10^1$	$4,48 \times 10^3$	$2,00 \times 10^1$

Διαπιστώθηκε ότι ήδη από την συγκέντρωση των 150 μg/ml οι διαφορές στα αληθώς μετασηματισμένα κύτταρα ως προς τα υπόβαθρα ήταν αξιοσημείωτη (10^3 και 10^2 φορές περίπου για τα CP4 και UA1 αντίστοιχα), αλλά εφόσον δεν υπήρχε ένδειξη πτώσης στη μετασηματιστική απόδοση, επιλέχθηκαν τα 175 μg/ml σαν συγκέντρωση επιλογής.

Ένας ακόμη φορέας που είναι σταθερός σε στελέχη του *Z. mobilis* (Galeros *et al.* 2001) είναι το pSUP104. Το pSUP104 (Priefer *et al.* 1985) είναι ένα φορέας ευρέος φάσματος ξενιστών μεγέθους 9,5 kb που φέρει τις περιοχές παρακίνησης (*mob*) και διπλασιασμού (*oriV*, *rep*) από τον IncQ φορέα RSF1010. Σε σύγκριση με το pBBR1MCS εισέρχεται σε κύτταρα *Z. mobilis* με χαμηλότερες συχνότητες μετασηματισμού, όπως φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 3.1.2), και επιλέγεται σε τετρακυκλίνη, δείκτης στον οποίο δεν σημειώνονται υπόβαθρα του *Z. mobilis*.

Για την τελική παραμετροποίηση της δεκτικότητας του UA1, τα πλασμίδια pBBR1MCS-K και pSUP104 εισήχθησαν σε κύτταρα CP4 και UA1 με μετασηματισμό μέσω ηλεκτροδιάτρησης (Πίνακας 3.1.2). Καταμετρήθηκαν επιτυχώς μετασηματισμένες αποικίες τόσο του CP4 όσο και του UA1 με το pBBR1MCS-K. Με τον συγκεκριμένο φορέα, τα κύτταρα του UA1 μετασηματίζονται με 4 έως και 10 φορές χαμηλότερες συχνότητες από του CP4, και με αποδόσεις 8 έως 20 φορές χαμηλότερες από του CP4. Στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε το pSUP104, πάρθηκαν μετασηματισμένες αποικίες μόνο του CP4 και καθόλου του UA1 σε καμία από τις 3 προσπάθειες (στον Πίνακα 3.1.2 αναγράφονται μέσοι όροι από τριών επαναλήψεων του πειράματος). Οι συχνότητες μετασηματισμού του CP4 με το pSUP104 ήταν κατά τρεις δεκαδικές τάξεις χαμηλότερες από τις αντίστοιχες με το pBBR1MCS-K.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.1.2. Συχνότητες και αποδόσεις μετασχηματισμού μέσω ηλεκτροδιατήρησης των στελεχών CP4 και UA1 με τα πλασμίδια pBBR1MCS-K και pSUP104

Φορέας	Συχνότητες μετασχηματισμού (μετασχ. κύτ. / κύτ. ολικά)		Αποδόσεις μετασχηματισμού (μετασχ. κύτ. / μg DNA)	
	<i>Z. mobilis</i> CP4	<i>Z. mobilis</i> UA1	<i>Z. mobilis</i> CP4	<i>Z. mobilis</i> UA1
pBBR1MCS-K	$4,26 \times 10^{-5}$	$6,78 \times 10^{-6}$	$5,32 \times 10^5$	$4,72 \times 10^4$
pSUP104	$3,33 \times 10^{-8}$	0	$1,20 \times 10^2$	0

3.1.6.2 Μελέτης της δεκτικότητας του στελέχους UA1 σε πειράματα σύζευξης

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ικανότητα του UA1 ως συζευκτικούς δέκτη σε TraP-βοηθούμενες συζεύξεις. Για το σκοπό αυτό, τα πλασμίδια pBBR1MCS-K και pSUP104 εισήχθησαν ξεχωριστά στο συζευκτικός στέλεχος *E. coli* S17.1 (Simon *et al.* 1983) μέσω χημικού μετασχηματισμού. Το στέλεχος S17.1 είναι ένα στέλεχος που χρησιμοποιείται για την TraP-παρακίνηση πλασμιδίων επειδή φέρει ενσωματωμένο στο χρωμόσωμά του το IncP πλασμίδιο RP4.

Παράλληλα, δοκιμάστηκε και η συζευκτική μεταφορά του συζευκτικού πλασμιδίου pRK2013 (Figurski & Helinski 1979) σε κύτταρα CP4 και UA1. Το pRK2013 είναι ένα πλασμίδιο που μπορεί συζευκτικά να παρακινηθεί από μόνο του ή να παρακινήσει άλλους φορείς γιατί περιέχει τα συζευκτικά γονίδια από το IncP πλασμίδιο RK2. Δεν μπορεί να σταθεροποιηθεί στα στελέχη του *Z. mobilis*, δύναται όμως να δώσει μετασυζευγμένες αποικίες σε τρυβλία επιλογής. Για την επιλογή μετασυζευγμένων αποικιών τόσο με το pBBR1MCS-K όσο και με το pRK2013 χρησιμοποιήθηκε καναμυκίνη σε συγκέντρωση $175 \mu\text{g/ml}$.

Τα αποτελέσματα των συζευκτικών μεταφορών με δότες τα S17.1(pBBR1MCS-K), S17.1(pSUP104) και DH5 α (pRK2013) και δέκτες τα στελέχη CP4, UA1 και *E. coli* RW96 (θετικός μάρτυρας) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.3.

Παρατηρήθηκε ότι το UA1 υπήρξε επιτυχής δέκτης των πλασμιδίων των στελεχών S17.1(pBBR1MCS-K) και DH5 α (pRK2013) εφόσον και στις δύο περιπτώσεις καταμετρήθηκαν επιτυχώς μετασυζευγμένες αποικίες και συγκεκριμένα με συχνότητες 10 φορές χαμηλότερες (για την περίπτωση του pBBR1MCS-K) ή ίσες (για την περίπτωση του pRK2013) με του CP4. Το πλασμίδιο pSUP104 δεν φάνηκε να εισέρχεται συζευκτικά στο UA1, ενώ στο CP4 έδωσε συχνότητες ίδιας τάξης μεγέθους με του pBBR1MCS-K.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.1.3. Αποτελέσματα συζευκτικών μεταφορών των πλασμιδίων pBBR1MCS-K, pRK2013 και pSUP104 εντός κυττάρων των στελεχών *Z. mobilis* CP4, UA1 και *E. coli* RW96

Δότες <i>E. coli</i>	Συζευκτικές συχνότητες (μετασυζ. κύτ. /σύνολο κυττάρων δέκτη)		
	Δέκτες		
	<i>Z. mobilis</i> CP4	<i>Z. mobilis</i> UA1	<i>E. coli</i> RW96 (θετικός μάρτυρας)
S17.1(pBBR1MCS-K)	$8,30 \times 10^{-5}$	$5,00 \times 10^{-6}$	$1,50 \times 10^{-2}$
DH5α(pRK2013)	$7,60 \times 10^{-5}$	$8,60 \times 10^{-5}$	nt
S17.1(pSUP104)	$5,60 \times 10^{-5}$	0	nt

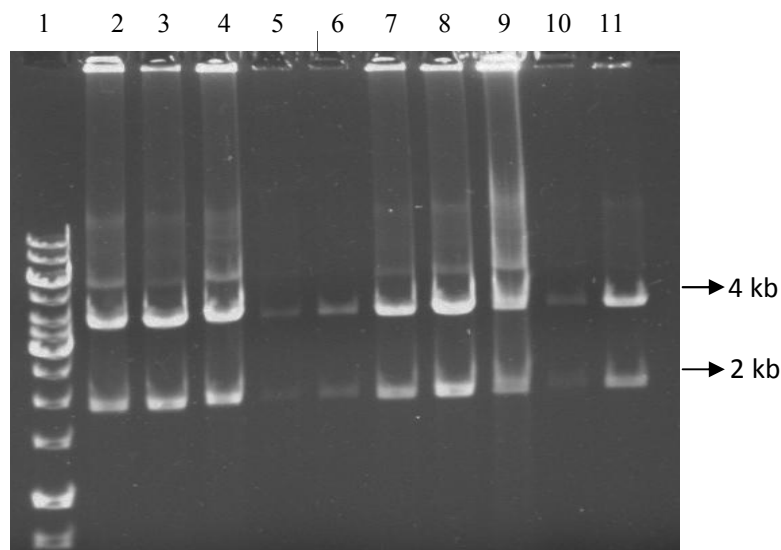
nt: δεν δοκιμάστηκε

Επόμενος στόχος ήταν η μοριακή επιβεβαίωση της εισαγωγής του pBBR1MCS-K στα κύτταρα των CP4 και UA1. Απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από τις μετασηματισμένες αποικίες του CP4 και UA1 με το pBBR1MCS-K, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον μετασηματισμό κυττάρων DH5α (back transformation). Μετασηματισμένες DH5α αποικίες (back transformants) προέκυψαν μόνο με το πλασμιδιακό DNA από τις CP4(pBBR1MCS-K) αποικίες. Από τις τελευταίες, εννιά χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση DNA και περιοριστική ανάλυση με *EcoRI*, η οποία παράγει 2 διακριτές ζώνες: 1 στα 1994 bp, που συμπεριλαμβάνει το γονίδιο *aphA1*, και μία στα 3965 bp (Εικόνα 3.1.19). Παρατηρήθηκε ότι το πρότυπο του πλασμιδιακού DNA από τις μετασηματισμένες DH5α αποικίες ήταν το ίδιο με το πρότυπο του pBBR1MCS-K.

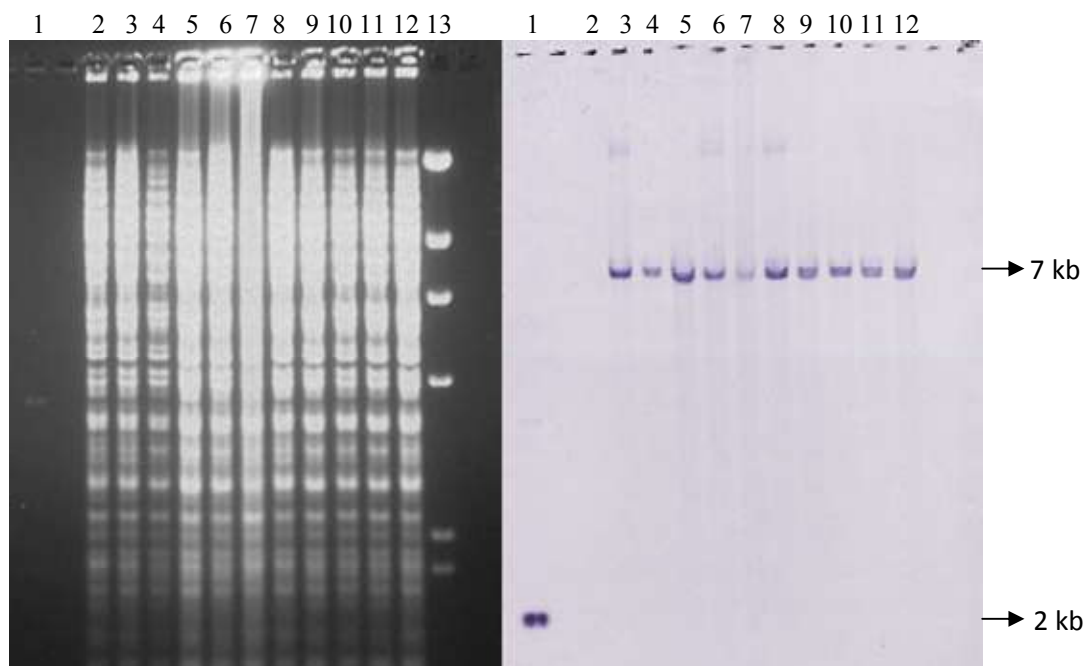
Επειδή δεν προέκυψαν μετασηματισμένες DH5α αποικίες με το πλασμιδιακό DNA από UA1(pBBR1MCS-K) σε καμία επανάληψη του πειράματος, και για να ελεγχθεί η εισαγωγή του pBBR1MCS-K, έγινε υβριδισμός κατά Southern, χρησιμοποιώντας το γονίδιο *aphA1* σαν ιχνηθέτη, σε *EcoRI*-κομμένο ολικό DNA απομονωμένο από 10 UA1(pBBR1MCS-K) μετασηματισμένες αποικίες (Εικόνα 3.1.20).

Στον μάρτυρα pBBR1MCS-K εντοπίζεται σήμα υβριδισμού σε μία ζώνη μεγέθους περίπου 2 kb, ενώ στις μετασηματισμένες UA1 αποικίες, εντοπίζεται αντιθέτως, σήμα σε μία ζώνη μεγέθους 7 kb, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι το pBBR1MCS-K δεν είναι ελεύθερο και μπορεί να έχει ανασυνδυαστεί εντός αυτών των κυττάρων.

3. Αποτελέσματα



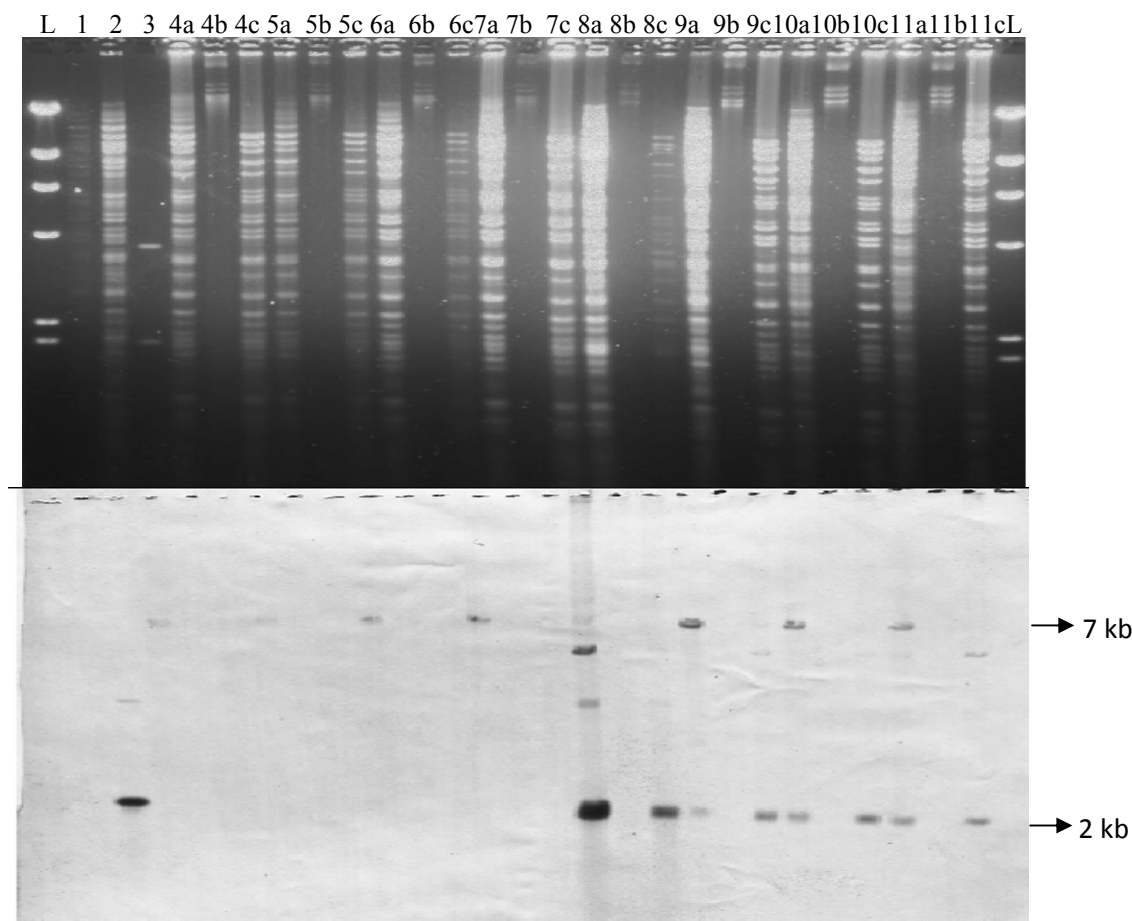
Εικόνα 3.1.19. Περιοριστικό πρότυπο του πλασμιδιακού DNA αποικιών DH5α που μετασηματίστηκαν με πλασμιδιακό DNA από CP4(pBBR1MCS-K) στελέχη. Διαδρομές 1: 1 kb ladder (Fermentas), 2-10: EcoRI πέψεις των πλασμιδιακών DNAs από τις μετασηματισμένες DH5α αποικίες, 11: EcoRI πέψη του pBBR1MCS-K (μάρτυρας).



Εικόνα 3.1.20. Υβριδισμός κατά Southern σε ολικά DNAs απομονωμένα από UAI(pBBR1MCS-K) μετασηματισμένες αποικίες και κομμένα με EcoRI καθώς και μάρτυρες. Διαδρομές 1: pBBR1MCS-K (θετικός μάρτυρας), 2: ολικό DNA από κύτταρα UAI (αρνητικός μάρτυρας), 3-12: ολικά DNAs από τις μετασηματισμένες UAI αποικίες, 13: λHindIII ladder (Fermentas).

3. Αποτελέσματα

Διεξοδικότερη μελέτη της τύχης του pBBR1MCS-K εντός των κυττάρων του UA1 έγινε σε υβριδισμούς κατά Southern χρησιμοποιώντας ολικά DNAs, κομμένα με *EcoRI*, και πλασμιδιακά DNAs, άκοπα και κομμένα με *EcoRI*, από μετασηματισμένες και μετασυζευγμένες αυτή τη φορά αποικίες του UA1 με το pBBR1MCS-K. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα DNAs από αποικία CP4(pBBR1MCS-K) που έδωσε DH5a back transformants, ενώ το γονίδιο *aphA1* σαν ιχνηθέτης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 3.1.21.



Εικόνα 3.1.21. Υβριδισμός κατά Southern σε ολικά DNAs, κομμένα με *EcoRI*, και πλασμιδιακά DNAs, άκοπα και κομμένα με *EcoRI*, από UA1(pBBR1MCS-K) μετασηματισμένες και μετασυζευγμένες αποικίες και μάρτυρες. L λHindIII ladder (Fermentas).. Διαδρομές 1: ολικό DNA από CP4 (αρνητικός μάρτυρας), 2: ολικό DNA από UA1 (αρνητικός μάρτυρας), 3: pBBR1MCS-K (θετικός μάρτυρας), 4-7: DNAs από μετασηματισμένες UA1(pBBR1MCS-K) αποικίες, 8: DNAs από CP4(pBBR1MCS-K), 9-11: DNAs από μετασυζευγμένες UA1(pBBR1MCS-K) αποικίες. a: *EcoRI*-κομμένα ολικά DNAs, b: άκοπα πλασμιδιακά DNAs, c: *EcoRI*-κομμένα πλασμιδιακά DNAs.

3. Αποτελέσματα

Στην περίπτωση του μάρτυρα CP4(pBBR1MCS-K) (Διαδρομές 8a και 8c, Εικόνα 3.1.21), παρατηρήθηκε η γνωστή ζώνη υβριδισμού στα 2 kb, τόσο στο κομμένο ολικό DNA όσο και στο κομμένο πλασμιδιακό DNA. Η ζώνη αυτή είναι ίδιου μεγέθους με την ζώνη των ~2 kb του μάρτυρα pBBR1MCS-K, όπως συζητήθηκε προηγουμένως. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν στο ίδιο στέλεχος και ζώνες ανώτερων μοριακών βαρών που πιθανόν προέρχονται από άκοπες ή υπερελιγμένες δομές του pBBR1MCS-K. Πιθανόν αυτή η ζώνη να προέρχεται από άκοπο ή γραμμικό pBBR1MCS-K.

Στην περίπτωση των μετασηματισμένων αποικιών του UA1 εμφανίζεται σήμα υβριδισμού μόνο στο κομμένο ολικό DNA σε μία ζώνη των 7 kb, όπως προηγουμένως (Εικόνα 3.1.20). Ωστόσο, στην περίπτωση των μετασυζευγμένων αποικιών, πλέον αυτού του σήματος εμφανίζεται και σήμα στα 2 kb στις διαδρομές του κομμένου ολικού και πλασμιδιακού DNA (ίδιου με αυτού του μετασηματισμένου CP4 και του pBBR1MCS-K). Να σημειωθεί ότι το DNA από τις μετασυζευγμένες αποικίες του UA1 πάρηκε μετά από την πρώτη ανακαλλιέργεια (~10 γενιές) ενώ από τις μετασηματισμένες αποικίες μετά από την τρίτη ανακαλλιέργεια (~30 γενιές). Φαίνεται, λοιπόν, ότι το pBBR1MCS-K εισέρχεται στο UA1 και πιθανόν με την πάροδο των γενεών τείνει να ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα.

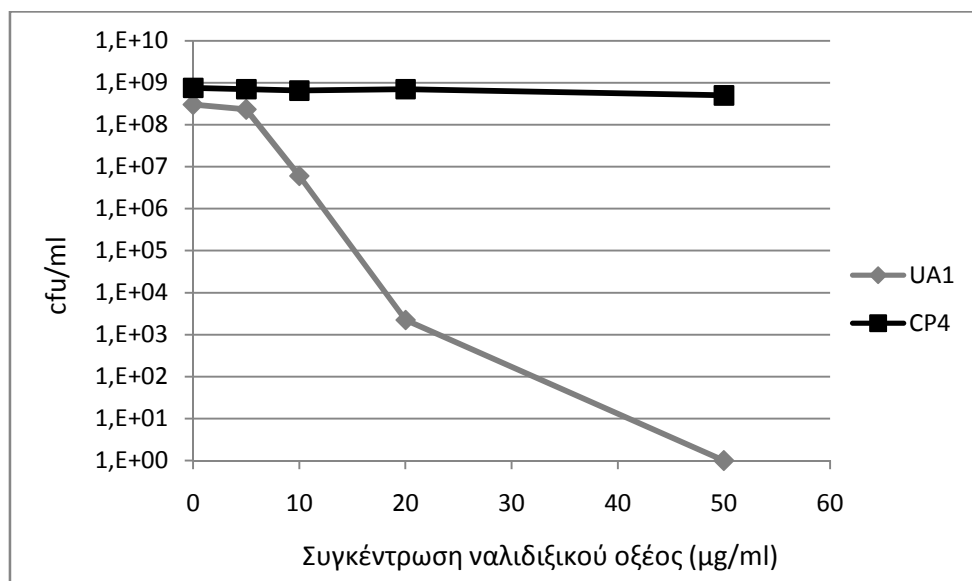
Είναι ενδιαφέρον ότι σε αυτόν τον υβριδισμό δεν παρατηρήθηκε σήμα στα άκοπα πλασμιδιακά DNAs όπως αναμενόταν, πιθανόν λόγω ισχνής υβριδοποίησης του ιχνηθέτη με το υπερελιγμένο DNA. Χαρακτηριστικό παράδειγμα προς ενίσχυση αυτού αποτελεί η περίπτωση του μετασηματισμένου CP4 στελέχους, στο οποίο επίσης έπρεπε να παρατηρηθεί ζώνη υβριδισμού για το άκοπο pBBR1MCS-K, εφόσον το τελευταίο και είναι παρόν και μετασηματίζει στη συνέχεια κύτταρα DH5α.

3.1.7. Μελέτη της ευαισθησίας του UA1 στο ναλιδιξικό οξύ

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων σύζευξης, βρέθηκε άλλος ένας *recA* φαινότυπος του UA1: αυτός της ευαισθησίας σε ναλιδιξικό οξύ. Το ναλιδιξικό οξύ είναι αντιβιοτικό που καταστέλλει την DNA γυράση και παρεμποδίζει την αντιγραφή του DNA (Goss *et al.* 1965, Sugino *et al.* 1977, Aldred *et al.* 2014). Η DNA γυράση κατά το έργο της δημιουργεί δίκλωνα σπασίματα. Με το ναλιδιξικό οξύ να παρεμποδίζει την γυράση, τα δίκλωνα σπασίματα με την σειρά τους παρεμποδίζουν την αντιγραφή του DNA και σαν αποτέλεσμα επάγεται η SOS απόκριση (Newmark *et al.* 2004, Aldred *et al.* 2014).

Το ναλιδιξικό οξύ χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα σύζευξης για την ανάσχεση του *E. coli* S17.1, που είναι ευαίσθητο στο ναλιδιξικό οξύ, στα τρυβλία επιλογής μετασυζευγμένων *Z. mobilis* αποικιών. Φάνηκε ότι ενώ το CP4 είναι ανθεκτικό σε συγκέντρωση ναλιδιξικού οξέος 50 μg/ml, το UA1 πεθαίνει στην αντίστοιχη συγκέντρωση. Ακολούθησε έλεγχος βιωσιμότητας του UA1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ναλιδιξικού οξέος για περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου (Εικόνα 3.1.22).

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.1.22. Καμπύλη βιωσιμότητας των στελεχών CP4 και UA1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ναλιδιξικού οξέος.

Παρατηρήθηκε ευαισθησία και πτώση βιωσιμότητας των κυττάρων του UA1 με την αύξηση των συγκεντρώσεων του ναλιδιξικού οξέος. Μόνο στην συγκέντρωση των 5 μg/ml ο αριθμός των κυττάρων του UA1 ήταν σχεδόν ίσος με τον αριθμό των κυττάρων απουσία του. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 5 μg/ml, που παραμένει να είναι δραστική εναντίον του S17.1, ως η καταλληλότερη για την απαλοιφή των στελεχών-δοτών στα πειράματα σύζευξης.

3.1.8. Μελέτη της έλλειψης λειτουργιών ομόλογου ανασυνδυασμού στο UA1

Για να ελεγχθούν λειτουργίες ομόλογου ανασυνδυασμού στο UA1 χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pUA8 (Παππά 1997). Το pUA8 βασίζεται στον ασταθή για το *Z. mobilis* φορέα pSUP203 (Simon *et al.* 1983) στον οποίον έχει κλωνοποιηθεί στην *Bam*HI περιοριστική θέση τμήμα 8 kb από το φυσικό πλασμίδιο του CP4 pCP4.2 (αριθμός GenBank EU709732). Το 8 kb-τμήμα αυτό προέρχεται από τμήμα του γονιδίου pCP4.2_p28 που κωδικοποιεί έναν μεγαλομοριακό μεταφορέα που περιέχει πολλαπλές δομές β-βαρελίων και σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας φέρει πολλαπλές ευθείες επαναλήψεις. Παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου (Παππά 1997) έδειξαν ότι το pUA8 σταθεροποιείται εντός των κυττάρων του CP4, σε σύγκριση με το pSUP203 που οδηγείται σε άμεση απώλεια από τα κύτταρα. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα CP4(pUA8) στελέχη και μετασχηματισμός κυττάρων DH5α με αυτό το DNA έδειξε ότι το pUA8 διασώζεται εντός των κυττάρων του CP4 με τον σχηματισμό σύνθετης δομής (cointegrate) με το pCP4.2. Δεν αποκλείεται με μεγάλη πιθανότητα οι πολλαπλές ευθείες επαναλήψεις του τμήματος αυτού να λειτουργούν ως παγίδα ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ του pUA8 και του pCP4.2 σχηματίζοντας σύνθετη δομή pUA8::pCP4.2, και διασώζοντας το pUA8 εντός του CP4. Οι πολλαπλές επαναλήψεις ως γνωστό είναι τα πλέον πρόσφορα υποστρώματα για ομόλογο ανασυνδυασμό (Bzymek & Lovett 2001). Τα χαρακτηριστικά αυτά του pUA8 και της διάσωσής του εξαιτίας του ενθέματός του, το κατέστησαν κατάλληλο εργαλείο για την απόδειξη των ιδιοτήτων του ομόλογου ανασυνδυασμού (ή την έλλειψη αυτού) στην παρούσα εργασία.

3. Αποτελέσματα

Καθώς το pUA8 φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη, στην οποία έχει ανθεκτικότητα το UA1, κλωνοποιήθηκε στην *SalI* περιοριστική θέση τμήμα 1252 bp από το pUC4K που φέρει την κασέτα ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη *aphA1*, κατασκευάζοντας το pUA8K. Η ίδια κασέτα κλωνοποιήθηκε στην *SalI* θέση του pSUP203 σχηματίζοντας το pSUP203K.

Οι κατασκευές pUA8K και pSUP203K εισήχθησαν στο συζευκτικό στέλεχος *E. coli* S17.1. Τα στελέχη S17.1(pUA8K) και S17.1(pSUP203K) χρησιμοποιήθηκαν σαν συζευκτικοί δότες για την εισαγωγή των pUA8K και pSUP203K σε TραP-παρακινοούμενες συζεύξεις σε κύτταρα CP4 και UA1 (Πίνακας 3.1.4). Το στέλεχος *E. coli* RW96 χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας της συζευκτικής παρακίνησης των πλασμιδίων.

Πίνακας 3.1.4. Αποτελέσματα συζευκτικών μεταφορών των πλασμιδίων pUA8K και pSUP203K εντός κυττάρων των στελεχών *Z. mobilis* CP4, UA1 και *E. coli* RW96

Δότες <i>E. coli</i>	Συζευκτικές συχνότητες (μετασζ. κύτ. /σύνολο κυττάρων δέκτη)		
	Δέκτες		
	<i>Z. mobilis</i> CP4	<i>Z. mobilis</i> UA1	<i>E. coli</i> RW96 (θετικός μάρτυρας)
S17.1(pSUP203K)	$1,20 \times 10^{-7}$	$2,70 \times 10^{-7}$	$6,50 \times 10^{-3}$
S17.1(pUA8K)	$3,60 \times 10^{-6}$	$1,90 \times 10^{-7}$	$7,90 \times 10^{-3}$

Από τα αποτελέσματα των άνω συζευκτικών μεταφορών η μεταφορά του pUA8K στο CP4 παρατηρείται με συζευκτική συχνότητα κατά μία δεκαδική τάξη ανώτερη αυτής του UA1 και αυτών της μεταφοράς του μάρτυρα pSUP203 και στα δύο στελέχη. Έλεγχος 25 μετασυζευγμένων αποικιών των CP4 και UA1 για τα pUA8K και pSUP203K έδειξε ότι μπορούσαν να ανακαλλιεργηθούν περαιτέρω μόνο τα μετασυζευγμένα CP4(pUA8K) σε επιλεκτικό θρεπτικό υλικό. Αυτό υποδεικνύει την αδυναμία σταθεροποίησης του pSUP203K στα κύτταρα του CP4 και του UA1 και επιπλέον, την αδυναμία σταθεροποίησης και ενσωμάτωσης του UA1, πιθανότατα λόγω έλλειψης λειτουργικών ομόλογου ανασυνδυασμού του στελέχους.

3.1.9. Μελέτη της παραγωγής αιθανόλης στο στέλεχος UA1

Παρουσιάστηκε παραπάνω ότι το UA1 είναι δεκτικό σε οριζόντιες εισαγωγές γονιδίων και δεν διαθέτει λειτουργίες ομόλογου ανασυνδυασμού. Ένα τέτοιο στέλεχος αποτελεί προσφορά ξενιστή εισερχόμενων γονιδίων με σκοπό την γενετική βελτίωσή του, την αυτήν καθ' αυτήν αξιοποίησή του για εφαρμοσμένους σκοπούς και τη παραγωγή αιθανόλης. Για αυτό το λόγο, ελέγχθηκε το επίπεδο της αιθανολοπαραγωγικότητάς του σε σύγκριση με το πατρικό στέλεχος CP4.

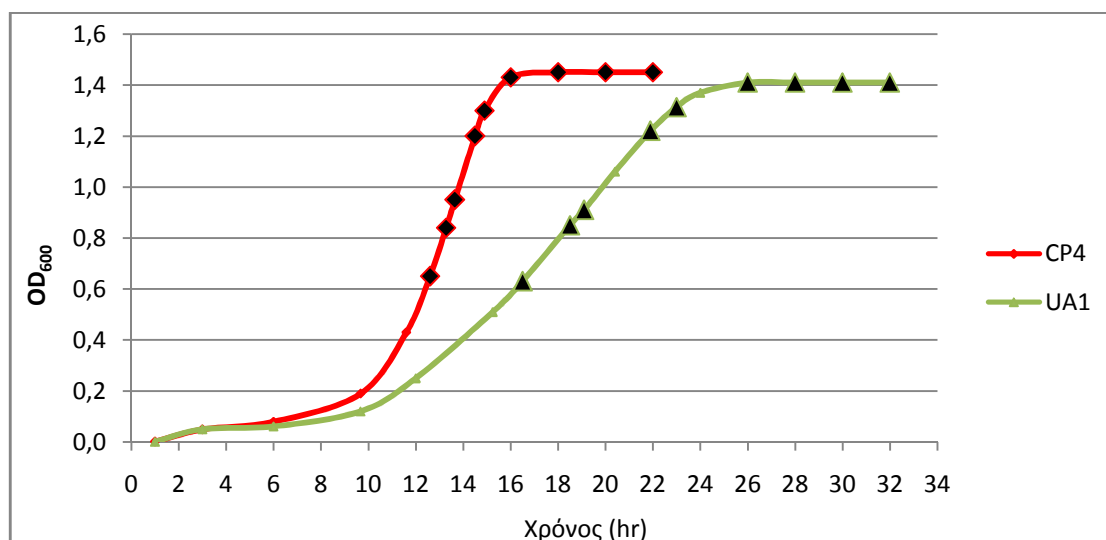
Για τον έλεγχο της παραγωγής αιθανόλης, συλλέχθηκαν υπερκείμενα δείγματα από ένα εύρος κοινών φάσεων ανάπτυξης των στελεχών CP4 και UA1 σε ασυνεχείς αναερόβιες καλλιέργειες με πλήρες θρεπτικό (από μέση εκθετικής έως 6

3. Αποτελέσματα

ώρες προχωρημένη στασιμότητα για το κάθε στέλεχος) (Εικόνα 3.1.20). Τα δείγματα φιλτραρίστηκαν (με χρήση minisart Sartorius filters 0,2 μm) και χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση ποσοτήτων αιθανόλης με τη χρήση αέριου χρωματογράφου (GC) και υγρού χρωματογράφου (HPLC), εξοπλισμό που παρέιχε ο Επίκ. Καθηγητής Δ. Χατζηνικολάου του Τομέας Βοτανικής, Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 3.1.21.

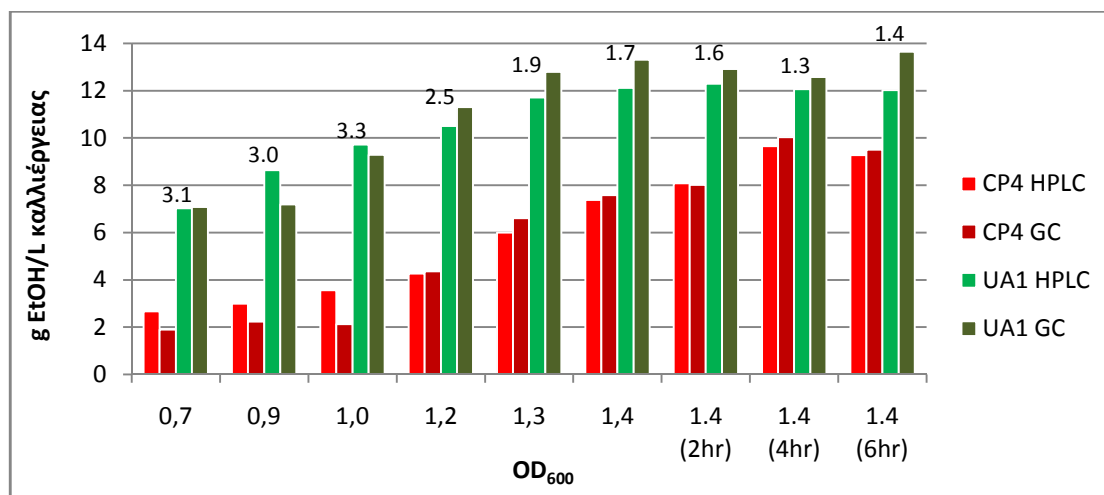
Παρατηρούμε ότι όλα τα δείγματα του UA1 έχουν μεγαλύτερες ποσότητες αιθανόλης από του CP4. Συγκεκριμένα στην OD₆₀₀: 1,0 παρατηρείται ο μέγιστος λόγος μεταξύ των δειγμάτων των δύο στελεχών: το συγκεκριμένο δείγμα του UA1 περιέχει 3,3 φορές περισσότερη αιθανόλη από το αντίστοιχο στο CP4. Επιπλέον, παρατηρείται ότι οι τιμές μεταξύ των δύο μεθόδων για το κάθε δείγμα συγκλίνουν αρκετά μεταξύ τους.

Για να γίνει αναγωγή της συγκέντρωσης αιθανόλης που βρέθηκε σε κάθε δείγμα ανά αριθμό κυττάρων του δείγματος, από τις αντίστοιχες OD₆₀₀ που πάρθηκαν τα υπερκείμενα δείγματα, μετρήθηκε και ο αριθμός των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας (Εικόνα 3.1.22). Ακολούθησε η αναγωγή της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης ανά αριθμό κυττάρων (Εικόνα 3.1.23).



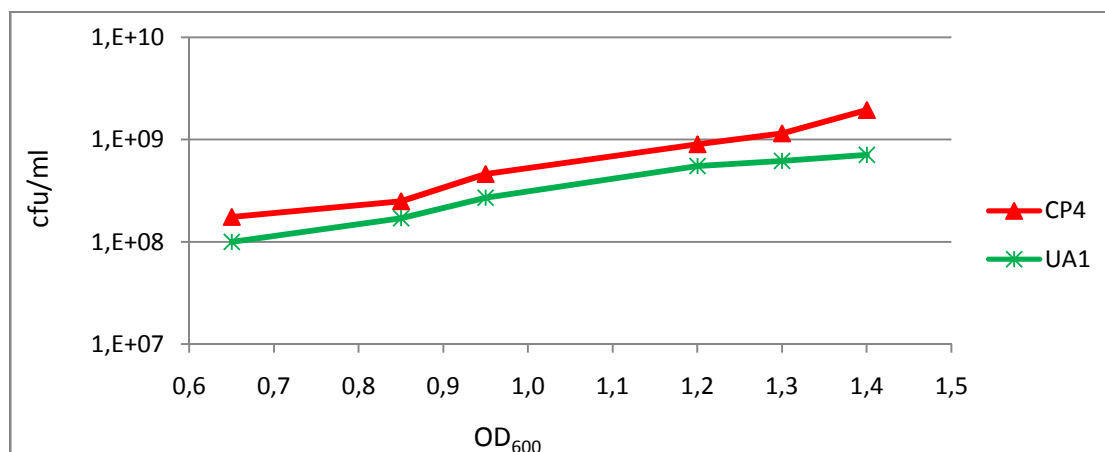
Εικόνα 3.1.20. Καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών CP4 (κόκκινη) και UA1 (πράσινη) σε αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες με πλήρες θρεπτικό υλικό και τα σημεία δειγματοληψιών υπερκείμενων (μαύρα σημεία) που πάρθηκαν για μέτρηση ποσοτήτων αιθανόλης.

3. Αποτελέσματα



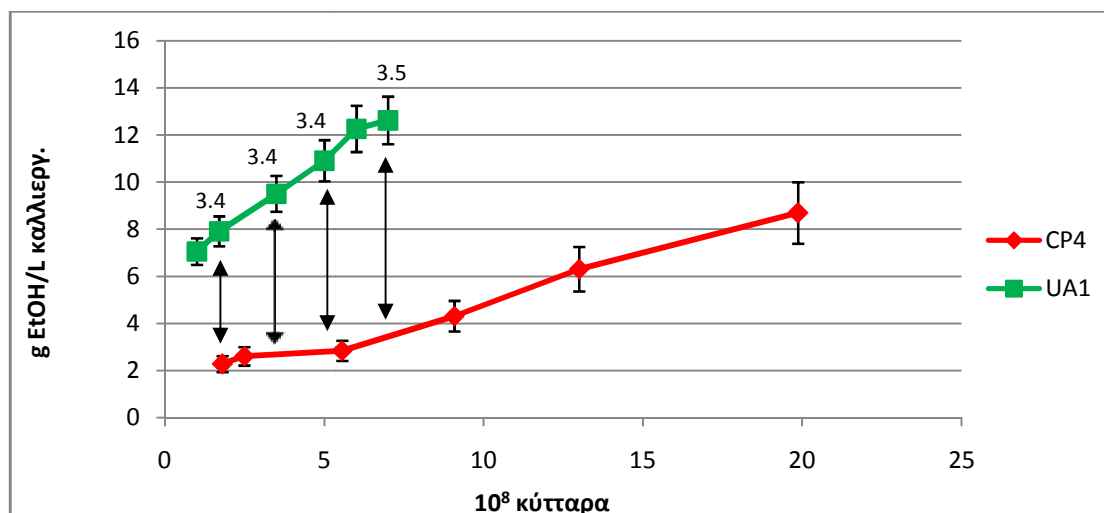
Εικόνα 3.1.21. Συγκέντρωση αιθανόλης (g/L καλλιέργειας, άξονας x'x) σε υπερκείμενα δείγματα καλλιιεργειών των στελεχών CP4 (κόκκινες μπάρες) και UA1 (πράσινες) από ένα εύρος τιμών OD₆₀₀ (άξονας y'y). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε GC (σκούρα χρώματα) και HPLC (ανοιχτά). Πάνω από κάθε ομάδα δειγματοληψιών (τετράδα μπαρών) δίνεται ο λόγος των τιμών του UA1 προς αυτών του CP4. Στην OD₆₀₀: 1,0 παρατηρήθηκε ο μεγαλύτερος λόγος.

Οι τιμές αιθανόλης της εικόνας 3.1.23 προέκυψαν από μέσους όρους των τιμών που πάρθηκαν από τις δύο μεθόδους GC και HPLC. Παρατηρήθηκε ότι για κοινούς αριθμούς κυττάρων το UA1 παράγει περισσότερη αιθανόλη από το CP4 με το μέγιστο λόγο UA1/CP4 να φτάνει στο 3,5 για 7×10^8 κύτταρα.



Εικόνα 3.1.22. Αριθμός κυττάρων των στελεχών CP4 και UA1 ανά ml ασυνεχείς αναερόβιων καλλιιεργειών με πλήρες θρεπτικό σε διαφορετικές τιμές OD₆₀₀.

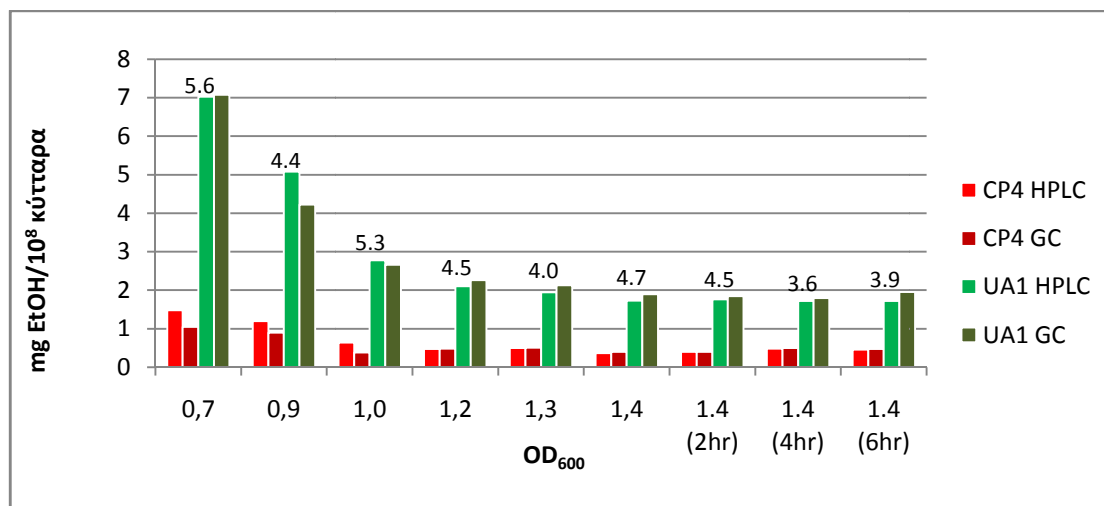
3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.1.23. Συγκέντρωση αιθανόλης σε υπερκείμενα δείγματα καλλιιεργειών των στελεχών CP4 (κόκκινη καμπύλη) και UA1 (πράσινη) προς των αριθμό των κυττάρων. Οι τιμές πάνω από την καμπύλη του UA1 υποδεικνύουν το λόγο των τιμών του UA1 προς αυτών του CP4 σε κάθε αντιπαράθεση των καμπυλών που δείχεται με βέλος.

Χρησιμοποιώντας τους αριθμούς των κυττάρων, υπολογίστηκε και η παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης ανά 10⁸ κύτταρα στα σημεία ανάπτυξης βάσει των OD₆₀₀ που συλλέχθηκαν τα δείγματα (Εικόνα 3.1.24).

Παρατηρούμε ότι το UA1 παράγει την περισσότερη αιθανόλη ανά αριθμό κυττάρων σε σύγκριση με το CP4, με την μέγιστη παραγωγικότητα να είναι 5,6 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του CP4 στο μέσο της εκθετικής φάσης (OD₆₀₀: 0,7).



Εικόνα 3.1.24. Παραγόμενες ποσότητες αιθανόλης ανά αριθμό κυττάρων (mg αιθανόλης ανά 10⁸ κύτταρα, άξονας x'x') των στελεχών CP4 (κόκκινες μπάρες) και UA1 (πράσινες) σε διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης (τιμές OD₆₀₀, άξονας γ'γ'). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε GC (σκούρα χρώματα) και HPLC (ανοιχτά). Πάνω από κάθε ομάδα δειγματοληψιών (τετράδα μπαρών) δίνεται ο λόγος των τιμών του UA1 προς αυτών του CP4. Στην OD₆₀₀: 0,7 παρατηρήθηκε ο μεγαλύτερος λόγος.

3. Αποτελέσματα

Παράλληλα, συγκρίθηκε η παραγωγικότητα των UA1 και CP4 με αυτή των στελεχών ZM4 και των δύο εκκριτικών παράγωγών του ZM401 και ZM481 (Lee *et al.* 1982, Tribe & Rogers 1984). Τα 5 στελέχη αναπτύχθηκαν αναερόβια υπό ανάδευση (150 rpm) σε πλήρες θρεπτικό με 4% (w/v) γλυκόζη (βλ. Υλικά και Μέθοδοι Παράγραφος 2.4). Δείγματα πάρθηκαν στις 0, 10 και 16 ώρες στα οποία μετρήθηκαν η οπτική πυκνότητα OD₆₀₀, η περιεκτικότητα σε γλυκόζη (με GOD-POD kit που παρείχε ο Επίκ. Καθηγητής Δ. Χατζηνικολάου του Τομέας Βοτανικής, Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ) και σε αιθανόλη (με GC).

Πίνακας 3.1.5α. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση γλυκόζης από αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες υπό ανάδευση των στελεχών ZM4, ZM401 και ZM481

h	ZM4			ZM401			ZM481		
	OD ₆₀₀	Gl (g/L)	Eth (g/L)	OD ₆₀₀	Gl (g/L)	Eth (g/L)	OD ₆₀₀	Gl (g/L)	Eth (g/L)
0	0,10	40,00	0	0,10	40,00	0	0,10	40,00	0
10	1,74	8,00	10,23	0,96	13,40	8,16	1,25	9,50	9,30
16	1,93	0	15,31	1,45	0	14,71	1,65	0	15,4

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι ώρες επώασης (h) των καλλιεργειών στα σημεία δειγματοληψίας (δηλαδή στις 0, 10 και 16 ώρες επώασης), η οπτική πυκνότητα του κάθε δείγματος στα σημεία αυτά (OD₆₀₀), τα μετρούμενα εναπομένοντα γραμμάρια γλυκόζης ανά λίτρο καλλιέργειας (Gl) και τα μετρούμενα γραμμάρια παραγόμενης αιθανόλης ανά λίτρο καλλιέργειας (Eth).

Πίνακας 3.1.5β. Παραγωγή αιθανόλης και κατανάλωση γλυκόζης από αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες υπό ανάδευση των στελεχών CP4 και UA1

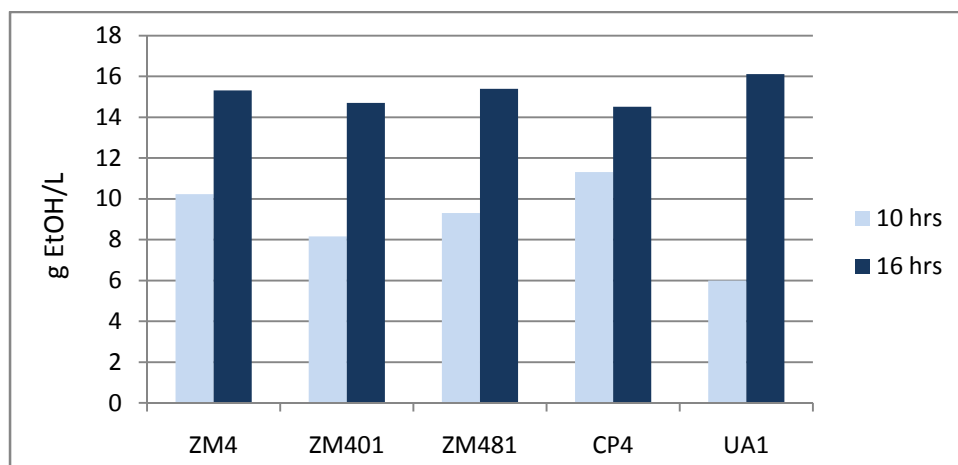
h	CP4			UA1		
	OD ₆₀₀	Gl (g/L)	Eth (g/L)	OD ₆₀₀	Gl (g/L)	Eth (g/L)
0	0,10	40,00	0	0,10	40,00	0
10	1,69	5,50	11,32	1,11	14,50	6,00
16	1,94	0	14,51	1,82	0	16,11

Το υπόμνημα του Πίνακα 3.1.5β είναι ίδιο με του Πίνακα 3.1.5α.

Παρατηρείται ότι στις 10 ώρες τα στελέχη CP4 και ZM4 έχουν την μεγαλύτερη ανάπτυξη, βάσει των τιμών OD₆₀₀, την μεγαλύτερη κατανάλωση γλυκόζης και την μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης, με το CP4 να είναι πιο παραγωγικό (11,32 g/L) από το ZM4 (10,23 g/L). Στις αντίστοιχες ώρες το UA1 είχε την μικρότερη κατανάλωση γλυκόζης και την μικρότερη παραγωγή αιθανόλης (6 g/L). Όμως, στις 16 ώρες, όπου όλα τα στελέχη είχαν καταβολίσει πλήρως όλη την γλυκόζη, το UA1 εμφανίζει την μεγαλύτερη παραγωγή αιθανόλης ξεπερνώντας τα 16 g/L. Αντιθέτως, το λιγότερο παραγωγικό στις 16 ώρες φάνηκε να είναι το CP4 (14,51

3. Αποτελέσματα

g/L). Η περιεκτικότητα των δειγμάτων των 10 και 16 ωρών σε αιθανόλη αντικατοπτρίζεται και στις στήλες της εικόνα 3.1.25.



Εικόνα 3.1.25. Οι ποσότητες παραγόμενης αιθανόλης από τα στελέχη ZM4, ZM401, ZM481, CP4 και UA1 σε αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες υπό ανάδευση με 4% (w/v) γλυκόζη μετά από 10 (γαλάζιες μπάρες) και 16 ώρες (μπλε) ανάπτυξης.

3.2 Κατασκευή ενός *Z. mobilis* CP4 *lexA*⁻ στελέχους

Προηγουμένως, παρουσιάστηκε η κατασκευή και μελέτη ενός CP4 *recA*⁻ στελέχους, του UA1. Θα ενδιέφερε και η κατασκευή ενός *lexA*⁻ στελέχους, που θα πρόσφερε έναν μόνιμα αποκατεσταλμένο φαινότυπο για την μελέτη του SOS συστήματος. Η κατασκευή *lexA*⁻ στελεχών σε γ- και α-πρωτεοβακτήρια προϋποθέτει την απενεργοποίηση ενός ακόμη γονιδίου, του *sfiA* (*sula*) (Pacelli *et al.* 1979, Walker 1984, Calero *et al.* 1993, Riera & Barbe 1995). Το *sfiA* γονίδιο είναι ένα SOS γονίδιο που παρεμποδίζει την κυτταρική διαίρεση κατά την SOS απόκριση μέχρι την επιδιόρθωση του DNA (Huisman *et al.* 1983, Walker 1984). Αν δεν απενεργοποιηθεί το *sfiA* γονίδιο στην κατασκευή *lexA*⁻ στελέχους το στέλεχος δεν είναι βιώσιμο (Mount 1977, Calero *et al.* 1993, Riera & Barbe 1995, Haijema *et al.* 1996). Όμως, στην περίπτωση των α-πρωτεοβακτηρίων *Rhodobacter sphaeroides* και *Caulobacter crescentus* δεν εντοπίστηκε ομόλογο *sfiA* γονίδιο και η κατασκευή *lexA*⁻ στελεχών επετεύχθη μέσω ένθεσης γονιδίου ανθεκτικότητας σε σπεκτινομυκίνη και καναμυκίνη αντίστοιχα εντός του φυσικού *lexA* γονιδίου (Tapias *et al.* 2000, da Rocha *et al.* 2008). Μέσω χρήσης του BLAST, αναζητήθηκε αλληλουχία γονιδίου και πρωτεΐνης ομόλογης με του *sfiA* γονιδίου και αντιστοίχως του προϊόντος του στο στέλεχος CP4. Δεν εντοπίστηκε ομόλογο γονίδιο ή πρωτεΐνη στο στέλεχος.

Για την κατασκευή ενός CP4 *lexA*⁻ στελέχους, και σε πλήρη αναλογία με την επιτυχή απενεργοποίηση του *recA*, στόχος ήταν η γονιδιακή αντικατάσταση του φυσικού *lexA* γονιδίου με μία *lexA* κατασκευή που θα φέρνει γονίδιο-δείκτη εντός του πλαισίου ανάγνωσης. Σχεδιάστηκαν τα εκκινητικά νουκλεοτίδια GS1-F και GS1-R που φέρουν τις περιοριστικές θέσεις *EcoRI* και *PstI* αντίστοιχα, ώστε το προϊόν της ενίσχυσης να κλωνοποιηθεί στις αντίστοιχες θέσεις του pBluescript, και τα οποία

3. Αποτελέσματα

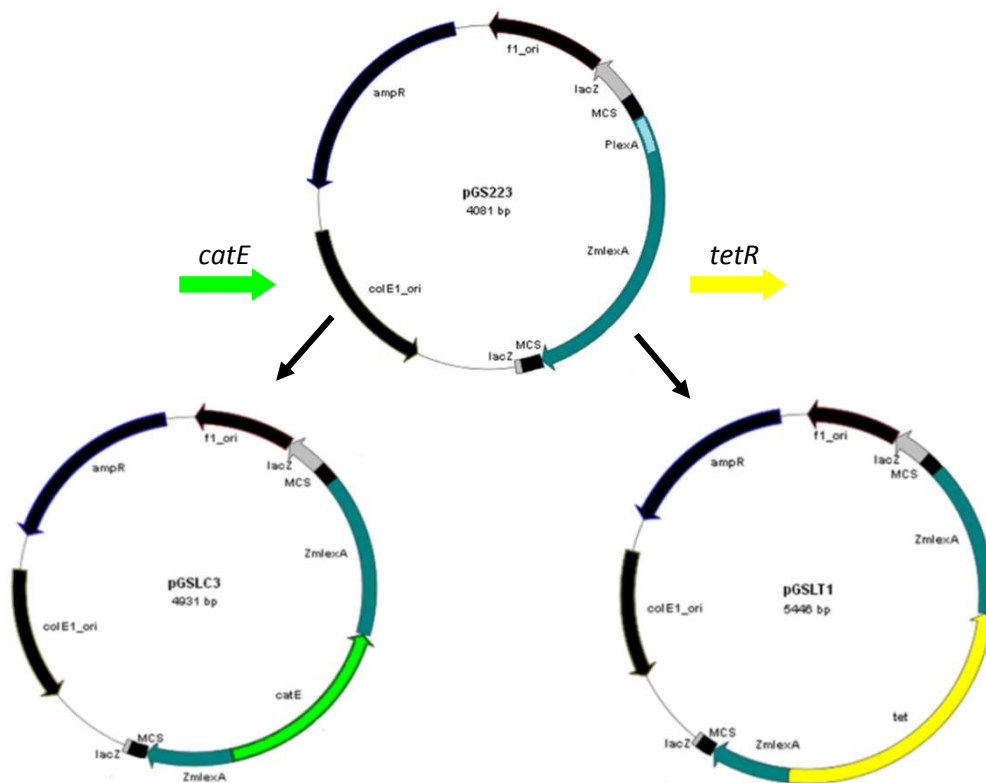
νουκλεοτίδια υβριδίζουν σε περιοχή ανοδικά του υποκινητή του *lexA* (το GS1-F) και καθοδικά της μεταφραστικής λήξης (για το GS1-R) (Εικόνα 3.2.1), και έγινε ενίσχυση τμήματος 1128 bp από το χρωμόσωμα του CP4 με χρήση αυτών. Το προϊόν της ενίσχυσης κλωνοποιήθηκε στις *EcoRI* και *PstI* περιοριστικές θέσεις του φορέα pBluescript, που είναι ασταθής στα κύτταρα των στελεχών του *Z. mobilis*, δημιουργώντας το πλασμίδιο pGS223 (Εικόνα 3.2.2).

Στην *BamHI* περιοριστική εντός του πλαισίου ανάγνωσης του κλωνοποιημένου *lexA* γονιδίου (561 bp καθοδικά της μεταφραστικής έναρξης, βλ. Εικόνα 3.2.1) κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά κασέτα ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη, δημιουργώντας τις κατασκευές pGSLC3 και pGSLT1 αντίστοιχα (Εικόνα 3.2.2). Οι κασέτες ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη πάρθηκαν με *BamHI* περιοριστική πέψη των κατασκευών του εργαστηρίου μας pUC4-C και pUC4-T αντίστοιχα (κατασκευές που βασίζονται στο pUC4K: με *BamHI* περιοριστική πέψη αφαιρέθηκε το γονίδιο ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη και αντικαταστάθηκε με το γονίδιο ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη αντίστοιχα για τα pUC4-C και pUC4-T από τον φορέα pBR325, αφήνοντας εκατέρωθέν τους *EcoRI* περιοριστικές θέσεις).

```
GS1-F → anthranilate phosphoribosyltransferase
GACGTGCCAGTCAAGTTTTCGAGGCATGGAAGAAATTTCCAGAATCTCCGCTAAAATAGCCGCTAACG 70
AATGGGGCAAAAAGAACGACTCATCTATTGACAGTTAGATGGATGTTTTCTACACGTTCTATATCTGTTC 140
AACAGAATCATGAAGCCTGTCTTATAAAAAGATGAGGAAACACGCCCTTCGTTAGCGGGCCTTTGACGGA 210
lexA
AGATTGCGGCTATGCTGACGCGCAAGCAACATGATTTGCTTCTTTTTATCCACAACCGGCTCAGCGTATC.. 280
..AGGCGAAATCGTGGTTGCCTTAATTGATAACAGCGATGCGACTTTAAAATATTTCCATCGTGAAGGTCGA 770
M L T R K G H D L L L F I H N R L S Y
G E I V V A L I D N S D A T L K Y F H R E G R M
BamHI
ATGGTTCGACT TGCCAATCGTGCCSTATGCACCGATGCGTTATGATGCCAGTAGAATTGGCATCC 840
V R L D P A N R A Y A P M R Y D A S R I G I
AAGTTCGGTTAGTGGGCTTATTACGGCGCTATTAAAGTAAATCTTTTAAATAGCGGTTTTTGACAACCGCT 910
Q G R L V G L L R R Y *
prfB
ATCAAAAATTTGTTCTCTATTCTACATCTTCGACTTCAACGGTTTCGCCTGTAATCCGTTGCGCCAAAG 980
CCGCAGCGATAAAGGCATCCAAATTACCATCCAGCACATCAGCCGGAGCCGTCGAAGTAATGCCAGTTTCG 1050
TAAATCTTTTACCAGCTGATAAGGTTGCAAGACATAAGAACGGATCTGATGCCCCCATCCGATTTCACTC 1120
← GS1-R
TTGGCAGC 1128
```

Εικόνα 3.2.1. Τμήμα από το χρωμόσωμα του CP4 που φέρει το γονίδιο *lexA* και ενισχύθηκε με τα εκκινητικά νουκλεοτίδια GS1-F και GS1-R. Με βέλη και υπογράμμιση δείχνονται τα σημεία που υβριδίζουν τα εκκινητικά νουκλεοτίδια. Με μαύρο και κόκκινο κουτί σημειώνεται η μεταφραστική έναρξη και λήξη αντίστοιχα του *lexA* γονιδίου. Με μπλε κουτί δείχνεται *BamHI* περιοριστική θέση. Με κώδικα του ενός γράμματος κάτω από την κωδική περιοχή του *lexA* δίνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα της *LexA* πρωτεΐνης (*=λήξη μετάφρασης). Με γκρι επισημείωση σημειώνονται οι μεταφραστικές λήξεις του προηγούμενου και επόμενου γονιδίου (ανθρανιλικής φωσφοριβοζυλοτρανσφεράσης και *prfB*, αντίστοιχα). Για συντομία έχει παραληφθεί η περιοχή βάσεων από 281 έως 840.

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.2.2. Τα πλασμίδια pGS223 (πάνω), pGSLC3 (αριστερά) και pGSLT1 (δεξιά). Και τα τρία είναι βασισμένα στον pBluescript και φέρουν την κωδική περιοχή (μπλε) και τον υποκινητή (γαλάζιο) του *lexA* του CP4. Εντός του πλαισίου ανάγνωσης του *lexA* κλωνοποιήθηκε κασέτα ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη (πράσινο), δημιουργώντας το pGSLC3, ή κασέτα ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη (κίτρινο), δημιουργώντας το pGSLT1.

Οι κατασκευές pGSLC3 και pGSLT1 εισήχθησαν σε κύτταρα CP4 με ηλεκτροδιάτρηση (Πίνακας 3.2.1). Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το pBBR1MCS.

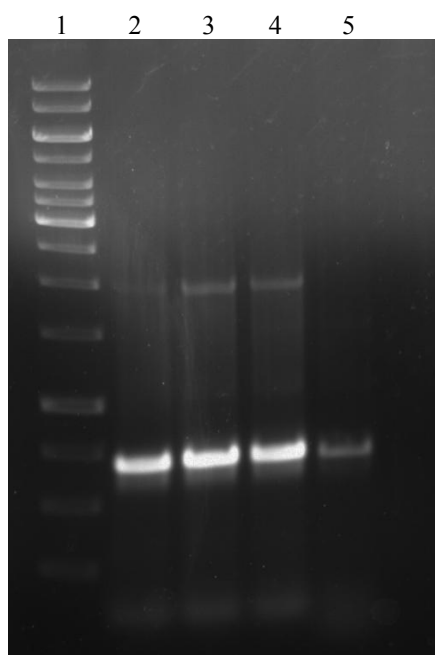
Τρεις προσπάθειες εισαγωγής των κατασκευών pGSLC3 και pGSLT1 δεν έδωσαν αποικίες που μπορούσαν να ανακαλλιεργηθούν σε επιλεκτικό θρεπτικό υλικό. Μόνο οι δύο αποικίες του 2ου πειράματος με το pGSLC3 μεγάλωσαν μόνο στην πρώτη ανακαλλιέργεια, από την οποία έγινε απομόνωση ολικού DNA. Ενίσχυση με PCR της κωδικής περιοχής του *lexA* (678 bp) με τα εκκινητικά νουκλεοτίδια CS-F1 και CS-R (Σκρέκας X., Διπλωματική εργασία 2014), χρησιμοποιώντας σαν μήτρα το ολικό DNA αυτών των 2 αποικιών και του CP4 (σαν μάρτυρα), είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ενισχυμένου τμήματος μεγέθους ίσου με του μάρτυρα-φυσικού στελέχους (Εικόνα 3.2.3). Στην περίπτωση που είχε γίνει διπλός επιχιασμός, η ενίσχυση θα έδινε ένα τμήμα μεγέθους 1528 bp, λόγω της ένθεσης κασέτας ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη, ενώ στην περίπτωση του μονού επιχιασμού θα έδινε δυο τμήματα μεγέθους 678 bp και 1528 bp (το φυσικό *lexA* γονίδιο και το

3. Αποτελέσματα

ομόλογο με την ένθεση κασέτας αντίστοιχα). Επομένως, δεν φαίνεται να έγινε ενσωμάτωση του pGSLC3 ή γονιδιακή απαλοιφή του *lexA*.

Πίνακας 3.2.1. Αποτελέσματα μετασηματισμών κυττάρων του CP4 με τα pGSLC3, pGSLT1 και pBBR1MCS (θετικός μάρτυρας)

No πειράματος	Πλασμίδιο	Ποσότητα	Αριθμός δεκτικών κυττάρων (κτύ./aliquot)	Μετασηματισμένες αποικίες	Συχνότητες μετασηματισμού (μετασχ. κτύ. / κτύ. ολικά)
1	pGSLC3	500 ng	$2,78 \times 10^8$	3	$1,08 \times 10^{-8}$
	pGSLT1			1	$3,60 \times 10^{-9}$
	pBBR1MCS	50 ng		688	$2,47 \times 10^{-6}$
2	pGSLC3	1 μ g	$2,60 \times 10^8$	2	$7,20 \times 10^{-9}$
	pGSLT1			0	0
	pBBR1MCS	50 ng		508	$1,95 \times 10^{-6}$
3	pGSLC3	1,5 μ g	$2,63 \times 10^8$	0	0
	pGSLT1			0	0
	pBBR1MCS	50 ng		976	$3,71 \times 10^{-6}$

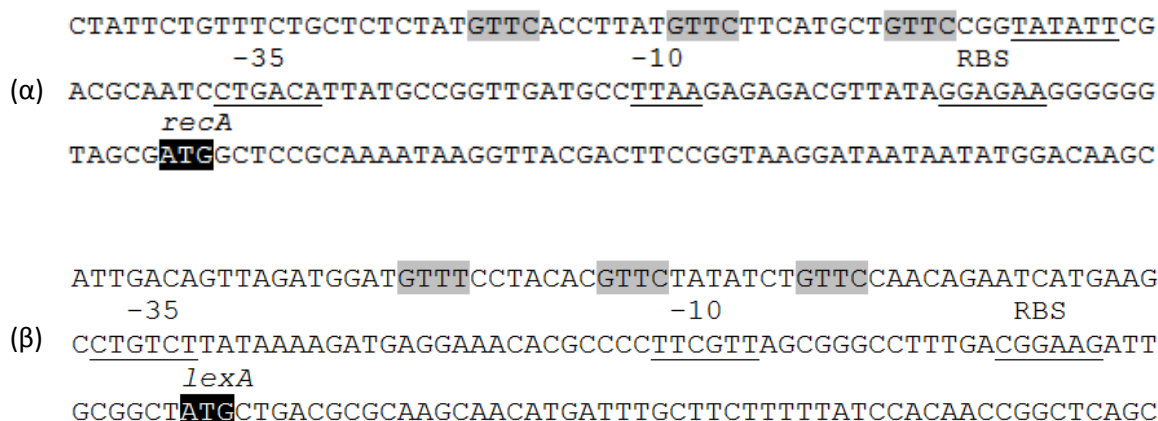


*Εικόνα 3.2.3. Ηλεκτροφόρηση ενίσχυσης προϊόντων με PCR της κωδικής περιοχής του *lexA* γονιδίου από 2 μετασηματισμένες αποικίες του CP4 με το pGSLC3 (διαδρομές 2, 3 και 4, οι 3 και 4 αποτελούν προϊόντα ενίσχυσης από την ίδια αποικία) και από το CP4 (διαδρομή 5, μάρτυρας). Διαδρομή 1: 1 kb ladder (Fermentas).*

3.3 *In silico* πρόβλεψη μελών του SOS συστήματος στο *Z. mobilis*

3.3.1 Βιοπληροφορική αναζήτηση για πιθανά μέλη του SOS συστήματος στο γονιδίωμα του στελέχους CP4

Προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου (βλ Εισαγωγή, Προκαταρκτικά αποτελέσματα), συνηγορούν στην ύπαρξη ενός SOS συστήματος στο *Z. mobilis*. Στο αλληλουχημένο γονιδίωμα του CP4 εντοπίζονται τα ομόλογα SOS-ρυθμιστικά *recA* και *lexA* γονίδια όπου ανοδικά του καθενός εντοπίζονται 2 αλληλεπικαλυπτόμενες πιθανές θέσεις πρόσδεσης του καταστολέα LexA (SOS χειριστές) για τα α-πρωτεοβακτήρια (Εικόνα 3.3.1). Επιπλέον, σημειώθηκαν οι πιθανότερες -35, -10 περιοχές ρυθμιζόμενου υποκινητή (με ατομικό έλεγχο της αλληλουχίας) καθώς και θέση πρόσδεσης ριβοσώματος (Ribosome Binding Site).



Εικόνα 3.3.1. Αλληλουχίες ανοδικά των *recA* (α) και *lexA* (β) γονιδίων στο CP4. Με μαύρη επισήμανση σημειώνονται οι μεταφραστικές ενάρξεις. Με γκρι σκίαση σημειώνονται τα συντηρημένα τετρανουκλεοτίδια των SOS χειριστών. Υπογραμμίζονται στοιχεία υποκινητή.

Στοιχισή και σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών των RecA και LexA πρωτεϊνών με των ομόλογών τους από το *E. coli* ανέδειξαν την μεγάλη συγγένεια ανάμεσα στο κάθε ζευγάρι ομόλογων και κατέδειξε συντηρημένες λειτουργικές επικράτειες και αμινοξικά κατάλοιπα κατάλληλα για την ρύθμιση του SOS συστήματος στις αμινοξικές ακολουθίες των πρωτεϊνών του *Z. mobilis* (Εικόνα 3.3.2 και 3.3.3 αντίστοιχα, βλ και Σαββάκης Ι., MSc Διπλωματική εργασία, 2011). Η συγγένεια αυτή ενθάρρυνε ως προς την πρόβλεψη ότι το *Z. mobilis* φέρει λειτουργικό SOS σύστημα.

3. Αποτελέσματα

```
NP_417179.1| MAIDE-----MKQKALAAALGQT KQQF GKGS IMRLGED PSM DVE 39
AAM50050.2| MAPQNKVTTSGHDNMMDKQKAL RAALAQIDRAF GKGS VMRLGSRREKIEID 50
** : : : ***** **_**: *****:***** . : : : :

NP_417179.1| TISTGSLSLDIALGAGGLPMGRIVEIYGP ESSCRT TL TLQVIAAAQREGK 89
AAM50050.2| TISSGSLGLDIALGIGGLPRGRIVEIYGP ESSCRT TLALHATAEAQKAGG 100
***:***_***** **_* * : : : : : : : : : * : * : *

NP_417179.1| TCAFIDAEHALDPVYAKRLGVDIDMLCSQPDTGEQALEICDALARSCAV 139
AAM50050.2| TAAFVDAEHALDPVYAKRLGVDIDMLCSQPDTGEQALEITD TLIRSNVAV 150
*_**_*:*****:**_*:*****: **_*: ***** **_* **_* **_*

NP_417179.1| DVTVVT SVAALTPKAEIECEICGDSHMGLAARMMSQAMPKLAGNLRQSNTL 189
AAM50050.2| DVLVVV SVAALTPRAEIEGEMCDSHVGLQARLMSQALPKITGCSINRSQTL 200
*_*:*****:*_*:*****: **_*:*****: **_* **_* **_* **_*

NP_417179.1| LIFINQIRMKICVMFCNPETTTCGNALKFYASVRLDIRRIEAVKEGENVV 239
AAM50050.2| VIFINQVRMKICVMYGNPETTTCGNALKFYASVRLDIRRVSQIKDRDEIV 250
:*****:*****:*****:*****:*****:*****: * : * : : : *

NP_417179.1| GSETRVKVVRKNKLAAPFKQAEFQILYCEGINFYCELVDLGVKEKLEIKAG 289
AAM50050.2| GNATRVRKVRKNKLAPRFKQVEFDIMYCEGVSRMGEILDLGVKAGIIDKSG 300
*_* *****: *_**_*_*:*****: **_*:***** :*_**_*

NP_417179.1| AMYSYKGEKIKQCKANATAWLRDNPETAKEIEKKVRELLLSNPWSTPDFS 339
AAM50050.2| SWFSDSVRICQGRN&KTFLREHPENTEKIEKMI PHNT&EADI&EMLDPS 350
:_*: . . . : ***** **_*: * : : : : **_* : * : . . . * *

NP_417179.1| VDDSEGV&ETNEDF 353
AAM50050.2| IPKD----- 354
: : :
```

Εικόνα 3.3.2. Στοιχίση αμινοξικής ακολουθίας του RecA του *E. coli* (NP_417179.1) και του *Z. mobilis* (AAM50050.21). Με χρώματα υπογραμμίζονται συντηρημένες λειτουργικές επικράτειες απαραίτητες για: αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων RecA (κίτρινο), πρόσδεση ATP (Walker A motif, μοβ), πρόσδεση ATP (Walker B motif, κόκκινο), αλληλεπίδραση με PolV (πράσινο), πρόσδεση DNA (γαλάζιο), δράση συμπρωτεάσης (γκρι). Υπογραμμίζεται περιοχή χαρακτηριστική των RecA πρωτεϊνών.

```
NP_418467.1| MKALTARQQEVEDLIRPDTHTSQGMPPTP&EIAQRLGFPSPNA&E&HLKAL 50
YP_161934.1| --MLTRKQHDLLFIHNRLSVSGISPSF&EMKLA&DLKSKSGI&HRLKAL 48
** :_*: : : : * :_*: :_*: * : * :_*: * :_*: * :_*: * :_*: * :_*: * :_*: *

NP_418467.1| ARKGVIEIVSGASRCIRLLQEE&-----GLPL 78
YP_161934.1| ERGFIRRLPNR&RAL&EVIRLPE&KT&EIQK&IS&D&YT&PK&DN&D&VI&EI&PL 98
..*_* . . . :_*: : : : * :_*: :_*: * :_*: * :_*: * :_*: * :_*: *

NP_418467.1| VGRVAAC&EPLLAQQHI&EGHYQV&DPSLFR&PNAD&FLLRV&SCMS&MKD&IG&IM&DG 128
YP_161934.1| H&RIA&CL&PI&E&AL&EQ&S&-HL&AV&PP&SY&L&GS&GA&HY&AL&EV&AG&D&SI&M&V&D&AG&I&F&DG 147
***:*** *_: * : . * * ** : . . .: *_*: * ** * **_* **_*

NP_418467.1| DLL&AV&HK&TQ&D&VR&N&GV&V&VAR&IDD&-E&VT&K&RL&RK&Q&G&M&K&V&EL&LP&EN&SE&K&PI 177
YP_161934.1| DYI&IV&RQ&T&D&E&A&H&E&GEI&V&VAL&ID&NS&D&AT&L&KY&F&H&R&EG&P&M&V&RL&D&P&AN&R&AY&AP&M 197
* : * :_*: : : : * :_*: **_*: . :_*: * :_*: . :_*: * ** * * :_*:

NP_418467.1| VV&DLR&Q&QS&FTI&EG&L&AV&GVIR&N&CD&WL 202
YP_161934.1| RY&D&AS&R&-I&GI&Q&R&LV&GL&LR&Y&- 217
* : : :_*: * **_*: :_*: *
```

Εικόνα 3.3.3. Στοιχίση αμινοξικής ακολουθίας του LexA του *E. coli* (NP_418467.1) και του *Z. mobilis* (YP_161934.1). Με κίτρινη επισήμειωση σημειώνονται συντηρημένα κατάλοιπα απαραίτητα για το δίπλωμα της πρωτεΐνης. Με κόκκινα γράμματα σημειώνονται συντηρημένα κατάλοιπα απαραίτητα για την αυτοπρωτεόλυση.

3. Αποτελέσματα

Για την εύρεση πιθανών μελών του SOS συστήματος στο στέλεχος CP4, αναζητήθηκαν πιθανές ακολουθίες SOS χειριστή στην ευρύτερη περιοχή υποκινητών γονιδίων του, με βάση το SOS μοτίβο των α-πρωτεοβακτηρίων (GTTCN₇GTTC και GAACN₇GAAC) (Fernandez de Henestrosa *et al.* 2000, Erill *et al.* 2004, da Rocha *et al.* 2008). Συγκεκριμένα, αναζητήθηκαν με το πρόγραμμα FITOM (Erill & O'Neill 2009) χρωμοσωμικά (κωδικός Genbank NC_022900) και πλασμιδιακά (κωδικοί Genbank NC_022901, NC_022902, NC_022903, NC_022910, NC_022913) γονίδια που φέρνουν μοτίβα με 0 ή 1 νουκλεοτιδική αλλαγή, σε σύγκριση με το συντηρημένο μοτίβο, σε διαγονιδιακές περιοχές ανοδικά τους και σε απόσταση -300 έως +10 από την μεταφραστική τους έναρξη. Εντοπίστηκαν 10 χρωμοσωμικά και 1 πλασμιδιακό γονίδιο με τέλεια συντηρημένα μοτίβα (Πίνακας 3.3.1) και 58 χρωμοσωμικά και 9 πλασμιδιακά γονίδια που φέρνουν μοτίβα με 1 νουκλεοτιδική αλλαγή (βλ. Παράρτημα Πίνακας 5.1).

Από επιδιορθωτικά γονίδια, που κατά κύριο λόγο είναι η κύρια κατηγορία SOS-ρυθμιζόμενων γονιδίων, εντοπίστηκαν τα *recA* και *lexA* με τέλεια μοτίβα, *lexA*, *unrA*, *recJ* και *unrC* με μοτίβα με μία αλλαγή. Πέρα από τα επιδιορθωτικά γονίδια, εντοπίστηκαν γονίδια μεταβολισμού (με χαρακτηριστικό παράδειγμα γονίδιο φωσφογλουκονολακτονάσης με τέλειο μοτίβο), κίνησης-μαστιγίων, μεταφορέων, ριβοσωμικών πρωτεϊνών (με χαρακτηριστικό παράδειγμα το *rpsB* με τέλειο μοτίβο), σύνθεσης οπανοειδών, παραγωγής ενέργειας, καθώς και γονίδια συγκρότησης φάγου και τρानσποζάσης στα πλασμίδια.

Πίνακας 3.3.1. Αποτελέσματα της εφαρμογής του προγράμματος FITOM για την αναζήτηση τέλεια συντηρημένων SOS χειριστών στο γονιδίωμα του στελέχους CP4

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Ακολουθία πιθανών SOS χειριστών	d
Χρωμοσωμικά γονίδια				
1	ZCP4_1046	SOS-response transcriptional repressor LexA	<u>GTTC</u> TATATCTG <u>TTC</u>	-97
2	ZCP4_RS00900	hypothetical protein	<u>GAAC</u> ATTGAAGA <u>GAAC</u>	-51
3	ZCP4_0166	protein RecA	<u>GTTC</u> ACCTTATG <u>TTC</u>	-103
4	ZCP4_1667	6-phosphogluconolactonase	<u>GTTC</u> TAATAAAAG <u>TTC</u>	-164
5	ZCP4_1546	ABC-type transport system involved in resistance	<u>GTTC</u> AAATAAAGG <u>TTC</u>	-254
6	ZCP4_0381	hypothetical protein	<u>GAAC</u> ATAACAAGA <u>GAAC</u>	-31
7	ZCP4_1387	hypothetical protein	<u>GAAC</u> ATAAGGGGA <u>GAAC</u>	-55
8	ZCP4_0435	hopanoid biosynthesis associated membrane	<u>GTTC</u> TTTCCTCG <u>TTC</u>	-189
9	ZCP4_0175	RpsB, 30S ribosomal protein S2	<u>GTTC</u> TTCAAATG <u>TTC</u>	-218
10	ZCP4_0383	hypothetical protein	<u>GAAC</u> AAAACATGA <u>GAAC</u>	-31
Πλασμιδιακά γονίδια (σε παρένθεση ο κωδικός GenBank του πλασμιδίου)				
1	ZCP4_RS09015 (NC_022901)	phage baseplate assembly protein V	<u>GTTC</u> ATGTTTGT <u>TTC</u>	-179

Υπογραμμίζονται όλα τα τετρανουκλεοτίδια GTTC και GAAC από τα μοτίβα GTTCN₇GTTC και GAACN₇GAAC. d: η απόσταση ανοδικά του κωδικονίου μεταφραστικής έναρξης του εκάστοτε γονιδίου μέχρι το πρώτο νουκλεοτίδιο από το πιθανό μοτίβο.

3. Αποτελέσματα

Στην περίπτωση που κάποιο από τα γονίδια, που βρέθηκαν να φέρουν SOS μοτίβο, είναι το πρώτο γονίδιο σε συνεργώμα, θεωρήθηκε εύλογο ότι και τα υπόλοιπα μέλη του αντίστοιχου συνεργώματος θα ρυθμίζονται από το αντίστοιχο μοτίβο. Επομένως, αναζητήθηκαν τα μέλη των συνεργωμάτων που το πρώτο τους γονίδιο φέρει πιθανό μοτίβο (με 0 ή 1 νουκλεοτιδική αλλαγή) σύμφωνα με την προηγούμενη ανάλυση στο CP4 (Πίνακας 3.3.2).

Πίνακας 3.3.2. Συνεργώματα που φέρουν SOS χειριστή με 0 ή 1 νουκλεοτιδική αλλαγή ανοδικά του πρώτου γονιδίου τους

A/A	Locus tag 1ου γονιδίου	Προϊόν γονιδίου	Locus tag επακόλουθων μελών συνεργώματος	Προϊόν γονιδίου	d
Συνεργώματα με τέλεια μοτίβα					
1	ZCP4_RS00900	hypothetical protein	ZCP4_0173	aspartate racemase	4
2	ZCP4_0166	RecA	ZCP4_0167	putative amidophosphoribosyltransferase	78
Συνεργώματα με μοτίβα με μία νουκλεοτιδική αλλαγή					
3	ZCP4_0294	ribonucleoside-triphosphate reductase class III	ZCP4_0293	hypothetical protein	37
			ZCP4_0292	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein	-7
4	ZCP4_0344	hopanoid biosynthesis associated glycosyltransferase	ZCP4_0343	hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnJ	15
			ZCP4_0342	hopanoid biosynthesis associated protein HpnK	16
5	ZCP4_1256	collagenase-like protease	ZCP4_1257	U32-family peptidase	-3
6	ZCP4_1471	putative membrane protein	ZCP4_1470	Enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase	23
			ZCP4_1469	chorismate synthase	-3
7	ZCP4_1433	serine O-acetyltransferase	ZCP4_1434	Protein of unknown function (DUF2794)	-3
8	ZCP4_0134	ribose-5-phosphate isomerase	ZCP4_0133	serine hydroxymethyltransferase	20
			ZCP4_0132	transcriptional regulator NrdR	5
			ZCP4_0131	RNA methyltransferase. TrmH family. group 1	-3
9	ZCP4_1227	gluconolactonase	ZCP4_1226	aldo/keto reductase	16
10	ZCP4_1011	ATP synthase F1 subcomplex delta subunit	ZCP4_1010	ATP synthase F1 subcomplex alpha subunit	3
			ZCP4_1009	ATP synthase F1 subcomplex gamma subunit	34
			ZCP4_1008	ATP synthase F1 subcomplex beta subunit	29
			ZCP4_1007	ATP synthase F1 subcomplex epsilon subunit	60
11	ZCP4_0119	hypothetical protein	ZCP4_0118	Histidine kinase	27
12	ZCP4_1539	DNA primase	ZCP4_1538	RNA polymerase. sigma 70 subunit. RpoD	1
13	ZCP4_0485	16S rRNA (cytosine(1402)-N(4))-methyltransferase	ZCP4_0484	hypothetical protein	-3
			ZCP4_0483	cell division protein FtsI	-3
			ZCP4_0482	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	0
			ZCP4_0481	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	-3
			ZCP4_0480	Phospho-N-acetylmuramoyl-	-12

3. Αποτελέσματα

				pentapeptide-transferase	
			ZCP4_0479	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	-3
			ZCP4_0478	cell division protein FtsW	0
			ZCP4_0477	UDP-N-acetylglucosaminyltransferase	-3
			ZCP4_0476	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	-3
			ZCP4_0475	UDP-N-acetylmuramate dehydrogenase	-3
			ZCP4_0474	D-alanine--D-alanine ligase	-3
			ZCP4_0473	cell division protein FtsQ	-7
			ZCP4_0472	cell division protein FtsA	18
14	ZCP4_0601	peroxiredoxin. Ohr subfamily	ZCP4_0602	DNA gyrase subunit A	69
			ZCP4_0603	tRNA:m(5)U-54 methyltransferase	49
15	ZCP4_0620	Excinuclease ABC subunit C UvrC	ZCP4_0619	DNA repair protein RecO	30
			ZCP4_0618	Hypothetical protein	38
16	ZCP4_RS09410	hypothetical protein	ZCP4_RS09405	transposase	0
17	ZCP4_RS09225	efflux transporter RND family. MFP subunit	ZCP4_RS09230	acriflavin resistance protein	-3

Στην 2η και 3η στήλη αναγράφονται τα πρώτα γονίδια που εντοπίστηκαν βάσει των αποτελεσμάτων αναζήτησης και στην 4η στήλη τα υπόλοιπα συνοργανωμένα γονίδια με τη σειρά σύνδεσης στο γονιδίωμα. Στη στήλη των αποστάσεων αριθμούνται οι βάσεις που απέχει το γονίδιο της εκάστοτε σειράς από το προηγούμενό του (αρνητικές αποστάσεις δείχνουν ότι η έναρξη του αντίστοιχου γονιδίου ξεκινά πριν από την μεταφραστική λήξη του προηγούμενου)

Βρέθηκαν 17 πιθανά συνεργιώματα που μπορεί να είναι SOS ρυθμιζόμενα. Τα συνεργιώματα αυτά προσθέτουν άλλα 39 ρυθμιζόμενα γονίδια ανεβάζοντας τον αριθμό των πιθανών SOS-ρυθμιζόμενων γονιδίων στο CP4 στα 117.

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα γονίδια του CP4, που βρέθηκαν με τέλεια συντηρημένα SOS μοτίβα, εντοπίστηκαν εξίσου και στο ZM4 (βλ. Αποτελέσματα Παράγραφο 3.3.2. Πίνακας 3.3.5). Όμως, όσον αφορά την αναζήτηση γονιδίων με μοτίβα με μία νουκλεοτιδική αλλαγή βρέθηκαν 12 γονίδια παραπάνω στο ZM4 από ότι στο CP4, τα οποία δίνονται στον Πίνακα 3.3.3. Από τα 12 επιπλέον γονίδια, τα 2 (ZMO1536 και ZMO0169) είναι μοναδικά και στελεχοειδικά για το ZM4. Το ZMO0170 φέρει ομολογία μόνο με το 67% του γονιδίου ZCP4_1076 στο CP4. Από τα υπόλοιπα 9 γονίδια, τα 2 (ZMO2011, ZMO0265) έχουν ομόλογα γονίδια στο CP4 (ZCP4_0117, ZCP4_0988) που όμως δε φέρουν αναγνωρίσιμα μοτίβα στις ίδιες αποστάσεις ανοδικά τους. Τα υπόλοιπα 7 γονίδια έχουν ομόλογα γονίδια στο CP4 που έχουν στις ίδιες αποστάσεις μοτίβα που φέρουν μία ακόμη νουκλεοτιδική αλλαγή (σημειώνονται με αστερίσκο στον πίνακα). Δηλαδή έχουν δύο αντί για μία νουκλεοτιδικές αλλαγές στα συντηρημένα τετρανουκλεοτίδια. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις, ακόμη και τα ενδιάμεσα μη συντηρημένα νουκλεοτίδια είναι ίδια. Λόγω των δύο νουκλεοτιδικών τους αλλαγών, αυτά τα γονίδια του CP4 δεν εντοπίστηκαν βάσει των παραμέτρων του FITOM σε αυτήν την σειρά αναζητήσεων. Πάραυτα, η ύπαρξη του πιθανού μοτίβου σε κατάλληλη θέση τα καθιστά πιθανότατα SOS-ρυθμιζόμενα.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.3.3. Γονίδια του ZM4 με SOS χειριστή με μία νουκλεοτιδική αλλαγή, ομόλογα των οποίων δεν βρέθηκαν μέσω αντίστοιχης βιοπληροφορικής αναζήτησης στο CP4

A/A	Γονιδιακό προϊόν	Locus tag στο ZM4	SOS χειριστής ...απόσταση στο ZM4	Locus tag στο CP4	SOS χειριστής ...απόσταση στο CP4
1	DNA repair ATPase	ZMO1536	<u>G</u> TTCAGCATGCGTT <u>A</u> .. .-194	NF	
2	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	ZMO0170	<u>G</u> TTCAGGCCGGT <u>T</u> TTC.. .-35	ZCP4_1076 (κατά 67%)	
3	short-chain dehydrogenase	ZMO0169	<u>G</u> TT <u>A</u> ACTTGAGG <u>T</u> TTC.. .-132	NF	
4	Ribonuclease P	ZMO1625	<u>A</u> TTC <u>A</u> ATGAGCGTTC.. .-134/-152	ZCP4_1536*	<u>A</u> TTC <u>A</u> ATGAGC <u>A</u> TTC...-134/-152
5	Mg chelatase subunit I	ZMO1624		ZCP4_1537*	
6	Entericidin	ZMO2011	<u>T</u> TTCACGCTCAGTTC.. -257	ZCP4_0117	<u>T</u> ATCAAAAAGC <u>C</u> ATC...-257
7	Thiamine pyrophosphate protein	ZMO1360	<u>G</u> TTC <u>T</u> GATATT <u>T</u> TTC.. -178	ZCP4_1765*	<u>T</u> TTC <u>T</u> GATATT <u>T</u> TTC...-178
8	Hypothetical protein	ZMO1920	<u>G</u> TTCATTCATA <u>A</u> TTC.. -137/-154	ZCP4_1261*	<u>A</u> TTCATTCATA <u>A</u> TTC...-137/-154
9	Thiol-disulfide isomerase	ZMO1919		ZCP4_1262*	
10	Hypothetical protein	ZMO1566	<u>G</u> ATCCAGAGGT <u>G</u> TTC.. .-17	ZCP4_1594*	<u>G</u> ATCCCGAGGT <u>A</u> TTC...-17
11	Hypothetical protein	ZMO1520	<u>G</u> TCCATTAAGG <u>T</u> TTC.. .-130	ZCP4_1629*	<u>A</u> TCCATTAAGG TTC...-130
12	Hypothetical protein	ZMO0265	<u>G</u> AACGTCATCA <u>C</u> AAC.. .-36	ZCP4_0988	<u>G</u> CGCGTCATC <u>C</u> AAC...-36

NF: δεν εντοπίστηκε ομόλογο γονίδιο στο CP4. Υπογραμμίζονται τα συντηρημένα τετρανουκλεοτίδια GTTC και με κόκκινα γράμματα υποδηλώνονται οι νουκλεοτιδικές αλλαγές σε σύγκριση με το τέλειο μοτίβο. Με αστερίσκο υποδηλώνονται γονίδια που δεν εντοπίστηκαν λόγω 2ης νουκλεοτιδικής αλλαγής στο πιθανό μοτίβο.

Επιπλέον, με χρήση του BLAST, έγινε αναζήτηση στα υπόλοιπα στελέχη του οργανισμού για γονίδια ομόλογα με αυτά που βρέθηκαν στα πλασμίδια του CP4 και φέρουν μοτίβα με 0 ή 1 αλλαγή, δηλαδή με τα πλασμιδιακά γονίδια του Πίνακα 3.3.1 και στο Παράρτημα του Πίνακα 5.1. Εντοπίστηκαν ομόλογα γονίδια μόνο για 3 πλασμιδιακά γονίδια του CP4 (Πίνακας 3.3.4). Τα δύο (ZCP4_RS09275, ZCP4_RS09415) έχουν ομόλογα γονίδια στα στελέχη ATCC 10988 (στο πλασμίδιο NC_017184 και στο χρωμόσωμα αντίστοιχα), στο NCIMB 11163 (στα πλασμίδια NC_013357 και NC_013356 αντίστοιχα) και στο ATCC 29191 (στο χρωμόσωμα). Για το τρίτο πλασμιδιακό γονίδιο του CP4 βρέθηκε ένα ομόλογο στο πλασμίδιο NC_017180 του ATCC 10988. Ανάλυση των ευρύτερων περιοχών ανοδικά των ομόλογων γονιδίων στα ATCC 10988, ATCC 29191 και NCIMB 11163 έδειξε ότι κανένα από τα ομόλογα γονίδια δεν έχει πιθανό SOS χειριστή. Τα υπόλοιπα πλασμιδιακά γονίδια του CP4 φαίνεται να είναι στελεχοειδικά.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.3.4. Πλασμιδιακά γονίδια του CP4, στα οποία εντοπίστηκαν SOS χειριστές, και που έχουν ομόλογα σε άλλα στελέχη *Z. mobilis*

Locus tag στο CP4	Προϊόν πρωτεΐνης	Locus tag στο εκάστοτε στέλεχος (τοπολογία)		
		ATCC 10988	NCIMB 11163	ATCC 29191
ZCP4_RS09275	Hypothetical protein	Zmob_1861 (πλασμίδιο NC_017184.1, 18.5 Kb)	Za10_1887 (πλασμίδιο NC_013357.1, 40.8 Kb)	ZZ6_0013 (χρωμόσωμα)
ZCP4_RS09415	IS5 family transposase	Zmob_1141 (χρωμόσωμα)	Za10_1837 (πλασμίδιο NC_013356.1, 53.4 Kb)	ZZ6_1238 (χρωμόσωμα)
ZCP4_RS09540	alpha/beta hydrolase	Zmob_1776 (πλασμίδιο NC_017180.1, 32.4 Kb)		

3.3.2 Βιοπληροφορική αναζήτηση για γονίδια με τέλεια συντηρημένους SOS χειριστές στα χρωμοσώματα στελεχών του *Z. mobilis*

Για την αναζήτηση πιθανών SOS γονιδίων στα υπόλοιπα στελέχη του *Z. mobilis*, αναζητήθηκαν γονίδια με τέλεια μοτίβα στα χρωμοσώματα των στελεχών ZM4, NCIMB 11163, ATCC 10988, ATCC 29191 και ATCC 29192 και γονίδια με μοτίβα με 0 ή 1 αλλαγή στα πλασμίδια των στελεχών NCIMB 11163, ATCC 10988, ATCC 29191 και ATCC 29192. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης στα χρωμοσώματα συγκρίνονται με αυτά του CP4 και δίνονται στον Πίνακα 3.3.5 για τα στελέχη *Z. mobilis* subsp. *mobilis* ZM4, NCIMB 11163, ATCC 10988 και ATCC 29191 και στον πίνακα 3.3.6 για το *Z. mobilis* subsp. *romanceae* ATCC 29192. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης στα πλασμίδια δίνονται στον πίνακα 3.3.7.

Παρατηρήθηκε ότι τα 10 γονίδια του CP4 που φέρουν τέλεια συντηρημένα μοτίβα βρέθηκαν να έχουν ομόλογά τους με τα ίδια μοτίβα και στην ίδια απόσταση στα υπόλοιπα *Z. mobilis* subsp. *mobilis* στελέχη. Εξάιρεση αποτελεί το υποθετικό γονίδιο του CP4 ZCP4_RS00900 που δεν έχει ομόλογό του στο ATCC 29191, καθώς και μία νουκλεοτιδική αλλαγή στα μη συντηρημένα νουκλεοτίδια του μοτίβου της υποθετικής ZCP4_0383 στο ομόλογό της στο ATCC 10988 (Zmob_0371) (σημειώνεται με μπλε γράμματα στον πίνακα 3.3.5).

Στο ATCC 29192 βρέθηκαν τα 7 από τα 10 ομόλογα του CP4 με τέλεια συντηρημένα μοτίβα. Για τα άλλα 3 γονίδια του CP4, το ATCC 29192 δεν διαθέτει ομόλογα. Μάλιστα, στα *recA*, *lexA*, *hpnM* και σε δύο υποθετικά γονίδια τα μοτίβα τους στο ATCC 29192 εντοπίζονται σε διαφορετικές αποστάσεις με ελάχιστες νουκλεοτιδικές διαφορές. Επίσης, μεταξύ των δύο στελεχών εντοπίστηκαν νουκλεοτιδικές αλλαγές στα ενδιάμεσα μη συντηρημένα νουκλεοτίδια των μοτίβων των *recA*, *lexA* και *rpsB* (σημειώνονται με μπλε γράμματα στον πίνακα 3.3.6). Τέλος, βρέθηκαν και 8 γονίδια του ATCC 29192 που έχουν τέλεια μοτίβα, είναι στελεχοειδικά και εκτός από 2 (ένα γονίδιο πρωτεάσης και ένα πρωτεΐνης διαχωρισμού χρωμοσωμάτων), τα υπόλοιπα είναι υποθετικά γονίδια.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.3.5. Αποτελέσματα αναζήτησης γονιδίων με τέλεια συντηρημένους SOS χειριστές στα χρωμοσώματα στελεχών *Z. mobilis* subsp. *mobilis*

A/A	Ακολουθία πιθανών SOS χειριστών	Προϊόν γονιδίου	Στέλεχη <i>Z. mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i>					d
			CP4	ZM4	NCIMB 11163	ATCC 10988	ATCC 29191	
			Locus tag					
1	<u>GTTC</u> TATA TCT <u>GTTC</u>	SOS-response transcriptional repressor LexA	ZCP4_10 46	ZMO0 199	Za10_1011	Zmob_0640	ZZ6_1013	-97
2	<u>GAAC</u> ATTT GAAGA <u>AC</u>	Hypothetical protein	ZCP4_ RS00900	ZMO_ RS051 85	ZA10_ RS00875	ZMOB_ RS00895	NF	-51
3	<u>GTTC</u> ACCT TAT <u>GTTC</u>	RecA,	ZCP4_01 66	ZMO1 166	Za10_0161	Zmob_0162	ZZ6_0164	-103
4	<u>GTTC</u> TAAT AAAG <u>TTC</u>	6-phosphoglucanolactonase	ZCP4_16 67	ZMO1 478	Za10_1721	Zmob_1640	ZZ6_1616	-164
5	<u>GTTC</u> AATA AAGG <u>TTC</u>	Toluene tolerance family protein	ZCP4_15 46	ZMO1 612	Za10_1602	Zmob_1526	ZZ6_1500	-254
6	<u>GAAC</u> ATAA CAAGA <u>AC</u>	Hypothetical protein	ZCP4_03 81	ZMO0 934	Za10_0364	Zmob_0369	ZZ6_0367	-31
7	<u>GAAC</u> ATAA GGGGA <u>AC</u>	Hypothetical protein	ZCP4_13 87	ZMO1 787	Za10_1444	Zmob_1364	ZZ6_1340	-55
8	<u>GTTC</u> TTCC TCG <u>TTC</u>	HpnM, hopanoid biosynthesis associated membrane protein	ZCP4_04 35	ZMO0 876	Za10_0416	Zmob_0421	ZZ6_0419	-189
9	<u>GTTC</u> TCA AATG <u>TTC</u>	RpsB, 30S ribosomal protein S2	ZCP4_01 75	ZMO1 156	Za10_0170	Zmob_0171	ZZ6_0172	-218
10	<u>GAAC</u> AAAA CATGA <u>AC</u>	Hypothetical protein	ZCP4_03 83	ZMO0 931	Za10_0366	Zmob_0371 (C)	ZZ6_0369	-31

NF: δεν βρέθηκε ομόλογο γονίδιο στο αντίστοιχο στέλεχος, με μπλε γράμματα επισημαίνεται η νουκλεοτιδική αλλαγή στο μοτίβο που είναι διαφορετική σε ένα στέλεχος (η αλλαγή σημειώνεται σε παρένθεση στο locus tag του αντίστοιχου γονιδίου του στελέχους). Για άλλες λεπτομέρειες του Πίνακα, βλ. υπόμνημα Πίνακα 3.3.1

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.3.6. Αποτελέσματα αναζήτησης γονιδίων με τέλεια συντηρημένους SOS χειριστές στο χρωμόσωμα του στελέχους ATCC 29192 και σε σύγκριση με τα αποτελέσματα στο στέλεχος CP4

A/A	Ακολουθία πιθανών SOS χειριστών	Locus tag στο ATCC 29192	Προϊόν γονιδίου	d	Ομόλογα στο CP4	d στο CP4
1	<u>GTTC</u> TCG TTATGTTTC	Zymop_0134	RecA protein	-101	ZCP4_0166	-103
2	<u>GTTC</u> TTATCTGTTTC	Zymop_0971	transcriptional repressor LexA	-98	ZCP4_1046	-97
3	<u>GTTC</u> TCATT ATGTTTC	Zymop_0141	30S ribosomal protein S2, RpsB	-218	ZCP4_0175	-218
4	<u>GTTC</u> TTTCTCTCGTTTC	Zymop_0389	hopanoid biosynthesis associated membrane protein HpnM	-184	ZCP4_0435	-189
5	<u>GAACAAAACATGAAC</u>	Zymop_0336	Hypothetical protein	-37	ZCP4_0381	-31
6	<u>GAACATAACAAGAAC</u>	Zymop_0334	Hypothetical protein	-29	ZCP4_0383	-31
7	<u>GAACATAAGGGGAAC</u>	Zymop_1339	Hypothetical protein	-55	ZCP4_1387	-55
8	<u>GTTC</u> AAAAAGGGTTTC	Zymop_0935	ATPase-like, ParA/MinD	-258	<i>NF</i>	
9		Zymop_0936	protease Do	-225	<i>NF</i>	
10	<u>GAACCTCTACCGAAC</u>	Zymop_1536	Hypothetical protein	-33	<i>NF</i>	
11	<u>GAACATAACAAGAAC</u>	Zymop_0334	Hypothetical protein	-30	<i>NF</i>	
12	<u>GAACAAAACATGAAC</u>	Zymop_0336	Hypothetical protein	-38	<i>NF</i>	
13	<u>GAACATAAAGCGAAC</u>	Zymop_0631	Hypothetical protein	-79	<i>NF</i>	
14	<u>GAACCTAGTAAGAAC</u>	Zymop_0731	Hypothetical protein	-68	<i>NF</i>	
15	<u>GAACATAAGGGGAAC</u>	Zymop_1339	Hypothetical protein	-56	<i>NF</i>	

NF: δεν βρέθηκε ομόλογο γονίδιο στο CP4, με μπλε γράμματα επισημαίνονται νουκλεοτίδια που είναι διαφορετικά στο ATCC 29192. Για άλλες λεπτομέρειες του Πίνακα, βλ. υπόμνημα Πίνακα 3.3.1.

3.3.3 Βιοπληροφορική αναζήτηση για γονίδια με SOS χειριστές με μηδέν ή μία αλλαγή στα πλασμίδια στελεχών του *Z. mobilis*

Εκτός από την αναζήτηση γονιδίων με SOS χειριστές στα χρωμοσώματα των στελεχών, διερευνήθηκε το αν εντοπίζονται και πλασμιδιακά γονίδια με SOS χειριστές στο *Z. mobilis*. Έτσι, αναζητήθηκαν γονίδια με μοτίβα με 0 ή 1 αλλαγή στα πλασμίδια των στελεχών NCIMB 11163, ATCC 10988, ATCC 29191 και ATCC 29192. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 3.3.7. Από τα όλα τα στελέχη, εντοπίστηκε 1 πλασμιδιακό γονίδιο με μοτίβο με καμία αλλαγή (Zymop_2048) στο ATCC 29192 και 17 γονίδια με μοτίβα με μία αλλαγή στα υπόλοιπα στελέχη. Να σημειωθεί ότι όλα τα μοτίβα εντοπίστηκαν σε πλασμίδια άνω των 13 kb. Ίδιο χαρακτηρισμό και ίδια μοτίβα φαίνεται να έχουν τα Za10_1823 του NCIMB 11163 και Zmob_1866 του ATCC 10988. Τα δύο γονίδια είναι τα μόνο πλασμιδιακά γονίδια που είναι ομόλογα μεταξύ τους με τα ίδια μοτίβα αλλά σε διαφορετικά στελέχη.

Στον Πίνακα 3.3.7 εντοπίστηκαν μόνο δύο γονίδια να έχουν ομόλογη λειτουργία μεταξύ τους: δύο *traJ* γονίδια, ένα στο πλασμίδιο NC_013356 (53.4 Kb) του NCIMB 11163 (γονίδιο Za10_1823, θέση 3 του Πίνακα) και ένα στο πλασμίδιο NC_017184 (18.5 Kb) του ATCC 10988 (γονίδιο Zmob_1866, θέση 10 του Πίνακα). Χωρίς να εντοπίζονται άλλα γονίδια ομόλογα μεταξύ τους στον Πίνακα 3.3.7 (και χωρίς να είναι γνωστό αν κάποιο υποθετικό γονίδιο του Πίνακα είναι ομόλογο με άλλο υποθετικό στον ίδιο Πίνακα), αναζητήθηκαν, με χρήση του BLAST, πιθανά γονίδια (χρωμοσωμικά και πλασμιδιακά) ομόλογα με τα πλασμιδιακά γονίδια του

3. Αποτελέσματα

Πίνακα τόσο εντός του ίδιου του στελέχους όσο και ανάμεσα στα υπόλοιπα στελέχη. Σε περίπτωση εύρεσης πιθανού ομόλογου γονιδίου, αναζητήθηκε σε αυτό με το FITOM πιθανός χειριστής με 0 ή 1 αλλαγή. Τα ομόλογα που βρέθηκαν και φέρουν πιθανό χειριστή δίνονται στον Πίνακα 3.3.8. Τα ομόλογα γονίδια που εντοπίστηκαν μεν αλλά δεν βρέθηκαν να φέρουν πιθανό χειριστή δίνονται στον Πίνακα 3.3.9. Βρέθηκαν μόνο δύο πλασμιδιακά γονίδια που φέρουν πιθανούς SOS χειριστές και έχουν ομόλογά τους σε άλλο στέλεχος. Αυτά τα 2 γονίδια ανήκουν στο NCIMB 11163 (εκ των οποίων το ένα είναι το *traJ*) και τα ομόλογά τους εντοπίστηκαν με πιθανούς SOS χειριστές στο ATCC 10988. Εκτός του *traJ*, το άλλο γονίδιο είναι ένα υποθετικό (Za10_1824) και διαθέτει 2 πλασμιδιακά ομόλογα στο ATCC 10988, εκ των οποίων και τα δύο διαθέτουν πιθανό SOS χειριστή με δύο αντί για μία νουκλεοτιδικές αλλαγές. Οι δύο αλλαγές είναι και ο λόγος που δεν εντοπίστηκε από το πρόγραμμα FITOM.

Πίνακας 3.3.7. Αποτελέσματα αναζήτησης γονιδίων με SOS χειριστές με μηδέν ή μία νουκλεοτιδική αλλαγή στα πλασμίδια των στελεχών NCIMB 11163, ATCC 10988, ATCC 29191 και ATCC 29192

A/A	Στέλεχος	Κωδικός πλασμιδίου	Ακολουθία πιθανών SOS χειριστών	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	d	
1	NCIMB 11163	NC_013356 (53.4 Kb)	<u>AAACGCAACATGAAC</u>	Za10_1838	putative type II restriction enzyme	-116	
2			<u>GTTCAGCCTTTATTC</u>	Za10_1824	Hypothetical protein	-98	
3			<u>GAACTAGAATGAAAC</u>	Za10_1823	<u>GAAATAAAGGCTGAAC</u>	conjugal transfer relaxosome component TraJ	-121
			-132				
4	ATCC 10988	NC_017180 (32.4 Kb)	<u>GTTC AATTTGTTTC</u>	Zmob_1766	transcriptional regulator XRE family	-298	
5		NC_017183 (32.3 Kb)	<u>GATCACGCTTCGTTTC</u>	Zmob_1787	Hypothetical protein	-206	
6		NC_017181 (31.7 Kb)	<u>GTTTGT CAGAAGTTTC</u>	Zmob_1828	Hypothetical protein	-161	
			<u>GTTCGGACGAGATTC</u>	Zmob_1830	ATP-binding region ATPase domain protein	-48	
8		NC_017184 (18.5 Kb)	<u>GAACATATAAAGAAT</u>	Zmob_1846	Cobyrinic acid ac-diamide synthase	-45	
9			<u>GATCTTTCTGCGTTTC</u>	Zmob_1857	Hypothetical protein	-110	
10			<u>GAACTAGAATGAAAC</u>	Zmob_1866	conjugal transfer relaxosome component TraJ	-56	
			<u>GAAATAAAGGCTGAAC</u>			-67	
11		ATCC 29191	NC_018146 (18.4 Kb)	<u>AAACAGCACTGGAAC</u>	ZZ6_1728	Hypothetical protein	-131
12				<u>GAAAATGGCTAGAAC</u>	ZZ6_1734	addiction module antidote protein	-263
13	NC_018148 (13.7 Kb)		<u>GAACGCAGATTGAAA</u>	ZZ6_1762	hypothetical protein	-74	
14			<u>GAACATTGCTCGATC</u>	ZZ6_1758	type I restriction-modification system M	-212	
			<u>GACCTTCTGTTGAAC</u>			-52	
			<u>GTTCTACTCTTGTC</u>			-228	
15	<u>GTTTGGCTGTTGTTTC</u>		ZZ6_1763	Hypothetical protein	-236		
16	ATCC 29192		NC_015715 (37.4 Kb)	<u>GAACGATCAGAAAC</u>	Zymop_1721	Hypothetical protein	-80
17		NC_015716 (34.2 Kb)	<u>GAACGAAAAAAGAAC</u>	Zymop_2048	Hypothetical protein	-65	
18		<u>GAACCATATAAGATC</u>	Zymop_2071	addiction module antitoxin. RelB/DinJ	-131		

d: η απόσταση ανοδικά του κωδικονίου μεταφραστικής έναρξης του εκάστοτε γονιδίου μέχρι το πρώτο νουκλεοτίδιο από το πιθανό μοτίβο. Για άλλες λεπτομέρειες του Πίνακα, βλ. υπόμνημα Πίνακα 3.3.3.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.3.8. Ομόλογα πλασμιδιακά γονίδια διαφορετικών στελεχών του *Z. mobilis* που φέρουν SOS χειριστές

A/A	Προϊόν γονιδίου	Locus tag (Στέλεχος)	Ακολουθία πιθανών SOS χειριστών...d	Locus tag ομόλογου γονιδίου (Στέλεχος)	Ακολουθία πιθανών SOS χειριστών...d
1	Hypothetical protein	Za10_1824 (NCIMB 11163)	<u>G</u> TTCAGCCTTT <u>A</u> TTC...-98	Zmob_1867 (ATCC 10988), Zmob_1871 (ATCC 10988)	<u>G</u> TTAGCCTTT <u>A</u> TTC...-96
2	conjugal transfer relaxosome component TraJ	Za10_1823 (NCIMB 11163)	<u>G</u> AACTAGAATG <u>A</u> AAC...-121 <u>G</u> AAT <u>A</u> AAAGGCT <u>G</u> AAC...-131	Zmob_1866 (ATCC 10988)	<u>G</u> AACTAGAATG <u>A</u> AAC...-56 <u>G</u> AAT <u>A</u> AAAGGCT <u>G</u> AAC...-67

Για λεπτομέρειες του Πίνακα, βλ. υπόμνημα Πίνακα 3.3.7.

Τέλος, βρέθηκαν πλασμιδιακά γονίδια που δε φέρουν SOS χειριστή και είναι ομόλογα με γονίδια των ATCC 10988 και ATCC 29192, τα οποία φέρουν πιθανούς SOS χειριστές (Πίνακας 3.3.9). Συγκεκριμένα για τα ομόλογα που δεν διαθέτουν πιθανούς χειριστές, εντοπίστηκε στο NCIMB 11163 πλασμιδιακό γονίδιο μεταγραφικού παράγοντα, της οικογένειας XRE που είναι δομής έλικα-στροφή-έλικα, ομόλογο με του ATCC 10988 (Zmob_1766), 2 πλασμιδιακά γονίδια, ένα στο NCIMB 11163 και ένα στο CP4, ομόλογα με γονίδιο σύνθεσης κοβυρινικού οξέους του ATCC 10988 (Zmob_1846, τέτοια γονίδια πιθανόν να σχετίζονται με την αντιγραφή του πλασμιδίου), και 8 πλασμιδιακά γονίδια, 3 στο ίδιο το ATCC 10988, 2 στο NCIMB 11163, 2 στο CP4 και 2 στο ATCC 29192, ομόλογα με υποθετικό γονίδιο του ATCC 10988. Επιπλέον, εντοπίστηκε πλασμιδιακό γονίδιο του ATCC 10988 που είναι ομόλογο με γονίδιο αντιτοξίνης (*relB/dinJ*) στο ATCC 29192. Αντίστοιχα ομόλογα γονίδια δεν εντοπίστηκαν στα χρωμοσώματα των στελεχών.

Πίνακας 3.3.9. Ομόλογα πλασμιδιακά γονίδια διαφορετικών στελεχών του *Z. mobilis* που φέρουν SOS χειριστές σε ένα μόνο στέλεχος

A/A	Προϊόν γονιδίου	Locus tag γονιδίου που φέρει πιθανό SOS χειριστή (Στέλεχος)	Locus tag ομόλογου γονιδίου στο οποίο δεν βρέθηκε πιθανός SOS χειριστής (Στέλεχος)
1	transcriptional regulator XRE family	Zmob_1766 (ATCC 10988)	Za10_1873 (NCIMB 11163)
2	Cobyrinic acid ac-diamide synthase	Zmob_1846 (ATCC 10988)	Za10_1832 (NCIMB 11163), ZCP4_RS09165 (CP4)
3	Hypothetical protein	Zmob_1857 (ATCC 10988)	Zmob_1761, Zmob_1802, Zmob_1824 (ATCC 10988), Za10_1854 και Za10_1890 (NCIMB 11163), ZCP4_RS09185 και ZCP4_RS09390 (CP4), Zymop_1726 και Zymop_2075 (ATCC 29192)
4	addiction module antitoxin. RelB/DinJ	Zymop_2071 (ATCC 29192)	Zmob_1758 (ATCC 10988)

3.4 Μεταγραφωματική ανάλυση των στελεχών *Z. mobilis* CP4 και UA1 σε SOS επαγόμενες συνθήκες

3.4.1 Συλλογή δειγμάτων των στελεχών CP4 και UA1 για αλληλούχηση RNA

Στα πλαίσια του προγράμματος CSP_52 (Υπεύθυνη Παππά Κ.Μ., σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Γονιδιωματικής JGI (Joint Genome Institute) του Υπουργείου Ενέργειας των Η.Π.Α) έγινε μεταγραφωματική ανάλυση μέσω αλληλούχησης RNA (RNASeq) διαφορετικών στελεχών του *Z. mobilis* σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Η γνώση της γονιδιακής έκφρασης στον οργανισμό ενδιαφέρει να οδηγήσει στην εξεύρεση συντονισμένων συστημάτων απόκρισης και των γονιδίων-μελών τους, σε αναλύσεις συγκριτικής γονιδιωματικής, καθώς και στην ταυτοποίηση υποθετικών γονιδίων που εκφράζονται.

Τα στελέχη τα οποία μελετήθηκαν στα πλαίσια του προγράμματος ήταν τα ZM4, ZM401 (ATCC 31822, εκκριτικό παράγωγο του ZM4, US Patent 4443543 A), CP4 και το *recA* παράγωγο του UA1. Ως προς τα στελέχη ZM4 και ZM401, μελετήθηκε η ανάπτυξή τους σε γλυκόζη έναντι σουκρόζης, σε αερόβια έναντι αναερόβιας ανάπτυξης και σε batch καλλιέργειες έναντι ανάπτυξης σε χημειοστάτη. Ως προς τα CP4 και UA1, μελετήθηκε η απόκρισή τους υπό SOS επαγωγή. Λεπτομερέστερα, οι συνθήκες που συλλέχθηκαν τα δείγματα του κάθε στελέχους δίνονται στον πίνακα 3.4.1. Για όλες τις συνθήκες συλλέχθηκαν βιολογικά διπλά δείγματα (δηλαδή επανάληψη του πειράματος και δειγματοληψία), εκτός από του χημειοστάτη από όπου συλλέχθηκαν τεχνικά διπλά δείγματα (δηλαδή δείγμα από το ίδιο ημερολογιακά πείραμα).

Για την επαγωγή του SOS συστήματος στα CP4 και UA1 επιλέχθηκε ο αλκυλιωτικός μεταλλαξογόνος παράγοντας μεθυλ-μεθανοσουλφονικό (MMS).

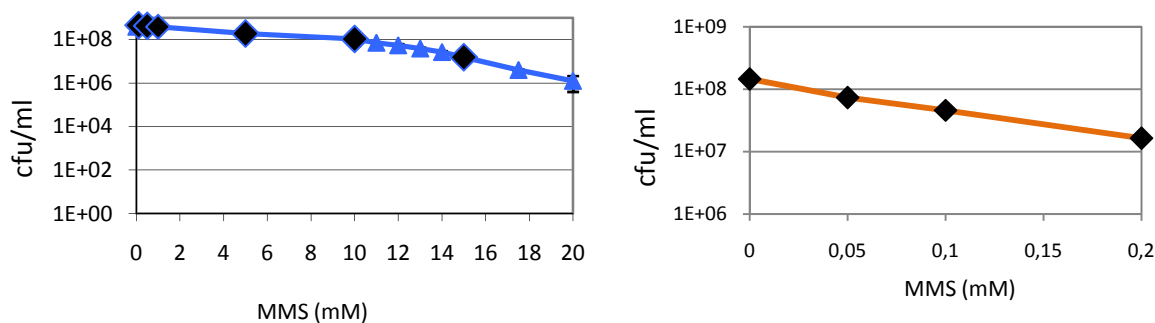
Κύτταρα από τα δύο στελέχη είχαν συλλεχθεί από OD₆₀₀: 0.8 (μέσο εκθετικής φάσης) και επώαστηκαν σε συγκεντρώσεις 0 mM (συνθήκη-μάρτυρας), 0.05, 0.1 και 0.2 mM για το UA1 και 0 (συνθήκη-μάρτυρας), 0.05, 0.1, 0.2, 1, 5, 10 και 15 mM για το CP4. Οι συγκεντρώσεις του MMS που επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόκληση των καλλιεργειών, οδήγησαν σε έως και μία δεκαδική πτώση της βιωσιμότητας (στην περίπτωση του CP4 έως 50 φορές), άρα ήταν αρκούντως δραστική χωρίς ωστόσο να υποβιβάζουν την ποσότητα και ποιότητα των κυττάρων και των βιομορίων εντός αυτών (γεγονός που επαληθεύτηκε πειραματικά, βλ. Παράγραφο 3.4.2 Εικόνες 3.4.6 και 3.4.13). Στη Εικόνα 3.4.1 φαίνεται η συσχέτιση των καμπυλών βιωσιμότητας και των δειγματοληψιών των κυττάρων για τις ακόλουθες απομονώσεις και αλληλουχίσεις RNA.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.4.1. Συνθήκες ανάπτυξης καλλιέργειών των στελεχών ZM4, ZM401, CP4 και UA1 για συλλογή κυττάρων και απομόνωση RNA για αλληλούχηση RNA στα πλαίσια του προγράμματος CSP_52

Στελέχη <i>Z. mobilis</i>		Συνθήκες ανάπτυξης	Υπό μελέτη συνθήκες	
ATCC 31821 (ZM4)	ATCC 31822 (ZM401)	Αναερόβιες batch καλλιέργειες με 2% γλυκόζη	Μέσο εκθετικής φάσης (O.D. ₆₀₀ : 0.85)	
			Μέση-τέλος εκθετικής (O.D. ₆₀₀ : 1.30)	
			Τέλος εκθετικής-αρχή στασιμότητας (O.D. ₆₀₀ : 1.44)	
			Στασιμότητα για 3.5 ώρες (O.D. ₆₀₀ : 1.52)	
		Αναερόβια καλλιέργεια σε χημειοστάτη με 10% γλυκόζη		
ATCC 31821 (ZM4)		Αναερόβιες batch καλλιέργειες με 4% σουκρόζη	Μέσο εκθετικής φάσης (O.D. ₆₀₀ : 1.20)	
			Μέση-τέλος εκθετικής (O.D. ₆₀₀ : 1.64)	
			Τέλος εκθετικής-αρχή στασιμότητας (O.D. ₆₀₀ : 1.82)	
			Στασιμότητα για 3 ώρες (O.D. ₆₀₀ : 1.91)	
			Αναερόβια καλλιέργεια σε χημειοστάτη με 10% σουκρόζη	
		Αερόβιες batch καλλιέργειες με 2% γλυκόζη		Μέσο εκθετικής φάσης (O.D. ₆₀₀ : 0.98)
				Μέση-τέλος εκθετικής (O.D. ₆₀₀ : 1.30)
				Τέλος εκθετικής-αρχή στασιμότητας (O.D. ₆₀₀ : 1.54)
				Στασιμότητα για 3 ώρες (O.D. ₆₀₀ : 1.59)
			Αερόβια καλλιέργεια σε χημειοστάτη με 10% γλυκόζη	
		Αερόβιες batch καλλιέργειες με 4% σουκρόζη		Μέσο εκθετικής φάσης (O.D. ₆₀₀ : 0.38)
				Στασιμότητα για 3.5 ώρες (O.D. ₆₀₀ : 0.66)
		Αερόβια καλλιέργεια σε χημειοστάτη με 10% σουκρόζη		
CP4	UA1	Αναερόβιες batch καλλιέργειες με 2% γλυκόζη στη μέση εκθετικής φάσης (O.D. ₆₀₀ : 0.80)	Επώαση με 0 mM (μάρτυρας)	
			Επώαση με 0.05 mM	
			0.1 mM	
			0.2 mM	
			1 mM	
			5 mM	
			10 mM	
CP4			15 mM	

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.4.1. Καμπύλες βιωσιμότητας των στελεχών CP4 (μπλε καμπύλη αριστερά) και UA1 (πορτοκαλί καμπύλη δεξιά) σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις του MMS. Με μαύρα σημεία στις καμπύλες σημειώνονται οι συγκεντρώσεις του MMS που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόκληση της SOS επαγωγής των στελεχών.

3.4.2 Ανάπτυξη πρωτοκόλλων απομόνωσης RNA από κύτταρα στελεχών *Z. mobilis* για σκοπούς αλληλούχησης RNA

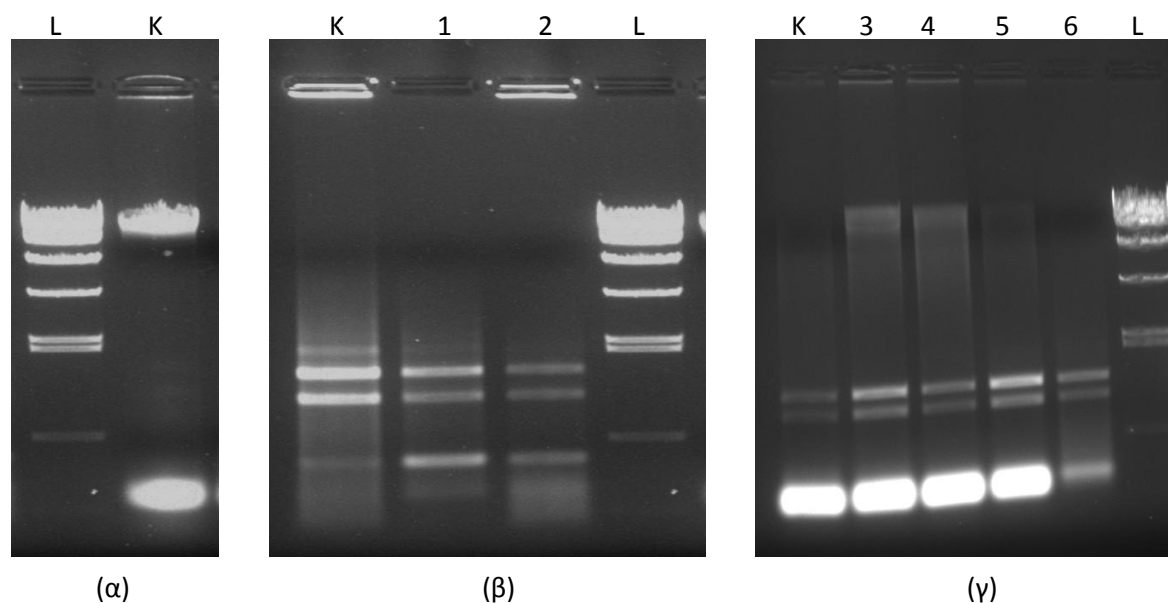
Για την διεκπεραίωση του προγράμματος CSP_52, και επομένως την αλληλούχηση RNA από τα συλλεγμένα δείγματα του *Z. mobilis*, χρειάστηκε να αναπτυχθεί αποτελεσματικό πρωτόκολλο απομόνωσης RNA που να δίνει την απαιτούμενη ποσότητα και ποιότητα RNA συναρτήσει του συνεργαζόμενου κέντρου γονιδιωματικής JGI ($A^{260/280}$ μεγαλύτερο του 1,9 και 300 ng RNA ανά δείγμα, <https://jgi.doe.gov/user-program-info/pmo-overview/project-materials-submission-overview/>).

Από kits απομόνωσης RNA, δοκιμάστηκε το Nucleospin RNA II kit της εταιρείας Macherey-Nagel, το Totally RNA kit και το mirVana kit της Ambion. Ηλεκτροφορήσεις ενδεικτικών απομονώσεων RNA με αυτά τα kits δίνονται στην Εικόνα 3.4.2. Η εικόνα ηλεκτροφόρησης του RNA που συλλεγόταν με το Totally RNA kit δεν ήταν η επιθυμητή και δεν υπολογίστηκε για το συγκεκριμένο δείγμα η ποσότητα και η καθαρότητά του. Για τα άλλα δύο kits, έγιναν απομονώσεις τόσο με το εγκεκριμένο πρωτόκολλο που περιείχαν όσο και με προσθήκη βημάτων α) εκχύλισης με όξινη φαινόλη:χλωροφόρμιο 5:1, β) εκχύλισης με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλικά αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1, γ) επώασης των κυττάρων με λυσοζύμη, δ) επώασης με DNάση (είτε πριν την εκχύλιση με φαινόλη είτε στην στήλη πρόσδεσης του RNA). Τα α και β βήματα δοκιμάστηκαν στο Nucleospin RNA II kit ενώ τα β, γ και δ στο το mirVana kit (συγκεκριμένα η εκχύλιση με phe:chl:IAA στο mirVana αντικατέστησε την εκχύλιση με acid phe:chl που συμπεριλάμβανε το πρωτόκολλο του kit). Μετρήσεις της ποσότητας του RNA και υπολογισμοί του λόγου $A^{260/280}$ για τα δείγματα που απομονώθηκαν από τα δύο kits έδειξε ότι με το Nucleospin RNA II kit λαμβάνονταν μέχρι 2,5 μg RNA/ml καλλιέργειας με λόγο $A^{260/280}$: 1,8 - 1,9 και με το mirVana kit έως 3,5 μg RNA/ml καλλιέργειας με λόγο $A^{260/280}$: 1,7 - 1,8. Οι προσθήκη βήματος εκχύλισης με phe:chl:IAA 25:24:1 στο Nucleospin RNA II βοήθησε στον καθαρισμό του δείγματος

3. Αποτελέσματα

αλλά μείωσε την ποσότητα του RNA, ενώ η εκχύλιση με acid phe:chl 5:1 δεν βοήθησε στον καθαρισμό και μείωσε την ποσότητα ακόμη παραπάνω (διαδρομές 1 και 2 αντίστοιχα εικόνα 3.4.2). Η εκχύλιση με phe:chl:IAA 25:24:1 καθώς και η προσθήκη βήματος επώασης με λυσοζύμη στο mirVana kit προκάλεσαν την εμφάνιση DNA στα δείγματα (διαδρομές 3 και 4), ενώ η προσθήκη DNάσης στην στήλη πρόσδεσης προκάλεσε την μείωση της τελικής ποσότητας του RNA (διαδρομή 6).

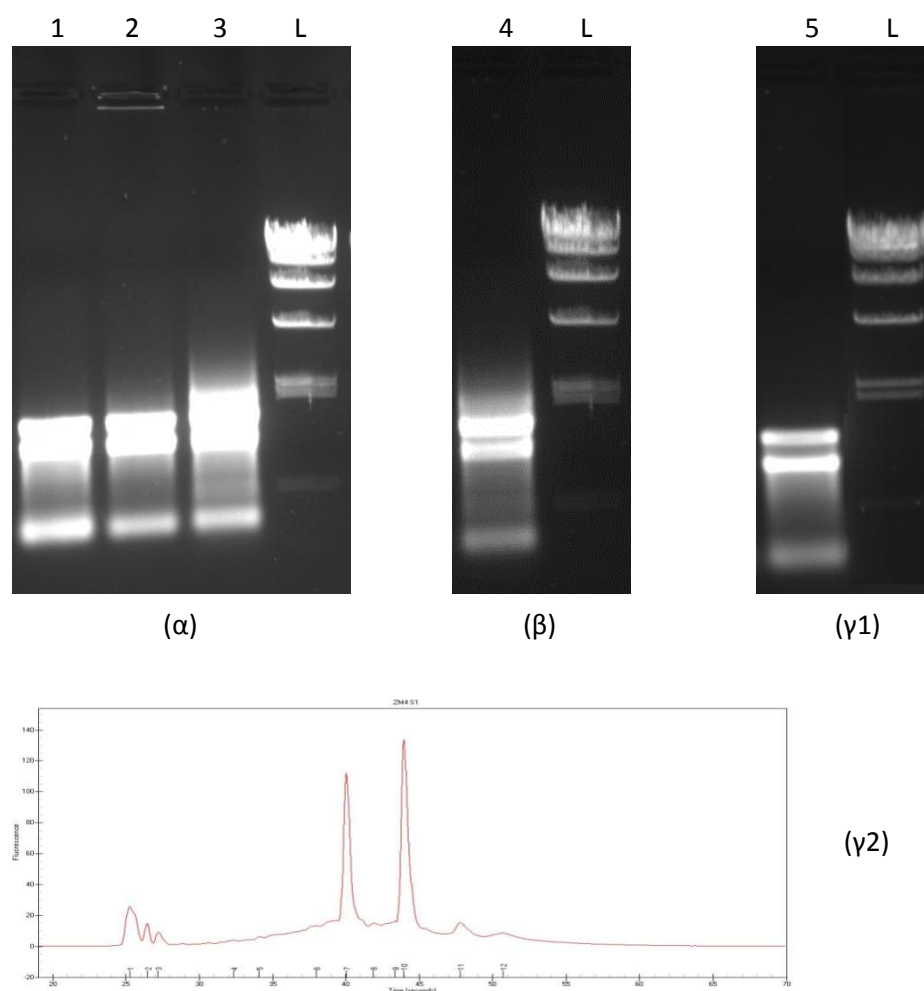
Το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA που δοκιμάστηκε με επιτυχία ήταν το πρωτόκολλο "Απλής Φαινόλης" (Simple Phenol Method, Atshan *et al.* 2012) με τις εξής τροποποιήσεις: α) χρήση acid phe:chl 5:1, αντί για 1:1 του αυτούσιου πρωτοκόλλου, στην λύση των κυττάρων, β) μείωση των αυθεντικών χρόνων vortex του πρωτοκόλλου στο μισό για συντόμευση του πρωτοκόλλου (Εικόνα 3.4.3), γ) προσθήκη σταδίου επώασης με DNAάση για αφαίρεση του DNA, δ) κατακρήμνιση με διπλάσιο όγκο αιθανόλης κατεψυγμένης στους -20°C (αντί της ισοπροπανόλης του αυτούσιου πρωτοκόλλου) για πιο αποδοτική και καθαρότερη κατακρήμνιση και ε), στην περίπτωση του εκκριτικού στελέχους ZM401 με την προσθήκη 200 μL NaCl 5M στο στάδιο κατακρήμνισης για απομάκρυνση των πολυσακχαριτών (Fang *et al.* 1992). Το αποτέλεσμα ήταν η απομόνωση RNA μεγαλύτερης ποσότητας (έως 36,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ καλλιέργειας) (Εικόνα 3.4.3) και καλύτερης ποιότητας ($A^{260}/_{280}$: 1,9-2,1) σε σύγκριση με τα προαναφερθέντα kits.



Εικόνα 3.4.2. Ηλεκτροφορήσεις δειγμάτων από απομονώσεις RNA με τα kits *Totally RNA* (α), *Nucleospin RNA II* (β), και *mirVana* (γ). L: ladder λHindIII 250 ng (Fermentas). K: απομόνωση RNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εκάστοτε kit. Διαδρομή 1: προσθήκη βήματος εκχύλισης με phe:chl:IAA 25:24:1, 2: προσθήκη βήματος εκχύλισης με acid phe:chl 5:1. Διαδρομή 3: αντικατάσταση εκχύλισης acid phe:chl 5:1 με phe:chl:IAA 25:24:1, 4: προσθήκη βήματος επώασης με λυσοζύμη, 5: επώαση με DNάση πριν τις εκχυλίσεις, 6: επώαση με DNάση στην στήλη πρόσδεσης RNA.

3. Αποτελέσματα

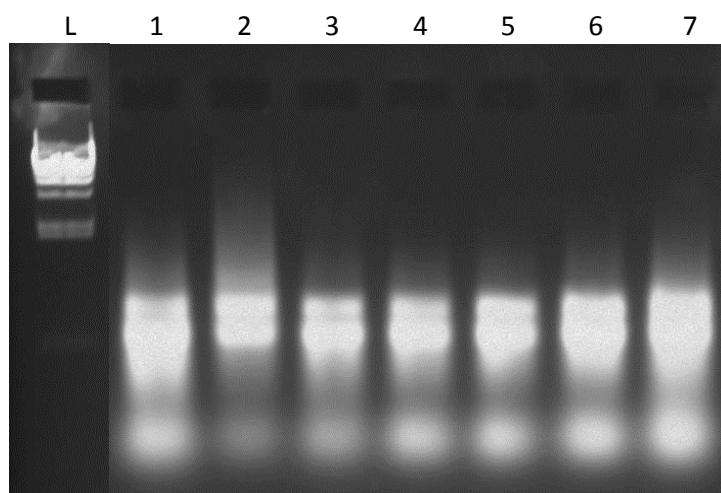
Επιπλέον, αξιοποιήθηκε η χρήση του αντιδραστηρίου RNAlater (Ambion), σε συνδυασμό με την αποθήκευση των κυττάρων στους -20°C ή -80°C , στην περίπτωση που δεν γινόταν απομόνωση RNA αμέσως μετά τη συλλογή των κυττάρων. Φάνηκε ότι το αντιδραστήριο δεν προκαλούσε πρόβλημα στην απομόνωση RNA (Εικόνα 3.4.3, β). Το πλήρες πρωτόκολλο απομόνωσης RNA που διαρθρώθηκε παρατίθεται αναλυτικά στα Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος 2.17. Η αξιολόγηση του τροποποιημένου πρωτοκόλλου έγινε σε έλεγχο δείγματος RNA, που απομονώθηκε με το πρωτόκολλο αυτό, σε bioanalyzer της εταιρείας BIO-RAD (Εικόνα 3.4.3, γ2) που διατίθεται στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών με την βοήθεια της δρ. Α. Δουλγεράκη.



Εικόνα 3.4.3. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων α: από απομόνωση RNA με το πρωτόκολλο "Απλής Φαινόλης" (α, διαδρομή 1), καθώς και με την ενσωμάτωση αλλαγών στο πρωτόκολλο (διαδρομή 2: χρήση *acid phe:chl* 5:1, 3: μείωση χρόνων vortex στο μισό). β: από κύτταρα αποθηκευμένα σε RNAlater. γ: απομονωμένου με το τελικά τροποποιημένο πρωτόκολλο. (γ1, διαδρομή 1) και ανάλυση αυτού με bioanalyzer της BIO-RAD (γ2). L: ladder λ HindIII 250 ng (Fermentas).

3. Αποτελέσματα

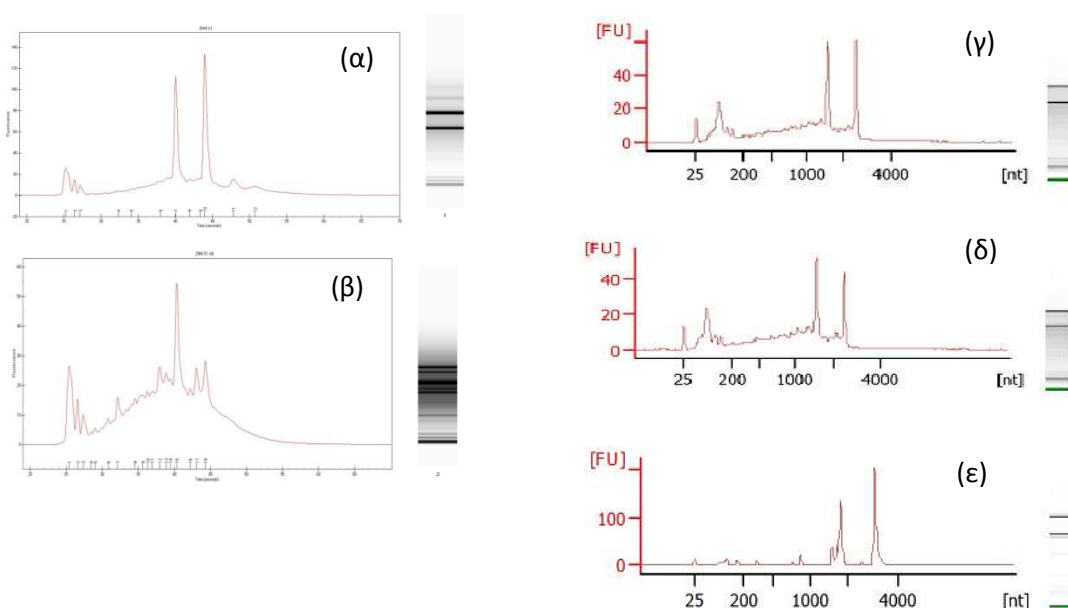
Το πρωτόκολλο δοκιμάστηκε και σε ενδεικτικά κυτταρικά δείγματα CP4 και UA1 που είχαν υποστεί επώαση με MMS, σε συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία (0, 0.05, 0.1 και 0.2 mM για το UA1, 0, 10 και 15 mM για το CP4). Η επίδραση του MMS στα κύτταρα των δύο στελεχών δεν φάνηκε να έχει αλλοιώσει την ακεραιότητα και την ποσότητα του RNA που συλλέγεται από αυτά (Εικόνα 3.4.4).



Εικόνα 3.4.4. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA που είχε απομονωθεί από κυτταρικά δείγματα CP4 και UA1, που είχαν επωαστεί με 0, 0.05, 0.1 και 0.2 mM MMS για το UA1 (διαδρομές 1-4 αντίστοιχα) και με 0, 10 και 15 mM MMS για το CP4 (διαδρομές 5-7 αντίστοιχα). L: ladder λHindIII 250 ng (Fermentas).

Επόμενος στόχος ήταν η δοκιμασία αποστολής δειγμάτων RNA στο κέντρο του JGI, για να ελεγχθεί η διασφάλιση της ακεραιότητας των δειγμάτων κατά την αποστολή τους. Σε δύο διαδοχικές δοκιμαστικές αποστολές δειγμάτων υπήρξε πρόβλημα στην ποιότητα του RNA που παρελήφθη. Συγκεκριμένα, στην πρώτη στάλθηκαν τρία δείγματα RNA που είχαν ξηρανθεί στους 65°C για περίπου 1 min. Ανάλυσή τους σε bioanalyzer στο JGI έδειξε ότι είχαν κατακερματιστεί πλήρως κατά την μεταφορά. Στη δεύτερη χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο RNASTable (Biomatrica, βλ. Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος 2.17). Από πατρικό δείγμα απομόνωσης εγκλείστηκαν 50 και 100 ng RNA σε tubes της εταιρείας που περιείχαν ενδεδειγμένες ποσότητες του RNASTable, στάλθηκαν στο JGI και αναλύθηκαν με το Prokaryote Total RNA Nano kit του Bioanalyzer 2100 της Agilent (project ID 1025880 και αριθμός δειγμάτων 47798 έως 9, Εικόνα 3.4.5γ και δ). Παράλληλα, εγκλείστηκαν 100 ng RNA σε αντίστοιχο tube για ανάλυσή του στον bioanalyzer της BIO-RAD στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Εικόνα 3.4.5β). Τόσο τα tubes που στάλθηκαν στο JGI όσο και το δείγμα που αναλύθηκε εδώ έδειξαν ποσοστό κατεκαρματισμού, παρόλο που το πατρικό δείγμα ήταν καλής ποιότητας (Εικόνα 3.4.5).

3. Αποτελέσματα



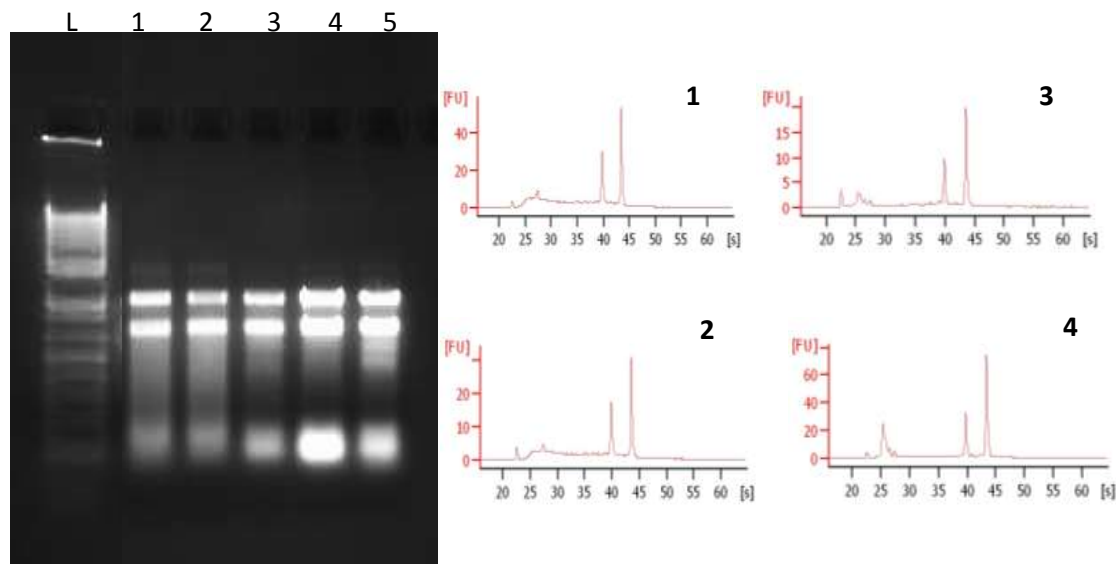
Εικόνα 3.4.5. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων RNA σε bioanalyzer της BIO-RAD (α,β) και της Agilent (γ-ε). Σε κάθε εικόνα δίνεται το διάγραμμα και δίπλα μια εικονική ηλεκτροφόρηση του δείγματος. α: Πατρικό δείγμα από όπου πάρθηκαν δείγματα για δοκιμασία του RNAsable. β: δείγμα εγκλεισμένο σε RNAsable που κρατήθηκε στο εργαστήριο, γ & δ: δείγματα εγκλεισμένα σε RNAsable που στάλθηκαν στο JGI, ε: δείγμα μάρτυρας του JGI.

Κατόπιν, των προηγούμενων, και για τη διασφάλιση της ποιότητας κατά την απομόνωση και αποστολή, υπήρξε φιλοξενία στο εργαστήριο του καθηγητή Robert Landick (Charles Yanofsky Professor of Biochemistry & Bacteriology, Microbial Sciences, University of Wisconsin/WEI/GLBRC) με τον οποίον υπάρχει τρέχουσα επιστημονική συνεργασία.

Τα κυτταρικά δείγματα που είχαν συλλεχθεί στα πλαίσια του προγράμματος CSP_52 κι εγκλειστεί σε RNAlater, μεταφέρθηκαν στο WEI σε ξηρό πάγο. Εκεί, δοκιμαστικές απομονώσεις με το Nucleospin RNA II kit της Macherey-Nagel δεν είχαν επιτυχία, ενώ με το πρωτόκολλο Hot Phenol που εφαρμόζουν στα εργαστήριά τους (ακολουθεί την ίδια αρχή με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου μας, Rhodius & Gross 2011) είχαν τα επιθυμητά αποτελέσματα μόνο όταν εφαρμοζόταν σε κύτταρα φρέσκιας καλλιέργειας και όχι σε κύτταρα εγκλεισμένα σε RNAlater. Κατόπιν τούτου, προστέθηκε ως πρώτο βήμα πρωτοκόλλου βήμα αφαίρεσης του RNAlater. Η αφαίρεσή του επετεύχθη με διάλυμα PBS όπου στα 10 mL διαλύματος προσθέτονταν 1,25 mL 5% rne:95% EtOH. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για ξέπλυμα των κυττάρων τόσο πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου Hot Phenol όσο και του Nucleospin RNA II kit. Τα αποτελέσματα της προσθήκης αυτού του βήματος στο φαίνονται στην Εικόνα 3.4.6 (και το ολοκληρωμένο πρωτόκολλο στα Υλικά και

3. Αποτελέσματα

Μέθοδοι, Παράγραφο 2.17), όπου παρατηρείται ότι η ενσωμάτωση του βήματος ξεπλύματος του RNAlater στο Hot Phenol πρωτόκολλο απέδωσε πολύ καλής ποιότητας και ποσότητας RNA, ενώ στο Nucleospin RNA II τα δείγματα έδειχναν μικρό κατακερματισμό.

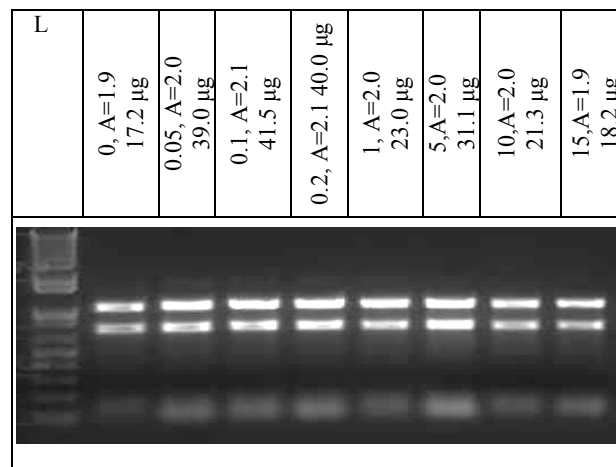
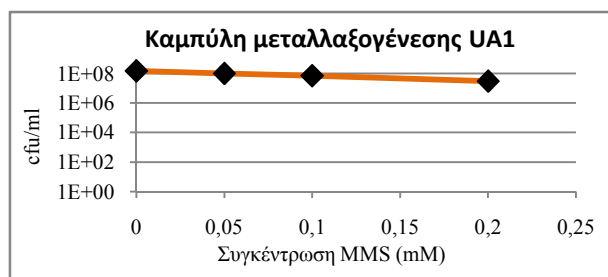
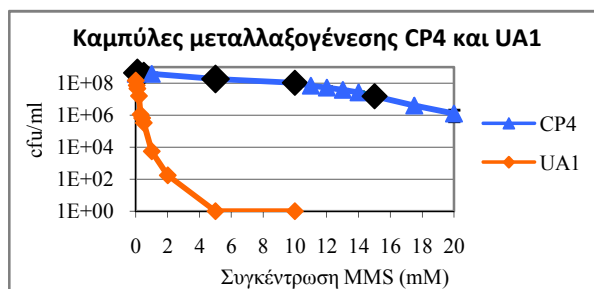


Εικόνα 3.4.6. Ηλεκτροφορήσεις και αναλύσεις σε bioanalyzer δειγμάτων RNA από απομονώσεις που συμπεριλάμβαναν βήμα αφαίρεσης του RNAlater. L: δείκτης μοριακών βαρών Διαδρομές και διαγράμματα 1 και 2: απομόνωση με το Nucleospin RNA II, 3 και 4: απομόνωση με το Hot Phenol, 5: απομόνωση από φρέσκα κύτταρα με το Hot Phenol (μάρτυρας).

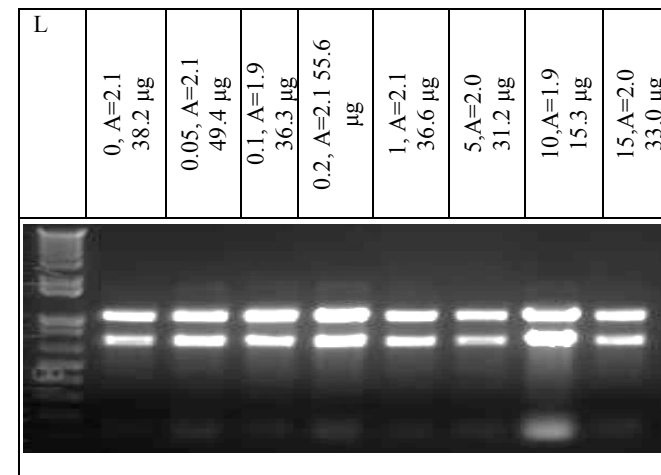
Με το τροποποιημένο τελικό Hot Phenol πρωτόκολλο του WEI έγιναν οι απομονώσεις RNA από τα 70 δείγματα του προγράμματος CSP_52. Στην εικόνα 3.4.7 δίνονται οι απομονώσεις των δειγμάτων του CP4 και UA1 στις συγκεντρώσεις του MMS, συμπεριλαμβανομένων και των βιολογικών επαναληπτικών τους.

Ποσότητες ~3 μg ανά δείγμα στάλθηκαν για αλληλούχηση στο JGI με ειδική πλάκα μικροτιλοδότησης (κωδικός πλάκας 27-94292, κωδικοί δειγμάτων 76680 ως το 76749). Στα Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος 2.18 δίνονται οι λεπτομέρειες για την αλληλούχηση των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αναρτήθηκαν και ομαδοποιήθηκαν σε βάση του JGI (genome.jgi.doe.gov). 2 μόνο δείγματα (τεχνικά επαναληπτικά δείγματα ZM4 αερόβιας ανάπτυξης σε βιοαντιδραστήρα με σουκρόζη) αποδείχθηκαν ότι έχουν προέλθει από *Klebsiella*, πιθανόν από μόλυνση του βιοαντιδραστήρα, και απορρίφθηκαν.

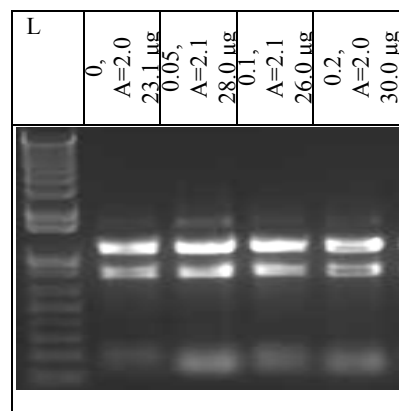
3. Αποτελέσματα



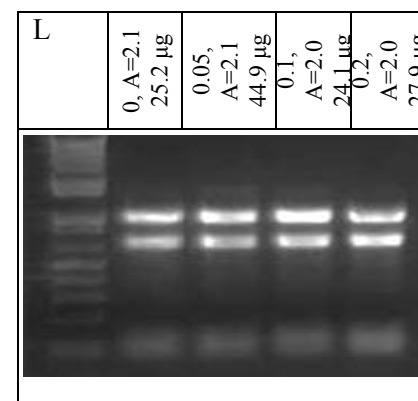
(α)



(β)



(γ)



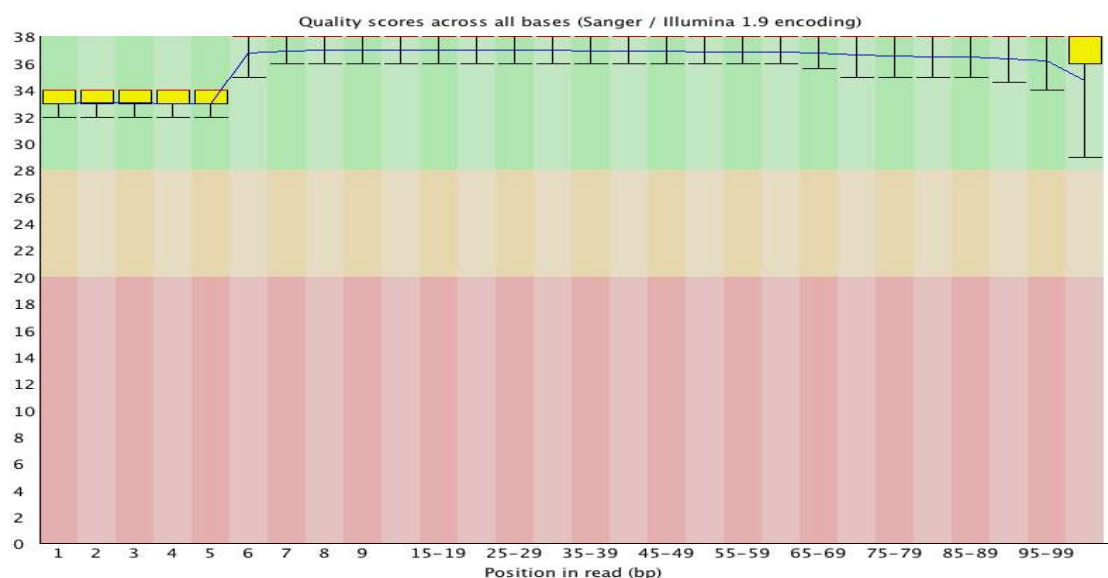
(δ)

Εικόνα 3.4.7. Ηλεκτροφορήσεις απομονώσεων RNA από τα δείγματα του CP4 και του UA1 για τους σκοπούς μεταγραφωμιακής αλληλούχησης. Αριστερά και για βοήθεια υπενθυμίζονται οι καμπύλες μεταλλαξογένεσης, για τα CP4 και UA1 και τα σημεία συλλογής δειγμάτων (μαύροι ρόμβοι). Δεξιά δίνονται οι φωτογραφίες ηλεκτροφορήσεων των απομονώσεων RNA από τα αντίστοιχα σημεία δειγματοληψιών. Συμβολισμοί: L=ladder, 0-15=συγκέντρωση MMS (mM) όπου έγιναν οι δειγματοληψίες από τις καμπύλες και οι αντίστοιχες απομονώσεις RNA, A= λόγος απορροφήσεων 260nm/280nm. α: δείγματα CP4, β: επαναληπτικά δείγματα CP4, γ: δείγματα UA1, δ: επαναληπτικά δείγματα UA1. Δίνεται η συνολική ποσότητα RNA (μg) που απομονώθηκε από κάθε δείγμα.

3. Αποτελέσματα

3.4.3 Ποιοτικός έλεγχος των αποτελεσμάτων αλληλούχησης και ποσοτικοποίηση των αλληλουχημένων μεταγράφων

Μετά την αλληλούχηση των RNAs, ακολούθησε ποιοτικός έλεγχος των αποτελεσμάτων. Διερεύνηση του ποσοστού λάθους στην αλληλούχηση κάθε μεταγράφου έδειξε ότι η πιθανότητα λάθους είναι μικρότερη του 0.1% (Εικόνα 3.4.8), ποσοστό άνω του επιτρεπτού για συνέχιση των αναλύσεων.



Εικόνα 3.4.8. Ποιοτικός έλεγχος της Illumina για το ποσοστό λάθους στην αλληλούχηση των μεταγράφων. Στον οριζόντιο άξονα δίνεται μήκος βάσεων στα μετάγραφα. Στον κάθετο άξονα δίνεται το σκορ λάθους όπου τιμή μεγαλύτερη του 30 (πράσινη περιοχή διαγράμματος) υποδεικνύει λάθος μικρότερο του 0.1%. Το διάγραμμα συμβολίζει την διακύμανση του ποσοστού λάθους κατά μήκος των μεταγράφων.

Στη συνέχεια έγινε συσχέτιση του κάθε δείγματος με όλα τα υπόλοιπα δείγματα του αντίστοιχου στελέχους, συμπεριλαμβανομένων και του δείγματος επανάληψης (biological duplicate). Τα heatmaps των συσχετίσεων για τα δείγματα του CP4 δίνονται στην εικόνα 3.4.9 και του UA1 στην εικόνα 3.4.10.

Παρατηρήθηκε ότι η συσχέτιση μεταξύ των πρώτων και δεύτερων επαναληπτικών δειγμάτων στο CP4 κυμαίνεται από 0.98 έως και 1, (δηλαδή τα βιολογικά διπλά δείγματα είναι όμοια κατά 98-100%). Επιπλέον, εμφανίζεται ένα πρότυπο ομοιότητας όπου τα δείγματα 0-1 mM μοιάζουν περισσότερο μεταξύ τους (κατά 98-100%) και σχηματίζουν μία πρώτη ομάδα, τα δείγματα 10 και 15 mM δείχνουν μόνο τους μία δεύτερη ομάδα (μοιάζουν μεταξύ τους 94-100% και με τα υπόλοιπα από 51-85%) και το δείγμα του 5 mM και το επαναλαμβανόμενο δεύτερο του φαίνεται να έχει μικρή ομοιότητα με την ομάδα 0-1 mM (90-97%) και ακόμη μικρότερη με των 10-15 mM (73-85%). Η συσχέτιση για το UA1 ήταν καλύτερη εφόσον τα επαναληπτικά δείγματα είχαν συσχέτιση 100%, αλλά όλα τα δείγματα του UA1 μεταξύ τους είχαν σχεδόν τέλεια συσχέτιση (99-100%).

3. Αποτελέσματα

	0_A	0_B	0.05_A	0.05_B	0.1_A	0.1_B	0.2_A	0.2_B	1_A	1_B	5_A	5_B	10_A	10_B	15_A	15_B
0_A	1	1	0,99	1	0,99	1	1	1	1	1	0,96	0,94	0,7	0,67	0,59	0,61
0_B	1	1	0,99	1	0,99	1	1	1	1	1	0,96	0,94	0,7	0,67	0,59	0,61
0.05_A	0,99	0,99	1	0,99	1	0,99	1	0,99	0,99	0,94	0,9	0,65	0,62	0,54	0,56	
0.05_B	1	1	0,99	1	0,99	1	1	1	1	0,96	0,93	0,69	0,66	0,57	0,59	
0.1_A	0,99	0,99	1	0,99	1	0,99	1	0,99	0,98	0,98	0,93	0,9	0,63	0,60	0,51	0,54
0.1_B	1	1	0,99	1	0,99	1	1	1	1	1	0,96	0,94	0,69	0,67	0,58	0,6
0.2_A	1	1	1	1	1	1	1	0,99	0,99	0,99	0,96	0,92	0,68	0,65	0,56	0,58
0.2_B	1	1	0,99	1	0,99	1	0,99	1	1	1	0,97	0,95	0,71	0,68	0,59	0,61
1_A	1	1	0,99	1	0,98	1	0,99	1	1	1	0,97	0,95	0,72	0,69	0,6	0,62
1_B	1	1	0,99	1	0,98	1	0,99	1	1	1	0,97	0,95	0,72	0,69	0,6	0,62
5_A	0,96	0,96	0,94	0,96	0,93	0,96	0,96	0,97	0,97	0,97	1	0,99	0,81	0,81	0,7	0,73
5_B	0,94	0,94	0,9	0,93	0,9	0,94	0,92	0,95	0,95	0,95	0,99	1	0,85	0,85	0,73	0,77
10_A	0,7	0,7	0,65	0,69	0,63	0,69	0,68	0,71	0,72	0,72	0,81	0,85	1	0,98	0,98	0,98
10_B	0,67	0,67	0,62	0,66	0,6	0,67	0,65	0,68	0,69	0,69	0,81	0,85	0,98	1	0,94	0,97
15_A	0,59	0,59	0,54	0,57	0,51	0,58	0,56	0,59	0,6	0,6	0,7	0,73	0,98	0,94	1	0,99
15_B	0,61	0,61	0,56	0,59	0,54	0,6	0,58	0,61	0,62	0,62	0,73	0,77	0,98	0,97	0,99	1

Εικόνα 3.4.9. Heatmap συσχετίσεων μεταξύ των δειγμάτων του CP4. Τα δείγματα συμβολίζονται με δύο παραμέτρους που χωρίζονται με κάτω παύλα: με ένα νούμερο που δείχνει την συγκέντρωση του MMS, από όπου συλλέχθηκε το δείγμα, και με το γράμμα A ή B που συμβολίζει το δείγμα ή το επαναληπτικό του αντίστοιχα. Τα νούμερα δείχνουν την ομοιότητα των δύο δειγμάτων, όπου 1 σημαίνει ότι είναι πλήρης. Τα χρώματα είναι απεικόνιση των αριθμών με πράσινο την μέγιστη ομοιότητα και κόκκινο την ελάχιστη.

	0_A	0_B	0.05_A	0.05_B	0.1_A	0.1_B	0.2_A	0.2_B
0_A	1	1	1	1	1	0,99	1	1
0_B	1	1	1	1	1	1	1	1
0.05_A	1	1	1	1	1	0,99	1	1
0.05_B	1	1	1	1	1	1	1	1
0.1_A	1	1	1	1	1	0,99	1	1
0.1_B	0,99	1	0,99	1	0,99	1	0,99	1
0.2_A	1	1	1	1	1	0,99	1	1
0.2_B	1	1	1	1	1	1	1	1

Εικόνα 3.4.10. Heatmap συσχετίσεων μεταξύ των δειγμάτων του UA1. Οι επεξηγήσεις είναι ίδιες με της Εικόνας 3.4.15.

3. Αποτελέσματα

Στη συνέχεια, μέσω του προγράμματος GLSeq (Moskvin *et al.* 2014) στο W.E.I., έγινε αντιστοίχιση των μεταγράφων στο γονίδιο από όπου προέρχονται και ποσοτικοποίηση του αριθμού των μεταγράφων για το κάθε γονίδιο στο κάθε δείγμα. Το GLSeq είναι ένας αγωγός προγραμμάτων (pipeline) που συνδέει επί μέρους προγράμματα για την επεξεργασία αποτελεσμάτων αλληλούχησης RNA. Έπειτα, συγκρίθηκαν οι αριθμοί μεταγράφων μεταξύ του κάθε δείγματος και του επαναληπτικού του για το κάθε γονίδιο και την κάθε συνθήκη-συγκέντρωση MMS. Αφαιρέθηκαν οι αριθμοί μεταγράφων που διέφεραν από τους αντίστοιχους στο επαναληπτικό δείγμα κατά 1.5 φορές εάν δεν εναρμονίζονται με αυτές των εκατέρωθεν συνθηκών (βλ. παράδειγμα πίνακας 3.4.3).

Πίνακας 3.4.3. Παράδειγμα αριθμού μεταγράφων που διέφεραν από τους αντίστοιχους αριθμούς στο βιολογικό διπλό δείγμα

Locus tag	Αριθμός δείγματος	Αριθμός μεταγράφων ανά δείγμα mM MMS		
		5	10	15
ZCP4_RS09615	1	495	497	517
	2	474	795	499
ZCP4_RS09290	1	1258	1994	1443
	2	1424	1031	1012

Με κόκκινο σημειώνονται οι τιμές που διέφεραν από τις αντίστοιχες στα βιολογικά διπλά δείγματα και βάσει ενδεδειγμένων κριτηρίων αφαιρέθηκαν

Με αυτόν τον τρόπο αφαιρέθηκε το 0,9% του συνόλου των μεταγράφων των γονιδίων (370 στα 43200), επηρεάζοντας 120 γονίδια. Στη συνέχεια πάρθηκε μέσος όρος αριθμού μεταγράφων για το κάθε γονίδιο στη κάθε συνθήκη-συγκέντρωση MMS και υπολογίστηκε ο λόγος έκφρασης του κάθε γονιδίου για την κάθε συνθήκη. Θεωρήθηκε υπερέκφραση όταν ο λόγος του αριθμού των μεταγράφων στην συνθήκη προς τον αριθμό μεταγράφων στην συνθήκη-μάρτυρα (0 mM) είναι άνω του 1,45. Υποέκφραση θεωρήθηκε όταν ο αντίστροφος λόγος (μάρτυρας προς συνθήκη) ήταν μικρότερος του -1,45 (σε αυτή τη περίπτωση το μείον χρησιμοποιείται για να δείχθει ότι υπολογίζεται ο αντίστροφος λόγος). Ο λόγος που αποφασίστηκε αυτό το κριτήριο είναι υπερέκφρασης και υποέκφρασης επαφύοταν στη διαπίστωση ότι τα επιδιορθωτικά γονίδια *lexA* και *uvrA*, που είναι κατεξοχήν SOS γονίδια, ξεκινούν να υπερεκφράζονται με λόγο 1,46. Το ίδιο με τα επιδιορθωτικά γονίδια *ruvA* και *ruvC* που ξεκινούν να υπερεκφράζονται με λόγους 1,48 και 1,49 αντίστοιχα (Πίνακας 3.4.4). Αντίστοιχα χαμηλοί λόγοι υπερέκφρασης έχουν χρησιμοποιηθεί και βιβλιογραφικά (Smoot *et al.* 2001, Desikan *et al.* 2001, Stintzi 2003).

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.4.4. Επιδιορθωτικά γονίδια που ξεκινούν να υπερεκφράζονται με λόγο μικρότερο του 1,5

Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
		0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
ZCP4_1046	SOS-response transcriptional repressor LexA	1,46	1,85	2,09	3,49	3,88	4,11	4,01
ZCP4_1568	Excinuclease ABC subunit A UvrA	-1,22	-1,18	1,14	1,46	2,88	9,65	14,36
ZCP4_1087	Holliday junction resolvase RuvC	1,49	1,51	1,15	1,01	-1,34	-2,74	-2,94
ZCP4_1086	Holliday junction DNA helicase RuvA	1,48	1,61	1,04	-1,30	-1,34	-4,05	-3,43

Με αποχρώσεις του κόκκινου χρώματος στα κελιά συμβολίζονται οι διαφορετικοί λόγοι υπερέκφρασης (πορτοκαλί: 1,45-1,49, σκούρο πορτοκαλί: 1,50-1,99, κόκκινο: 2,00 και άνω). Με πράσινο συμβολίζονται οι λόγοι υποέκφρασης.

3.4.4. Αντιστοίχιση των μεταγράφων με τα προβλεπόμενα γονίδια του γονιδιώματος του CP4

Οι αλληλουχίες των μεταγράφων που βρέθηκαν στις βιβλιοθήκες του RNASeq για τα δύο στελέχη, αντιστοιχήθηκαν, με τη χρήση του GLSeq (Moskvin *et al.* 2014), με τα γονίδια που έχουν προβλεφθεί και διατίθενται στην GenBank στην κατάθεση NC_022900 του χρωμοσώματος του CP4 και στις καταθέσεις NC_022901, NC_022902, NC_022903, NC_022910 και NC_022913 των πλασμιδίων του CP4.

Η κατάθεση στην GenBank αριθμεί για το χρωμόσωμα 1712 και για τα πλασμίδια 158 προβλεπόμενα πλαίσια ανάγνωσης πρωτεϊνών. Από τις βιβλιοθήκες των δειγμάτων-μαρτύρων (0 mM) και για το CP4 και για το UA1 βρέθηκε ότι τα 1660 από τα 1712 μεταγράφονται στο χρωμόσωμα (ποσοστό 97%) και 140 από τα 158 στα πλασμίδια (ποσοστό 89%) και στα δύο στελέχη (συνολικά 1800 μεταγραφόμενα γονίδια). Τα 52 χρωμοσωμικά και 18 πλασμιδιακά γονίδια των οποίων μετάγραφα δεν εντοπίστηκαν στις βιβλιοθήκες παρατίθενται στους πίνακες 5.2 και 5.3 αντίστοιχα στο Παράρτημα. Συγκεκριμένα στα πλασμίδια, 7 γονίδια στο NC_022901, 3 στο NC_022902, 3 στο NC_022903 και 4 στο NC_022910 βρέθηκαν να μη μεταγράφονται. Το NC_022913 διαθέτει 29 προβλεπόμενα πλαίσια ανάγνωσης εκ των οποίων όλα βρέθηκαν να μεταγράφονται. Τα γονίδια που βρέθηκαν να μη μεταγράφονται στις δεδομένες συνθήκες ήταν υποθετικά, ψευδογονίδια αλλά και γονίδια (11 στον αριθμό, 8 χρωμοσωμικά και 3 πλασμιδιακά, Πίνακας 3.4.5) στα οποία είχαν προβλεφθεί και προσδιοριστεί οι πρωτεΐνες που μπορεί να παράγονται. Χαρακτηριστικά, ανάμεσα στα χρωμοσωμικά, αρκετά είναι γονίδια αζωτοδέσμευσης, πιθανότατα συνοργανωμένα (σημειωμένα με αστερίσκο, Πίνακας 3.4.5).

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.4.5. Γονίδια πρωτεϊνών με προβλεπόμενη λειτουργία των οποίων μετάγραφα δεν βρέθηκαν στις RNASeq βιβλιοθήκες των CP4 και UA1

Locus tag	Προϊόν γονιδίου
Χρωμοσωμικά γονίδια	
ZCP4_1113	Cys-tRNA(Pro) deacylase
ZCP4_1348 *	ferredoxin III, nif-specific
ZCP4_0656	flagellar hook-basal body complex protein FliE
ZCP4_1346 *	Iron-sulfur cluster assembly accessory protein
ZCP4_1355 *	Mo-nitrogenase iron protein subunit NifH
ZCP4_1347 *	NifQ family protein
ZCP4_1342 *	Nitrogen fixation protein NifW
ZCP4_1285	protein translocase subunit yajC
Πλασμιδιακά γονίδια	
ZCP4_RS09030	phage tail protein I
ZCP4_RS09080	small terminase subunit
ZCP4_RS09070	tail X family protein

Με αστερίσκο επισημειώνονται γονίδια αζωτοδέσμευσης που πιθανώς είναι συννοργανωμένα.

3.4.5. Σύγκριση μεταγραφωμάτων του CP4 και του UA1 παρουσία του μεταλλαξογόνου παράγοντα MMS

Μετά τον υπολογισμό του λόγου έκφρασης για όλα τα γονίδια που βρέθηκαν μεταγραφόμενα στο CP4 και UA1 και για να ελεγχθεί η επαγωγιμότητα ή όχι του UA1 στην πρόκληση με MMS, συγκρίθηκαν τα πρότυπα διαφορετικής έκφρασης μεταξύ των δύο στελεχών και αναζητήθηκαν τα γονίδια που έχουν διαφορετική έκφραση στο UA1 για κάθε κοινή συνθήκη-συγκέντρωση MMS (0.05, 0.1 και 0.2 mM). Τα heatmaps των προτύπων έκφρασης δίνονται για κάθε συγκέντρωση στην Εικόνα 3.4.11.

Οι λόγοι έκφρασης για όλα τα γονίδια του UA1 σε όλες τις συγκεντρώσεις του MMS δίνονται στο πίνακα 5.4 στο Παράρτημα. Παρατηρήθηκε ότι στις τρεις συγκεντρώσεις συνολικά 67 διαφορετικά γονίδια έχουν διαφορετική έκφραση στο CP4 (τα υπερκεραζόμενα δίνονται στον πίνακα 5.5 και τα υποεκφραζόμενα στον 5.6 στο Παράρτημα) ενώ μόνο 9 στο UA1 (Πίνακας 3.4.6). Ήδη από τα heatmaps της εικόνας 3.4.11, και σε σύγκριση με το CP4, φαίνεται η έλλειψη επαγόμενων γονιδίων παρουσία του MMS στο UA1.

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.4.11. Heatmaps διαφορικής έκφρασης γονιδίων των στελεχών CP4 και UA1 σε τρεις συγκεντρώσεις του MMS. Κάθε ένα από τα τρία heatmaps αφορά τη διαφορική έκφραση των γονιδίων του CP4 (αριστερή στήλη) και του UA1 (δεξιά στήλη) στη συγκέντρωση που αναφέρεται. Κάτω από τα heatmaps δίνεται ο αντίστοιχος αριθμός των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων. Κάθε γραμμή στα heatmaps είναι η διαφορική έκφραση διαφορετικού γονιδίου με σειρά συναρτήσει του αύξοντα αριθμού στη GenBank. Με κόκκινο συμβολίζεται η υπερέκφραση, με πράσινο η υποέκφραση.

		Συγκεντρώσεις MMS (mM)					
		0.05		0.1		0.2	
		CP4	UA1	CP4	UA1	CP4	UA1
Αριθμός διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων	Υπερεκφραζόμενα	27	4	29	4	14	3
	Υποεκφραζόμενα	33	1	34	2	11	0

Μόνο 9 γονίδια είναι διαφορικά εκφραζόμενα στο UA1: 7 υπερεκφραζόμενα και 2 υποεκφραζόμενα. Κανένα υπερεκφραζόμενο δεν ξεπερνά τον λόγο 2 και κανένα υποεκφραζόμενο τον λόγο -2 στο UA1. Μόνο 2 από τα 9 του UA1 δείχνουν να έχουν κοινή διαφορική έκφραση και στο CP4 (τα ZCP4_1106 και ZCP4_RS00900), και συγκεκριμένα υπερεκφράζονται και στα δύο στελέχη, με το ZCP4_RS00900 να είναι γονίδιο υποθετικής πρωτεΐνης (στο CP4 λόγος υπερέκφρασης 3,93).

Στη συνέχεια, αναζητήθηκαν τα επιδιορθωτικά γονίδια που υπερεκφράζονται στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του MMS στο CP4, και αναζητήθηκαν οι λόγοι έκφρασής τους και στο UA1 (Πίνακας 3.4.7). Βρέθηκαν τα *lexA*, *rivA* και *rivC* να υπερεκφράζονται στο CP4 στις τρεις συγκεντρώσεις. Κανένα επιδιορθωτικό γονίδιο δεν

3. Αποτελέσματα

έχει διαφορετική έκφραση στο UA1 σε καμία από τις τρεις συγκεντρώσεις του MMS το οποίο καταδεικνύει τον SOS-κατεσταλμένο φαινότυπό του.

Πίνακας 3.4.6. Γονίδια που έχουν διαφορετική έκφραση στο UA1 και συγκριτικά το πρότυπο έκφρασής τους στο CP4

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)					
			UA1			CP4		
			0,05	0,1	0,2	0,05	0,1	0,2
1	ZCP4_0055	YeaQ/YmgE, transglycosylase-associated protein	1,45	1,00	-1,20	-1,73	-1,37	-1,27
2	ZCP4_0382	putative secretion activating protein	1,55	1,56	1,20	-1,06	-1,05	1,16
3	ZCP4_0881	hypothetical protein	1,45	1,50	1,53	1,02	1,38	-1,20
4	ZCP4_0885	hypothetical protein	-1,02	-1,50	-1,06	-1,36	-1,15	-1,17
5	ZCP4_1106	TPR repeat-containing protein	1,56	1,11	1,19	1,46	1,55	1,04
6	ZCP4_1748	putative homoserine kinase type II	1,58	1,04	1,05	-1,28	-1,07	-1,21
7	ZCP4_RS00900	hypothetical protein	-1,10	1,37	1,49	1,79	2,39	3,93
8	ZCP4_RS08890	hypothetical protein	-1,61	-1,46	-1,04	-1,14	1,29	-1,08
9	ZCP4_RS09570	hypothetical protein	1,51	1,58	1,56	1,05	1,09	1,11

Με κλιμακώσεις του κόκκινου χρώματος στα κελιά συμβολίζονται οι διαφορετικοί λόγοι υπερέκφρασης (πορτοκαλί: 1,45-1,49, σκούρο πορτοκαλί: 1,50-1,99, κόκκινο: 2,00 και άνω). Με πράσινο συμβολίζονται οι λόγοι υποέκφρασης. Με πλάγια γράμματα των locus tags αναφέρονται τα πλασμιδιακά γονίδια.

Πίνακας 3.4.7. Επιδιορθωτικά γονίδια που υπερεκφράζονται στις συγκεντρώσεις 0,05-0,2 mM στο CP4 και συγκριτικά το πρότυπο έκφρασής τους στο UA1

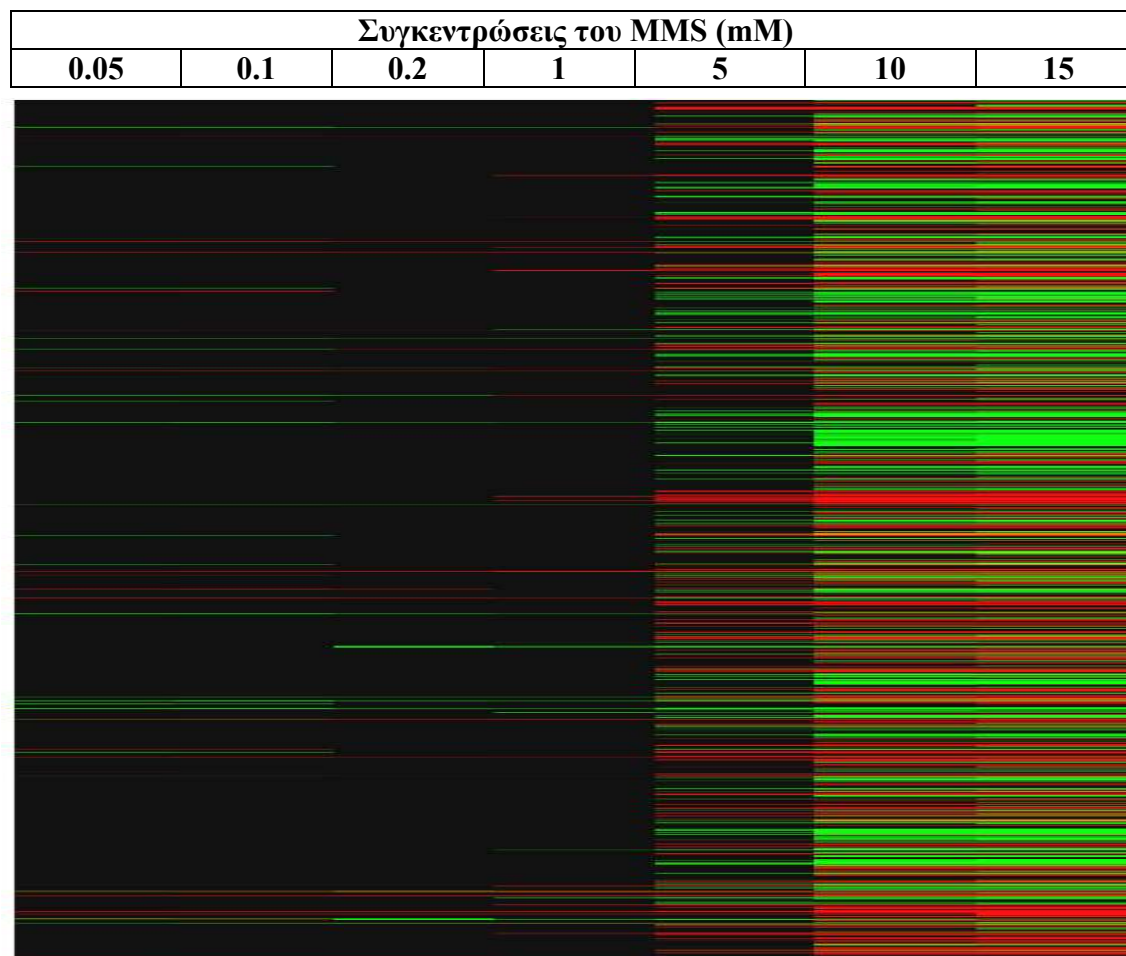
A/A	Locus Tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)					
			CP4			UA1		
			0,05	0,1	0,2	0,05	0,1	0,2
1	ZCP4_1046	SOS-response transcriptional repressor LexA	1,46	1,85	2,09	-1,06	-1,00	-1,08
2	ZCP4_1086	Holliday junction DNA helicase RuvA	1,48	1,61	1,04	1,19	-1,01	-1,04
3	ZCP4_1087	Holliday junction endonuclease RuvC	1,49	1,51	1,15	1,02	1,04	-1,03

Οι χρωματικές επεξηγήσεις των κελιών εξηγούνται στον πίνακα 3.4.6.

3. Αποτελέσματα

3.4.6 Μελέτη του προφίλ της έκφρασης των γονιδίων του CP4 υπό SOS επαγωγή

Διερευνήθηκε το μεταγραφικό προφίλ του CP4 σε όλες τις συγκεντρώσεις του MMS που δοκιμάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Μέσω αυτού, αναζητήθηκε ο αριθμός των γονιδίων που έχουν διαφορετική έκφραση παρουσία MMS, δηλαδή ο αριθμός των γονιδίων που ανταποκρίνονται στο SOS stimulon, με κατώφλι λόγω ορισμένο στα 1,5 και άνω για υπερέκφραση και -1,5 και κάτω για υποέκφραση, όπως έχει ήδη οριστεί (Smoot *et al.* 2001, Desikan *et al.* 2001, Stintzi 2003). Το προφίλ της διαφορετικής έκφρασης των γονιδίων του CP4 συναρτήσει της αύξησης των συγκεντρώσεων φαίνεται στην Εικόνα 3.4.12.



Εικόνα 3.4.12 Heatmap της διαφορετικής έκφρασης των γονιδίων του στελέχους CP4 στις συγκεντρώσεις του MMS που αναγράφονται. Έκαστη γραμμή αποτελεί συμβολισμό της διαφορετικής έκφρασης συγκεκριμένου γονιδίου με κατάταξη σύμφωνα με τον αύξοντα αριθμό στην GenBank. Με κόκκινο συμβολίζεται η υπερέκφραση, με πράσινο η υποέκφραση.

Στον πίνακα 3.4.8 δίνονται οι συνολικοί αριθμοί των γονιδίων που υπερεκφράζονται και υποεκφράζονται σε κάθε συγκέντρωση.

3. Αποτελέσματα

Πίνακα 3.4.8. Οι αριθμοί των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων του CP4 σε κάθε συγκέντρωση του MMS.

	Διαφορική έκφραση	Συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
		0,05	0,1	0,2	1	5	10	15
Αριθμός διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων	Υπερεκφραζόμενα	27	29	14	28	243	549	611
	Υποεκφραζόμενα	33	34	11	11	229	542	604
	Σύνολο	60	63	25	39	472	1091	1215

Παρατηρήθηκε ότι στην χαμηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (0.05 mM) εμφανίστηκαν συνολικά 60 διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια (27 υπερεκφραζόμενα και 33 υποεκφραζόμενα, βλ. Πίνακες 5.5 και 5.6 αντίστοιχα στο Παράρτημα), δηλαδή το 3% των 1800 μεταγραφόμενων γονιδίων, ενώ στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (15 mM) εμφανίστηκαν 1215 διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια (611 υπερεκφραζόμενα και 604 υποεκφραζόμενα), δηλαδή το 67,5% των 1800 μεταγραφόμενων γονιδίων. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η απόκριση στην παρουσία του MMS, το SOS stimulon, είναι αρκετά ευρύ και περιλαμβάνει τα 2/3 των γονιδίων. Οι ταυτότητες των μεταγραφόμενων γονιδίων και οι λόγοι έκφρασής τους στις συγκεντρώσεις του MMS δίνονται στο Παράρτημα στον Πίνακα 5.7.

Πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ σε συγκέντρωση 0.1 mM MMS είχαμε 63 διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια, στα 0.2 mM παρατηρήθηκε μια πτώση στον αριθμό τους (25 διαφορετικά εκφραζόμενα), και κατόπιν αύξηση στο 1 mM σε 39, και περαιτέρω αύξηση στα 5 mM σε 472. Παράλληλα, με την αριθμητική αυτή διαφορά, εντοπίστηκε διαφορά και στις ταυτότητες των γονιδίων (αλλαγή προτύπου έκφρασης): 38 συνολικά γονιδίων (Πίνακας 3.4.9), τα οποία ενώ ήταν διαφορετικά εκφραζόμενα στα 0,05 και 0,1 mM, σταματούν να έχουν διαφορετική έκφραση στα 0,2 mM.

Ανάμεσα στα γονίδια που υπερεκφράζονται μέχρι τα 0,1 mM και μετά αλλάζει το πρόσημο της έκφρασής τους έχουμε χαρακτηριστικά τα επιδιορθωτικά γονίδια *runA* και *runC*. Στα γονίδια που υποεκφράζονται μέχρι τα 0,1 mM έχουμε γονίδιο του κυτοχρώματος *c*, γονίδια που συμμετέχουν σε αποκρίσεις έναντι στρες (*osmC*, *csbD*), γονίδια μαστιγίων, ανθεκτικότητας στον υδράργυρο (*merC*) και δέσμευσης αζώτου (*nifX*).

Από το 1 mM και έπειτα, τα γονίδια που έχουν ήδη συγκεκριμένη διαφορετική έκφραση, την διατηρούν (Πίνακας 3.4.10) ενώ συνεχώς νέα γονίδια ξεκινούν να υπερ-/υποεκφράζονται και παραμένουν υπερ-/υποεκφραζόμενα αντίστοιχα. Τα γονίδια που από τις χαμηλές συγκεντρώσεις (0,05-1 mM) ήταν διαφορετικά εκφραζόμενα και κράτησαν το ίδιο προφίλ, οργανώθηκαν ανά λειτουργίες με βάση τον κώδικα Clusters of Orthologous Groups (COG, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) (Εικόνα 3.4.13).

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.4.9. Γονίδια των οποίων το μεταγραφικό προφίλ αλλάζει στα 0,2-1 mM

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
			0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
Από υπερέκφραζόμενα σε υποεκφραζόμενα									
1	ZCP4_0064	hypothetical protein	1,70	1,72	-1,13	-1,33	-1,41	-1,78	-1,91
2	ZCP4_0313	dihydropteroate synthase	1,73	1,63	1,07	1,04	-1,22	-1,34	-1,65
3	ZCP4_0434	hypothetical protein	1,96	2,07	1,15	1,19	1,15	1,10	-1,15
4	ZCP4_0607	signal transduction protein	1,59	1,57	1,19	1,14	1,12	1,20	1,18
5	ZCP4_0862	MarC-related protein	1,51	1,46	1,18	1,07	1,21	-1,32	-1,20
6	ZCP4_1056	transcriptional regulator, RpiR family	1,74	1,85	1,33	1,17	1,34	-1,02	-1,21
7	ZCP4_1086	Holliday junction DNA helicase RuvA	1,48	1,61	1,04	-1,30	-1,34	-4,05	-3,43
8	ZCP4_1087	Holliday junction endonuclease RuvC	1,49	1,51	1,15	1,01	-1,34	-2,74	-2,94
9	ZCP4_1106	TPR repeat protein	1,46	1,55	1,04	-1,14	-1,30	-1,33	-1,50
10	ZCP4_1323	5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase	1,51	1,59	1,10	-1,09	1,24	1,20	1,47
11	ZCP4_1451	peptidylprolyl isomerase FKBP-type	1,51	1,51	1,08	1,05	-1,30	-3,82	-5,12
12	ZCP4_1496	rRNA large subunit m3Psi methyltransferase RlmH	1,93	1,60	-1,09	1,05	-1,17	-2,06	-2,33
13	ZCP4_0337	TonB-dependent receptor	1,46	1,46	1,43	1,41	-1,07	-4,03	-4,37
14	ZCP4_RS09135	MFS transporter	1,46	1,50	-2,89	-1,38	-1,95	-1,81	1,03
15	ZCP4_RS09685	hypothetical protein	1,73	2,24	1,25	1,11	1,30	2,90	2,39
Από υποεκφραζόμενα σε υπερέκφραζόμενα									
1	ZCP4_0055	Transglycosylase-associated protein	-1,73	-1,37	-1,27	-1,31	1,33	3,69	4,79
2	ZCP4_0058	glucose-methanol-choline oxidoreductase	-1,60	-1,60	-1,12	-1,07	1,19	4,81	4,26
3	ZCP4_0059	cytochrome c, mono- and diheme variants family	-1,43	-1,55	-1,19	-1,12	1,13	4,92	4,43
4	ZCP4_0147	formamidopyrimidine-DNA glycosylase	-1,52	-1,50	1,09	-1,18	1,29	4,45	5,47
5	ZCP4_0307	DUF329 domain-containing protein (zinc binding)	-1,43	-1,45	-1,24	-1,27	1,39	3,43	4,05
6	ZCP4_0427	MerC mercury resistance protein	-1,62	-1,47	1,08	1,39	6,44	39,87	68,93
7	ZCP4_0534	hypothetical protein	-1,77	-1,80	-1,27	-1,13	-1,16	-1,09	-1,15
8	ZCP4_0558	CsbD family protein	-1,59	-1,62	1,18	1,29	6,32	8,69	7,79
9	ZCP4_0601	OsmC family protein	-1,58	-1,35	-1,04	1,13	4,01	9,10	10,13
10	ZCP4_0618	hypothetical protein	-2,11	-1,55	1,11	1,13	2,69	6,35	6,57
11	ZCP4_0658	flagellin/flagellar hook associated protein	-1,58	-1,59	-1,34	1,08	1,44	3,65	4,31
12	ZCP4_0671	flagellar hook capping protein	-1,66	-1,47	-1,04	-1,00	1,14	1,04	-1,16
13	ZCP4_0952	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,97	-2,05	-1,14	1,11	3,03	9,05	10,60
14	ZCP4_0969	SIMPL domain-containing protein	-1,66	-1,55	-1,03	1,05	1,88	7,94	8,93
15	ZCP4_1032	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	-1,88	-1,49	1,14	-1,05	2,43	10,00	13,73
16	ZCP4_1332	periplasmic binding protein	-1,54	-1,77	-1,38	-1,42	-1,42	-1,32	-1,01
17	ZCP4_1350	nitrogen fixation protein NifX	-1,87	-1,46	-1,20	-1,09	-1,40	1,30	1,51
18	ZCP4_1386	hypothetical protein	-1,60	-1,53	1,10	-1,03	1,93	6,28	6,54
19	ZCP4_1418	Chagasin family peptidase inhibitor I42	-1,81	-1,61	1,14	-1,02	2,06	1,81	1,67
20	ZCP4_1457	Thioredoxin domain protein	-1,68	-1,46	1,23	1,14	3,86	15,52	19,62
21	ZCP4_1506	3-demethylubiquinone-9 methyltransferase	-1,64	-1,40	1,06	1,08	2,14	5,02	5,98
22	ZCP4_RS04065	hypothetical protein	-1,94	-2,05	1,08	-1,13	1,26	1,95	2,03
23	ZCP4_RS08955	Beta/Gamma crystallin-domain containing protein	-1,60	-1,55	1,15	1,04	1,23	1,34	1,17

Με κλιμακώσεις του κόκκινου χρώματος στα κελιά συμβολίζονται οι διαφορετικοί λόγοι υπερέκφρασης (πορτοκαλί: 1,45-1,49, σκούρο πορτοκαλί: 1,50-1,99, κόκκινο: 2,00-4,99, σκούρο κόκκινο: 5,00 και άνω). Με κλιμακώσεις του πράσινου συμβολίζονται οι λόγοι υποέκφρασης (ανοιχτό πράσινο: -1,45 - -1,49, πράσινο: -1,50 - -1,99, σκούρο πράσινο: -2,00 και κάτω). Με πλάγια γράμματα των locus tags δίνονται τα πλασμιδιακά γονίδια.

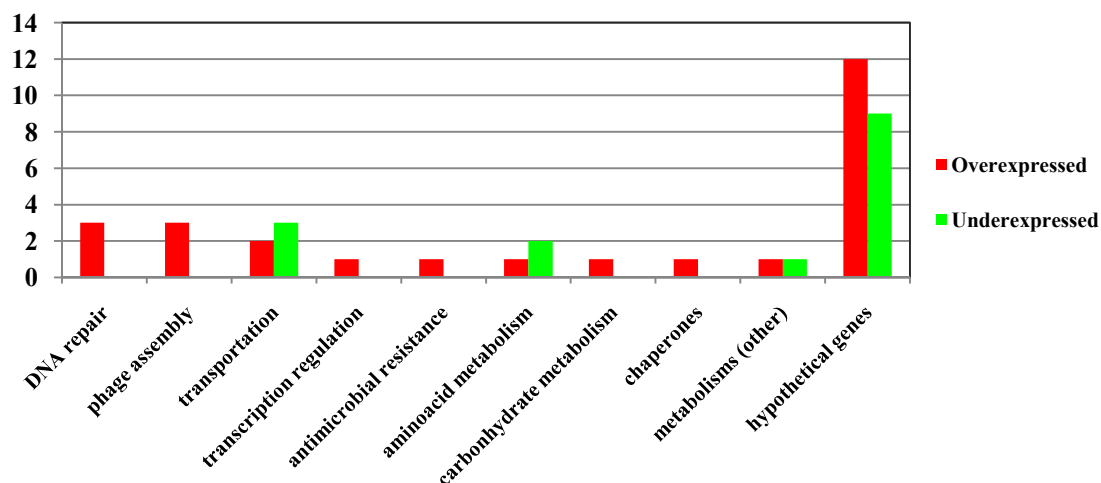
3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.4.10. Γονίδια του CP4 που ξεκινούν να έχουν διαφορετική έκφραση στο εύρος των συγκεντρώσεων 0,05-1 mM και κρατούν το ίδιο πρότυπο μέχρι τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του MMS

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
			0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
Υπερεκφραζόμενα									
1	ZCP4_0076	ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system	1,79	1,88	1,53	1,50	1,49	2,68	3,53
2	ZCP4_0384	hypothetical protein	-1,05	1,39	1,04	1,98	1,89	2,84	1,88
3	ZCP4_0880	hypothetical protein	1,03	1,02	1,09	1,46	1,29	1,69	1,48
4	ZCP4_0889	hypothetical protein	1,02	1,21	1,19	1,55	1,76	3,93	2,89
5	ZCP4_0890	hypothetical protein	-1,02	-1,07	1,15	1,73	1,69	2,59	1,97
6	ZCP4_0166	recombinase A	1,09	1,14	1,18	1,75	3,22	9,32	10,23
7	ZCP4_1046	SOS-response repressor, LexA	1,46	1,85	2,09	3,49	3,88	4,11	4,01
8	ZCP4_1568	excinuclease ABC subunit A	-1,22	-1,18	1,14	1,46	2,88	9,65	14,36
9	ZCP4_0167	Amidophosphoribosyltransferase ComF	1,26	1,38	1,30	2,03	2,44	2,94	2,63
10	ZCP4_0173	Aspartate racemase	-1,19	-1,06	1,23	1,83	3,73	7,72	7,30
11	ZCP4_0261	phage shock protein C, PspC	1,02	-1,01	1,29	1,54	2,73	9,37	17,65
12	ZCP4_0326	heat shock protein Hsp20	-1,02	-1,04	1,40	1,57	4,18	9,43	10,80
13	ZCP4_0381	secretion-related protein	-1,21	1,03	1,39	2,60	1,45	1,99	2,10
14	ZCP4_0382	glycosyl hydrolase	-1,06	-1,05	1,16	2,39	1,77	2,95	2,59
15	ZCP4_1341	molybdenum utilization protein ModD	1,76	1,43	1,76	1,53	1,69	2,68	3,05
16	ZCP4_1733	hypothetical protein	1,14	1,07	1,43	1,54	2,18	2,18	2,34
17	ZCP4_1754	Replication protein	-1,48	-1,16	1,07	1,45	5,00	11,51	11,66
18	ZCP4_RS00900	hypothetical protein	1,79	2,39	3,93	12,51	19,53	29,05	27,25
19	ZCP4_RS05670	hypothetical protein	1,59	1,82	2,14	2,35	2,78	5,32	7,07
20	ZCP4_RS08925	hypothetical protein	1,23	1,32	1,19	1,88	3,84	5,13	5,49
21	ZCP4_RS09015	phage baseplate assembly protein V	1,80	1,70	1,83	2,01	3,47	9,77	8,78
22	ZCP4_RS09035	baseplate assembly protein J	1,54	1,59	1,56	1,46	1,69	3,14	4,43
23	ZCP4_RS09055	hypothetical protein	1,38	1,72	1,86	1,74	2,15	3,92	3,52
24	ZCP4_RS09185	hypothetical protein	1,21	1,44	1,33	1,96	1,33	1,89	2,63
25	ZCP4_RS09295	hypothetical protein	1,28	1,03	1,27	1,56	2,11	1,81	2,24
26	ZCP4_RS09645	phage capsid scaffolding protein	1,59	1,49	1,85	2,28	1,99	1,55	1,24
Υποεκφραζόμενα									
1	ZCP4_0246	hypothetical protein	1,15	1,05	-1,32	-1,45	-1,79	-2,24	-3,53
2	ZCP4_0514	hypothetical protein	1,14	1,18	-1,21	-1,51	-2,49	-3,67	-3,70
3	ZCP4_0718	PLP-dependent, histidinol-phosphate	-2,23	-2,51	-1,49	-1,23	-3,30	-3,00	-2,14
4	ZCP4_0900	hypothetical protein	-1,75	-2,04	-1,56	-1,71	-1,26	-1,88	-3,25
5	ZCP4_1130	hypothetical protein	-1,11	-1,03	-1,27	-2,11	-1,36	-1,45	-1,60
6	ZCP4_1206	hypothetical protein	-1,23	-1,31	-1,16	-1,54	-1,87	-1,81	-1,47
7	ZCP4_1213	sulfate adenyllyltransferase	-1,30	-1,19	-2,41	-1,32	-2,07	-1,88	-1,68
8	ZCP4_1214	adenyllylsulfate kinase	-1,32	-1,27	-2,50	-1,42	-1,99	-2,32	-1,86
9	ZCP4_1371	TonB-dependent receptor	-1,21	-1,08	-1,25	-1,83	-1,43	-1,51	-1,65
10	ZCP4_1675	hypothetical protein	-1,19	-1,38	-1,07	-1,63	-1,85	-2,82	-1,35
11	ZCP4_1750	ethanolamine transporter	-1,59	-1,75	-1,56	-1,12	-3,03	-2,65	-3,79
12	ZCP4_RS08335	hypothetical protein	1,29	1,29	-1,08	-1,57	-2,58	-2,22	-2,72
13	ZCP4_RS09140	ligand-gated channel	-1,29	-1,02	-3,60	-1,48	-2,72	-2,45	-1,13

Οι χρωματικοί κώδικες είναι ίδιοι με τον Πίνακα 3.4.9.

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.4.13. Διάγραμμα αριθμού γονιδίων του CP4 που ξεκινούν να έχουν διαφορετική έκφραση (κόκκινες στήλες: υπερεκφραζόμενα, πράσινες: υποεκφραζόμενα) από τα 0,05-1 mM και διατηρούν το ίδιο πρότυπο έκφρασης μέχρι τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χωρισμένα ανά κυτταρική λειτουργία.

Παρατηρήθηκαν ως επί το πλείστον γονίδια επιδιόρθωσης, τα *recA*, *lexA* και *uvrA*, και γονίδια συγκρότησης φάγων (phage baseplate assembly protein V, baseplate assembly protein J, phage capsid scaffolding protein) να ξεκινούν να υπερεκφραζονται από τις χαμηλές συγκεντρώσεις και να παραμένουν υπερεκφραζόμενα. Όσον αφορά την αντίστοιχη κατηγορία των υποεκφραζόμενων γονιδίων, παρατηρήθηκαν ως επί το πλείστον γονίδια μεταφορέων και μεταβολισμού αμινοξέων. Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι βρέθηκαν 12 υπερεκφραζόμενα και 9 υποεκφραζόμενα υποθετικά γονίδια που μεταγράφονται.

Στη συνέχεια αναζητήθηκαν διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια που έδειχναν μεγάλους λόγους διαφορετικής έκφρασης. Συγκεκριμένα τα εντόνως υπερεκφραζόμενα γονίδια, με λόγο υπερέκφρασης μεγαλύτερο ή ίσο του 10 (Πίνακας 3.4.11), και τα εντόνως υποεκφραζόμενα γονίδια, με λόγο υποέκφρασης μικρότερο ή ίσο του -10 (Πίνακας 3.4.12). Στα εντόνως υπερεκφραζόμενα γονίδια βρέθηκαν γονίδια επιδιόρθωσης, τα *uvrA*, *uvrB* και *recA*, γονίδια ανταπόκρισης σε στρες (*pscB*, *pspC*, *hrcA*, *hsp20*, *osmC*, μεταγραφικός παράγοντας που ανταποκρίνεται σε οξειδωτικό στρες και μεμβρανική πρωτεΐνη σχετιζόμενη με όξινο στρες), γονίδια που συμμετέχουν στο δίπλωμα πρωτεϊνών (*clpA*, *clpB*), γονίδια μεταφορέων αραβινόζης, γονίδιο ανθεκτικότητας στον υδράργυρο (*merC*) και γονίδιο αλκοολικής αφυδρογονάσης. Στα εντόνως υποεκφραζόμενα γονίδια, 11 από αυτά είναι γονίδια ριβοσωμικών πρωτεϊνών.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.4.11. Γονίδια που έχουν λόγο υπερέκφρασης μεγαλύτερο ή ίσο του 10 σε τουλάχιστον μία συγκέντρωση του MMS

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
			0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
1	ZCP4_0427	MerC mercury resistance protein	-1,62	-1,47	1,08	1,39	6,44	39,87	68,93
2	ZCP4_1261	hypothetical protein	-1,30	-1,37	1,01	1,11	2,70	10,11	16,50
3	ZCP4_1122	hydroxylamine reductase	-1,06	-1,03	1,04	1,20	3,31	11,59	36,51
4	ZCP4_0093	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding protein	-1,42	-1,23	1,16	1,18	4,19	31,37	30,32
5	ZCP4_0967	hypothetical protein	-1,41	-1,36	1,22	1,16	3,27	18,42	27,39
6	ZCP4_RS00900	hypothetical protein	1,79	2,39	3,93	12,51	19,53	29,05	27,25
7	ZCP4_0413	TonB-dependent receptor	1,10	1,09	1,18	1,13	6,42	22,73	25,43
8	ZCP4_1568	excinuclease ABC subunit A	-1,22	-1,18	1,14	1,46	2,88	9,65	14,36
9	ZCP4_0909	excinuclease ABC subunit B	-1,31	-1,34	1,01	1,03	1,96	8,69	10,48
10	ZCP4_0166	recombinase A	1,09	1,14	1,18	1,75	3,22	9,32	10,23
11	ZCP4_1618	hypothetical protein	-1,75	-1,44	-1,00	1,01	3,90	19,72	22,83
12	ZCP4_1457	Thioredoxin domain protein	-1,68	-1,46	1,23	1,14	3,86	15,52	19,62
13	ZCP4_1017	hypothetical protein	-1,38	-1,20	1,08	1,02	3,43	15,55	19,44
14	ZCP4_0005	FtsH-interacting integral membrane protein	-1,21	-1,20	1,03	1,02	2,50	11,67	19,43
15	ZCP4_0261	phage shock protein C, PspC	1,02	-1,01	1,29	1,54	2,73	9,37	17,65
16	ZCP4_1123	transcriptional regulator responding to oxidative stress	1,06	1,05	1,08	1,16	3,21	19,14	37,90
17	ZCP4_1202	heat-inducible transcription repressor HrcA	-1,11	-1,22	-1,06	1,04	1,94	9,52	11,90
18	ZCP4_0326	heat shock protein Hsp20	-1,02	-1,04	1,40	1,57	4,18	9,43	10,80
19	ZCP4_0601	OsmC family protein	-1,58	-1,35	-1,04	1,13	4,01	9,10	10,13
20	ZCP4_0262	phage shock protein B	-1,21	1,07	1,10	1,18	2,23	5,99	10,55
21	ZCP4_1105	Outer-membrane-associated acid tolerance proteins	-1,29	-1,37	-1,01	1,17	3,05	11,06	15,16
22	ZCP4_1501	ATP-dependent metalloprotease FtsH	-1,08	-1,14	-1,01	1,04	1,97	10,13	14,89
23	ZCP4_1744	hypothetical protein	-1,06	-1,08	1,00	1,15	2,28	11,91	13,88
24	ZCP4_1414	Aldehyde Dehydrogenase	-1,52	-1,28	1,16	1,35	5,95	13,45	13,78
25	ZCP4_1032	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	-1,88	-1,49	1,14	-1,05	2,43	10,00	13,73
26	ZCP4_1707	ATP-dependent chaperone ClpB	-1,37	-1,29	1,04	1,15	3,24	11,47	13,45
28	ZCP4_0869	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	-1,34	-1,25	1,11	1,35	4,94	15,85	18,15
28	ZCP4_1458	peptidase S16 lon domain protein	1,02	-1,01	1,03	1,00	1,88	8,61	12,78
29	ZCP4_0015	arabinose efflux permease family protein	-1,38	-1,40	-1,04	-1,01	2,31	8,43	12,45
30	ZCP4_1232	arabinose efflux permease family protein	1,16	1,02	-1,08	1,01	2,03	7,85	12,43
31	ZCP4_0019	TrpR binding protein WrbA	-1,29	-1,24	-1,06	1,22	3,37	11,60	12,31
32	ZCP4_1754	hypothetical protein	-1,48	-1,16	1,07	1,45	5,00	11,51	11,66
33	ZCP4_1182	sigma 54 modulation protein/ribosomal protein S30EA	-1,55	-1,38	-1,02	1,04	4,48	11,48	11,11
34	ZCP4_0952	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,97	-2,05	-1,14	1,11	3,03	9,05	10,60
35	ZCP4_1121	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaA	1,03	1,01	1,17	1,04	1,95	7,30	10,38
36	ZCP4_1583	major facilitator superfamily MFS 1	-1,20	-1,18	1,12	1,16	2,46	6,39	10,37

Οι χρωματικοί κώδικες του πίνακα είναι ίδιοι με του Πίνακα 3.4.9.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.4.12. Γονίδια που έχουν λόγο υποέκφρασης μικρότερο ή ίσο του -10 σε τουλάχιστον μία συγκέντρωση του MMS

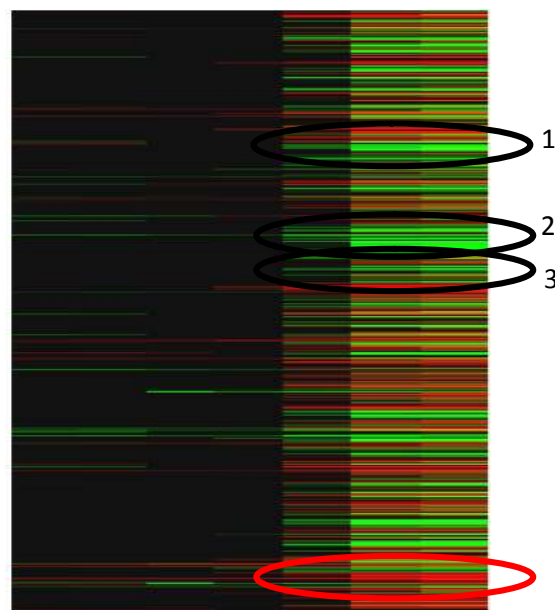
A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
			0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
1	ZCP4_0606	acetolactate synthase	-1,02	-1,05	-1,12	-1,08	-1,96	-12,07	-27,26
2	ZCP4_0213	putative oxidoreductase	1,07	1,08	-1,04	-1,12	-3,20	-16,72	-23,97
3	ZCP4_0212	Glutamate synthase (ferredoxin)	1,04	-1,01	-1,06	-1,14	-2,74	-11,59	-20,85
4	ZCP4_0829	cell wall hydrolase SleB	1,18	1,23	-1,03	-1,29	-2,54	-7,35	-15,94
5	ZCP4_1637	hypothetical protein	1,19	1,16	1,02	1,10	-1,67	-9,61	-15,86
6	ZCP4_0306	hypothetical protein	1,41	1,43	1,01	-1,06	-1,83	-6,14	-15,35
7	ZCP4_0429	30S ribosomal protein S9	1,09	1,08	-1,04	1,04	-1,31	-6,96	-14,61
8	ZCP4_0428	50S ribosomal protein L13	1,00	-1,05	1,02	1,10	-1,29	-7,51	-14,49
9	ZCP4_1335	PhnA protein	1,02	1,06	-1,04	-1,19	-2,69	-10,83	-14,43
10	ZCP4_1383	dihydroxy-acid dehydratase	-1,23	-1,48	-1,41	-1,14	-2,70	-9,95	-14,21
11	ZCP4_0108	50S ribosomal protein L9	1,13	1,31	1,12	-1,07	-1,59	-8,07	-14,12
12	ZCP4_0247	50S ribosomal protein L19	1,04	-1,07	-1,16	-1,17	-2,85	-10,19	-13,74
13	ZCP4_0765	30S ribosomal protein S10	1,17	1,22	1,09	-1,07	-1,44	-7,21	-13,25
14	ZCP4_0728	ribosomal protein S15	1,02	-1,04	1,05	-1,04	-1,63	-8,76	-12,74
15	ZCP4_0824	Formate--tetrahydrofolate ligase	-1,18	-1,28	-1,36	-1,19	-3,15	-9,37	-12,17
16	ZCP4_0110	30S ribosomal protein S6	1,23	1,22	1,18	1,16	-1,12	-7,43	-11,81
17	ZCP4_0305	maf protein	1,40	1,38	1,11	1,08	-1,48	-5,54	-11,71
18	ZCP4_1759	30S ribosomal protein S4	1,14	1,04	-1,12	-1,05	-2,20	-8,13	-11,59
19	ZCP4_1630	ribose-phosphate pyrophosphokinase	1,13	1,15	1,00	1,00	-1,79	-8,42	-11,50
20	ZCP4_0089	50S ribosomal protein L36P	1,43	1,37	-1,05	-1,11	-2,75	-10,00	-11,30
21	ZCP4_1641	Inorganic diphosphatase	1,16	1,12	1,10	1,03	-1,99	-7,34	-11,25
22	ZCP4_1633	50S ribosomal protein L20	1,06	1,07	-1,02	-1,14	-2,33	-8,21	-10,81
23	ZCP4_0454	hypothetical protein	1,16	1,09	1,06	1,19	-1,19	-5,83	-10,65
24	ZCP4_0762	50S ribosomal protein L23	-1,07	1,01	1,02	-1,08	-1,83	-5,76	-10,42
25	ZCP4_0190	ketol-acid reductoisomerase	-1,13	-1,17	-1,22	-1,12	-1,85	-7,44	-10,27
26	ZCP4_0790	nitrogen regulatory protein P-II	-1,32	-1,30	-1,35	-1,29	-3,80	-8,58	-10,20

Οι χρωματικοί κώδικες είναι ίδιοι με του Πίνακα 3.4.9.

Στην συνέχεια επιδιώχθηκε να βρεθούν περιοχές με ομάδες γονιδίων (clusters) στο γονιδίωμα του CP4 που δείχνουν κοινό πρότυπο διαφορικής έκφρασης. Εντοπίστηκαν 3 περιοχές ενδιαφέροντος (Εικόνα 3.4.9, μαύροι κύκλοι 1-3). Να σημειωθεί ότι ένα τμήμα του heatmap (Εικόνα 3.4.20, κόκκινος κύκλος) που δείχνει αρκετά γονίδια να υπερεκφράζονται, δεν είναι μία κοινή περιοχή αλλά αφορά υπερεκφραζόμενα γονίδια διαφορετικών πλασμιδίων με διαδοχικούς αριθμούς locus tag.

3. Αποτελέσματα

Εικόνα 3.4.14. Το heatmap της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων του στελέχους CP4 στις συγκεντρώσεις του MMS που παρουσιάστηκε και στην εικόνα 3.4.18. Με μαύρους κύκλους σημειώνονται περιοχές του χρωμοσώματος του CP4 που τα γονίδια δείχνουν κοινό προφίλ διαφορικής έκφρασης και σχολιάζονται στο κείμενο. Με κόκκινο κύκλο σημειώνονται γονίδια υπερεκφραζόμενα αλλά δεν είναι σε μία κοινή περιοχή..



Η πρώτη περιοχή (νούμερο 1 Εικόνα 3.4.14), αφορά υποεκφραζόμενα γονίδια (Πίνακας 3.4.13, γονίδια που ανήκουν σε συνεργίωμα σημειώνονται με αγκύλη αριστερά) τα οποία αφορούν α) την ρευστότητα μεμβράνης (τα 2 πρώτα συνεργιώματα του Πίνακα 3.4.13), β) μεταβολισμό DNA (το 3ο συνεργίωμα του πίνακα, επιπλέον το γονίδιο των υπομονάδων γ και τ της πολυμεράσης III) και γ) τον σχηματισμό κυτταρικού τοιχώματος (4ο συνεργίωμα).

Η δεύτερη περιοχή (νούμερο 2 Εικόνα 3.4.14), αφορά υπερεκφραζόμενα γονίδια που η μεγαλύτερη πλειοψηφία αυτών (τα 28 από τα 35) συμμετέχουν στην μεταφραστική μηχανή του κυττάρου (ριβωσωμικές πρωτεΐνες και οι παράγοντες επιμήκυνσης Tu και G, Πίνακας 3.4.14)

Η τρίτη περιοχή που σημειώνεται στην Εικόνα 3.4.14 αφορά υπερεκφραζόμενα γονίδια (Πίνακας 3.4.15). Τα περισσότερα από αυτά είναι υποθετικά γονίδια. Αναζήτηση ομολόγων τους σε άλλα βακτήρια με χρήση του BLAST κατέδειξε τις πιθανές πρωτεΐνες που μπορούν να εκφράζουν (σημειώνονται στο κελί του προϊόντος του εκάστοτε υποθετικού γονιδίου σε παρένθεση στον Πίνακα 3.4.15). Παρατηρείται ότι τα γονίδια αυτά αφορούν κατά κύριο λόγο πρωτεΐνες συγκρότησης φάγων.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.4.13. Γονίδια με κοινό πρότυπο διαφορικής έκφρασης που εντοπίζονται σε κοινή περιοχή στο χρωμόσωμα του CP4

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
			0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
1	ZCP4_0436	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	1,24	1,22	1,07	1,01	-1,47	-2,48	-2,44
2	ZCP4_0437	hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnH	1,01	1,02	1,10	1,02	-1,40	-2,44	-2,71
3	ZCP4_0438	hopanoid-associated phosphorylase	-1,02	-1,06	-1,06	-1,04	-1,33	-2,08	-2,47
4	ZCP4_0439	squalene-hopene cyclase	1,31	1,31	1,02	-1,14	-1,81	-3,41	-4,41
5	ZCP4_0440	squalene-associated FAD-dependent desaturase	1,07	1,05	1,00	-1,19	-1,91	-2,84	-3,23
6	ZCP4_0441	squalene synthase HpnD	1,01	-1,04	-1,03	-1,09	-1,59	-2,20	-2,34
7	ZCP4_0442	squalene synthase HpnC	-1,05	-1,00	1,03	-1,03	-1,33	-1,64	-1,64
8	ZCP4_0443	hopene-associated glycosyltransferase HpnB	1,13	1,13	1,13	-1,01	-1,31	-1,33	-1,20
9	ZCP4_0444	hopanoid-associated sugar epimerase	1,27	1,23	1,06	-1,01	-1,91	-4,07	-4,51
10	ZCP4_0445	cation diffusion facilitator family transporter	1,18	1,21	1,01	-1,04	-1,09	-1,57	-1,57
11	ZCP4_0446	replicative DNA helicase	1,10	1,10	1,03	1,04	1,23	-1,02	-1,01
12	ZCP4_0447	cytidine deaminase	-1,15	-1,23	-1,09	-1,15	-1,61	-2,89	-5,28
13	ZCP4_0448	deoxycytidine triphosphate deaminase	-1,03	1,01	1,02	-1,06	-1,77	-5,07	-8,28
14	ZCP4_0449	hypothetical protein	-1,18	-1,20	-1,02	-1,01	-1,68	-4,27	-5,77
15	ZCP4_0450	DNA polymerase III subunits gamma and tau	1,28	1,24	1,03	1,03	-1,19	-1,71	-1,99
<i>κενό</i>									
16	ZCP4_0474	D-alanine--D-alanine ligase	-1,04	-1,04	1,02	-1,14	-1,64	-1,91	-2,19
17	ZCP4_0475	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	-1,05	-1,05	1,04	-1,15	-1,60	-1,91	-1,85
18	ZCP4_0476	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	-1,02	1,02	1,01	-1,14	-1,60	-1,69	-1,59
19	ZCP4_0477	undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N- acetylglucosaminyltransferase	1,01	-1,05	-1,07	-1,14	-1,34	-1,24	-1,15
20	ZCP4_0478	cell division protein FtsW	-1,02	-1,14	-1,14	-1,30	-1,77	-1,59	-1,49
21	ZCP4_0479	UDP-N-acetylmuramoylalanine/D-glutamate ligase	-1,03	-1,03	-1,07	-1,29	-2,05	-2,88	-2,70
22	ZCP4_0480	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	1,03	1,16	1,00	-1,26	-1,57	-1,43	-1,30
23	ZCP4_0481	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2, 6-diaminopimelate/D-alanyl-D-alanyl ligase	1,07	1,16	1,06	-1,15	-1,71	-2,46	-2,88
24	ZCP4_0482	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2, 6-diaminopimelate ligase	1,10	1,09	1,03	-1,12	-1,67	-1,84	-1,80
25	ZCP4_0483	Peptidoglycan glycosyltransferase	1,25	1,20	-1,00	-1,12	-1,58	-1,72	-1,40
26	ZCP4_0484	hypothetical protein	1,20	1,14	1,03	-1,10	-1,36	-1,14	1,06
27	ZCP4_0485	S-adenosyl-methyltransferase MraW	1,34	1,35	1,04	-1,07	-1,17	-1,08	1,02

Οι χρωματικοί κώδικες των λόγων έκφρασης είναι ίδιοι με του Πίνακα 3.4.9. Με αγκύλες αριστερά σημειώνονται γονίδια που ανήκουν σε συνεργίσια.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.4.14. Γονίδια με κοινό πρότυπο διαφορικής έκφρασης που εντοπίζονται σε κοινή περιοχή στο χρωμόσωμα του CP4

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
			0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
1	ZCP4_0735	indole-3-glycerol-phosphate synthase	-1,08	-1,10	1,06	1,17	-1,10	-1,87	-1,66
2	ZCP4_0736	isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent	1,01	-1,04	-1,11	-1,06	-2,12	-3,97	-5,67
3	ZCP4_0737	aconitate hydratase	-1,02	-1,00	-1,06	-1,08	-1,72	-2,82	-2,97
4	ZCP4_0739	50S ribosomal protein L17	1,12	1,10	1,20	1,08	-1,18	-4,14	-7,70
5	ZCP4_0740	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	1,09	1,12	1,10	1,07	-1,20	-4,87	-9,41
6	ZCP4_0741	30S ribosomal protein S11	1,15	1,21	1,20	1,14	-1,10	-5,09	-9,44
7	ZCP4_0742	30S ribosomal protein S13	1,15	1,17	1,18	1,20	-1,07	-4,67	-7,25
8	ZCP4_0743	Adenylate kinase	1,02	1,11	1,02	-1,10	-1,59	-3,46	-3,76
9	ZCP4_0744	preprotein translocase subunit SecY	1,14	1,26	1,05	-1,10	-1,22	-1,94	-2,04
10	ZCP4_0745	50S ribosomal protein L15	1,01	1,03	-1,02	-1,18	-1,90	-5,20	-7,81
11	ZCP4_0746	50S ribosomal protein L30	-1,04	-1,07	-1,08	-1,06	-1,06	-2,34	-2,87
12	ZCP4_0747	30S ribosomal protein S5	1,01	1,00	1,00	-1,07	-1,30	-2,85	-4,40
13	ZCP4_0748	50S ribosomal protein L18	1,01	-1,06	1,03	-1,02	-1,14	-2,27	-3,81
14	ZCP4_0749	50S ribosomal protein L6	-1,04	-1,07	-1,07	-1,05	-1,52	-3,79	-5,79
15	ZCP4_0750	30S ribosomal protein S8	-1,02	-1,04	-1,04	-1,11	-1,26	-2,93	-4,58
16	ZCP4_0751	30S ribosomal protein S14	-1,05	-1,09	1,00	-1,09	-1,23	-3,81	-5,74
17	ZCP4_0752	50S ribosomal protein L5	-1,08	-1,04	-1,12	-1,16	-1,40	-2,56	-4,10
18	ZCP4_0753	50S ribosomal protein L24	1,01	-1,02	-1,02	-1,07	-1,64	-4,70	-8,14
19	ZCP4_0754	ribosomal protein L14	-1,03	1,01	1,01	-1,06	-1,14	-1,94	-2,83
20	ZCP4_0755	ribosomal protein S17	-1,06	-1,04	-1,00	-1,18	-1,70	-3,84	-6,38
21	ZCP4_0756	50S ribosomal protein L29	-1,21	-1,08	-1,07	-1,20	-1,35	-3,01	-4,95
22	ZCP4_0757	50S ribosomal protein L16	-1,10	1,03	1,08	-1,03	1,11	-1,30	-1,94
23	ZCP4_0758	30S ribosomal protein S3	-1,04	-1,00	-1,02	-1,12	-1,12	-2,26	-3,27
24	ZCP4_0759	50S ribosomal protein L22	-1,01	1,03	1,01	-1,06	-1,07	-2,43	-3,62
25	ZCP4_0760	ribosomal protein S19	-1,06	1,02	1,06	-1,05	-1,16	-2,48	-3,69
26	ZCP4_0761	50S ribosomal protein L2	-1,09	-1,01	-1,01	-1,14	-1,36	-3,11	-4,65
27	ZCP4_0762	50S ribosomal protein L23	-1,07	1,01	1,02	-1,08	-1,83	-5,76	-10,42
28	ZCP4_0763	50S ribosomal protein L4	-1,09	-1,04	-1,03	-1,23	-1,78	-4,66	-7,54
29	ZCP4_0764	50S ribosomal protein L3	1,02	1,03	1,02	-1,13	-1,57	-4,93	-7,43
30	ZCP4_0765	30S ribosomal protein S10	1,17	1,22	1,09	-1,07	-1,44	-7,21	-13,25
31	ZCP4_0766	elongation factor Tu	-1,10	-1,13	1,07	-1,08	-1,32	-3,83	-6,36
32	ZCP4_0767	elongation factor G	-1,03	1,06	1,03	-1,13	-1,25	-5,26	-8,18
33	ZCP4_0768	30S ribosomal protein S7	1,08	1,08	1,08	1,00	-1,15	-4,95	-8,10
34	ZCP4_0769	ribosomal protein S12	1,05	1,07	1,08	1,02	-1,17	-5,64	-8,98
35	ZCP4_0770	phosphoesterase PA-phosphatase related protein	1,08	1,07	-1,11	-1,23	-1,86	-1,53	-1,46

Οι ενδείξεις είναι ίδιες με τον πίνακα 3.4.13.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.4.15. Γονίδια με κοινό πρότυπο διαφορικής έκφρασης που εντοπίζονται σε κοινή περιοχή στο χρωμόσωμα του CP4

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
			0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
1	ZCP4_0873	diguanylate cyclase/phosphodiesterase	1,20	1,19	1,06	-1,07	1,23	1,74	2,38
2	ZCP4_0874	hypothetical protein (Phage tail protein)	1,01	1,05	-1,09	1,02	1,16	2,00	2,35
3	ZCP4_0875	hypothetical protein (Chaperone of endosialidase)	-1,02	1,12	1,25	1,34	1,46	2,60	2,30
4	ZCP4_0876	hypothetical protein (Integrase)	-1,19	-1,18	1,12	-1,02	1,66	2,72	2,85
5	ZCP4_0877	hypothetical protein (sodium:alanine symporter)	-1,18	1,09	1,05	-1,72	1,51	3,41	4,03
6	ZCP4_0878	hypothetical protein (Phage-related tail fibre protein)	-1,23	-1,03	1,11	1,15	1,49	2,44	2,17
7	ZCP4_0879	hypothetical protein (AraC-type transcriptional regulator)	1,12	-1,01	1,05	1,18	-1,03	-1,03	1,14
8	ZCP4_0880	hypothetical protein (Putative acetyltransferase phage protein)	1,03	1,02	1,09	1,46	1,29	1,69	1,48
9	ZCP4_0881	hypothetical protein	1,02	1,38	-1,20	1,38	1,79	3,40	4,56
10	ZCP4_0882	hypothetical protein	1,42	1,73	-1,12	1,13	1,79	2,60	4,61
11	ZCP4_0883	hypothetical protein (Phage stabilisation protein)	-1,08	-1,05	-1,07	-1,03	1,49	2,81	3,27
12	ZCP4_0884	constituent protein	-1,05	-1,07	1,02	1,08	1,95	4,06	4,66
13	ZCP4_0885	hypothetical protein	-1,36	-1,15	-1,17	1,06	-1,14	2,27	3,39
14	ZCP4_0886	putative phage major head protein	1,30	1,40	1,20	1,30	2,17	3,99	4,15
15	ZCP4_0889	hypothetical protein (Scaffolding protein)	1,02	1,21	1,19	1,55	1,76	3,93	2,89
16	ZCP4_0890	hypothetical protein	-1,02	-1,07	1,15	1,73	1,69	2,59	1,97
17	ZCP4_0891	hypothetical protein (Phage portal protein)	-1,00	1,05	1,05	1,08	1,52	2,41	2,85
18	ZCP4_0892	phage terminase, large subunit, PBSX family	1,15	1,31	1,16	1,35	1,96	3,66	4,18
19	ZCP4_0893	hypothetical protein (Terminase)	1,34	1,32	1,14	1,01	1,24	1,98	1,67
20	ZCP4_0894	HhH-GPD family protein	1,17	1,16	1,18	1,23	-1,11	-1,06	1,05
21	ZCP4_0895	ATP-dependent protease La	-1,07	-1,08	1,03	1,06	1,43	3,79	4,24
22	ZCP4_0897	Levansucrase	-1,06	1,04	1,04	-1,03	1,50	4,31	4,14
23	ZCP4_0898	Levansucrase	-1,08	1,07	1,04	1,21	1,46	3,93	4,53

Οι χρωματικοί κώδικες είναι ίδιοι με του Πίνακα 3.4.9. Με αγκύλες αριστερά σημειώνονται γονίδια που ανήκουν σε συνεργήματα.

3.5 Εύρεση των μελών του SOS συστήματος στο *Z. mobilis* CP4

Κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση των μελών του SOS συστήματος. Το πρώτο βήμα προς αυτήν την κατεύθυνση πραγματοποιήθηκαν με τις *in silico* προβλέψεις μελών (βλ. 3.3). Με τα δεδομένα της μεταγραφωματικής αλληλούχησης, επόμενο βήμα ήταν η επιβεβαίωση αυτών των προβλέψεων καθώς και η εύρεση επιπλέον μελών που δεν προβλέφθηκαν με τις βιοπληροφορικές μεθόδους.

Η κατεξοχήν ομάδα γονιδίων που είναι SOS-ρυθμιζόμενα στα βακτήρια είναι τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA. Ήδη τα γονίδια *lexA*, *recA*, *uvrA*, *uvrB*, *runA* και *runC* (βλ. Πίνακες 3.4.9, 3.4.10 και 3.4.11), που είναι SOS-ρυθμιζόμενα σε άλλα βακτήρια (βλ. Εισαγωγή), δείχθηκε ότι υπερεκφράζονται στο CP4 παρουσία MMS, και μάλιστα τα *lexA*, *uvrA*, *runA* και *runC* έθεσαν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης RNA τον γνώμονα για το κριτήριο διαφορικής έκφρασης στα 1,45 (βλ. Πίνακα 3.4.4).

Για να βρεθεί το σύνολο των επιδιορθωτικών γονιδίων στο γονιδίωμα του CP4, εντοπίστηκαν τα επιδιορθωτικά γονίδια του *E. coli* (Eisen & Hanawalt 1999, Martins-Pinheiro *et al.* 2007) και στη συνέχεια αναζητήθηκαν, μέσω BLAST και επισημειώσεων

3. Αποτελέσματα

της GenBank, τα ομόλογά τους στο γονιδίωμα του στελέχους. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης, και η αντιστοιχία τους με τα ομόλογα γονίδια του *E. coli*, δίνονται στον Πίνακα 3.5.1 (η κατηγοριοποίηση είναι βάσει των Eisen & Hanawalt 1999).

Πίνακας 3.5.1. Επιδιορθωτικά γονίδια του *E. coli* ανά κατηγορία επιδιόρθωσης και τα ομόλογά τους στο CP4

Γονίδιο στο <i>E. coli</i>	Χαρακτηρισμός προϊόντος γονιδίου στο <i>E. coli</i>	Locus tag στο CP4	Χαρακτηρισμός προϊόντος γονιδίου στο CP4
Άμεση επιδιόρθωση			
<i>ada</i>	fused DNA-binding transcriptional dual regulator/O6-methylguanine-DNA methyltransferase		
<i>alkB</i>	oxidative demethylase of N1-methyladenine or N3-methylcytosine DNA lesions		
<i>phr</i>	deoxyribodipyrimidine photolyase, FAD-binding	ZCP4_1682	Deoxyribodipyrimidine photolyase, FAD-binding
<i>ogt</i>	O-6-alkylguanine-DNA:cysteine-protein methyltransferase		
Επιδιόρθωση με εκτομή βάσεων			
<i>alkA</i>	3-methyl-adenine DNA glycosylase II		
<i>jpg (mutM)</i>	formamidopyrimidine/5-formyluracil/ 5-hydroxymethyluracil DNA glycosylase	ZCP4_0147	Formamidopyrimidine/5-formyluracil/5-hydroxymethyluracil DNA glycosylase
<i>mug</i>	G/U mismatch-specific DNA glycosylase	ZCP4_1573	G/U mismatch -specific DNA glycosylase
<i>mutY</i>	adenine glycosylase	ZCP4_1485	Adenine DNA glycosylase
<i>nei</i>	endonuclease VIII and 5-formyluracil/5-hydroxymethyluracil DNA glycosylase		
<i>nfi</i>	endonuclease V		
<i>nfo</i>	endonuclease IV with intrinsic 3'-5' exonuclease activity		
<i>nth</i>	DNA glycosylase and apyrimidinic (AP) lyase (endonuclease III)	ZCP4_0590	DNA glycosylase AP lyase
<i>tag</i>	3-methyl-adenine DNA glycosylase I, constitutive		
<i>ung</i>	uracil-DNA-glycosylase	ZCP4_0149/ZCP4_1512	Uracil-DNA glycosylase
<i>udg</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	ZCP4_0489	UDP-glucose 6-dehydrogenase
<i>xthA</i>	exodeoxyribonuclease III	ZCP4_1463/ZCP4_1730	Exodeoxyribonuclease III/Exodeoxyribonucleas III-AP endonuclease
Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίων			
<i>mfd</i>	transcription-repair coupling factor	ZCP4_1515	Transcription-repair coupling factor
<i>uvrA</i>	ATPase and DNA damage recognition protein of nucleotide excision repair excinuclease UvrABC	ZCP4_1568	Excinuclease ABC subunit A
<i>uvrB</i>	exision nuclease of nucleotide excision repair, DNA damage recognition componen	ZCP4_0909	Excinuclease ABC subunit B
<i>uvrC</i>	excinuclease UvrABC, endonuclease subunit	ZCP4_0620	Excinuclease ABC endonuclease subunit
<i>uvrD</i>	DNA-dependent ATPase I and helicase II	ZCP4_0705/ ZCP4_1662	DNA-dependent ATPase I and helicase II/ DNA-dependent ATPase I and helicase II
Επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων			
<i>dam</i>	DNA adenine methyltransferase		
<i>mutH</i>	methyl-directed mismatch repair protein		
<i>mutL</i>	methyl-directed mismatch repair protein	ZCP4_0916	Methyl-directed mismatch repair protein
<i>mutS</i>	methyl-directed mismatch repair	ZCP4_1274	Methyl-directed mismatch repair

3. Αποτελέσματα

	protein		protein
<i>vsr</i>	DNA mismatch endonuclease of very short patch repair		
<i>xseA</i>	exonuclease VII, large subunit		
<i>xseB</i>	exonuclease VII small subunit		
Επιδιόρθωση μέσω ανασυνδυασμού			
<i>radA (sms)</i>	DNA repair protein	ZCP4_0693	DNA repair protein RadA
<i>recA</i>	DNA recombination and repair protein; ssDNA-dependent ATPase; ATP-dependent homologous DNA strand exchanger; recombinase A; LexA autocleavage cofactor	ZCP4_0166	Recombinase A
<i>recB</i>	exonuclease V (RecBCD complex), beta subunit		
<i>recC</i>	exonuclease V (RecBCD complex), gamma chain		
<i>recD</i>	exonuclease V (RecBCD complex), alpha chain		
<i>recE</i>	exonuclease VIII		
<i>recF</i>	gap repair protein	ZCP4_1571	Recombination protein F
<i>recG</i>	ATP-dependent DNA helicase	ZCP4_1516	ATP-dependent DNA helicase
<i>recJ</i>	ssDNA exonuclease, 5' --> 3'-specific	ZCP4_0105	ssDNA exonuclease RecJ
<i>recN</i>	recombination and repair protein	ZCP4_1251	DNA replication and repair protein RecN
<i>recO</i>	gap repair protein	ZCP4_0619	DNA repair protein RecO
<i>recQ</i>	ATP-dependent DNA helicase		
<i>recR</i>	gap repair protein	ZCP4_0494	Recombination protein RecR
<i>recT</i>	recombination and repair protein RecT		
<i>recX</i>	regulatory protein for RecA		
<i>rus</i>	endonuclease RUS		
<i>ruvA</i>	component of RuvABC resolvosome, regulatory subunit	ZCP4_1086	Holliday junction DNA helicase RuvA
<i>ruvB</i>	ATP-dependent DNA helicase, component of RuvABC resolvosome	ZCP4_1083	Holliday junction DNA helicase RuvB
<i>ruvC</i>	component of RuvABC resolvosome, endonuclease	ZCP4_1087	Crossover junction endodeoxyribonuclease RuvC
<i>sbcB (exoI)</i>	exodeoxyribonuclease I		
<i>sbcC</i>	exonuclease, dsDNA, ATP-dependent		
<i>sbcD</i>	exonuclease, dsDNA, ATP-dependent		
<i>ssb</i>	single-stranded DNA-binding protein	ZCP4_1613	Single-stranded DNA-binding protein
SOS επιδιόρθωση			
<i>lexA</i>	SOS regulon transcription repressor	ZCP4_1046	Transcription repressor of SOS regulon LexA
<i>umuC</i>	SOS mutagenesis		
<i>umuD</i>	SOS mutagenesis		
Επιδιόρθωση-Αντιγραφή			
<i>polA</i>	5' to 3' DNA polymerase and 3' to 5'/5' to 3' exonuclease	ZCP4_1021	5' to 3' DNA polymerase and 3' to 5'/5' to 3' exonuclease
<i>polB</i>	DNA polymerase II		
<i>polC/dnaE</i>	DNA polymerase III	ZCP4_1616	DNA polymerase III alpha subunit
Άλλα			
<i>mutT</i>	Repairs 8-oxy-dGTP, GTP		
<i>radC</i>	DNA repair protein RadC	ZCP4_0629	DNA repair protein RadC

Από τα 59 επιδιορθωτικά γονίδια του *E. coli*, εντοπίστηκαν 34 ομόλογα στο CP4. Αξιοσημείωτη ήταν η απουσία γονιδίων από επιδιορθωτικά συστήματα όπως τα *recB*, *recC* και *recD* του RecBCD μονοπατιού επιδιόρθωσης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, τα *umuD* και *umuC*, δύο SOS γονίδια που σχηματίζουν την επιρρεπή σε λάθη UmuD₂C πολυμεράση που είναι υπεύθυνη για την SOS μεταλλαξογένεση,

3. Αποτελέσματα

καθώς και γονίδια μεθυλοτρανσφερασών στην άμεση επιδιόρθωση και γλυκοζυλασών και ενδονουκλεασών στην επιδιόρθωση με εκτομή βάσης.

Στη συνέχεια αναζητήθηκαν οι λόγοι έκφρασης των ομόλογων επιδιορθωτικών γονιδίων του CP4 στις συγκεντρώσεις του MMS συγκρίνοντας ταυτόχρονα ποια από τα ομόλογά τους είναι επαγόμενα SOS σε άλλα βακτήρια (Πίνακας 3.5.2). 17 επιδιορθωτικά γονίδια (*mutM*, *mutY*, *ung*, *xthA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *recA*, *recR*, *recO*, *recG*, *ruvA*, *ruvB*, *ruvC*, *lexA* και *radC*) βρέθηκαν να έχουν προφίλ έκφρασης σταθερό και επαγόμενο ή αμιγώς επαγόμενο και 7 (*ung* ZCP4_1512, *mug*, *uvrD* ZCP4_0705, *radA*, *ssb*, *polA* και *dnaE*) βρέθηκαν να έχουν σταθερό και υποεκφραζόμενο ή αμιγώς υποεκφραζόμενο προφίλ έκφρασης. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα *mutM*, *ruvA* και *ruvC* αλλάζουν πρότυπα διαφορικής έκφρασης κατά την αύξηση των συγκεντρώσεων και συγκεκριμένα το *mutM* ξεκινάει υποεκφραζόμενο και καταλήγει υπερεκφραζόμενο, ενώ τα *ruvA* και *ruvC* ξεκινούν υπερεκφραζόμενα και καταλήγουν υποεκφραζόμενα.

Πίνακας 3.5.2. Τα επιδιορθωτικά γονίδια του CP4, ανά επιδιορθωτικό σύστημα, και οι λόγοι έκφρασής τους σε συγκεντρώσεις του MMS 0,05-15 mM

Επιδιορθωτικό σύστημα/Προϊόν γονιδίου	Locus Tag	Γονίδιο	SOS σε άλλα βακτήρια	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
				0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
Επιδιόρθωση μέσω εκτομής βάσης										
Formamidopyrimidine glycosylase	DNA ZCP4_0147	<i>mutM</i> / <i>fpg</i>		-1,52	-1,50	1,09	-1,18	1,29	4,45	5,47
Uracil-DNA glycosylase	ZCP4_0149	<i>ung</i>		-1,08	-1,05	1,07	-1,10	1,06	2,19	3,62
UDP-glucose 6-dehydrogenase	ZCP4_0489	<i>udg</i>		1,02	1,01	1,04	1,01	1,09	1,01	1,24
DNA glycosylase AP lyase	ZCP4_0590	<i>nth</i>		-1,09	-1,17	-1,11	-1,11	-1,37	-1,05	-1,43
Exodeoxyribonuclease III	ZCP4_1463	<i>xthA</i>		1,08	1,12	1,09	-1,05	-1,15	-1,04	1,00
Adenine DNA glycosylase	ZCP4_1485	<i>mutY</i>	Y	1,07	1,00	1,04	1,10	1,05	1,58	1,73
Uracil-DNA glycosylase	ZCP4_1512	<i>ung</i>		1,18	1,09	-1,10	-1,09	-1,34	-1,88	-2,30
G/U mismatch DNA glycosylase	ZCP4_1573	<i>mug</i>		1,12	-1,03	1,12	1,15	-1,04	-1,26	-1,45
Exodeoxyribonuclease III	ZCP4_1730	<i>xthA</i>		-1,01	-1,03	-1,11	-1,14	1,03	2,47	2,81
Επιδιόρθωση μέσω εκτομής νουκλεοτιδίου										
Excinuclease ABC endonuclease subunit C	ZCP4_0620	<i>uvrC</i>	Y	1,14	1,16	1,13	1,10	1,38	2,19	2,41
DNA-dependent ATPase I and helicase II	ZCP4_0705	<i>uvrD</i>	Y	1,19	1,19	-1,03	-1,06	-1,20	-1,44	-1,47
Excinuclease ABC subunit B	ZCP4_0909	<i>uvrB</i>	Y	-1,31	-1,34	1,01	1,03	1,96	8,69	10,48
Transcription-repair coupling factor	ZCP4_1515	<i>mfd</i>		-1,00	-1,05	-1,01	1,02	1,12	1,39	1,34
Excinuclease ABC subunit A	ZCP4_1568	<i>uvrA</i>	Y	-1,22	-1,18	1,14	1,46	2,88	9,65	14,36
DNA-dependent ATPase I and helicase II	ZCP4_1662	<i>uvrD</i>	Y	1,02	1,06	1,12	1,01	1,08	1,89	2,75
Επιδιόρθωση μέσω ανασυνδυασμού										
ssDNA exonuclease RecJ	ZCP4_0105	<i>recJ</i>		1,08	1,02	-1,03	1,02	-1,11	-1,34	-1,17
Recombinase A	ZCP4_0166	<i>recA</i>	Y	1,09	1,14	1,18	1,75	3,22	9,32	10,23
Recombination protein RecR	ZCP4_0494	<i>recR</i>		1,19	1,18	-1,06	-1,08	1,08	1,93	2,51
DNA repair protein RecO	ZCP4_0619	<i>recO</i>		1,29	1,29	1,16	1,10	1,20	1,87	2,35
DNA repair protein RadA	ZCP4_0693	<i>radA</i>		1,11	1,06	-1,08	-1,24	-1,65	-1,57	-1,76
Holliday junction DNA helicase RuvA	ZCP4_1086	<i>ruvA</i>	Y	1,48	1,61	1,04	-1,30	-1,34	-4,05	-3,43
Holliday junction DNA helicase RuvB	ZCP4_1083	<i>ruvB</i>	Y	-1,13	-1,21	-1,02	1,04	1,31	1,41	1,50
Endodeoxyribonuclease RuvC	ZCP4_1087	<i>ruvC</i>	Y	1,49	1,51	1,15	1,01	-1,34	-2,74	-2,94
DNA replication and repair protein RecN	ZCP4_1251	<i>recN</i>	Y	1,09	1,10	1,03	-1,01	1,13	1,10	-1,05
ATP-dependent DNA helicase	ZCP4_1516	<i>recG</i>		-1,03	-1,07	-1,04	-1,01	1,13	1,81	1,83
Recombination protein F	ZCP4_1571	<i>recF</i>		1,01	1,00	-1,10	1,12	1,08	-1,10	-1,08
Single-stranded DNA-binding protein	ZCP4_1613	<i>ssb</i>	Y	1,28	1,36	1,03	-1,16	-1,56	-3,24	-3,35
Φωτολύση										

3. Αποτελέσματα

Deoxyribodipyrimidine photolyase, FAD-binding	ZCP4_1682	<i>phr</i>		1,13	1,14	1,06	1,05	1,13	-1,14	-1,28
Επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων										
Methyl-directed mismatch repair protein L	ZCP4_0916	<i>mutL</i>		1,11	1,00	-1,05	1,11	1,09	1,17	1,12
Methyl-directed mismatch repair protein S	ZCP4_1274	<i>mutS</i>		1,25	1,26	1,07	-1,08	-1,23	-1,03	1,23
Ρύθμιση του SOS συστήματος										
Transcription repressor LexA	ZCP4_1046	<i>lexA</i>	Y	1,46	1,85	2,09	3,49	3,88	4,11	4,01
Άλλα										
DNA repair protein RadC	ZCP4_0629	<i>radC</i>		1,22	1,23	1,00	-1,07	-1,01	1,58	1,64
DNA polymerase I	ZCP4_1021	<i>polA</i>		1,24	1,23	1,04	-1,02	-1,37	-2,20	-2,14
DNA polymerase III alpha subunit	ZCP4_1616	<i>dnaE</i>	Y	1,15	1,07	1,01	1,16	-1,00	-1,42	-2,15

Με κλιμακώσεις του κόκκινου χρώματος στα κελιά συμβολίζονται οι διαφορετικοί λόγοι υπερέκφρασης (πορτοκαλί: 1,45-1,49, σκούρο πορτοκαλί: 1,50-1,99, κόκκινο: 2,00-4,99, σκούρο κόκκινο: 5,00 και άνω). Με κλιμακώσεις του πράσινου συμβολίζονται οι λόγοι υποέκφρασης (ανοιχτό πράσινο: -1,45 - -1,49, πράσινο: -1,50 - -1,99, σκούρο πράσινο: -2,00 και κάτω). Με Y σημειώνονται τα γονίδια που έχουν ομόλογα επαγόμενα SOS σε άλλα βακτήρια.

Από τα 17 υπερεκφραζόμενα γονίδια, 7 διαπιστώθηκαν στην παρούσα εργασία και για πρώτη φορά να είναι SOS-επαγόμενα (*mutM*, *ung*, *xthA*, *recR*, *recO*, *recG* και *radC*). Τα υπόλοιπα 10 (*mutY*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *recA*, *ruvA*, *ruvB*, *ruvC* και *lexA*) είναι γονίδια που ομόλογά τους έχουν χαρακτηριστεί σαν SOS γονίδια σε άλλα βακτήρια. Επίσης, βρέθηκαν γονίδια που ομόλογά τους έχουν χαρακτηριστεί μέλη του SOS συστήματος σε άλλα βακτήρια αλλά στο CP4 βρέθηκαν μόνο να υποεκφράζονται (*ssb*, *recN*, *dnaE* και *uvrD* 2ο ομόλογο). Να σημειωθεί ότι εντοπίστηκαν 2 ομόλογα *uvrD* γονίδια, από τα οποία το ένα υπερεκφράζεται και το άλλο υποεκφράζεται (ZCP4_1662 και ZCP4_0705 αντιστοίχως).

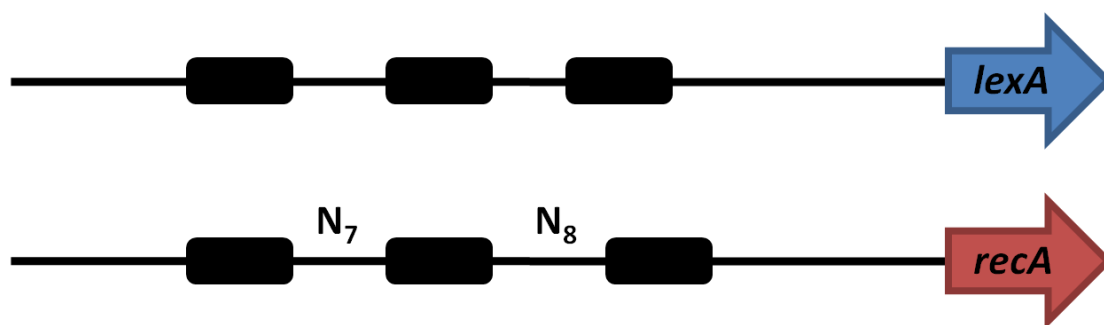
Εφόσον είχαν ήδη προβλεφθεί ενδεικτικά μέλη του SOS συστήματος με μοτίβα που έφεραν αλλαγές στα συναινετικά μοτίβα (*lexA*, *uvrA*, *uvrC*) και με στόχο να βρεθεί αν πιθανόν ρυθμίζονται από τις LexA/RecA τα υπερεκφραζόμενα επιδιορθωτικά γονίδια, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα FITOM και αναζητήθηκαν πιθανοί χειριστές (με μηδέν έως και τρεις νουκλεοτιδικές αλλαγές) ανοδικά αυτών των 17 υπερεκφραζόμενων επιδιορθωτικών γονιδίων. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.3.

Και τα 17 επιδιορθωτικά γονίδια που υπερεκφράζονται βρέθηκαν να φέρουν πιθανούς SOS χειριστές σε ένα εύρος απόστασης +10 έως -300 βάσεις από το κωδικόνιο έναρξης του εκάστοτε γονιδίου, με μηδέν έως και τρεις νουκλεοτιδικές αλλαγές (εντός πλαισίου ανάγνωσης εντοπίστηκε ο πιθανός χειριστής του *uvrC* και συγκεκριμένα ξεκινάει μετά από 4 βάσεις αντός του πλαισίου). Σε συγκεκριμένα γονίδια εντοπίστηκαν πάνω από ένας πιθανοί χειριστές, οι οποίοι είτε εντοπίζονται σαν διακριτοί χειριστές (περιπτώσεις *ruvCA* και *uvrA*), είτε συντηγμένοι (περιπτώσεις *lexA* και *recA*, Εικόνα 3.5.1) είτε συνδυασμός των δύο περιπτώσεων (*mutY*). Να σημειωθεί ότι τα *ruvCA* και *uvrC-recO* ανήκουν σε συνεργιώματα με αποτέλεσμα το κάθε ζευγάρι να ρυθμίζεται από κοινούς χειριστές (τα *ruvC* και *ruvA* είναι δεύτερο και τρίτο αντίστοιχο γονίδιο σε συνεργίωμα με πρώτο γονίδιο το ZCP4_1088 (ρυθμιστικής πρωτεΐνης) και επομένως στον πίνακα δίνεται η απόσταση των χειριστών από το ZCP4_1088).

Για την περίπτωση του *recA* πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ έχουμε 2 συντηγμένους χειριστές με καμία νουκλεοτιδική αλλαγή στα τετρανουκλεοτίδια, ο

3. Αποτελέσματα

δεύτερος χειριστής έχει ένα έξτρα νουκλεοτίδιο στα μη συντηρημένα, δηλαδή ακολουθεί ένα μοτίβο GTTCN₈GTTC. Επιπλέον, οι 2 συντηγμένοι χειριστές του *mutY* δεν μοιράζονται το ίδιο τετρανουκλεοτίδιο. Συγκεκριμένα, από το κεντρικό κομμάτι του συντηγμένου χειριστή ATTTG το TTTG είναι το δεύτερο τετρανουκλεοτίδιο του 1ου χειριστή ενώ το ATTT είναι το πρώτο τετρανουκλεοτίδιο του 2ου χειριστή (Πίνακας 3.5.3).



Εικόνα 3.5.1. Σχεδιαστική αποικόνιση των συντηγμένων χειριστών των *lexA* και *recA*. Με χρωματισμένα βέλη δείχνονται τα γονίδια και η κατεύθυνση μεταγραφής τους. Με μαύρα κουτιά υποδηλώνονται τα τετρανουκλεοτίδια των χειριστών τους. Στην περίπτωση του *recA* δείχνεται ανάμεσα ποιών τετρανουκλεοτιδίων εντοπίζονται οι 7 και οι 8 άτυπες βάσεις των χειριστών.

Πίνακας 3.5.3. Γονίδια επιδιόρθωσης του DNA στο CP4, τα οποία υπερεκφράζονται σε τουλάχιστον μία συγκέντρωση του MMS, και οι SOS χειριστές τους.

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	SOS χειριστές	d	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
					0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
1	ZCP4_1046	SOS-response transcriptional repressor LexA	<u>GTTCCTACACGTCT</u> <u>ATATCTGTTC</u>	-108	1,46	1,85	2,09	3,49	3,88	4,11	4,01
2	ZCP4_1087	Holliday junction resolvase RuvC	i) <u>CTTCCTGGTATGTTT</u> ii) <u>GTTACGGTTTTCTTC</u>	i)-256 ii)-271	1,49	1,51	1,15	1,01	-1,34	-2,74	-2,94
3					ZCP4_1086	Holliday junction DNA helicase RuvA	1,48	1,61	1,04	-1,30	-1,34
4	ZCP4_0166	protein RecA	<u>GTTCACCTTATGTTC</u> <u>TTCATGCTGTTC</u>	-103	1,09	1,14	1,18	1,75	3,22	9,32	10,23
5	ZCP4_1568	Excinuclease ABC subunit A UvrA	i) <u>GAACGGTAGCAGAAT</u> ii) <u>GAACAAAGGGGGAAT</u>	i)-166 ii)-94	-1,22	-1,18	1,14	1,46	2,88	9,65	14,36
6	ZCP4_0909	Excinuclease ABC subunit B UvrB	<u>TTTCTACGCTTGTTC</u>	-44	-1,31	-1,34	1,01	1,03	1,96	8,69	10,48
7	ZCP4_0147	Formamidopyrimidine DNA glycosylase MutM	<u>TTTCTGGATATATTC</u>	-39	-1,52	-1,50	1,09	-1,18	1,29	4,45	5,47
8	ZCP4_1730	Exodeoxyribonucleas III-AP endonuclease	<u>GAAATGACAAACAAC</u>	-4	-1,01	-1,03	-1,11	-1,14	1,03	2,47	2,81

3. Αποτελέσματα

9	ZCP4_0149	Uracil-DNA glycosylase	<u>TTTC</u> TATTATTC <u>TTC</u>	-119	-1,08	-1,05	1,07	-1,10	1,06	2,19	3,62
10	ZCP4_0620	Excinuclease ABC subunit C UvrC	<u>TTTCAAAGATCGTTC</u>	+4						2,19	2,41
11	ZCP4_0619	DNA repair protein RecO			1,14	1,16	1,13	1,10	1,38	1,87	2,35
12	ZCP4_0494	Recombination protein RecR	<u>TTTG</u> TATAAAG <u>GTTT</u>	-27	1,29	1,29	1,16	1,10	1,20	1,93	2,51
13	ZCP4_1662	UvrD/REP helicase	<u>GTTTCTGGCTGATC</u>	+6	1,19	1,18	-1,06	-1,08	1,08	1,89	2,75
14	ZCP4_1516	ATP-dependent DNA helicase RecG	<u>GTTGAACTCTGCTTT</u>	-37						1,81	1,83
15	ZCP4_0629	DNA repair protein RadC	<u>GAAA</u> AAGCCGC <u>TATC</u>	-76	-1,03	-1,07	-1,04	-1,01	1,13	1,58	1,64
16	ZCP4_1485	A/G-specific adenine glycosylase MutY	ii) <u>TTTC</u> CTGATA <u>ATTG</u> ii) <u>CCGTTA</u> <u>ATTC</u> ii) <u>AAACAGCTCTGAAAG</u>	i)-34 ii)-110	1,22	1,23	1,00	-1,07	-1,01	1,58	1,73
17	ZCP4_1083	Holliday junction DNA helicase RuvB	<u>GATCGCCTTATGAAG</u>	-132	-1,13	-1,21	-1,02	1,04	1,31	1,41	1,80

Οι χρωματικοί κώδικες είναι ίδιοι με του Πίνακα 3.5.1. Στους SOS χειριστές υπογραμμίζονται τα συντηρημένα τετρανουκλεοτίδια και σημειώνονται με κόκκινα γράμματα οι νουκλεοτιδικές αλλαγές. d: απόσταση χειριστή από κωδικόνιο έναρξης (-: ανοδικά, +: καθοδικά).

Όσον αφορά την σειρά που ξεκινούν να υπερεκφράζονται τα γονίδια, συναρτήσεως των συγκεντρώσεων του MMS, παρατηρήθηκε ότι τα *lexA*, *ruvA* και *ruvC* είναι τα μόνα που υπερεκφράζονται στα 0,05 και 0,1 mM, από τα οποία τα δύο τελευταία κατόπιν "σιγούν" ενώ το πρώτο παραμένει υπερεκφραζόμενο την τελική συγκέντρωση. Τα επόμενα γονίδια που ξεκινούν να υπερεκφράζονται είναι τα *recA* και *uvrA* από το 1 mM, το *uvrB* στα 5 mM και σχεδόν όλα τα υπόλοιπα από τα 10 mM. Εξαιρεση αποτελεί το *ruvB* που υπερεκφράζεται μόνο στα 15 mM.

Εφόσον στα επιδιορθωτικά γονίδια που αποτελούν γνώμονα του SOS συστήματος εντοπίστηκαν χειριστές με 0-3 νουκλεοτιδικές αλλαγές, αναζητήθηκαν αντίστοιχοι χειριστές ανοδικά των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων σε διαγονιαδικές θέσεις και σε απόσταση -300 έως +10 σε όλο το γονιδίωμα. Εντοπίστηκαν 340 υπερεκφραζόμενα γονίδια και 310 υποεκφραζόμενα γονίδια που φέρουν αντίστοιχους χειριστές. Οι λίστες των γονιδίων δίνονται στο Παράρτημα στους Πίνακες 5.9 και 5.10 αντίστοιχα. Φαίνεται, λοιπόν, ότι ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων έχει διαφορετική έκφραση παρουσία του SOS-επαγωγικού μεταλλαξογόνου παράγοντα MMS και φέρει SOS χειριστές, που δύναται να αναγνωρίζονται από την LexA. Αυτά τα γονίδια καλύπτουν τα κριτήρια του χαρακτηρισμού "SOS γονίδιο".

Ανάμεσα στα 340 υπερεκφραζόμενα γονίδια, εκτός από τα γονίδια επιδιόρθωσης που αναφέρθηκαν στον Πίνακα 3.5.2, υπάρχουν γονίδια που συμμετέχουν και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Χαρακτηριστικές τέτοιες λειτουργίες είναι η απόκριση σε στρεσογόνο συνθήκες, μεταφορά ουσιών, κίνηση του κυττάρου, συγκρότηση φάγων, μετάθεση του DNA και επεξεργασία του DNA. Οι τρεις τελευταίες λειτουργίες καλύπτονται από SOS υπερεκφραζόμενα γονίδια που εδράζονται αποκλειστικά στα πλασμίδια. Ομοίως, τα 310 υποεκφραζόμενα γονίδια καλύπτουν αρκετές λειτουργίες του κυττάρου με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα τον μεταφραστικό μηχανισμό. Άλλες λειτουργίες που συμμετέχουν τα SOS υποεκφραζόμενα γονίδια είναι η παραγωγή ενέργειας, ο μεταβολισμός αμινοξέων, ο μεταβολισμός του DNA κ.ά.. Λεπτομερέστερα, ο αριθμός των SOS γονιδίων ανά λειτουργία δίνονται στο διάγραμμα της Εικόνας 3.5.2.

3. Αποτελέσματα

Η οργάνωση ανά λειτουργία έγινε με βάση τον κώδικα Clusters of Orthologous Groups (COG).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι εντοπίστηκαν και πλασμιδιακά SOS γονίδια (36 υπερκεφραζόμενα και 19 υποκεφραζόμενα, Πίνακας 3.5.4 και για συντομία χώρου οι χειριστές τους δίνονται στο Παράρτημα στους Πίνακες 5.9 και 5.10 μαζί με τα χρωμοσωμικά SOS γονίδια). Ήδη αναφέρθηκε ότι τα διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια που συμμετέχουν στην συγκρότηση φάγων, μετάθεσης τους DNA και περιοριστικών συστημάτων είναι αποκλειστικά πλασμιδιακά. Επιπλέον πλασμιδιακά SOS γονίδια είναι γονίδια μεταφορέων, συστήματος τοξίνης-αντιτοξίνης, καταμερισμού πλασμιδίου (*parAB*) και γονίδιο αλκοολικής αφυδρογονάσης. Η τοπολογία των πλασμιδικών SOS γονιδίων ανά πλασμιδίο δίνεται στην Εικόνα 3.5.3, όπου σημειώνονται με βέλη SOS πλασμιδιακά γονίδια με γνωστές λειτουργίες.

Πίνακας 3.5.4 Τα πλασμιδιακά SOS γονίδια του CP4

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
			0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
1	ZCP4_RS08925	hypothetical protein	1,23	1,32	1,19	1,88	3,84	5,13	5,49
2	ZCP4_RS08930*	DUF955 domain-containing protein	1,12	1,13	1,08	1,32	1,74	1,68	2,08
3	ZCP4_RS08970	hypothetical protein	-1,05	-1,06	1,25	1,07	-1,05	1,72	1,57
4	ZCP4_RS08975	hypothetical protein	-1,14	-1,12	1,24	-1,05	1,32	4,37	4,17
5	ZCP4_RS09000	tail E family protein	-1,17	-1,20	1,09	-1,00	1,20	2,03	3,02
6	ZCP4_RS09010	tail sheath protein	-1,02	-1,07	1,17	1,38	1,62	2,76	3,95
7	ZCP4_RS09005*	hypothetical protein	-1,11	-1,05	1,05	1,08	1,43	2,75	3,78
8	ZCP4_RS09015	phage baseplate assembly protein V	1,80	1,70	1,83	2,01	3,47	9,77	8,78
9	ZCP4_RS09090	NADPH dehydrogenase	1,11	1,19	1,12	1,10	1,34	2,87	3,97
10	ZCP4_RS09185	hypothetical protein	1,21	1,44	1,33	1,96	1,33	1,89	2,63
11	ZCP4_RS09205	NADP oxidoreductase coenzyme F420-dependent	-1,23	-1,24	-1,05	-1,02	1,66	3,37	4,37
12	ZCP4_RS09235	TonB-dependent receptor	1,04	1,13	-1,05	-1,11	1,04	2,29	2,75
13	ZCP4_RS09275	hypothetical protein	1,10	1,11	1,16	1,19	1,30	1,47	1,70
14	ZCP4_RS09295	hypothetical protein	1,28	1,03	1,27	1,56	2,11	1,81	2,24
15	ZCP4_RS09300	hypothetical protein	-1,17	1,02	-1,08	1,33	1,63	1,90	1,63
16	ZCP4_RS09375	hypothetical protein	-1,31	-1,36	1,02	1,11	1,58	3,36	3,12
17	ZCP4_RS09400	hypothetical protein	1,09	1,17	1,07	-1,13	1,04	1,62	1,64
18	ZCP4_RS09415	Transposase	1,07	-1,01	1,07	1,12	1,41	4,53	5,85
19	ZCP4_RS09435	hypothetical protein	1,01	1,02	1,02	-1,10	-1,02	1,52	1,79
20	ZCP4_RS09430*	hypothetical protein	1,06	1,15	-1,04	-1,15	-1,13	1,21	1,50
21	ZCP4_RS09425*	DNA adenine methylase	1,13	1,11	1,01	-1,05	1,08	1,46	1,62
22	ZCP4_RS09440	hypothetical protein	-1,12	1,08	1,09	1,09	1,44	2,83	3,54
23	ZCP4_RS09445	TonB-dependent receptor	1,14	1,15	1,09	1,01	1,38	2,30	3,03
24	ZCP4_RS09480	hypothetical protein	1,31	1,14	-1,19	-1,01	1,29	1,98	1,99
25	ZCP4_RS09485	type I restriction-modification system. M	-1,06	-1,10	-1,09	1,13	1,60	2,22	2,41
26	ZCP4_RS09490*	restriction modification system DNA specificity	-1,09	-1,07	1,02	-1,00	1,38	2,16	2,22
27	ZCP4_RS09495*	anticodon nuclease PrrC	-1,08	-1,01	-1,03	-1,06	1,20	2,22	2,27
28	ZCP4_RS09500*	type I site-specific deoxyribonuclease HsdR	-1,08	-1,10	-1,07	-1,04	1,15	2,04	1,94
29	ZCP4_RS09530	uncharacterized protein with a C-terminal OMP	-1,07	-1,05	1,18	1,10	1,80	4,29	4,91
30	ZCP4_RS09570	hypothetical protein	1,05	1,09	1,11	1,11	1,21	1,83	1,51
31	ZCP4_RS09595	hypothetical protein	1,18	1,12	1,20	1,23	1,45	1,80	1,66
32	ZCP4_RS09600*	hypothetical protein	1,31	1,58	1,52	1,16	1,17	1,10	-1,35
33	ZCP4_RS09645	phage capsid scaffolding protein	1,59	1,49	1,85	2,28	1,99	1,55	1,24
34	ZCP4_RS09085*	phage capsid protein	1,38	1,25	1,20	1,16	1,23	1,54	1,12
35	ZCP4_RS09650	hypothetical protein	-1,51	-1,20	1,29	1,08	1,63	2,44	2,85
36	ZCP4_RS09685	hypothetical protein	1,73	2,24	1,25	1,11	1,47	2,90	2,39
1	ZCP4_RS08855	hypothetical protein	-1,38	-1,32	-1,11	-1,28	-1,51	-1,42	-1,61
2	ZCP4_RS08880	hypothetical protein	1,11	-1,01	-1,17	-1,34	-2,16	-1,48	-1,39
3	ZCP4_RS08890	hypothetical protein	-1,14	1,29	-1,08	-1,15	-3,07	-2,70	-3,54
4	ZCP4_RS08905	DUF891 domain-containing protein	-1,01	1,02	-1,01	-1,07	-1,23	-1,13	-1,80
5	ZCP4_RS08915	hypothetical protein	1,06	1,07	1,05	1,04	-1,47	-1,64	-2,04

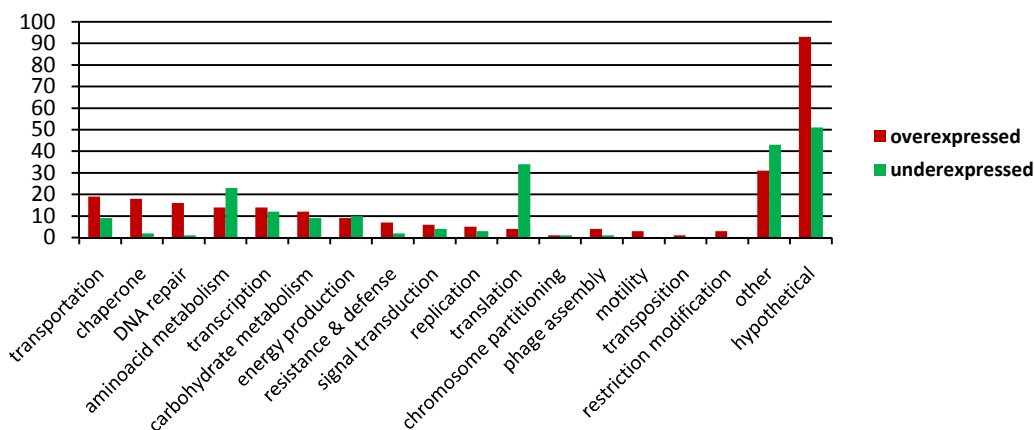
3. Αποτελέσματα

6	ZCP4_RS09255	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,12	-1,15	-1,05	-1,11	-1,29	-1,73	-2,18
7	ZCP4_RS09280	hypothetical protein	1,13	1,15	1,01	-1,10	-1,42	-2,16	-2,02
8	ZCP4_RS09325	hypothetical protein	-1,13	-1,14	-1,02	1,06	-1,14	-1,83	-1,70
9	ZCP4_RS09330*	hypothetical protein	1,09	1,10	-1,14	1,03	-1,00	-1,80	-1,01
10	ZCP4_RS09335*	hypothetical protein	1,15	1,18	1,03	1,03	1,06	1,25	-1,01
11	ZCP4_RS09455	hypothetical protein	-1,07	-1,06	1,03	1,05	-1,13	-2,20	-1,69
12	ZCP4_RS09450*	hypothetical protein	1,18	1,02	-1,01	1,02	-1,27	-3,09	-2,51
13	ZCP4_RS09465	addiction module antitoxin RelB	-1,04	1,01	-1,08	-1,15	-1,78	-2,46	-2,05
14	ZCP4_RS09460*	addiction module toxin, RelE/StbE family	1,06	1,06	1,06	1,04	-1,07	-1,53	-1,33
15	ZCP4_RS09520	chromosome partitioning protein ParA	-1,26	-1,14	1,05	-1,05	-1,40	-1,54	-1,49
16	ZCP4_RS09515*	hypothetical protein	-1,43	-1,08	1,11	1,26	-1,99	-4,30	-5,20
17	ZCP4_RS09105	iron-containing alcohol dehydrogenase	1,02	1,22	-2,23	-1,20	-1,48	1,02	1,23
18	ZCP4_RS09190	hypothetical protein	-1,58	-1,52	-1,85	-1,48	-1,26	1,06	-1,18
19	ZCP4_RS09200	transcriptional regulator, HxlR family	1,10	1,02	-1,23	1,06	-1,88	-2,17	-3,58

Οι χρωματικοί κώδικες είναι ίδιοι με του Πίνακα 3.5.1. Με αστερίσκο σημειώνονται γονίδια που ανήκουν σε συνεργιώμα με το προηγούμενό τους στον Πίνακα.

Ακολούθησε αναζήτηση γονιδίων ομόλογων με τα πλασμιδιακά SOS γονίδια του CP4 στα υπόλοιπα στελέχη του *Z. mobilis* με αλληλουχημένα πλασμίδια. Η αναζήτηση εντόπισε γονίδια στα στελέχη ATCC 10988, NCIMB 11163, ATCC 29191 και ATCC 29192 που είναι ομόλογα με 15 πλασμιδιακά SOS γονίδια του CP4 (Πίνακας 3.5.5). Παρατηρήθηκε ότι 4 υποθετικά γονίδια του CP4 (ZCP4_RS09295, ZCP4_RS09300, ZCP4_RS09570, ZCP4_RS09190), καθώς και γονίδιο NADPH αφυδρογονάσης έχουν περισσότερα από ένα ομόλογα σε τουλάχιστον ένα από τα υπόλοιπα στελέχη. Μάλιστα, τα υποθετικά γονίδια ZCP4_RS09300 (με χειριστή GAAAGAGGGCTTAAC), ZCP4_RS09570 (με χειριστή GTTTTTTCAGCCTTT) και ZCP4_RS09190 (με χειριστή GTTCTGTTTCCGTC) είναι ομόλογα και μεταξύ τους, αλλά τα δυο πρώτα υπερεκφράζονται και το τρίτο υποεκφράζεται, καθώς και δεν διαθέτουν τους ίδιους χειριστές. Επιπλέον, δεν βρέθηκαν όλα τα γονίδια των υπολοίπων στελεχών να διαθέτουν τους ίδιους χειριστές με τα ομόλογά τους στο CP4 (όσα φέρουν σημειώνονται με κίτρινη υπογράμμιση). Αντιθέτως, εντοπίστηκαν ομόλογα που είχαν προβλεφθεί με το FITOM στα άλλα στελέχη να φέρουν πιθανό χειριστή με μία αλλαγή, δεν είχαν προβλεφθεί στο CP4 αλλά βρέθηκαν να είναι SOS-ρυθμιζόμενα σε αυτό: γονίδιο περιοριστικού συστήματος M (με GAACATTGCTCGATC στο ATCC 29191 και GAAGCCAGTCCGAAG στο CP4) και NADPH αφυδρογονάσης (με GATCTTTCTGCGTTC στο ATCC 10988 και TTTTGGGTATAGTTT στο CP4).

3. Αποτελέσματα



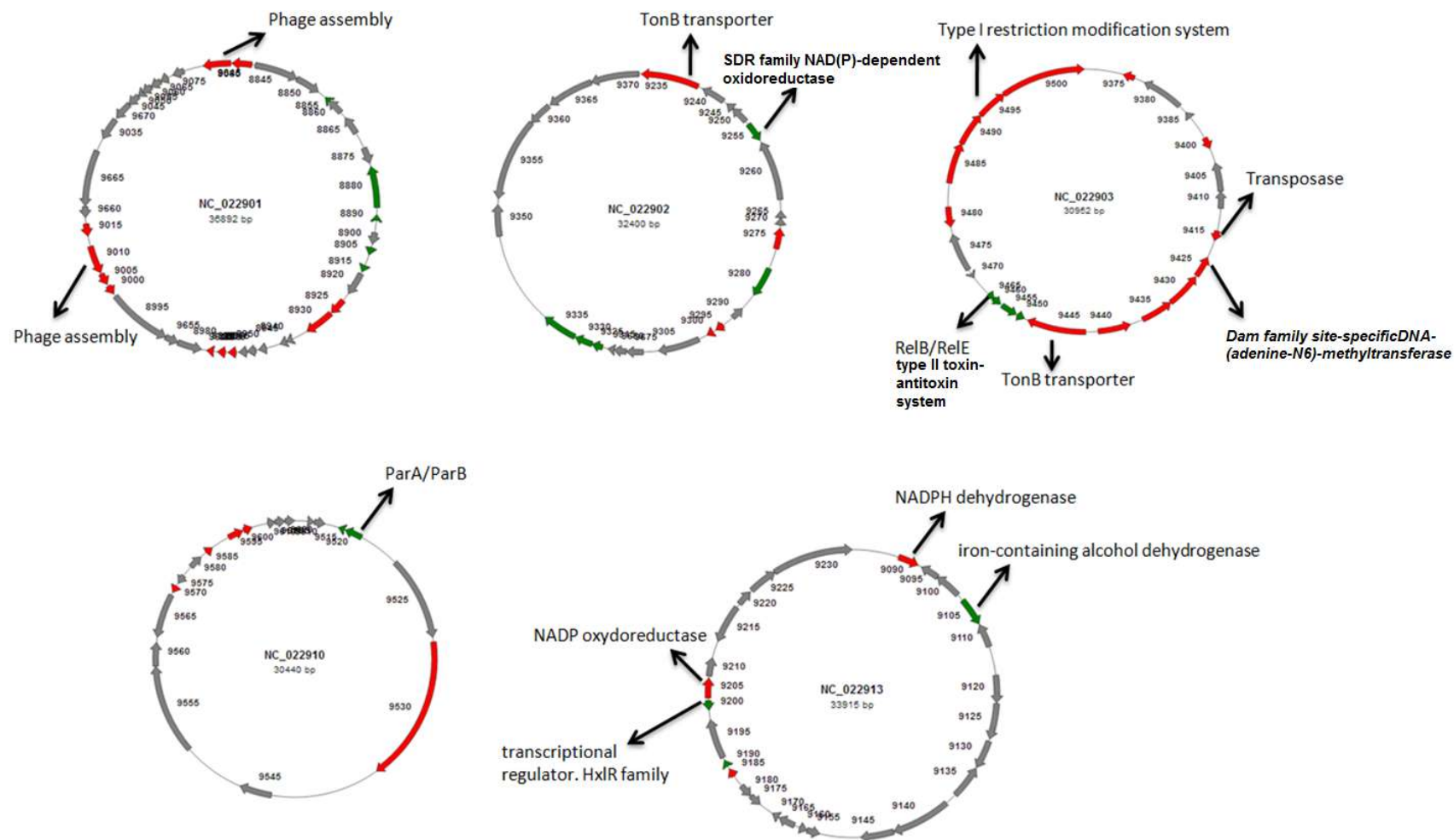
Εικόνα 3.5.2. Ο αριθμός των υπερεκφραζόμενων και υποεκφραζόμενων SOS γονιδίων του CP4 ανά κυτταρική λειτουργία.

Πίνακας 3.5.5. Πλασμιδιακά SOS γονίδια του CP4 στα οποία εντοπίστηκαν ομόλογά τους σε άλλα στελέχη του *Z. mobilis*

A/A	CP4		ATCC 10988	NCIMB 11163	ATCC 29191	ATCC 29192
	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Locus tag	Locus tag	Locus tag	Locus tag
1	ZCP4_RS09255	short-chain dehydrogenase	Zmob_1815	Za10_1883		
2	ZCP4_RS09235	TonB-dependent receptor	Zmob_1838	Za10_1879		
3	ZCP4_RS09275	hypothetical protein	Zmob_1861	Za10_1887	ZZ6_0013	
4	ZCP4_RS09295	hypothetical protein	Zmob_1802, Zmob_1824	Za10_1890	ZZ6_1741	
5	ZCP4_RS09300	hypothetical protein	Zmob_1763, Zmob_1804, Zmob_1826, Zmob_1856	Za10_1855, Za10_1891	ZZ6_1743	Zymop_1725, Zymop_2076
6	ZCP4_RS09485	type I restriction-modification system M			ZZ6_1758*	Zymop_2046
7	ZCP4_RS09450	hypothetical protein	Zmob_1792	Za10_1848	ZZ6_1752	Zymop_1702
8	ZCP4_RS09455	hypothetical protein	Zmob_1791	Za10_1847	ZZ6_1751	Zymop_1703
9	ZCP4_RS09460	addiction module toxin. RelE/StbE family	Zmob_1790	Za10_1846	ZZ6_1750	Zymop_1704
10	ZCP4_RS09465	addiction module antitoxin RelB	Zmob_1789	Za10_1845	ZZ6_1749	Zymop_1705
11	ZCP4_RS09415	transposase	Zmob_1141	Za10_1837	ZZ6_1238	
12	ZCP4_RS09500	type I site-specific deoxyribonuclease HsdR				Zymop_2043
13	ZCP4_RS09570	hypothetical protein	Zmob_1763, Zmob_1804, Zmob_1826, Zmob_1856	Za10_1855, Za10_1891	ZZ6_1743	Zymop_1725, Zymop_2076
14	ZCP4_RS09190	hypothetical protein	Zmob_1763, Zmob_1804, Zmob_1826, Zmob_1856	Za10_1855, Za10_1891	ZZ6_1743	Zymop_1725, Zymop_2076
15	ZCP4_RS09090	NADPH dehydrogenase	Zmob_1761, Zmob_1857*	Za10_1854		Zymop_1726

Με κίτρινη υπογράμμιση σημειώνονται τα γονίδια των υπολοίπων στελεχών που φέρουν ίδιους SOS χειριστές με τα ομόλογά τους στο CP4. Με αστερίσκο σημειώνονται γονίδια των υπολοίπων στελεχών που προβλέφθηκαν με το πρόγραμμα FITOM να φέρουν SOS χειριστές.

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.5.3. Τα πλασμιδιακά SOS-ρυθμιζόμενα γονίδια του CP4 και οι θέσεις τους στους χάρτες των πλασμιδίων. Με πράσινο σημειώνονται τα υποεκφραζόμενα SOS γονίδια και με κόκκινο τα υπερεκφραζόμενα SOS γονίδια. Καταδεικνύονται οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται με γνωστές λειτουργίες.

3. Αποτελέσματα

Οι αναζητήσεις SOS γονιδίων περιλάμβαναν την εύρεση SOS χειριστών που ακολουθούν τα μοτίβα GTTCN₇GTTC και GAACN₇GAAC και εντοπίζονται σε διαγονιδιακές θέσεις. Συμπληρωματικά, αναζητήθηκαν και SOS χειριστές που είναι ενδογονιδιακοί, ακολουθούν τα ίδια μοτίβα και εντοπίζονται -300 έως -50 βάσεις ανοδικά υπερκεφραζόμενου γονιδίου (δηλαδή οι χειριστές αυτών των γονιδίων εντοπίζονται εντός των προηγούμενων τους γονιδίων). Τα αποτελέσματα αυτής της αναζήτησης δίνονται στον Πίνακα 5.11 στο Παράρτημα. Εντοπίστηκαν συνολικά 46 γονίδια με τέτοιους χειριστές. Να σημειωθεί ότι κανένας από αυτούς τους χειριστές δεν ήταν τέλεια συντηρημένος, όλοι είχαν από 1 έως και 3 νουκλεοτιδικές αλλαγές.

Ενδιαφέρουσα περίπτωση χειριστών ήταν αυτή του *recA*. Στο αυτό το SOS γονίδιο είχαν εντοπιστεί 2 συμπυγμένοι χειριστές (μοιράζονται ένα κοινό GTTC τετρανουκλεοτίδιο) όπου ο δεύτερος έχει N₈ αντί για N₇ μη συντηρημένα ενδιάμεσα νουκλεοτίδια. Δεύτερη αναζήτηση χειριστών αφορούσε τους χειριστές που έχουν N₆ ή N₈ ενδιάμεσα μη συντηρημένα νουκλεοτίδια (Πίνακες 3.5.6).

Πίνακας 3.5.6. Υπερεκφραζόμενα γονίδια που φέρουν πιθανούς SOS χειριστές με N₆ και N₈ αντί για τα N₇ άτυπο αριθμό ενδιάμεσων βάσεων (spacers) στο SOS μοτίβο

A/A	Locus Tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS d (mM)								SOS χειριστής
			0.05	0.1	0.2	1	5	10	15		
Περίπτωσης SOS χειριστών με N₆											
Γονίδια με χειριστές με μία αλλαγή											
1	ZCP4_0701	arabinose efflux permease family protein	1,05	1,10	1,01	1,00	1,04	1,41	1,70	-82	GTTCGTTACA ATTC
2	ZCP4_1072	hypothetical protein	-1,20	-1,29	-1,01	1,01	1,48	2,72	3,52	-202	GTTC CAATAAGATTC
3	ZCP4_1114	Cys-tRNA(Pro) deacylase	-1,03	-1,14	-1,11	1,05	-1,02	1,29	1,87	-30	GAT CAAAAAGAGAAC
4	ZCP4_1119	transcriptional regulator. LysR family	-1,05	-1,08	1,20	1,07	1,31	1,64	1,66	-19	GAACAATGAAGA AG
5	ZCP4_1375	integration host factor. beta subunit	-1,14	-1,19	1,06	-1,17	1,20	2,03	2,58	7	GTTC CGAACTGATC
6	ZCP4_1498	nicotinic acid mononucleotide	1,10	-1,06	-1,07	1,06	1,25	2,38	2,53	-41	G GTCTTTATTGTTC
7	ZCP4_1601	glutamate--cysteine ligase. plant type	1,12	1,18	1,01	-1,05	1,64	2,97	3,84	-205	GTTC CAAGCCCGTTG
8	ZCP4_1693	putative amidohydrolase	1,03	1,07	1,08	1,02	1,06	1,72	1,98	-50	ATTCTAAGCTGTTC
Περίπτωσης SOS χειριστών με N₈											
Γονίδια με τέλεια συντηρημένους χειριστές											
1	ZCP4_0166	protein RecA	1,09	1,14	1,18	1,75	3,22	9,32	10,23	-93	GTTC TCATGCTGTTC
Γονίδια με χειριστές με μία αλλαγή											
1	ZCP4_0099	ABC-type polysaccharide/polyol phosphate export	-1,09	-1,07	-1,01	1,00	1,04	1,39	1,58	-108	GA ACTATTATTA AAAC
2	ZCP4_0967	putative membrane protein	-1,41	-1,36	1,22	1,16	3,27	18,42	27,39	-71	TTTCGCAAAATGGTTC
3	ZCP4_1195	Fe-S oxidoreductase	-1,30	-1,18	-1,01	1,22	2,72	5,33	5,64	+5	GTT GCTTGT TTGTTC
4	ZCP4_1328	dihydrodipicolinate synthase/N-acetylneuraminate	-1,32	-1,26	1,02	1,10	1,76	2,38	2,43	-121	GTTC CTTTGTGGGTTT

Οι χρωματικοί κώδικες είναι ίδιοι με του Πίνακα 3.5.1.. d: η απόσταση του χειριστή από την μεταφραστική έναρξη του γονιδίου (αρνητικά νούμερα υποδηλώνουν τον χειριστή να βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου, θετικοί αριθμοί υποδηλώνουν καθοδικά του γονιδίου). Υπογραμμίζονται τα συντηρημένα τετρανουκλεοτίδια του κάθε χειριστή. Με κόκκινα γράμματα δείχνονται οι νουκλεοτιδικές αλλαγές στον χειριστή.

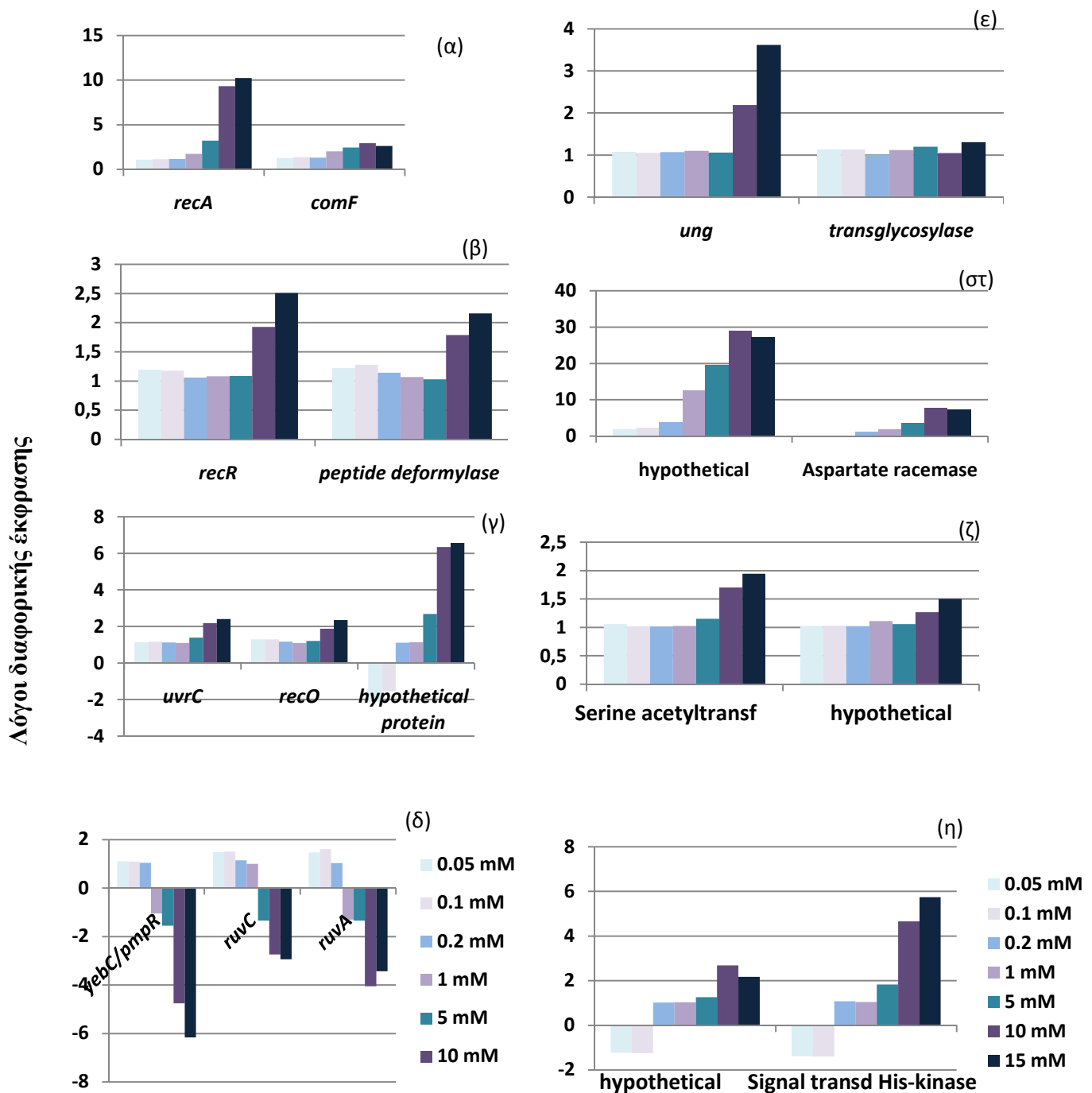
3. Αποτελέσματα

Εκτός του *recA*, κανένα γονίδιο δεν είχε τέλεια συντηρημένα τετρανουκλεοτίδια σε N₆ ή N₈ χειριστές. Όμως, εντοπίστηκαν 8 υπερεκφραζόμενα γονίδια με N₆ χειριστές και μία νουκλεοτιδική αλλαγή και 4 υπερεκφραζόμενα γονίδια με N₈ χειριστές και μία αλλαγή.

3.6 Μεταβολή της μεταγραφικής ισχύς ανάμεσα στα γονίδια-μέλη εντός συνεργιωμάτων

Για να διερευνηθεί πώς μεταβάλλεται η μεταγραφική ισχύς από το πρώτο προς το τελευταίο γονίδιο ενός συνεργιώματος έγινε ανάλυση σε συνεργιώματα όπου ανήκουν τα επιδιορθωτικά γονίδια. Φάνηκε (Εικόνα 3.6.1) στα συνεργιώματα των επιδιορθωτικών γονιδίων, αλλά και ενδεικτικά άλλων 3 περιπτώσεων SOS γονιδίων όπως φαίνεται στην εικόνα, ότι η μεταγραφική ισχύς δεν είναι προβλέψιμη από το πρώτο προς το τελευταίο γονίδιο. Παρατηρήθηκαν περιπτώσεις όπου η ισχύς γινόταν πιο έντονη από το πρώτο γονίδιο στο επόμενο (διαγράμματα γ και η), περιπτώσεις που παρέμενε στα ίδια ή σχεδόν στα ίδια επίπεδα (διαγράμματα β και ζ) και περιπτώσεις που μειονόταν (διαγράμματα α, δ, ε και στ). Οι αλλαγές στην ισχύ είναι έντονες για τις συγκεντρώσεις των 5 mM και άνω.

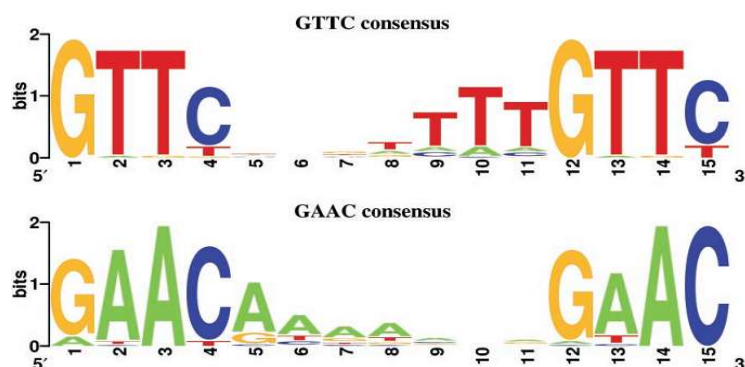
3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.6.1. Διαγράμματα έκφρασης SOS γονιδίων-μελών συνεργιωμάτων στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του MMS. Κάθε διάγραμμα είναι ένα SOS συνεργίωμα και στον οριζόντιο άξονα δίνονται τα ονόματα όλων των μελών του συνεργιώματος. Η φορά μεταγραφής είναι από αριστερά προς τα δεξιά στον οριζόντιο άξονα. Στον κατακόρυφο άξονα δίνονται οι λόγοι διαφορικής έκφρασης. Τα διαφορετικά χρώματα των στηλών συμβολίζουν τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του MMS (το υπόμνημα των χρωμάτων δίνεται στο τελευταίο διάγραμμα και ισχύει για όλα τα διαγράμματα)

3.7 Εντοπισμός του SOS μοτίβου στο *Z. mobilis*

Ύστερα από ανάλυση και στοίχιση χειριστών με 0 ή 1 αλλαγή 9 DNA-επιδιορθωτικών SOS γονιδίων, των *recA*, *lexA*, *uvrA*, *uvrD*, *ssb*, *ruvC*, *dnaE*, *sulA* και *dinP*, σε 14 διαφορετικά α-πρωτεοβακτήρια των γενών *Acidiphilium*, *Aquaspirillum*, *Agrobacterium*, *Brucella*, *Caulobacter*, *Mesorhizobium*, *Paracoccus*, *Rhodobacter*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas* και *Sinorhizobium*, προτάθηκε ως SOS μοτίβο στα α-πρωτεοβακτήρια το κάτωθι μοτίβο της Εικόνας 3.7.1 (Erill *et al.* 2004).



Εικόνα 3.7.1. Το SOS μοτίβο των α-πρωτεοβακτηρίων, όπως προέκυψε από στοίχιση SOS χειριστών 9 DNA-επιδιορθωτικών SOS γονιδίων σε 14 διαφορετικά α-πρωτεοβακτήρια (Erill *et al.* 2004).

Σε σύγκριση με την ανάλυση των Erill και συνεργατών, στην παρούσα εργασία διατίθονταν μεταγραφικά δεδομένα διαφορετικής έκφρασης μαζί με την ύπαρξη χειριστών για να ονομαστεί ένα γονίδιο μέλος του SOS συστήματος, και άρα και οι χειριστές του SOS χειριστές. Έτσι, ήταν εφικτό, σαν πρώτο βήμα, να βρεθεί το επικρατές SOS μοτίβο στο *Z. mobilis*, συγκεντρώνοντας τους χειριστές με μηδέν ή μία αλλαγή από τα υπερεκφραζόμενα γονίδια (Εικόνα 3.7.2).

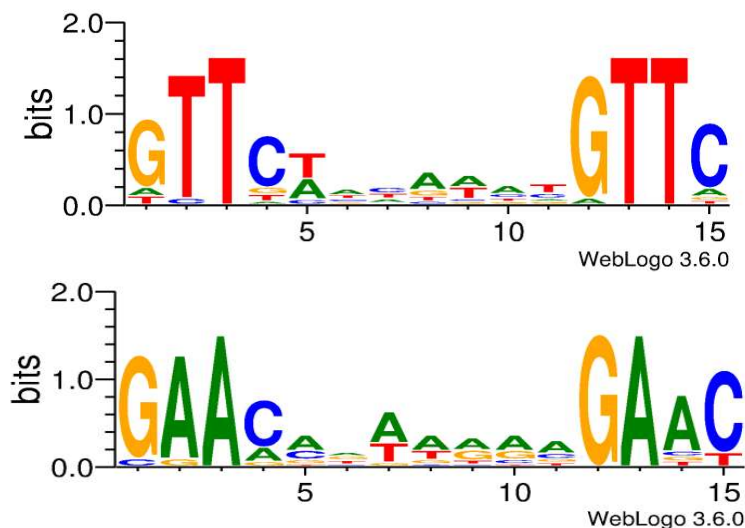
Τα αποτελέσματα της στοίχισης κατέδειξαν την αναμενόμενη συντήρηση των τετρανουκλεοτιδίων GTTC/GAAC του μοτίβου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μεγάλη συντήρηση των ενδιάμεσων AA και TT στα τετρανουκλεοτίδια, παρατηρήσεις που φάνηκαν και στο αποτέλεσμα των Erill και συνεργατών. Επίσης, όπως και στην Εικόνα 3.7.1, παρατηρήθηκε μία τάση προτίμησης A στα ενδιάμεσα άτυπα νουκλεοτίδια του GAACN₇GAAC μοτίβου. Όμως, στην Εικόνα 3.7.2 παρατηρείται προτίμηση για T στα ενδιάμεσα άτυπα νουκλεοτίδια του GTTCN₇GTTC, καθώς και μικτή συντήρηση για G και στα C στα τετρανουκλεοτίδια, σε σύγκριση με την Εικόνα 3.7.1.

Διευρύνοντας την ομάδα των μοτίβων που τροφοδότησαν το WebLogo, συγκεντρώθηκαν οι χειριστές που εντοπίστηκαν ανοδικά των υπερεκφραζόμενων DNA επιδιορθωτικών γονιδίων και οι χειριστές με μηδέν ή μία νουκλεοτιδική αλλαγή των υπολοίπων υπερεκφραζόμενων γονιδίων. Δηλαδή, διατηρήθηκε το ευρέως χρησιμοποιούμενο κριτήριο της 0 ή 1 επιτρεπτής νουκλεοτιδικής αλλαγής στην αναζήτηση χειριστών και η αναζήτηση εμπλουτίστηκε, με βάση μεταγραφικά δεδομένα και υπολογιστικές αναζητήσεις, με χειριστές από το σύνολο των διαπιστωμένα υπερεκφραζόμενων γονιδίων επιδιόρθωσης με 0-3 αλλαγές. Ακολούθησε στοίχιση ξεχωριστά των χειριστών που ακολουθούν το GTTCN₇GTTC

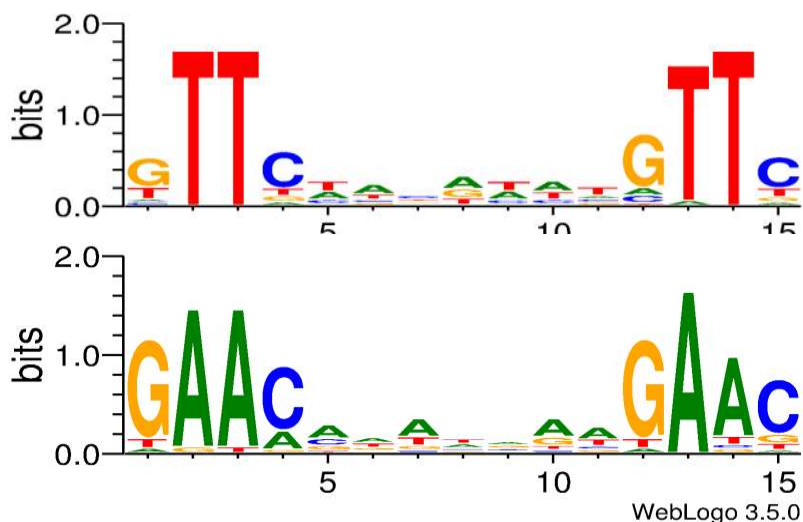
3. Αποτελέσματα

πρότυπο και αυτών που ακολουθούν το GAACN₇GAAC πρότυπο και δημιουργία των μοτίβων με το πρόγραμμα Weblogo (Crooks *et al.* 2004) (Εικόνα 3.7.2).

Τα αποτελέσματα της στοίχισης κατέδειξαν πιο έντονα σε αυτήν την στοίχιση ότι τα δινουκλεοτίδια TT και AA των συντηρημένων τετρανουκλεοτιδίων είναι πιο συντηρημένα από τα G και C. Επίσης, ξαναφάινεται η προτίμηση για αδενίνες αλλά και θυμίνες στα ενδιάμεσα μη συντηρημένα N₇ νουκλεοτίδια του μοτίβου.



Εικόνα 3.7.2. Αποτελέσματα στοίχισης των GTTCN₇GTTC (άνω) και GAACN₇GAAC (κάτω) SOS χειριστών με μηδέν ή μία νουκλεοτιδική αλλαγή των υπερεκφραζόμενων γονιδίων του CP4.

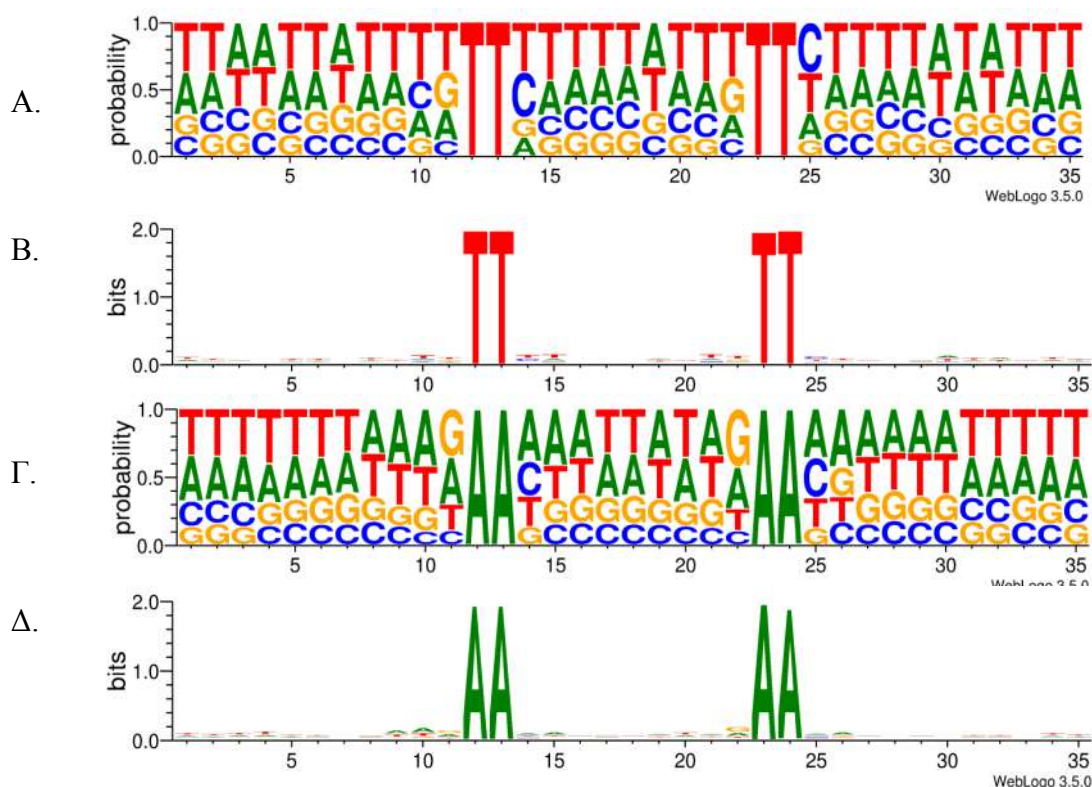


Εικόνα 3.7.3. Αποτελέσματα στοίχισης των GTTCN₇GTTC (άνω) και GAACN₇GAAC (κάτω) SOS χειριστών των DNA-επιδιορθωτικών υπερεκφραζόμενων γονιδίων και των SOS χειριστών με μηδέν ή μία νουκλεοτιδική αλλαγή των υπολοίπων υπερεκφραζόμενων γονιδίων του CP4.

3. Αποτελέσματα

Στη συνέχεια έγινε στοίχιση όλων των SOS χειριστών (με μηδέν έως και 3 νουκλεοτιδικές αλλαγές σε απόσταση -300 έως +10 από την μεταγραφική έναρξη) που εντοπίστηκαν σε υπερεκφραζόμενα SOS γονίδια του CP4. Συμπληρωματικά, συμπεριλήφθηκαν στην στοίχιση και οι εκατέρωθεν περιοχές των χειριστών, μήκους 10 νουκλεοτιδίων. Τα αποτελέσματα δίνονται στην Εικόνα 3.7.4.

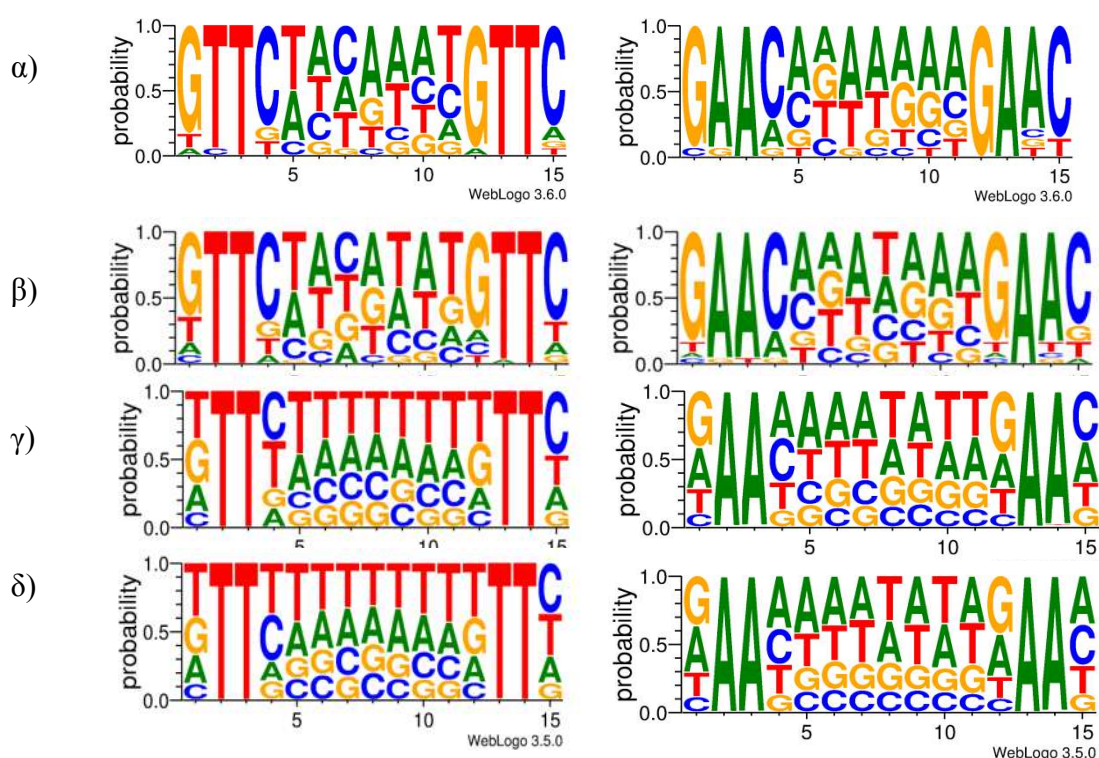
Στα διαγράμματα της Εικόνας 3.6.4 είναι έντονη η μεγάλη συντήρηση των TT και AA των τετρανουκλεοτιδίων. Συγκριτικά, τα G και C δεν εμφανίζουν αντίστοιχη ισχυρή συντήρηση. Μάλιστα, στην περίπτωση των GTTC φαίνεται να είναι πιο συχνή η εμφάνιση T, σαν νουκλεοτιδική αλλαγή, στην θέση του G από ότι η εμφάνιση του ίδιου του G. Ομοίως, παρατηρήθηκε πιο συχνή εμφάνιση του A αντί για C στα GAAC. Εκατέρωθεν των τετρανουκλεοτιδίων, δηλαδή στα συντηρημένα N₇ νουκλεοτιδία του χειριστή καθώς και ανοδικά και καθοδικά του, φαίνεται να προτιμάται η εμφάνιση αδενινών και θυμινών. Συγκεκριμένα, φαίνεται να προτιμώνται θυμίνες γύρω από τα GTTC τετρανουκλεοτιδία και αδενίνες γύρω από τα GAAC. Η προτίμηση για A και T εκατέρωθεν του χειριστή φαίνεται να φτάνει σε ποσοστό 60-65% για κάθε θέση. Να σημειωθεί ότι το περιεχόμενο για GC στο γονίδιο του CP4 είναι στο 46%.



Εικόνα 3.7.4. Στοίχιση SOS χειριστών με μηδέν έως και τρεις νουκλεοτιδικές αλλαγές σε απόσταση -300 έως +10 από την μεταγραφική έναρξη υπερεκφραζόμενων γονιδίων του CP4. Στις αλληλουχίες χειριστών συμπεριλήφθηκαν και περιοχές 10 βάσεων εκατέρωθεν τους. Οι στοιχίσεις των GTTC χειριστών δίνονται στα A και B, των GAAC στα Γ και Δ. Στον κάθετο άξονα δίνονται η πιθανότητα εμφάνισης (A και Γ) ή τα bits (B και Δ) του κάθε νουκλεοτιδίου.

3. Αποτελέσματα

Σε επόμενο βήμα της ανάλυσης συμπεριλήφθηκαν οι χειριστές και των υποεκφραζόμενων SOS γονιδίων. Συγκεκριμένα, συγκροτήθηκαν μοτίβα με τροφοδοσία δεδομένων από α) τους χειριστές με 0-1 αλλαγές από υπερεκφραζόμενα γονίδια, β) χειριστές από επιδιορθωτικά γονίδια και με 0-1 αλλαγές από λοιπά υπερεκφραζόμενα γονίδια, γ) τους χειριστές με τις λιγότερες νουκλεοτιδικές αλλαγές για κάθε SOS υπερ- και υποεκφραζόμενο γονίδιο, και δ) όλους τους χειριστές όλων των SOS γονιδίων (υπερ- και υποεκφραζόμενων) του CP4 (Εικόνα 3.7.5). Επίσης, μελετήθηκε και η απόσταση που εντοπίζονται οι προαναφερθείσες τρεις κατηγορίες χειριστών από την μεταφραστική έναρξη των SOS γονιδίων που ρυθμίζουν (Εικόνα 3.7.6). Να σημειωθεί ότι δεν έχει διαχωρισμός GAAC και GTTC μοτίβων στην τροφοδοσία για στοίχιση των χειριστών με καμία αλλαγή λόγου του μικρού τους αριθμού (3 GAAC και 7 GTTC τέλεια συντηρημένοι χειριστές).



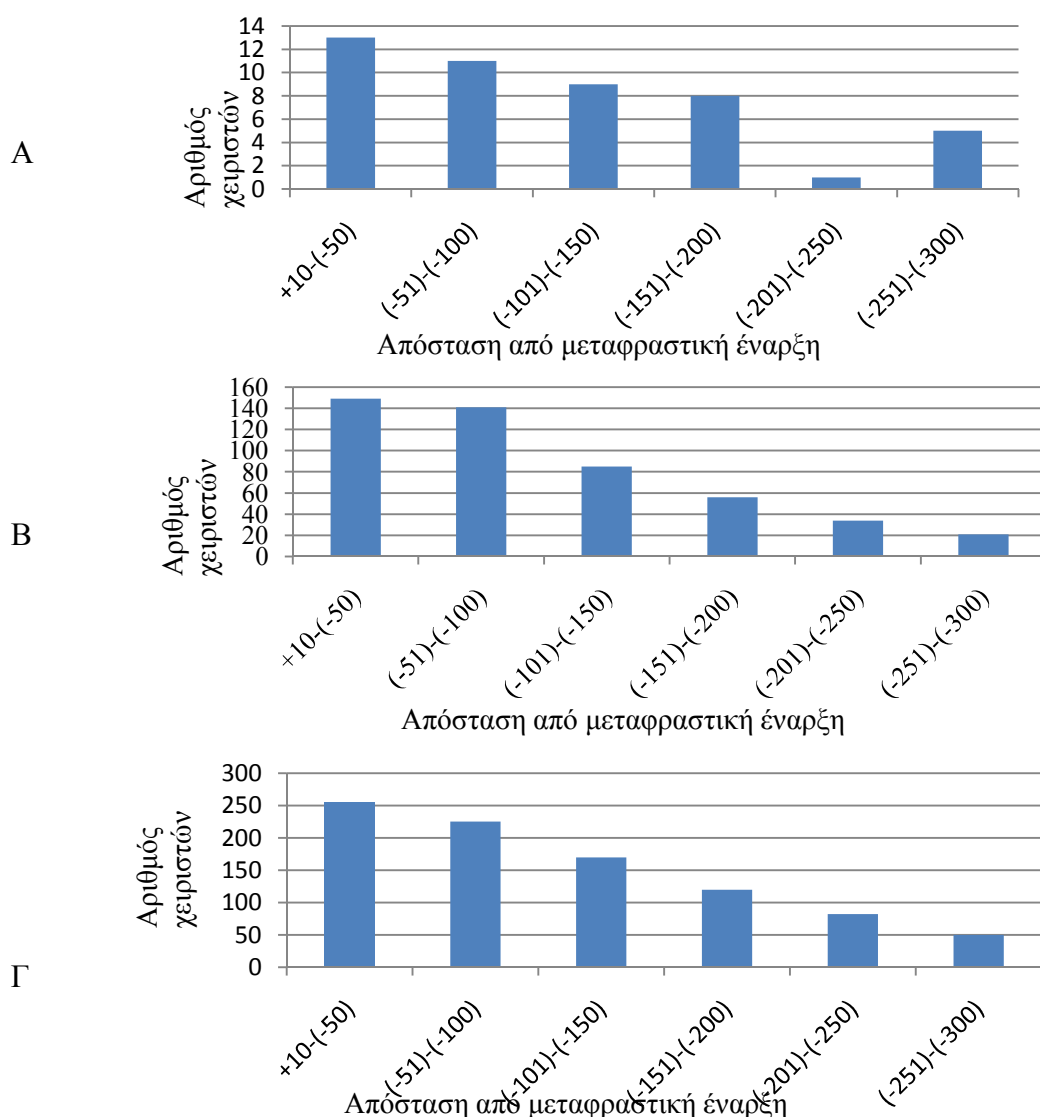
Εικόνα 3.7.5. Στοίχιση α) SOS χειριστών με 0 ή 1 αλλαγή από τα υπερεκφραζόμενα γονίδια β) SOS χειριστών από τα υπερεκφραζόμενα επιδιορθωτικά και SOS χειριστών με μηδέν ή μία αλλαγή από τα λοιπά υπερεκφραζόμενα γονίδια, γ) των SOS χειριστών με τις λιγότερες αλλαγές από κάθε SOS γονίδιο και δ) όλων των χειριστών από όλα τα πιθανά SOS γονίδια του CP4. Αριστερά δίνονται οι στοιχίσεις των GTTC χειριστών και δεξιά των GAAC χειριστών.

Παρατηρήθηκε η συντήρηση των AA και TT στα GAAC/GTTC τετρανουκλεοτίδια σε όλες τις στοιχίσεις όλων των εξεταζόμενων συνδυασμό χειριστών. Επομένως, η συντήρηση ήταν καθολική για όλους τους χειριστές. Επιπλέον, η προτίμηση για αδενίνες και θυμίνες ως ενδιάμεσα άτυπα νουκλεοτίδια ήδη σκιαγραφείται από την στοίχιση των χειριστών με 0 ή 1 αλλαγή (α) και φαίνεται πιο έντονα στις στοιχίσεις γ και δ στην Εικόνα 3.7.5, όπου στοιχήθηκαν χειριστές από όλα τα SOS γονίδια. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρείται διαφορά ανάμεσα

3. Αποτελέσματα

στις περιπτώσεις γ και δ της Εικόνας 3.7.4, δείχνοντας ότι δεν προκαλεί διαφορά το να επιλεχθούν ξεχωριστά οι χειριστές με τις λιγότερες νουκλεοτιδικές αλλαγές.

Όσον αφορά την απόσταση των SOS χειριστών (Εικόνα 3.6.6) από την μεταφραστική έναρξη του εκάστοτε SOS γονιδίου, παρατηρήθηκε ότι το 87% των χειριστών εντοπίζονται σε απόσταση -200 έως +10 βάσεις και το 50% σε απόσταση -100 έως +10 βάσεις από την μεταφραστική έναρξη των γονιδίων που ρυθμίζουν. Επιπλέον, ομοίως όπως και στην Εικόνα 3.7.4, η εικόνα ανάμεσα στα διαγράμματα Β και Γ δεν είναι διαφορετική, δείχνοντας και πάλι ότι δεν προσφέρει κάποιο πλεονέκτημα η επιλογή των χειριστών με τις λιγότερες αλλαγές σε κάθε SOS γονίδιο.



Εικόνα 3.7.6. Αριθμοί A) SOS χειριστών από τα υπερεκφραζόμενα επιδιορθωτικά και SOS χειριστών με μηδέν ή μία αλλαγή από τα λοιπά υπερεκφραζόμενα γονίδια, B) των SOS χειριστών με τις λιγότερες αλλαγές από κάθε SOS γονίδιο και B) όλων των χειριστών από όλα τα πιθανά SOS γονίδια του CP4 ανά απόσταση από την μεταφραστική έναρξη. x'x:αριθμός χειριστών, y'γ: εύρος απόστασης από την μεταφραστική έναρξη των SOS γονιδίων

3. Αποτελέσματα

3.8 Επιβεβαίωση και σύγκλιση των *in silico* προβλέψεων SOS γονιδίων με τα αποτελέσματα της μεταγραφωματικής ανάλυσης

Στην *in silico* πρόβλεψη μελών του SOS συστήματος στο *Z. mobilis* χρησιμοποιήθηκαν βιοπληροφορικές προσεγγίσεις για την πρόβλεψη των πιθανών SOS γονιδίων στο CP4, μέσω της εύρεσης ακολουθιών SOS χειριστών ανοδικά των υποψηφίων γονιδίων. Μέσα από την μεταγραφωματική ανάλυση του CP4, εντοπίστηκαν τα SOS γονίδια, δηλαδή γονίδια με διαφορετική έκφραση παρουσία του MMS και με SOS χειριστές ανοδικά τους.

Σε αυτό το σημείο, κρίθηκε απαραίτητο να συγκριθεί το ποσοστό των γονιδίων από τις *in silico* προβλέψεις που επιβεβαιώθηκε με την μεταγραφωματική ανάλυση, δηλαδή όντως βρέθηκαν διαφορεικά εκφραζόμενα στις συγκεντρώσεις του MMS. Πρώτα στη σειρά ελέγχθηκαν τα γονίδια που είχαν προβλεφθεί με τέλεια συντηρημένους χειριστές (10 χρωμοσωμικά και 1 πλασμιδιακό γονίδιο, Πίνακας 3.8.1). Εκτός ενός υποθετικού γονιδίου (ZCP4_0383) του οποίου μετάγραφα δεν εντοπίστηκαν στις βιβλιοθήκες, από τα υπόλοιπα 10 γονίδια, 8 υπερεκφράζονται και 1 υποεκφράζεται. Δηλαδή, το 90% των γονιδίων που προβλέφθηκαν με τέλειους χειριστές έχουν διαφορετική έκφραση και συγκεκριμένα σε τουλάχιστον 2 συγκεντρώσεις του MMS.

Πίνακας 3.8.1. Γονίδια που προβλέφθηκαν με τέλεια συντηρημένους SOS χειριστές και οι λόγοι έκφρασής τους στις συγκεντρώσεις του MMS που δοκιμάστηκαν

Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)							SOS χειριστής	d
		0,05	0,1	0,2	1	5	10	15		
ZCP4_1046	SOS-response transcriptional repressor LexA	1,46	1,85	2,09	3,49	3,88	4,11	4,01	GTTCTATATCTGTTTC	-97
ZCP4_RS00900	hypothetical	1,79	2,39	3,93	12,51	19,53	29,05	27,25	GAACATTTGAAGAAC	-51
ZCP4_0166	protein RecA	1,09	1,14	1,18	1,75	3,22	9,32	10,23	GTTACCTTATGTTTC	-103
ZCP4_1667	6-phosphogluconolactonase	-1,27	-1,23	-1,02	1,05	1,67	2,74	2,58	GTTCTAATAAAGTTTC	-164
ZCP4_1546	ABC-type transport system involved in resistance	1,12	1,18	1,07	1,03	1,46	2,48	2,03	GTTCAATAAAGTTTC	-254
ZCP4_0381	hypothetical	-1,21	1,03	1,39	2,60	1,45	1,99	2,10	GAACATAACAAGAAC	-31
ZCP4_1387	hypothetical	1,29	1,28	1,79	2,14	1,81	1,25	1,46	GAACATAAGGGGAAC	-55
ZCP4_0435	hopanoid biosynthesis associated	-1,14	-1,18	-1,04	-1,01	1,07	-1,05	1,01	GTTCTTTCCTCGTTTC	-189
ZCP4_0175	RpsB, 30S ribosomal protein S2	1,14	1,07	1,03	1,09	-1,44	-2,78	-2,31	GTTCTCAAATGTTTC	-218
ZCP4_0383	hypothetical	Δεν βρέθηκαν μετάγραφα							GAACAAAAACATGAAC	
ZCP4_RS09015 (πλασμιδιακό γονίδιο)	phage baseplate assembly protein V	1,80	1,70	1,83	2,01	3,47	9,77	8,78	GTTTCATGTTTTGTTTC	-179

Με κλιμακώσεις του κόκκινου χρώματος συμβολίζονται οι διαφορετικοί λόγοι υπερέκφρασης (πορτοκαλί: 1,45 έως 1,49, σκούρο πορτοκαλί: 1,50 έως 1,99, κόκκινο: 2,00 έως 4,99, σκούρο κόκκινο: 5,00 και άνω). Με κλιμακώσεις του πράσινου οι λόγοι υποέκφρασης (ανοιχτό πράσινο: -1,45 έως -1,49, πράσινο: -1,50 έως -1,99, σκούρο πράσινο: -2,00 και κάτω). Υπογραμμίζονται τα συντηρημένα τετρανουκλεοτίδια στους

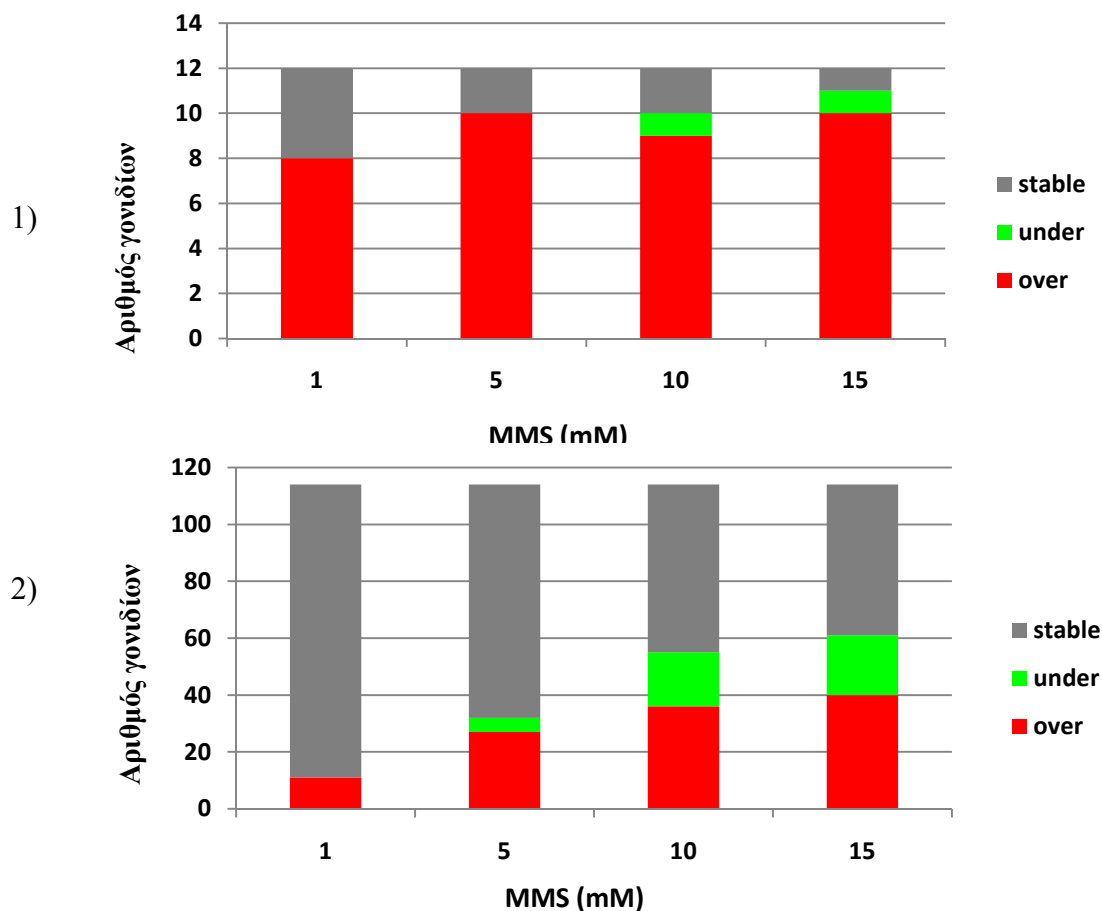
3. Αποτελέσματα

35	ZCP4_1584	short-chain alcohol dehydrogenase	-1,29	-1,10	1,19	1,12	2,06	2,06	1,59	GAACCGGAATGAGC	-103
36	ZCP4_1228	glucose-inhibited division protein A	1,11	1,04	-1,06	-1,08	-1,40	-1,73	-2,13	TTTCTCTCTGTTC	-138
37	ZCP4_1227	gluconolactonase	-1,45	-1,29	1,16	-1,02	1,41	2,76	2,98		-260
38	ZCP4_1011	ATP synthase F1 subcomplex delta subunit	-1,09	-1,10	-1,01	1,07	1,25	-1,27	-1,30	GAACCGGGACGGAAT	-53
39	ZCP4_1013	periplasmic serine protease. Do/DeqQ family	-1,11	-1,14	-1,12	-1,07	-1,14	1,24	1,79	ATTCAAAAAAGGTTC	-220
40	ZCP4_1012	ATPase involved in chromosome partitioning	-1,01	1,00	1,09	-1,02	1,09	1,66	2,12		-331
41	ZCP4_0895	ATP-dependent proteinase	-1,07	-1,08	1,03	1,06	1,43	3,79	4,24	GAACCCAGAAAGATC	-68
42	ZCP4_0894	HhH-GPD superfamily base excision DNA repair protein	1,17	1,16	1,18	1,23	-1,11	-1,06	1,05		-142
43	ZCP4_1568	Excinuclease ABC subunit A	-1,22	-1,18	1,14	1,46	2,88	9,65	14,36	i)GAACCGGTAGCAGAAT ii)GAACAAAAGGGGAAT	i)-166 ii)-94
44	ZCP4_1211	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	1,32	1,38	-1,73	-1,06	-1,76	-2,13	-2,25	GAACAGGAATAGAGC	-70
45	ZCP4_1519	hypothetical protein	-1,20	-1,40	-1,32	-1,15	-1,61	-1,12	-1,07	ATTCATCTTGGGTTC	-114
46	ZCP4_0604	putative dehydrogenase	1,07	1,08	1,05	1,13	1,27	-2,71	-5,77	GAACCATGACGGATC	-55
47	ZCP4_1097	pyridoxal phosphate enzyme. YggS family	-1,07	-1,10	-1,08	-1,15	-1,22	-1,54	-2,00	TTTCGGGCTTTGTTC	-54
48	ZCP4_1098	protein tyrosine phosphatase	-1,08	-1,21	-1,07	1,08	1,08	-1,07	-1,13		-300
49	ZCP4_1046	SOS-response transcriptional repressor LexA	1,46	1,85	2,09	3,49	3,88	4,11	4,01	GTTTCCTACACGTTC	-108
50	ZCP4_0119	hypothetical protein	-1,23	-1,25	1,02	1,03	1,26	2,69	2,18	GAACCGTATCCGACC	-34
51	ZCP4_0622	F0F1-type ATP synthase. beta subunit	1,02	1,05	1,03	1,05	1,30	-1,00	-1,35	TTTCAGCCCGTGTTC	-84
52	ZCP4_1394	aminopeptidase N	-1,36	-1,35	-1,07	-1,03	1,46	3,21	2,96	GTTAAAGATAGGTTC	-187
53	ZCP4_1395	hypothetical protein	1,01	1,04	1,15	1,08	1,45	2,05	2,27		-283
54	ZCP4_1551	septum formation initiator	1,07	1,11	-1,16	-1,22	-1,81	-2,36	-2,63	GTCCCTGATTCGTTC	-56
55	ZCP4_1539	DNA primase	1,07	1,06	1,00	1,00	-1,38	1,03	1,22	GTCCTTTTTGTTC	-209
56	ZCP4_1415	flavodoxin reductase family protein	1,00	1,04	1,09	1,04	1,13	-1,13	-1,34	GAACAATAAAGGATC	-117
56	ZCP4_0485	16S rRNA (cytosine(1402)-N(4))-methyltransferase	-1,34	1,35	1,04	-1,07	-1,17	-1,08	1,02	GAACTTCATTCGAGC	-314
58	ZCP4_0601	peroxiredoxin. Ohr subfamily	-1,58	-1,35	-1,04	1,13	4,01	9,10	10,13	GCTCTTCAGGCGTTC	-114
59	ZCP4_RS09280	hypothetical (πλασμιδιακό γονίδιο)	1,13	1,15	1,01	-1,10	-1,42	-2,16	-2,02		-289
60	ZCP4_RS09275	hypothetical (πλασμιδιακό γονίδιο)	1,10	1,11	1,16	1,19	1,30	1,47	1,70	ATTCTGTCTATGTTC	-298
61	ZCP4_RS09420	transposase (πλασμιδιακό γονίδιο)	Δεν βρέθηκαν μετάγραφα							GTTCCCATGTGGGTC	-68
62	ZCP4_RS09415	transposase (πλασμιδιακό γονίδιο)	1,07	-1,01	1,07	1,12	1,41	4,53	5,85		-227
63	ZCP4_RS09410	hypothetical (πλασμιδιακό γονίδιο)	1,06	1,19	1,32	-1,02	1,31	1,39	1,38	GTTTGTAGGTCGTTC	-245
64	ZCP4_RS09525	autotransporter-associated beta strand repeat (πλασμιδιακό γονίδιο)	-1,04	1,04	1,01	-1,12	1,12	1,18	1,24	GTTTCATATCGGTTC	-119
65	ZCP4_RS09540	hypothetical (πλασμιδιακό γονίδιο)	Δεν βρέθηκαν μετάγραφα							GTTGAATATCTGTTC	-88
66	ZCP4_RS09685	hypothetical (πλασμιδιακό γονίδιο)	1,73	2,24	1,25	1,11	1,47	2,90	2,39	GTTGAACAAGTGTTC	-10
67	ZCP4_RS09225	efflux transporter RND family MFP subunit (πλασμιδιακό γονίδιο)	1,02	1,10	1,06	1,21	1,52	1,20	1,25	GTTGACAAATGTTC	-61

Οι ενδείξεις είναι ίδιες με του πίνακα 3.8.1.

Αναφέρθηκε το γεγονός ότι στην περίπτωση που γονίδια που φέρουν SOS χειριστές είναι πρώτα γονίδια σε συνεργιώματα, θεωρείται ότι όλα τα γονίδια του συνεργιώματος ρυθμίζονται από τον αντίστοιχο χειριστή. Βάσει αυτής της παραδοχής, είχαν προβλεφθεί 12 γονίδια που ρυθμίζονται από τέλεια συντηρημένους χειριστές (το *recA* είναι σε συνεργίωμα με το *comF* και το υποθετικό γονίδιο ZCP4_RS00900 σε συνεργίωμα με γονίδιο ασπαρτικής ρακεμάσης), ενώ συνολικά 114 γονίδια είχαν προβλεφθεί να ρυθμίζονται από χειριστές με μηδέν ή μία νουκλεοτιδική αλλαγή. Με βάση αυτά τα νούμερα, η επιβεβαίωση των προβλέψεων αλλάζει σε 91,7% για την περίπτωση των γονιδίων που ρυθμίζονται από τέλεια συντηρημένους χειριστές και 53,5% για την περίπτωση των γονιδίων με χειριστές με μηδέν ή μία αλλαγή. Τα ποσοστά αυτά προκύπτουν από τα νούμερα στα διαγράμματα στηλών της Εικόνας 3.8.1, διαιρώντας τον αριθμό των γονιδίων που έχουν διαφορετική έκφραση και ρυθμίζονται από SOS χειριστές (1η περίπτωση: με μηδέν αλλαγές, 2η περίπτωση: με μηδέν ή μία αλλαγή) με τον αριθμό όλων των γονιδίων που είχαν προβλεφθεί ότι ρυθμίζονται από αντίστοιχους χειριστές.

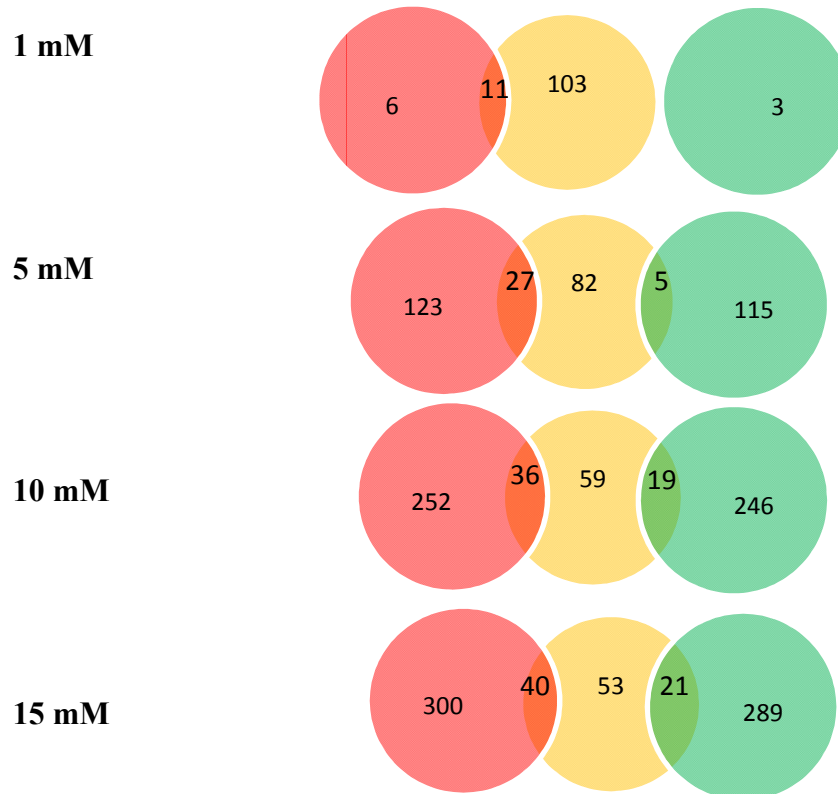
3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.8.1. Ραβδογράμματα γονιδίων που ρυθμίζονται 1: από SOS χειριστές με μηδέν αλλαγές, 2: από SOS χειριστές με μηδέν ή μία αλλαγή και το πρότυπο διαφορικής τους έκφρασης ανά συγκέντρωση MMS. Με κόκκινες μπάρες σημειώνεται το πλήθος των υπερεκφραζόμενων, με πράσινες των υποεκφραζόμενων και γκρι των σταθερά εκφραζόμενων γονιδίων. Οι μπάρες δείχνουν ότι από έναν σταθερό αριθμό γονιδίων (άξονας y'y) που είχαν προβλεφθεί ότι ρυθμίζονται από χειριστές με μηδέν αλλαγές (12 στο διάγραμμα 1) ή από χειριστές με μηδέν ή μία αλλαγή (114 στο διάγραμμα 2), ποια από αυτά τα γονίδια υπερ- ή υποεκφράζονται ανά συγκέντρωση MMS (άξονας x'x).

Οι προβλέψεις, όμως, περιλάμβαναν χειριστές με μηδέν ή μία νουκλεοτιδική αλλαγή. Στην περίπτωση του CP4, η μεταγραφωματική του ανάλυση υπέδειξε διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια παρουσία MMS που διέθεταν χειριστές με δύο ή και τρεις αλλαγές. Όπως δείχνεται και στα διαγράμματα Venn της Εικόνας 3.8.2, παίρνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από τα 15 mM MMS, που είχαμε και τα περισσότερα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια, συνειδητοποιούμε ότι τα επιβεβαιωμένα προβλεπόμενα SOS γονίδια είναι μόλις το 9,4% (61 γονίδια που προβλέφθηκαν με SOS χειριστή και φάνηκε η διαφορική τους έκφραση στο MMS προς 650 γονίδια που βρέθηκαν με διαφορική έκφραση και SOS χειριστές στην παρούσα ανάλυση) από το σύνολο των υπερεκφραζόμενων (340) και υποεκφραζόμενων (310) SOS γονιδίων.

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.8.2. Διαγράμματα Venn που απεικονίζουν τον αριθμό των προβλεπόμενων SOS γονιδίων (γονιδίων που προβλέφθηκαν με SOS χειριστές με μηδέν ή μία αλλαγή, πορτοκαλί κύκλος) σε σύγκριση με τον αριθμό των SOS γονιδίων που υπερ- (κόκκινος) ή υποεκφράζονται (πράσινος κύκλος) ανά συγκέντρωση MMS (αριστερά). Η τομή των κύκλων δείχνει τον αριθμό των γονιδίων που προβλέφθηκαν να ρυθμίζονται από τους SOS χειριστές τους και όντως υπερ- ή υποεκφράζονται.

3.9 Μελέτη των υποκινητών των *recA* και *lexA* γονιδίων για χρήση τους ως μοντέλα αλληλεπίδρασης της LexA με SOS χειριστές

3.9.1. Κλωνοποίηση της ευρύτερης περιοχής του υποκινητή των *recA* και *lexA* γονιδίων από το στέλεχος CP4

Παρουσιάστηκε προηγουμένως (Αποτελέσματα, Παράγραφος 3.3) ότι εντοπίστηκαν αλληλεπικαλυπτόμενοι SOS χειριστές ανοδικά των *recA* και *lexA* γονιδίων στο CP4. Συγκεκριμένα, καθένας από τους προαναφερόμενους χειριστές είναι αλληλοεπικάλυψη ενός τέλει χειριστή (GTTCN₇GTTC) και ενός χειριστή που στην περίπτωση του *lexA* φέρνει μία νουκλεοτιδική αλλαγή (GTTT αντί για GTTC) και στην περίπτωση του *recA* 8 αντί για 7 ενδιάμεσα μη συντηρημένα νουκλεοτίδια (GTTCN₈GTTC).

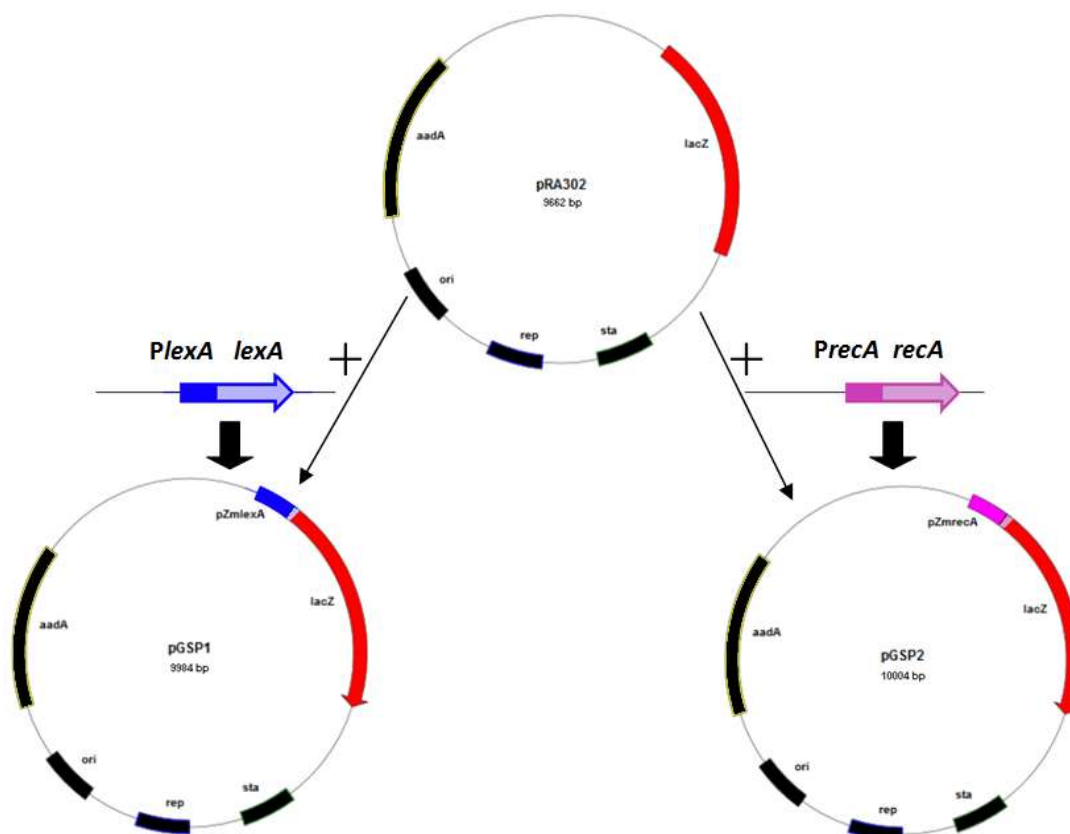
Για την μοριακή μελέτη των προαναφερθέντων περιοχών χειριστή-υποκινητή, ενισχύθηκαν και κλωνοποιήθηκαν οι ευρύτερες περιοχές υποκινητών, μεγέθους 341 bp και 322 bp, των *recA* και *lexA* γονιδίων αντίστοιχα από το CP4. Σχεδιάστηκαν τα κατάλληλα εκκινητικά νουκλεοτίδια GS1-F και GS1-R2 για την περιοχή ανοδικά του *recA* και GS2-F και GS2-R για την περιοχή ανοδικά του *lexA* (Εικόνα 3.9.1), τα οποία έφεραν στα 5' άκρα τους τις περιοριστικές θέσεις *Eco*RI (στους forward primers GS1-F και GS2-F) και *Pst*I (στους reverse primers GS-R2 και GS2-R) και κλωνοποιήθηκαν στις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις του φορέα ελέγχου μεταγραφικής ενεργότητας pRA302 έτσι ώστε να βρεθούν σε μεταφραστική σύντηξη με το γονίδιο *lacZ* του φορέα. Ο pRA302 (Akakura & Winans 2002) είναι ένα φορέας ευρέως φάσματος ξενιστών και διαθέτει πολυσύνδεσμο (MCS) ανοδικά από γονίδιο *lacZ* που δεν φέρει υποκινητή. Έτσι, μπορούν να κλωνοποιηθούν ανοδικά αυτού περιοχές υποκινητών και έναρξης γονιδίων σε μεταφραστική σύντηξη με το γονίδιο ώστε να ελεγχθεί η ενεργότητά τους.



Εικόνα 3.9.1. Περιοχές ανοδικά των *lexA* (α) και *recA* (β) που ενισχύθηκαν στην παρούσα εργασία. Με κόκκινα γράμματα σημειώνονται οι περιοχές που υβριδίζουν τα εκκινητικά νουκλεοτίδια. Με μπλε επισημείωση καταδεικνύονται τα κωδικόνια λήξης των προηγούμενων γονιδίων, με μαύρη τα κωδικόνια έναρξης των *lexA* και *recA* και με γκρι τα συντηρημένα τετρανουκλεοτίδια των SOS χειριστών. Υπογραμμίζονται οι περιοχές -35, -10 και RBS των υποκινητών.

3. Αποτελέσματα

Ακολούθησε ενίσχυση με PCR του τμήματος 322 βάσεων από την ευρύτερη περιοχή του *lexA* γονιδίου με τα εκκινητικά νουκελοτίδια GS1-F και GS1-R2, και του τμήματος 341 βάσεων από την ευρύτερη περιοχή του *recA* γονιδίου με τα εκκινητικά νουκελοτίδια GS2-F και GS2-R (Εικόνα 3.9.1) και κλωνοποίηση στον φορέα pRA302 κατά τα άνω στις *EcoRI* και *PstI* θέσεις του MCS, δημιουργώντας τις κατασκευές pGSP1 (φέρει το τμήμα του *lexA*) και pGSP2 (φέρει το τμήμα του *recA*) (Εικόνα 3.9.2).



Εικόνα 3.9.2. Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής των pGSP1 (αριστερά, περιέχει τον υποκινητή του *lexA*, μπλε χρώμα) και pGSP2 (δεξιά, περιέχει τον υποκινητή του *recA*, μοβ χρώμα) με βάση τον φορέα pRA302 (πάνω) που περιέχει το *lacZ* γονίδιο χωρίς υποκινητή (κόκκινο χρώμα).

Οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για μετασηματισμό κυττάρων *E. coli* DH5α, *A. tumefaciens* KYC55 και *Z. mobilis* CP4. Προτιμήθηκε χημικός μετασηματισμός για τα κύτταρα DH5α και μετασηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση για τα υπόλοιπα. Τα αποτελέσματα των μετασηματισμών δίνονται στον Πίνακα 3.9.1.

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.9.1. Αποτελέσματα μετασχηματισμών στελεχών *E. coli* DH5α, *A. tumefaciens* KYC55 και *Z. mobilis* CP4 με τα πλασμίδια pRA302, pGSP1 και pGSP2

Στέλεχος	Πλασμίδιο	Συχνότητες μετασχηματισμού	Αποδόσεις μετασχηματισμού
<i>E. coli</i> DH5α	pRA302	1.93×10^{-2}	3.85×10^3
	pGSP1	9.25×10^{-3}	1.85×10^3
	pGSP2	1.13×10^{-2}	2.25×10^3
<i>A. tumefaciens</i> KYC55	pRA302	3.86×10^{-6}	2.70×10^4
	pGSP1	1.13×10^{-6}	8.00×10^3
	pGSP2	3.34×10^{-6}	2.3×10^4
<i>Z. mobilis</i> CP4	pRA302	6.72×10^{-7}	1.20×10^4
	pGSP1	4.40×10^{-7}	8.00×10^3
	pGSP2	1.59×10^{-6}	2.80×10^4

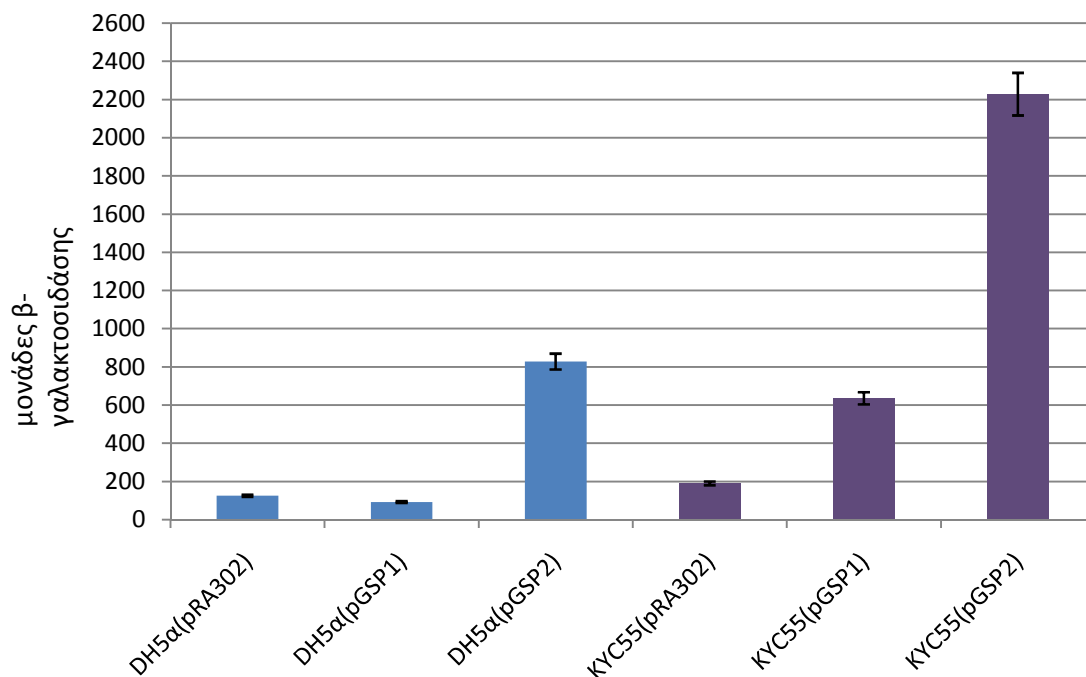
Από τις μετασχηματισμένες αποικίες, ανακαλλιεργήθηκαν σε επιλεκτικό θρεπτικό υλικό οι μετασχηματισμένες αποικίες του DH5α και του KYC55. Δεν κατορθώθηκε να ανακαλλιεργηθούν οι μετασχηματισμένες αποικίες του CP4.

3.9.2. *In vivo* μελέτη της ενεργότητας των υποκινητών των *recA* και *lexA* του CP4 εντός κυττάρων των *E. coli* DH5α και *A. tumefaciens* KYC55

Για να μελετηθεί η ενεργότητα των *PlexA* και *PrecA* στις κατασκευές pGSP1 και pGSP2 αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες Miller στα στελέχη DH5α(pGSP1), DH5α(pGSP2), KYC55(pGSP1) και KYC55(pGSP2) (οι καλλιέργειες από όπου πάρθηκαν τα δείγματα αναπτύσσονταν σε συνθήκες ανάλογες το στέλεχος-ξενιστή, βλ. Υλικά και Μέθοδοι Παράγραφος 2.4 για *E. coli* και *A. tumefaciens* αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα δίνονται στα διαγράμματα της εικόνας 3.9.3.

Παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη που έφεραν την κατασκευή pGSP2, δηλαδή τον υποκινητή του *recA*, έδειξαν μεγαλύτερη ενεργότητα από τα στελέχη που περιείχαν τον pGSP1 (τον υποκινητή του *lexA*) και μάλιστα 12 φορές μεγαλύτερη στο *E. coli* και 7 φορές μεγαλύτερη στο *A. tumefaciens*. Επιπλέον, τα στελέχη του *A. tumefaciens* έδειξαν μεγαλύτερη ενεργότητα από τα *E. coli* αντίστοιχά τους, με το KYC55(pGSP2) να ξεπερνάει τις 900 μονάδες β-γαλακτοσιδάσης

3. Αποτελέσματα



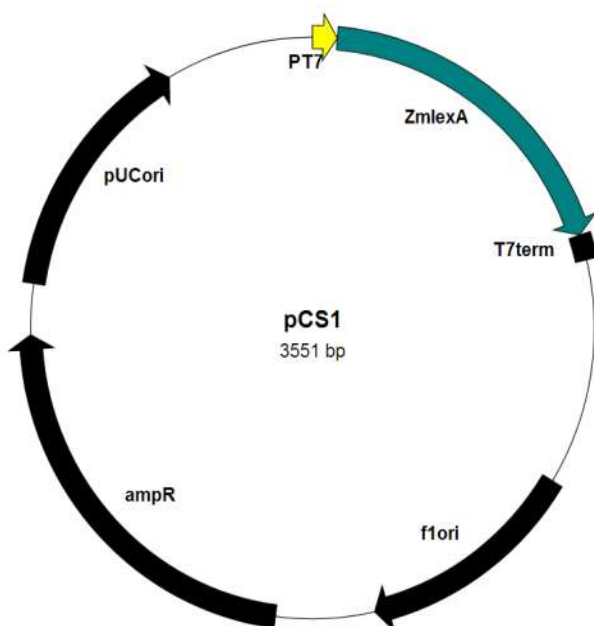
Εικόνα 3.9.3. Διαγράμματα μεταγραφικής ενεργότητας σε στελέχη που φέρουν συζευγμένους τους *PrecA* και *PlexA* με το *lacZ* και σε στελέχη-μάρτυρες.

3.9.3. *In vivo* μελέτη της αλληλεπίδρασης των υποκινητών των *recA* και *lexA* του CP4 με την LexA του CP4 εντός του *E. coli* DH5α

Στη συνέχεια στόχος ήταν να κατασκευαστεί ένα σύστημα μελέτης της αλληλεπίδρασης της LexA του CP4 με τους SOS χειριστές. Επιλέχθηκε για αυτήν την μελέτη το στέλεχος DH5α(pGSP2) εφόσον έδινε στο *E. coli* την μεγαλύτερη ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης.

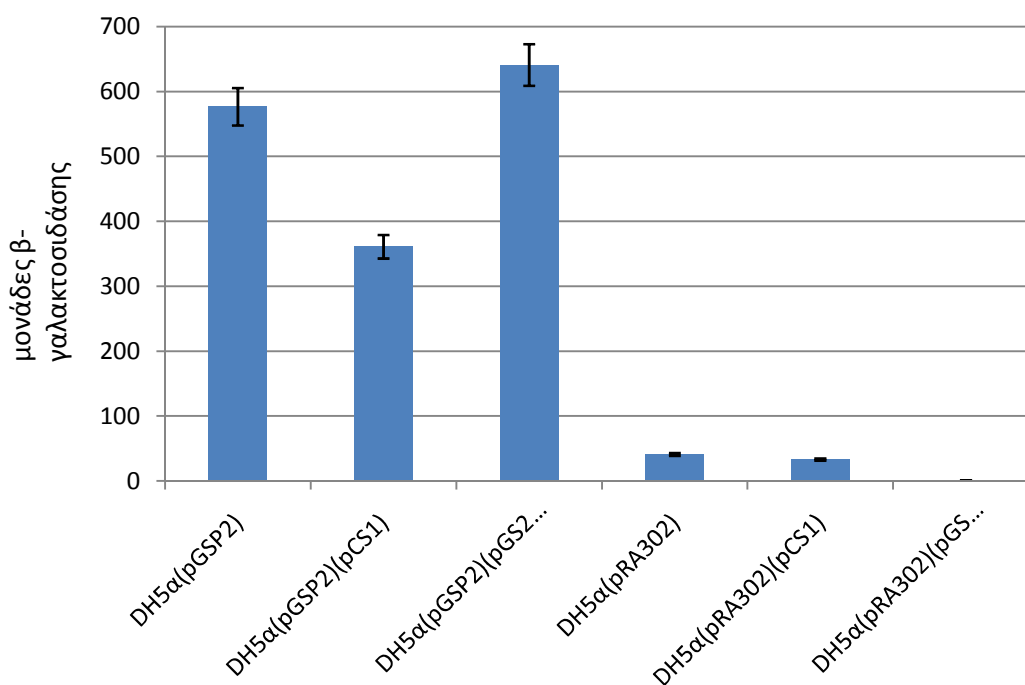
Για την ανασύσταση οποιασδήποτε αλληλεπίδρασης της LexA του CP4 με τον SOS χειριστή του *recA*, η οποία θα φαινόταν ως καταστολή του υποκινητή και μείωση της ενεργότητάς του, χρειάστηκε να εισαχθεί εντός του DH5α(pGSP2) η οικεία LexA του CP4. Η εισαγωγή έγινε μέσω δύο διαφορετικών κατασκευών. Η μία ήταν το πλασμίδιο pGS223, του οποίου η σύνθεση περιγράφηκε προηγουμένως (βλ. Αποτελέσματα, Παράγραφο 3.2). Στο pGS223 έχει κλωνοποιηθεί το *lexA* του CP4 και βρίσκεται υπό την ρύθμιση του ίδιου του υποκινητή του. Η δεύτερη κατασκευή ήταν το pCS1 (Σκρέκας Χ. Διπλωματική εργασία 2014, Εικόνα 3.9.4). Για το τελευταίο χρησιμοποιήθηκαν τα εκκινητικά νουκλεοτίδια CS-F2 και CS-R, που φέρουν τις περιοριστικές θέσεις *NdeI* και *EcoRI* αντίστοιχα, για ενίσχυση του πλαισίου ανάγνωσης του *lexA* και έγινε κλωνοποίηση του ενισχυμένου τμήματος στον φορέα υπερέκφρασης pRSETA, καθοδικά του υποκινητή T7. Η χρησιμότητα των δύο κατασκευών ήταν η *in trans* παροχή της LexA από το pCS1 για ρύθμιση οποιουδήποτε υποκινητή αναφοράς στο κύτταρο και η σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με την επίσης *in trans* παροχή της LexA από τον φορέα έκφρασης pGS223 που ωστόσο αυτοτιλοδοτεί την πρωτεΐνη λόγω της παρουσίας του ανοδικού χειριστή του.

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.9.4. Το πλασμίδιο pCS1 (Σκρέκας X., Διπλωματική εργασία 2014). Η κωδική περιοχή του *lexA* γονιδίου του CP4 (μπλε βέλος) κλωνοποιήθηκε στον φορέα υπερέκφρασης pRSETA καθοδικά του υποκινητή T7 (κίτρινο).

Οι κατασκευές pGS223 και pCS1 εισήχθησαν ξεχωριστά στα στελέχη DH5α(pRA302) (μάρτυρας) και DH5α(pGSP2). Στα παραγόμενα στελέχη έγιναν δοκιμασίες Miller για να μετρηθεί η ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης σε δείγματα που πάρθηκαν από O.D 0.7-1.0 από καλλιέργειες ανεπτυγμένες στατικά στους 30°C (δοκιμάστηκαν οι συνθήκες ανάπτυξης του *Z. mobilis* από όπου προήλθαν τα γονίδια) (Εικόνα 3.9.5),

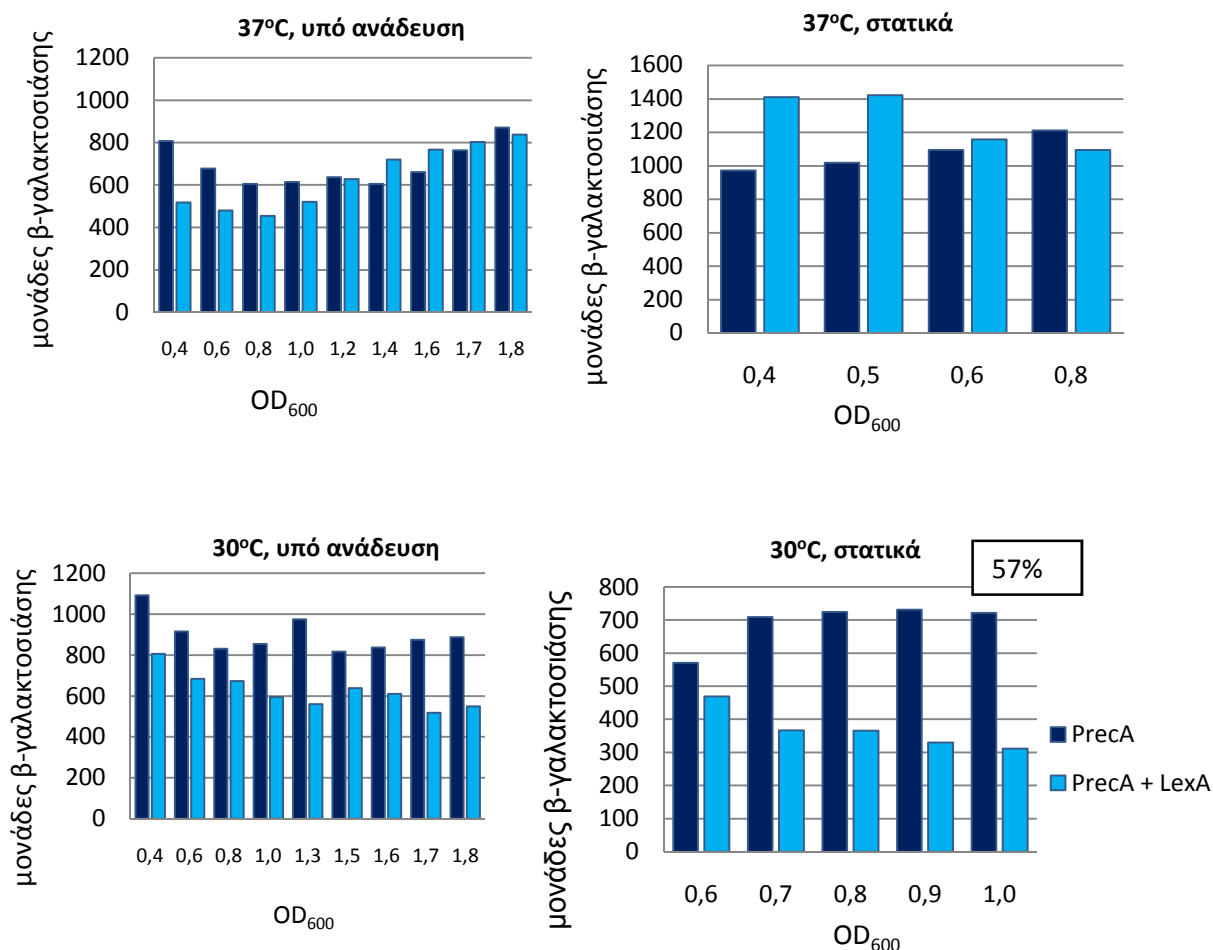


Εικόνα 3.9.5. Διαγράμματα ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης στα στελέχη *E. coli* που αναγράφονται.

3. Αποτελέσματα

Παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας του υποκινητή του *recA* μόνο στο στέλεχος DH5α(pGSP2)(pCS1), σε σύγκριση με το στέλεχος DH5α(pGSP2), δηλαδή στην περίπτωση που το *lexA* είναι κλωνοποιημένο στο pRSETA.

Δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης των στελεχών DH5α(pGSP2) και DH5α(pGSP2)(pCS1) για να βρεθούν αυτές όπου εμφανίζεται η μεγαλύτερη μείωση ενεργότητας του υποκινητή του *recA* παρουσία της LexA (Εικόνα 3.9.6). Η μεγαλύτερη μείωση ενεργότητας του υποκινητή του *recA* εμφανίζεται σε ανάπτυξη του DH5α(pGSP2)(pCS1) στους 30°C στατικά (συνθήκες ανάπτυξης του *Z. mobilis*), όπου δείχνει έως και 57% λιγότερες μονάδες β-γαλακτοσιδάσης από το DH5α(pGSP2) σε OD₆₀₀ 1,0. Συνεπώς, επετεύχθη προσομοίωση της καταστολής της ενεργότητας του υποκινητή του *recA* από την LexA, έστω και μερική, στο ετερόλογο σύστημα του *E. coli*.



Εικόνα 3.9.6. Διαγράμματα ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης στα στελέχη *E. coli* DH5α(pGSP2) (σκούρο μπλε) και DH5α(pGSP2)(pCS1) (γαλάζιο) σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης και σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης.

3. Αποτελέσματα

3.9.4. *In vivo* μελέτη της αποκαταστολής των υποκινητών των *recA* και *lexA* του CP4 εντός κυττάρων *A. tumefaciens* KYC55

Η εισαγωγή των υποκινητών των *recA* και *lexA*, μέσω των κατασκευών pGSP1 και pGSP2 αντίστοιχα, στα κύτταρα KYC55 είχε σαν σκοπό την μελέτη της αποκαταστολής τους υπό SOS-επαγόμενες συνθήκες. Το *A. tumefaciens* ανήκει στα α-πρωτεοβακτήρια, συνεπώς διαθέτει την αλληλουχία GTTCN₇GTTC σαν SOS χειριστή, και διαθέτει LexA πρωτεΐνη που είναι υψηλά ομόλογη με την LexA του *Z. mobilis* σε επίπεδο 60% ταυτότητας και 85% ομοιότητας πλην περιοχής 22 επιπλέον καταλοίπων της LexA του *Z. mobilis* (Εικόνα 3.9.7). Λόγω αυτής της ομοιολογίας η LexA του *A. tumefaciens* αναμένεται να αναγνωρίζει τους SOS χειριστές των εισαγόμενων *recA* και *lexA* του CP4.

```
WP_023593454.1      MLTRKQHDLLELFIHNRLSVSGISPSFEEMKLALDLKSKSGIHRLIKALEERGFIRRLPNR
WP_003496192.1      MLTRKQQLLELFIHERMKESGVPPSFDEMKDALDLASKSGIHRLITALEERGFIRRLPNR
*****:*****:*. . ** : **:* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

WP_023593454.1      ARALEVIRLPEDKTEIQKKISRDY-----TTPKADNDVIEIPL
WP_003496192.1      ARALEVIKLEAYTPGARP-QRGFSFVIEGSLGKPKAPEPAPAPKAPANDFGGAVTVPV
*****:* ** * : .*. :                               : * :   . . . : : **

WP_023593454.1      HGRIAAGLPTEALEEQSH-LAVPPSYLGSGAHYALEVAGDSMVDAGIFDGDYIIVRQTDE
WP_003496192.1      MGRIAAGVPIISAIQNNTHDVAVPVDMLGTGEHYALEVKGDSMIEAGIFDGDTVIIRNSNT
*****:* .*. : : : : * : ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

WP_023593454.1      AHEGEIVVALIDNSDATLKYFHREGRMVRLDPANRAYAPMRYDASRIGIQGRLVGLLRRY
WP_003496192.1      ANPGDIVVALVDDEEATLKRFRKASIALEAANPAYETRIFGPDVKIQKLVGLIRRY
* : * : ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

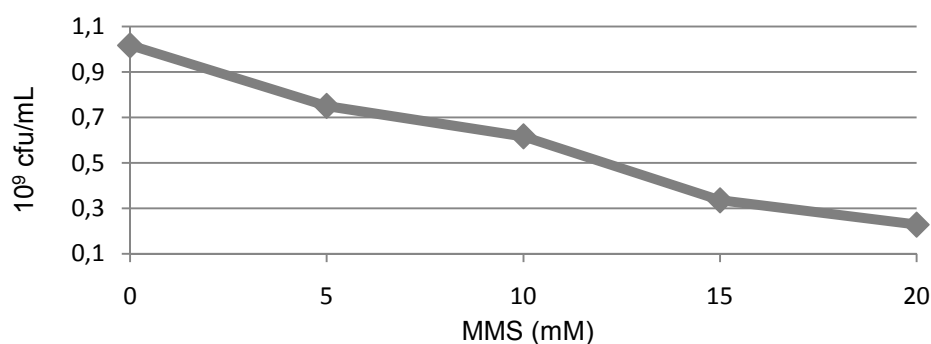
WP_023593454.1      -
WP_003496192.1      H
```

Εικόνα 3.9.7. Στοιχισή αμινοξικών ακολουθιών των LexA του *Z. mobilis* (WP_023593454, πάνω ακολουθία) και του *A. tumefaciens* (WP_003496192, κάτω ακολουθία).

Σκοπός αυτής της προσέγγισης ήταν μέσω μεταλλακτικού στρες να επαχθεί το SOS σύστημα στα κύτταρα KYC55(pGSP1) και KYC55(pGSP2) ώστε να επιτευχθεί απενεργοποίηση της ενδογενούς LexA που με τη σειρά της θα επέφερε αποκαταστολή των *recA* και *lexA* υποκινητών στις εισαγόμενες κατασκευές.

Για την επαγωγή του SOS συστήματος στα κύτταρα KYC55, επιλέχθηκε ο χημικός μεταλλαξογόνος παράγοντας MMS. Για να προσδιοριστούν οι συνθήκες που είναι κατάλληλες για την επαγωγή, έγινε καμπύλη βιωσιμότητας του στελέχους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του MMS (Εικόνα 3.9.8).

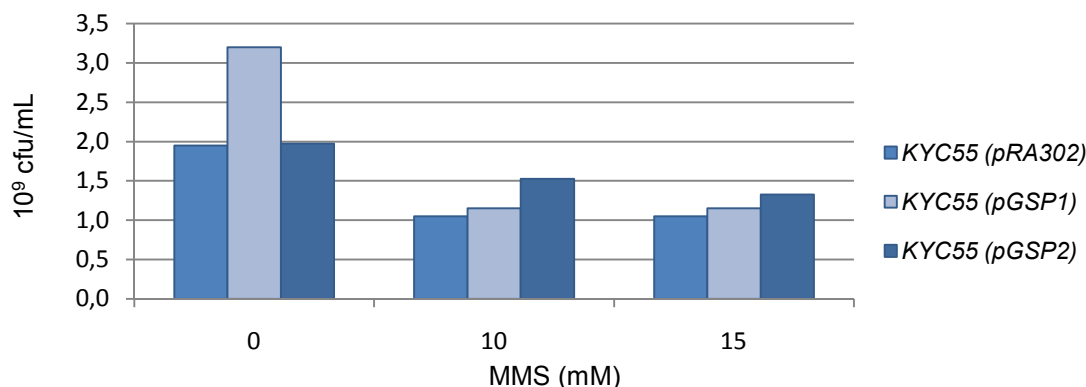
3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.9.8. Καμπύλη βιωσιμότητας του στελέχους KYC55 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μεταλλαζογόνου παράγοντα MMS.

Παρατηρήθηκε πτώση βιωσιμότητας κατά περίπου 30% στα 5 mM, 50% στα 10 mM, 70% στα 15 mM και 80% στα 20 mM. Επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 10 mM και 15 mM στις οποίες ελέγχθηκαν οι βιωσιμότητες των κυττάρων των στελεχών KYC55(pRA302), KYC55(pGSP1) και KYC55(pGSP2) (Εικόνα 3.9.9).

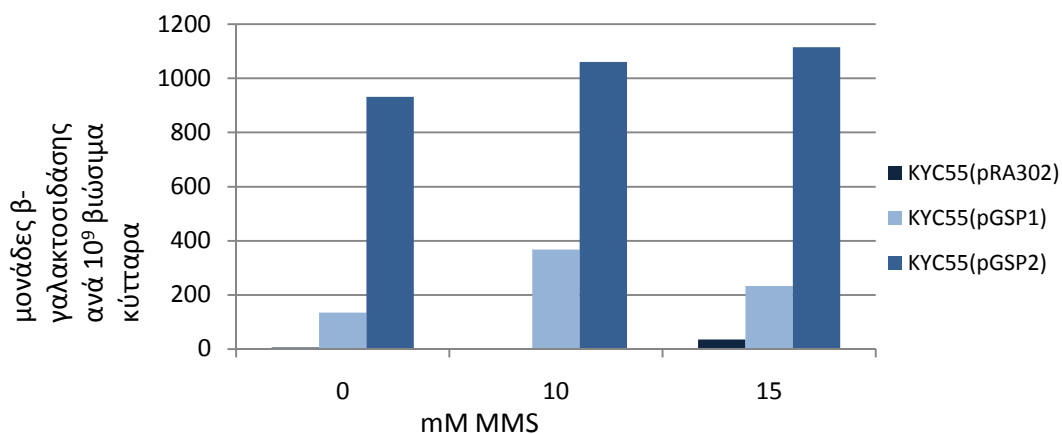
Παρατηρήθηκε πτώση βιωσιμότητας 40% με 60%, ανάλογα με το στέλεχος και τη συγκέντρωση, δηλαδή σε επίπεδα που υπήρχε επίδραση του παράγοντα αλλά δεν έπεφτε η βιωσιμότητα τόσο όσο να καθιστά προβληματικές τις μετρήσεις ενζυμικών ενεργοτήτων.



Εικόνα 3.9.9. Διαγράμματα βιωσιμότητας των στελεχών KYC55(pRA302), KYC55(pGSP1) και KYC55(pGSP2) παρουσία του μεταλλαζογόνου παράγοντα MMS.

Στη συνέχεια έγιναν δοκιμασίες Miller στα τρία KYC55 στελέχη κατόπιν επώασης σε 10 mM και 15 mM MMS. Λόγω των πτώσεων βιωσιμότητας που προκάλεσαν οι άνω συγκεντρώσεις του MMS, οι μονάδες β-γαλακτοσιδάσης ανάχθηκαν ως προς τους αριθμούς κυττάρων, ώστε να μπορέσουν να συγκριθούν με τον μάρτυρα (0 mM MMS) (Εικόνα 3.9.10).

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.9.10. Μονάδες β-γαλακτοσιδάσης των στελεχών *KYC55(pRA302)*, *KYC55(pGSP1)* και *KYC55(pGSP2)* παρουσία του μεταλλαξογόνου παράγοντα MMS.

Παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας των υποκινητών των *recA* και *lexA* και συγκεκριμένα έως 1,2 φορές στην ενεργότητα του *recA* (στα 15 mM) και έως και 2,7 φορές στην ενεργότητα του *lexA* (στα 10 mM). Αυτό δείχνει ότι υπήρξε αλληλεπίδραση του LexA καταστολέα του *A. tumefaciens* με τους υποκινητές του *Z. mobilis*, καίτοι ισχνή, καθώς και απενεργοποίηση του καταστολέα και επαγωγή των υποκινητών παρουσία του SOS-επαγωγικού παράγοντα MMS.

Να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.9.3, 3.9.5, 3.9.6, 3.9.8, 3.9.9 και 3.9.10 και του Πίνακα 3.9.1 έγιναν σε συνεργασία με τον προπτυχιακό φοιτητή Π. Πουλή και αποτελούν μέρος της διπλωματικής του εργασίας (Πουλή 2015).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. Συζήτηση

4.1 Μελέτη του CP4 *recA* στελέχους UA1

Τα πλεονεκτήματα που διακρίνουν το *Zymomonas mobilis* στην παραγωγή αιθανόλης ήδη έχουν αναφερθεί στην Εισαγωγή και είναι οι λόγοι που το βακτήριο αυτό προσελκύει το ενδιαφέρον. Έχουν κατασκευαστεί αρκετά στελέχη του *Z. mobilis* με σκοπό την μελέτη του οργανισμού αλλά και την μεταβολική διεύρυνσή του για την αξιοποίησή του. Όμως το πρώτο και μόνο *recA* στέλεχος του οργανισμού κατασκευάστηκε στο εργαστήριό μας (Σαββάκης Ι., Διπλωματική εργασία 2009) και μελετήθηκε διεξοδικά στην παρούσα εργασία.

Κατεξοχήν τρόπος κατασκευής *recA* στελεχών είναι μέσω ανταλλαγής αλληλομόρφου του φυσικού *recA* γονιδίου με *recA* γονίδιο που φέρει ένθεση γονιδίου ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, μέθοδος που έχει εφαρμοστεί στην κατασκευή *recA* στελεχών αρκετών α-πρωτεοβακτηρίων (Farrand *et al.* 1989, Martinez-Salazar *et al.* 1991, Fernandez de Henestrosa & Barbe 1994, Calero *et al.* 1994, Fernandez de Henestrosa *et al.* 1997, Liu *et al.* 1999). Μέσω του διπλού επιχιασμού που συνοδεύει την διαδικασία της γονιδιακής απαλοιφής, απενεργοποιείται το *recA* γονίδιο και με αυτόν τον τρόπο το *recA* στέλεχος καθίσταται αδύναμο να προβεί σε εξαγωγή τη εισδοχής μέσω διαδικασιών ομόλογου ανασυνδυασμού, που πλέον έχει απολέσει.. Ακολουθώντας την ίδια στρατηγική γονιδιακής απαλοιφής μέσω ανταλλαγής αλληλομόρφου για την κατασκευή του *Z. mobilis* CP4 *recA* στελέχους UA1 χρησιμοποιήθηκε κασέτα ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη (*catE*) (Σαββάκης Ι., Διπλωματική εργασία 2009, Savvakis & Pappas 2018) καθώς η χλωραμφαινικόλη είναι ένα από τα λίγα αντιβιοτικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επιλογή γενετικών χειρισμών στο *Z. mobilis* μιας και ο οργανισμός εμφανίζει ανθεκτικότητα σε μεγάλο εύρος αντιβιοτικών (Sprenger *et al.* 1993).

Από την πειραματική διαδικασία κατασκευής του *recA* στελέχους, ξεχώρισαν τρία στελέχη τα οποία είχαν δεχτεί την *recA::catE* κατασκευή μέσω μετασχηματισμού, κατέδειξαν την ευαισθησία τους στην SOS-επαγωγική UV ακτινοβολία και με μοριακούς ελέγχους αποδείχθηκαν ότι είχαν υποστεί γονιδιακή αντικατάσταση του φυσικού *recA* γονιδίου με το *recA::catE*. Σε αυτά τα στελέχη δεν φάνηκε να έχει γίνει εισδοχή του φορέα που έφερε το *recA::catE* αλλά ούτε και ένθεση του *catE* σε άλλο σημείο εκτός του *recA*. Ενώ και τα τρία στελέχη αποδείχθηκαν ισογονικά και φέροντα γονιδιακής απαλοιφής του *recA* γονιδίου τους, το στέλεχος με τον πιο σταθερά επαναλαμβανόμενο φαινότυπο επιλέχθηκε σαν *recA* και ονομάστηκε UA1. Να σημειωθεί ότι υβριδισμός κατά Southern στα 19 μετασχηματισμένα στελέχη που πάρθηκαν από την εισαγωγή του *recA::catE* εντός του CP4 έδειξε ότι σε 5 συνολικά στελέχη, συμπεριλαμβανομένων και των τριών που είχαν μελετηθεί διεξοδικότερα, είχε πραγματοποιηθεί γονιδιακή αντικατάσταση, δείχνοντας ότι η συχνότητα αυτού του φαινομένου στην προκειμένη περίπτωση ήταν 28%, δηλαδή λιγότερα από 1/3 στελέχη είχαν υποστεί αντικατάσταση αλληλομόρφου.

Μετά την επιβεβαίωση της ένθεσης, μελετήθηκε η σταθερότητα και η ανάπτυξη του UA1. Σαν στέλεχος αποδείχθηκε σταθερό όπως δείχθηκε σε πειράματα απουσία επιλογής για άνω των 50 γενεών. Το ότι είναι σταθερό το στέλεχος και δεν χρειάζεται η συνεχής επιλογή του σε χλωραμφαινικόλη συμφέρει ως προς την αξιοποίησή του: προτιμάται να αποφεύγεται η προσθήκη αντιβιοτικών σε

4. Συζήτηση

βιοαντιδραστήρες μιας και επιβαρύνουν οικονομικά τη διαδικασία ζύμωσης (Buchholz & Eveleigh 1986, He *et al.* 2014). Επιπλέον, το UA1 δείχθηκε πιο αργό σε ανάπτυξη από ότι το CP4 σε αερόβιες και αναερόβιες ασυνεχείς καλλιέργειες με πλήρες θρεπτικό υλικό και αναερόβιες με ελάχιστο θρεπτικό υλικό. Η αργή ανάπτυξη είναι ένα χαρακτηριστικό που παρατηρείται σε *recA*⁻ στελέχη (Selbitschka *et al.* 1991). Ακόμη, το UA1 εμφάνιζε χαμηλότερους αριθμούς κυττάρων από το πατρικό στέλεχος. Η διαφορά στον ρυθμό ανάπτυξης και στους αριθμούς κυττάρων σε σύγκριση με το CP4 πιθανόν οφείλεται στην δημιουργία στρεσογόνων καταστάσεων κατά την ανάπτυξη του οργανισμού, καταστάσεις στις οποίες πιθανόν συμβάλει η RecA στην αντιμετώπισή τους. Η θνησιμότητα των κυττάρων του UA1 φάνηκε στα προχωρημένα στάδια στασιμότητας του στελέχους καθώς μετά από μία μέρα στασιμότητας οι αριθμοί πέφτουν 1 δεκαδική τάξη (ενώ του CP4 παραμένουν σταθεροί) και συνεχίζουν να πέφτουν ραγδαία στη συνέχεια.

Ένας από τους φαινοτύπους των *recA*⁻ στελεχών είναι η ευαισθησία σε SOS επαγωγικούς μεταλλαξογόνους παράγοντες, όπως η UV ακτινοβολία και το MMS. *recA*⁻ στελέχη α-πρωτεοβακτηρίων έχουν αποδειχθεί ευαίσθητα στην UV ακτινοβολία (Farrand *et al.* 1989, Better & Helinski 1983, Croes *et al.* 1990, Selbitschka *et al.* 1991, Fernandez de Henestrosa & Barbe 1994, Calero *et al.* 1994, Fernandez de Henestrosa *et al.* 1997, Liu *et al.* 1999, Vial *et al.* 2004) και στο MMS (Farrand *et al.* 1989, Martinez-Salazar *et al.* 1991, Chen & Michel 1998, Vial *et al.* 2004). Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε η ευαισθησία του στελέχους, και του πατρικού CP4 συγκριτικά, και στους δύο μεταλλαξογόνους παράγοντες. Οι καμπύλες βιωσιμότητας των δύο στελεχών απέδειξαν την αυξημένη ευαισθησία του UA1 σε σύγκριση με το CP4. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η RecA στο *Z. mobilis* είναι απαραίτητη για την επιβίωση του στελέχους παρουσία μεταλλαξογόνων παραγόντων. Βιοπληροφορικές αναλύσεις (Σαββάκης 2012 και παρούσα εργασία) έδειξαν ότι η RecA του *Z. mobilis* έχει 85% ομοιότητα με την ομόλογη του *E. coli* και φέρει συντηρημένες δομικές επικράτειες απαραίτητες τόσο για την επιδιόρθωση του DNA όσο και για την ρύθμιση του SOS συστήματος. Αντίστοιχες δομικές επικράτειες και ομοίως υψηλές ομοολογίες με την RecA του *E. coli* δείχθηκε ότι φέρουν και οι RecA των α-πρωτεοβακτηρίων *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. sphaeroides*, *P. denitrificans* και *G. oxydans* (Selbitschka *et al.* 1991, Calero *et al.* 1994, Fernandez de Henestrosa *et al.* 1997, Liu *et al.* 1999). Η ευαισθησία του UA1 στελέχους και η συντήρηση της RecA ήταν από τις ενδείξεις που υποδείκνυαν και στήριζαν την ύπαρξη SOS συστήματος στον οργανισμό. Επιπλέον, η ευαισθησία του στελέχους στο MMS αξιοποιήθηκε και στην μελέτη του μεταγραφώματος του οργανισμού υπό SOS επαγωγή.

Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την διάρκεια της μελέτης της δεκτικότητας του UA1 σε ξένα πλασμίδια (βλ. παρακάτω), επισημάνθηκε άλλος ένας *recA*⁻ φαινότυπος: αυτός της ευαισθησίας σε ναλιδιζικό οξύ. Σε συζευκτικά πειράματα της παρούσας εργασίας το ναλιδιζικό οξύ χρησιμοποιήθηκε για την απαλοιφή των *E. coli* στελεχών-δοτών, που είναι ευαίσθητα στο ναλιδιζικό οξύ σε σύγκριση με το CP4. Όμως, το UA1 έδειξε θνησιμότητα των κυττάρων του στη συγκέντρωση των σε 50 µg/ml που χρησιμοποιούνταν μέχρι στιγμής. Χρειάστηκε να ελεγχθεί ένα φάσμα συγκεντρώσεων ναλιδιζικού οξέος για να διαπιστωθεί ότι σε συγκέντρωση 5 µg/ml το UA1 παραμένει ανεπηρέαστο ενώ συνεχίζουν να πεθαίνουν τα κύτταρα των *E. coli* δοτών. Το ναλιδιζικό οξύ δρα πάνω στη DNA γυράση αναστέλλοντας την αντιγραφή του DNA (Goss *et al.* 1965, Sugino *et al.* 1977, Aldred *et al.* 2014). Η δράση του ναλιδιζικού οξέος πάνω στην DNA γυράση έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία

4. Συζήτηση

δίκλωνων σπασιμάτων. Τα δίκλιωνα σπασίματα με την σειρά τους επάγουν την SOS απόκριση (Newmark *et al.* 2005, Aldred *et al.* 2014). Στα *recA* στελέχη η επαγωγή της SOS απόκρισης είναι αδύνατη λόγω απουσίας της RecA πρωτεΐνης. Επομένως, αυτά τα δίκλιωνα σπασίματα που προκαλούνται από την παρουσία του ναλιδιξικού οξέος είναι θνησιγόνα για τα κύτταρα των *recA* στελεχών, όπως αποδείχθηκε και στην περίπτωση του UA1. Πιθανόν, μικρές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού (όπως των 5 μg/ml που χρησιμοποιήθηκε) να έχουν πιο ήπια και περιορισμένη δράση ή/και να ακολουθεί επιδιόρθωση των σπασιμάτων με μηχανισμούς που δεν χρειάζονται την επαγωγή του SOS συστήματος.

Η αξιοποίηση των *recA* στελεχών για σκοπούς γενετικής μηχανικής (Bolivar *et al.* 1977, Kurnit 1989) έγκειται στο ότι δέχονται ξένα τμήματα DNA τα οποία και δεν ανακατατάσσουν. Για να μπορεί να αξιοποιηθεί το UA1, έπρεπε να ελεγχθεί η δεκτικότητα του καθώς και οι λειτουργίες του στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Ως προς το πρώτο, κατασκευάστηκε ειδικά για το UA1 ο φορέας pBBR1MCS-K. Βασίζεται στον φορέα pBBR1MCS, που είναι αρκετά σταθερός στο *Z. mobilis* και εισέρχεται στα κύτταρά του με αρκετά ικανοποιητικές αποδόσεις (δεδομένα εργαστηρίου). Επειδή το pBBR1MCS φέρει δείκτη ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη (στην οποία έχει ανθεκτικότητα το UA1 λόγω του *catE* γονιδίου), κλωνοποιήθηκε η κασέτα ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη *aphA1*, δημιουργώντας το pBBR1MCS-K. Το *Z. mobilis*, όμως, φέρει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά της κατηγορίας των αμινογλυκοσιδών. Για αυτό ελέγχθηκε η συγκέντρωση της καναμυκίνης που επιτρέπει την ικανοποιητική επιλογή μετασχηματισμένων αποικιών χωρίς την εμφάνιση υποβάθρων. Φάνηκε ότι σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 150 μg/ml υπήρχε η εμφάνιση έντονων υποβάθρων (έως και μιας δεκαδικής τάξης διαφορά από τις μετασχηματισμένες αποικίες στην περίπτωση των 100 μg/ml), ενώ σε συγκεντρώσεις 150-200 μg/ml τα υπόβαθρα μειώνονται αισθητά, έως και εξαφανίζονται στην περίπτωση των 200 μg/ml. Μέσα από την αναζήτηση κατάλληλου φορέα με τον κατάλληλο δείκτη φάνηκε ένα πρόβλημα που εμφανίζεται στην κατασκευή και αξιοποίηση στελεχών: η χρήση γονιδίου ανθεκτικότητας για την διακοπή γονιδίων. Σε έναν οργανισμό όπως το *Z. mobilis* που είναι ανθεκτικός σε πολλά αντιβιοτικά, το εύρος χρήσης νέων δεικτών ανθεκτικότητας για την κατασκευή στελεχών είναι πιο περιορισμένο. Υπάρχουν μάλιστα περιπτώσεις στελεχών από τα οποία αφαιρέθηκαν γονίδια ανθεκτικότητας μετά την κατασκευή τους και μελέτη τους, όπως στην περίπτωση του στελέχους 8b. Το 8b είναι παράγωγο του ZM4 που καταβολίζει ξυλόζη και έχει ανθεκτικότητα σε χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη (Mohagheghi *et al.* 2004). Πρόσφατα, και για δυνατότητα χρήσης εκ νέου των ίδιων δεικτών που είναι και από τους λίγους κατάλληλους για το *Z. mobilis*, αφαιρέθηκαν οι δείκτες από το 8b, δημιουργώντας το στέλεχος 9c, που αξιοποιήθηκε στην κατασκευή στελέχους που παράγει 2-βουτανοδιόλη (Yang *et al.* 2016).

Για τον έλεγχο της δεκτικότητας του UA1, και συγκριτικά με το CP4, αξιοποιήθηκε ο φορέας pBBR1MCS-K σε πειράματα μετασχηματισμού μέσω ηλεκτροδιάτρησης και σε πειράματα σύζευξης. Στα πειράματα μετασχηματισμού, ο φορέας πέρασε σε κύτταρα και των δύο στελεχών με συχνότητες 4-10 φορές χαμηλότερα στο UA1 από ότι στο CP4. Παράλληλα, δοκιμάστηκε και ο φορέας pSUP104 που είναι σταθερός στα στελέχη του *Z. mobilis* (Galeros *et al.* 2001). Το pSUP104 πέρασε μόνο σε κύτταρα CP4, και όχι στο UA1, και μάλιστα με συχνότητες 1000 φορές χειρότερες για το πρώτο από ότι το pBBR1MCS-K. Η διαφορά στις συχνότητες εισαγωγής μεταξύ των δύο φορέων στο CP4 είναι μεγάλη. Δεδομένου ότι το UA1 εμφάνισε υποδεκαπλάσιες συχνότητες από το CP4, μπορεί να θεωρηθεί ότι η

4. Συζήτηση

συχνότητα εισαγωγής του pSUP104 στο UA1 θα μπορούσε να ειδωθεί πιθανόν με χρήση μεγαλύτερου αριθμού δεκτικών κυττάρων. Παράλληλα, το pBBR1MCS-K εισήχθη και συζευκτικά στα CP4 και UA1. Φάνηκε ότι παρακινείται και στα δύο στελέχη με το UA1 να δείχνει 10 φορές χαμηλότερες συχνότητες από το CP4. Σε παράλληλες συζεύξεις χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pSUP104 και pRK2013, από τα οποία το δεύτερο μεταφέρθηκε εντός του UA1 με συχνότητες ισότιμες αν όχι μεγαλύτερες από αυτές του CP4, παρόλο που εν γένει είναι ασταθές στο *Z. mobilis* (δεδομένου του εργαστηρίου). Αντιθέτως, με το pSUP104, πάρθηκαν μόνο CP4-μετασυζευγμένες αποικίες, σε συχνότητες σχεδόν ίδιες με αυτές της εισαγωγής του pBBR1MCS-K. Δεν υπήρξαν μετασυζευγμένες αποικίες του UA1 με χρήση του pSUP104, δείχνοντας ότι ο φορέας μάλλον είναι ακατάλληλος για το στέλεχος αυτό. Επειδή το pSUP104 προέρχεται από τον IncQ φορέα RSF1010, θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί αν άλλοι φορείς προερχόμενοι από τον RSF1010 μπορούν να εισέλθουν και να σταθεροποιηθούν εντός των κυττάρων του UA1. Πάραυτα, φάνηκε ότι το UA1 μπορεί να δεχθεί ξένους φορείς και πλασμίδια με συζευκτική μεταφορά όπως και με μετασχηματισμό και σε συχνότητες ανάλογα τον φορέα που χρησιμοποιείται.

Για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του pBBR1MCS-K στα κύτταρα των CP4 και UA1, έγινε μετασχηματισμός κυττάρων DH5α χρησιμοποιώντας πλασμιδιακά DNAs μετασχηματισμένων στελεχών CP4(pBBR1MCS-K) και UA1(pBBR1MCS-K) (πειράματα αποκαλούμενα "back transformations"). Το ότι πάρθηκαν DH5α μετασχηματισμένες αποικίες με το DNA από τα μετασχηματισμένα CP4(pBBR1MCS-K) στελέχη, οι οποίες αποικίες είχαν το pBBR1MCS-K όπως δείχθηκε σε περιοριστική ανάλυση και ηλεκτροφόρηση, έδειξε ότι το pBBR1MCS-K υφίσταται σαν ελεύθερο πλασμίδιο εντός των μετασχηματισμένων CP4 στελεχών. Αντίστοιχες DH5α μετασχηματισμένες αποικίες δεν πάρθηκαν με το DNA από τα μετασχηματισμένα UA1(pBBR1MCS-K) στελέχη. Υβριδισμοί κατά Southern έδωσαν εξήγηση σε αυτό το φαινόμενο: διαπιστώθηκε ότι η κασέτα *aphA1* του pBBR1MCS-K ήταν ενσωματωμένη στο χρωμόσωμα αυτών. Υβριδισμοί κατά Southern σε DNAs από μετασυζευγμένα UA1(pBBR1MCS-K) στελέχη, από τα οποία το DNA είχε απομονωθεί μετά από μικρότερο αριθμό γενεών (10 γενιές) σε σύγκριση με των μετασχηματισμένων (30 γενιές), έδειξαν την ύπαρξη ελεύθερου pBBR1MCS-K αλλά και ενσωματωμένης ζώνης υβριδισμού. Επομένως, το pBBR1MCS-K εισέρχεται στο UA1 και κατ' αναλογία μετασχηματισμός κυττάρων DH5α με πλασμιδιακό DNA από τις πρώτες ανακαλλιέργειες των μετασχηματισμένων/μετασυζευγμένων UA1(pBBR1MCS-K) αποικιών να έδινε μετασχηματισμένες DH5α αποικίες. Να σημειωθεί ότι στους υβριδισμούς χρησιμοποιήθηκε σαν ιχνηθέτης το γονίδιο *aphA1* που έχει παρθεί από τον φορέα pUC4K, στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί από το μεταθετό στοιχείο Tn903. Μένει να δειχθεί αν η ενσωμάτωση αφορά όλον τον φορέα pBBR1MCS-K ή μόνο την περιοχή του *aphA1*, η οποία θα μπορούσε να συμβεί με μη ομόλογο ή Tn-προκαλούμενο ανασυνδυασμό. Σε κάθε περίπτωση και κατόπιν αυτών των ευρυμάτων, δύναται το pBBR1MCS-K να χρησιμοποιηθεί σαν φορέας εισαγωγής και σταθεροποίησης γονιδίων στο χρωμόσωμα του UA1, γεγονός που μένει να αποδειχθεί.

Ένας από τους φαινοτύπους που διακρίνουν τα *recA*⁻ στελέχη είναι η έλλειψη λειτουργιών ομόλογου ανασυνδυασμού, φαινότυπος που κάνει τα στελέχη αυτά αξιοποίησιμα εφόσον δεν ανακατατάσσουν ξένα τμήματα DNA που τους εισάγονται (Bolivar *et al.* 1977, Kurnit 1989). Έτσι, λοιπόν, έγινε έλεγχος των λειτουργιών του ομόλογου ανασυνδυασμού του UA1. Μία στρατηγική ελέγχου τέτοιων λειτουργιών είναι μέσω εισαγωγής και διάσωσης πλασμιδίου που βασίζεται σε ασταθή φορέα και

4. Συζήτηση

φέρει κλωνοποιημένο τμήμα από το γενετικό υλικό του βακτηρίου, μέθοδος που έχει εφαρμοστεί στη μελέτη *recA* στελεχών α-πρωτεοβακτηρίων (Croes *et al.* 1990, Selbitschka *et al.* 1991, Calero *et al.* 1994, Chen & Michel 1998, Vial *et al.* 2004). Αυτό το κλωνοποιημένο τμήμα λειτουργεί σαν παγίδα ανασυνδυασμού και διάσωσης ολόκληρου του πλασμιδίου μέσω ενσωμάτωσης στο γενετικό υλικό του βακτηρίου. Στην παρούσα εργασία αντίστοιχο πλασμίδιο ήταν το pUA8 (Παππά 1997). Το pUA8 βασίζεται στον ασταθή για τα κύτταρα του *Z. mobilis* και συζευκτικά παρακινούμενο φορέα pSUP203 και φέρει τμήμα 8 kb γονιδίου που κωδικοποιεί μεταφορέα (pCP4.2_p28) από το φυσικό πλασμίδιο του CP4 pCP4.2 (32.6 Kb), το οποίο τμήμα φέρει συνεχείς επαναλήψεις αλληλουχιών. Είχε δειχθεί παλαιότερα ότι το pUA8 εισέρχεται στο CP4 και σταθεροποιείται σχηματίζοντας σύνθετες δομές (cointegrates) με το pCP4.2 (Παππά 1997). Αυτό το πλασμίδιο κατά συνέπεια, ήταν το άριστο υπόστρωμα για ανάδειξη λειτουργιών ομόλογου ανασυνδυασμού ή έλλειψης αυτών στο UA1. Επειδή το pUA8 έχει δείκτη ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη, κλωνοποιήθηκε σε αυτό το γονίδιο *aphA1*, σχηματίζοντας το pUA8K. Εισαγωγή μέσω σύζευξης του pUA8K σε κύτταρα CP4 και UA1 έδειξε ότι μόνο μετασυζευγμένα κύτταρα του CP4 διατήρησαν την ανθεκτικότητα σε καναμυκίνη και δύναται να ανακαλλιεργηθούν σε επιλεκτικό θρεπτικό, καταδεικνύοντας την αδυναμία του UA1 να διασώσει το πλασμίδιο με τον τρόπο που διασώζεται στο μητρικό στέλεχος, δηλαδή μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Εφόσον το πλασμίδιο διασώζεται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, φαίνεται ότι το UA1 δεν διαθέτει τις αντίστοιχες λειτουργίες.

Με το UA1 να φέρει ιδιότητες που το καθιστούν αξιοποιήσιμο για εφαρμοσμένους σκοπούς, ελέγχθηκε αν και κατά πόσο έχει επηρεαστεί η παραγωγικότητά του σε αιθανόλη. Μετρήθηκαν οι ποσότητες αιθανόλης σε δείγματα από φάσεις, που κάλυψαν σχεδόν όλη την ανάπτυξη, από καλλιέργειες των στελεχών CP4 και UA1, καθώς και από επιλεκτικές φάσεις ανάπτυξης καλλιεργειών υπό ανάδευση με διπλάσια ποσότητα γλυκόζης των CP4, UA1 και 3 ακόμη στελεχών του *Z. mobilis* (ZM4 και τα εκκριτικά παράγωγά του ZM401 και ZM481). Στις πρώτες δειγματοληψίες, το UA1 παρήγαγε καθ' όλη την ανάπτυξή του περισσότερη αιθανόλη από το CP4 έως και 3.3 φορές, και μάλιστα, αν η παραγωγή αιθανόλης μετρηθεί σαν ποσότητα αιθανόλης ανά αριθμό κυττάρων, διαπιστώνεται ότι το UA1 παράγει έως 5,6 φορές περισσότερη αιθανόλη. Στις δεύτερες δειγματοληψίες που ελέγχθηκαν 5 στελέχη, το UA1 είχε παράγει την περισσότερη αιθανόλη από όλα τα στελέχη στο τέλος της ανάπτυξης. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η απενεργοποίηση του *recA* γονιδίου δεν έχει επηρεάσει αρνητικά την αιθανολοπαραγωγική ικανότητα του UA1. Γενικά, δεν έχουν παρατηρηθεί να αλλάζουν άλλες ιδιότητες των *recA* στελεχών, πέρα από αυτές με τις οποίες σχετίζεται η RecA (Better & Helinski 1983, Selbitschka *et al.* 1991, Martinez-Salazar *et al.* 1991). Όμως, στην περίπτωση του UA1 η παραγωγή αιθανόλης έχει αυξηθεί σε σύγκριση με το πατρικό στέλεχος. Δεν είναι ξεκάθαρο το πώς συνδέεται η RecA πρωτεΐνη με την παραγωγή αιθανόλης. Αναφέρθηκε προηγουμένως ότι ένας λόγος που καθυστερεί σε ανάπτυξη και έχει μικρότερους αριθμούς κυττάρων το UA1 είναι ότι το στέλεχος δεν μπορεί να ανταπεξέλθει σε στρεσογόνες συνθήκες που προκαλούνται κατά την ανάπτυξή του. Πιθανόν, λόγω αυτής της κατάστασης, ο μεταβολισμός του UA1 στρέφεται περισσότερο προς τη γλυκόλυση ώστε να επιτευχθεί ανάπτυξη και περισσότερη παραγωγή ενέργειας. Η ενίσχυση του Entner-Doudorof μονοπατιού γλυκόλυσης έχει σαν συνέπεια και την παραγωγή περισσότερης αιθανόλης. Ένας δεύτερος πιθανός λόγος είναι η ύπαρξη ενός SOS-ρυθμιζόμενου πιθανού καταστολέα της γλυκόλυσης. Στο CP4, στις προαναφερθείσες στρεσογόνες συνθήκες κατά την ανάπτυξη, πιθανή ενεργοποίηση

4. Συζήτηση

του SOS συστήματος οδηγεί και στην παραγωγή αυτού του πιθανού καταστολέα με συνέπεια την καθυστέρηση στην ανάπτυξη έως ότου αντιμετωπιστούν οι στρεσογόνες συνθήκες. Αντιθέτως, στο UA1 ο καταστολέας είναι μόνιμα κατεσταλμένος, εφόσον το UA1 δεν δύναται να αποκαταστεί το SOS σύστημα, με συνέπεια να μην περιορίζεται η γλυκόλυση στο στέλεχος. Όποια πάντως είναι η πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου, που ενδιαφέρει να μελετηθεί περισσότερο για να δειχθεί η σχέση της RecA με την παραγωγή αιθανόλης στο *Z. mobilis*, φαίνεται ότι το UA1 ενδιαφέρει ακόμη περισσότερο για σκοπούς μεταβολικής διεύρυνσης εφόσον, πέρα της δεκτικότητάς του σε ξένους φορείς και της έλλειψης ομόλογου ανασυνδυασμού, διαθέτει ήδη ένα πλεονέκτημα σε σύγκριση με το πατρικό του στέλεχος: την αυξημένη παραγωγή αιθανόλης.

Το UA1, λοιπόν, αποδείχθηκε ότι είναι ένα ενδιαφέρον *recA*⁻ στέλεχος που επιδέχεται μετασχηματισμού και σύζευξης, δεν διαθέτει λειτουργίες ομόλογου ανασυνδυασμού και, το πιο ενδιαφέρον, παράγει περισσότερη αιθανόλη από το πατρικό στέλεχος. Σαν τέτοιο στέλεχος, κατατέθηκε στην Αμερικάνικη τράπεζα στελεχών ATCC που μέχρι στιγμής έχει λάβει το προσωρινό κωδικό AcqID-01168, μέχρι οριστικής αποδοχής. Ύστερα, θα είναι διαθέσιμο σε περισσότερα εργαστήρια ώστε να μπορεί να αξιοποιηθεί σε πιθανές περαιτέρω μελέτες της επιδιόρθωσης, του ανασυνδυασμού και της SOS απόκρισης καθώς και για χειρισμούς γενετικής μηχανικής που θα αποσκοπούν στην μεταβολική διεύρυνσή του.

4.2 Προσπάθεια κατασκευής ενός CP4 *lexA*⁻ στελέχους

Το UA1 χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία για την μεταγραφωματική ανάλυση του *Z. mobilis* παρουσία MMS, σαν στέλεχος που έχει απενεργοποιημένη το γονίδιο της SOS-ρυθμιστικής πρωτεΐνης RecA. Θα ενδιέφερε να κατασκευαστεί και ένα *lexA*⁻ στέλεχος, δηλαδή ένα στέλεχος που αδυνατεί να παράγει τον LexA καταστολέα του SOS συστήματος και θα μπορούσε να καταδείξει άμεσα τα γονίδια που ρυθμίζονται από αυτόν.

Για την κατασκευή ενός CP4 *lexA*⁻ στελέχους, δοκιμάστηκε η ίδια στρατηγική με αυτή της περίπτωσης κατασκευής του UA1: κλωνοποιήθηκε το *lexA* γονίδιο από το CP4 και εντός του πλαισίου ανάγνωσής του κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά γονίδια ανθεκτικότητας σε γλωραμφαινικόλη (pGSLC3) και τετρακυκλίνη (pGSLT1). Από τρεις προσπάθειες εισαγωγής των πλασμιδίων στο CP4, απομονώθηκαν μόνο δυο αποικίες που δεν ανακαλλιεργόντουσαν περαιτέρω σε επιλεκτικό θρεπτικό, ενώ ενίσχυση του *lexA* γονιδίου τους με PCR δεν έδειχνε διαφορετική εικόνα από αυτή του φυσικού στελέχους CP4. Πιθανότητα χρήσης μεγαλύτερου αριθμού δεκτικών κυττάρων (από 10^8 που χρησιμοποιήθηκε σε 10^9) θα κατεδείκνυε αν αυτές οι δύο αποικίες ήταν αποτέλεσμα υποβάθρου ή αναλογικά θα απομονώνονταν 10πλάσιες ασταθείς αποικίες. Πάντως, η κατασκευή *lexA*⁻ στελέχους κρύβει δυσκολίες, όπως έχει δειχθεί σε περιπτώσεις άλλων βακτηρίων. Στο *E. coli* η κατασκευή τέτοιου στελέχους προϋποθέτει και την απενεργοποίηση ακόμη ενός γονιδίου, του *sulA* (Pacelli *et al.* 1979, Walker 1984). Το *sulA* είναι ένα SOS γονίδιο που σταματάει τον κυτταρικό κύκλο κατά την SOS απόκριση, μέχρι να γίνει η επιδιόρθωση του DNA και καταστολή του SOS συστήματος (συμπεριλαμβανομένου και του ίδιου του *sulA*) (Huisman *et al.* 1983, Walker 1984). Αν δεν απενεργοποιηθεί και το *sulA*, τα *lexA*⁻ κύτταρα δεν είναι βιώσιμα (Mount 1977). Εκτός του *E. coli*, έχει παρατηρηθεί ότι και σε άλλα γ-πρωτεοβακτήρια (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Erwinia* και *Salmonella*) είναι απαραίτητη η διπλή απενεργοποίηση (Calero *et al.* 1993, Riera and Barbe 1995).

Έχουν περιγραφεί περιπτώσεις *lexA*-μεταλλαγμένων στελεχών στο *B. subtilis* που δεν είναι βιώσιμα, παρόλο που δεν έχει περιγραφεί *sulA* ομόλογο γονίδιο (Haijema *et al.* 1996). Όμως, υπάρχει και η περίπτωση των α-πρωτεοβακτηρίων *R. sphaeroides* και *C. crescentus* στα οποία δεν έχει εντοπιστεί *sulA* ομόλογο γονίδιο και η κατασκευή *lexA* στελεχών σε αυτά τα είδη επετεύχθη μέσω γονιδιακής αντικατάστασης του φυσικού *lexA* γονιδίου (Tapias *et al.* 2000, da Rocha *et al.* 2008). Στην περίπτωση μας εδώ, δεν εντοπίστηκε ομόλογο γονίδιο ή πρωτεΐνης μέσω αναζητήσεων με το BLAST. Πάραυτα, δεν κατορθώθηκε να αποκτηθεί το επιθυμητό στέλεχος. Χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση να ξεκαθαριστεί αν οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία μπορούν να εισέλθουν σε κύτταρα CP4 και στην συνέχεια μπορούν να οδηγήσουν στην κατασκευή του επιθυμητού στελέχους ή είναι αδύνατη η κατασκευή του.

4.3 *In silico* πρόβλεψη μελών του SOS συστήματος στο *Z. mobilis*

Με την εύρεση όλο και περισσότερων πληροφοριών πάνω στα χαρακτηριστικά του SOS συστήματος, προτάθηκαν τα μοτίβα των SOS χειριστών διαφορετικών φύλων και κλάσεων βακτηρίων (Erill *et al.* 2007). Τα μοτίβα αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν σε υπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης για τον εντοπισμό SOS γονιδίων, με χαρακτηριστικά παραδείγματα χρήσης τους στο *E. coli* (Fernandez de Henestrosa *et al.* 2000, Courcelle *et al.* 2001) αλλά και σε α-πρωτεοβακτήρια, που ανήκει το *Z. mobilis* (Erill *et al.* 2004, da Rocha *et al.* 2008). Στην προκειμένη περίπτωση, το μοτίβο των α-πρωτεοβακτηρίων είναι GTTCN₇GTCC ή GAACN₇GAAC (Tapias and Barbe 1998 και 1999, Fernandez de Henestrosa *et al.* 1998, Tapias *et al.* 2000). Με στόχο, λοιπόν, την πρόβλεψη των μελών του SOS συστήματος στο *Z. mobilis*, στην παρούσα εργασία αξιοποιήθηκε το πρόγραμμα FITOM (Erill & O'Neill 2009), ένα πρόγραμμα που είχε ξαναχρησιμοποιηθεί από το εργαστήριο στο παρελθόν (Σαββάκης Ι., MSc Διπλωματική εργασία 2011, Savvakis & Pappas HSCBB Conference 2011).

Στην παρούσα διατριβή, διεξοδικές προβλέψεις με τη χρήση του FITOM έγιναν στο στέλεχος CP4 (Kouvelis *et al.* 2014). Έγινε αναζήτηση στις αλληλουχίες του χρωμοσώματος και των 5 πλασμιδίων του στελέχους για γονίδια που φέρουν SOS χειριστές με μηδέν ή μία νουκλεοτιδική αλλαγή ανοδικά τους (σε διαγονιδιακή περιοχή από -300 έως +10 βάσεις από τη μεταφραστική έναρξη). Η υπολογιστική αναζήτηση SOS χειριστών με έως και μία νουκλεοτιδική αλλαγή σε σύγκριση με το εκάστοτε συντηρημένο μοτίβο είναι η ευρέως χρησιμοποιούμενη αναζήτηση βιβλιογραφικά και έχει χρησιμοποιηθεί στην περίπτωση του *E. coli* (Fernandez de Henestrosa *et al.* 2000), των α-πρωτεοβακτηρίων *C. crescentus* (da Rocha *et al.* 2008) και *S. meliloti* (Erill *et al.* 2004), του *B. subtilis* (Au *et al.* 2015), του *M. tuberculosis* (Davis *et al.* 2002), του *C. difficile* (Walter *et al.* 2014) και των β-πρωτεοβακτηρίων σαν κλάση (Sanchez-Alberola *et al.* 2015). Επιπλέον, προβλέψεις, και αργότερα η πειραματική επιβεβαίωσή τους, έδειξαν ότι σχεδόν το σύνολο των χειριστών εντοπίζονται σε απόσταση έως 300 βάσεων από την μεταφραστική έναρξη (Davis *et al.* 2002, Erill *et al.* 2004, da Rocha *et al.* 2008, Li *et al.* 2010, Sanchez-Alberola *et al.* 2015, Au *et al.* 2015, Erill *et al.* 2016), με μόνο μεμονωμένα γονίδια να έχουν υποκινητές σε μεγαλύτερες αποστάσεις: στο *E. coli* βρέθηκε γονίδιο που σχετίζεται με την σύνθεση αμινοξέων με χειριστή στο -330 (*ivbL*, Fernandez de Henestrosa *et al.* 2000) και γονίδιο αιμολυσίνης που είναι αντιδιαμετρικά του συνεργιώματος *umuDC* και μοιράζεται τους χειριστές του *umuDC* στις θέσεις -331 και -351 (Courcelle *et al.*

4. Συζήτηση

2001). Για αυτούς τους λόγους τα κριτήρια για τις προβλέψεις μας έγιναν με τα προαναφερθέντα κριτήρια.

Από τα αποτελέσματα της αναζήτησης συνολικά 117 γονίδια βρέθηκαν να είναι πιθανά μέλη του SOS συστήματος. Σε αυτά τα γονίδια προβλέφθηκαν γονίδια χρωμοσωμικά αλλά και πλασμιδιακά (10 στο σύνολο), δείχνοντας ότι η ύπαρξη SOS χειριστών δεν περιορίζεται μόνο στο χρωμόσωμα αλλά εκτείνεται και στα πλασμίδια. Επιπλέον, στα προαναφερθέντα γονίδια ανήκουν και γονίδια που συνυπονοούνται σε κοινά συνεργιώματα (17 συνεργιώματα στο σύνολο), διότι προβλέφθηκαν πιθανοί χειριστές ανοδικά των πρώτων γονιδίων αυτών των συνεργιωμάτων και θεωρήθηκε ότι έτσι ρυθμίζονται και όλα τα γονίδια του εκάστοτε συνεργιώματος. Στα αποτελέσματα της αναζήτησης ανήκουν, πρώτα απ' όλα επιδιορθωτικά γονίδια, που είναι και η κατεξοχήν SOS-ρυθμιζόμενη ομάδα γονιδίων στα βακτήρια των οποίων έχει μελετηθεί η απόκριση, γονίδια μεταβολικά, πρωτεϊνσύνθεσης, βιοσύνθεσης λιπιδίων, ανθεκτικότητας σε οργανικούς παράγοντες, μεταφορέων, πρωτεϊνών παραγωγής ενέργειας κ.ά. Δηλαδή, η SOS απόκριση στο *Z. mobilis* περιλαμβάνει όχι μόνο γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, αλλά και άλλα μονοπάτια στο κύτταρο με απώτερο σκοπό την συνολική απόκριση του οργανισμού έναντι της στρεσογόνου συνθήκης που προκάλεσε την επαγωγή. Να σημειωθεί, όμως, ότι στην παρούσα εργασία έγινε καθολική αναζήτηση πιθανών χειριστών σε ολόκληρο το γονιδίωμα, και για αυτό εντοπίστηκαν πιθανά μέλη που συμμετέχουν και σε διεργασίες πέρα της επιδιόρθωσης, ενώ η κατεξοχήν χρήση εργαλείων πρόβλεψης σε βακτήρια με άγνωστα SOS συστήματα γίνεται σε επιλεγμένα γονίδια, που είναι ομόλογα γνωστών και αποδεδειγμένων SOS γονιδίων, με αποτέλεσμα να μην εντοπίζονται περαιτέρω πιθανά μέλη του συστήματος άρα και αντίστοιχα μεταβολικά μονοπάτια που πιθανόν ρυθμίζονται. Χαρακτηριστικά τέτοια παραδείγματα είναι αναζητήσεις σε άλλα α-πρωτεοβακτήρια (Erill *et al.* 2004, da Rocha *et al.* 2008), στα κυανοβακτήρια (Li *et al.* 2010), στα β-πρωτεοβακτήρια (Sanchez-Alberola *et al.* 2015) και στα Verrucomicrobia (Erill *et al.* 2016).

Τέλεια συντηρημένοι χειριστές εντοπίστηκαν ανοδικά 10 χρωμοσωμικών γονιδίων στο CP4. Οι ίδιοι χειριστές εντοπίστηκαν σε ίδιες αποστάσεις ανοδικά των 10 αντίστοιχων ομόλογων χρωμοσωμικών γονιδίων στα στελέχη *Z. mobilis* subsp. *mobilis* ZM4, NCIMB 11163 και ATCC 10988, και σε 9 στο στέλεχος ATCC 29191 (το υποθετικό γονίδιο ZCP4_RS00900 δεν διαθέτει ομόλογό του σε αυτό το στέλεχος). Έτσι, σκιαγραφείται ένας πυρήνας SOS γονιδίων κοινός ανάμεσα στα στελέχη με τα γονίδια *recA*, *lexA*, γονίδιο ριβοσωμικής πρωτεΐνης, γονίδιο ανθεκτικότητας στο τολουόλιο, γονίδιο 6-φωσφογλουκονολακτονάσης, γονίδιο σύνθεσης οπανοϊδών και 4 υποθετικών. Πυρήνας που μάλιστα δεν συμπεριλαμβάνει μόνο επιδιορθωτικά γονίδια αλλά και γονίδια ανθεκτικότητας, βιοσυνθετικό, μεταβολισμού και πρωτεϊνσύνθεσης. Το στέλεχος που ξεχώρισε ήταν το ATCC 29192 που ανήκει στο *Z. mobilis* subsp. *potomacae*. Σε αυτό εντοπίστηκαν 7 από τα 10 ομόλογα χρωμοσωμικά γονίδια που έφεραν τέλειους χειριστές, οι οποίοι όμως δεν είχαν την ίδια αλληλουχία ή/και θέση με τους αντίστοιχούς τους στα άλλα στελέχη. Επιπλέον, στο ATCC 29192 βρέθηκαν επιπλέον 8 γονίδια με τέλειους χειριστές, στα οποία δεν εντοπίστηκαν ομόλογα στο CP4. Επομένως, φαίνεται η διαφορετικότητα του SOS συστήματος μεταξύ στελεχών του ίδιου οργανισμού. Θα ήταν ενδιαφέρον να δειχθεί αν όντως τα στελεχοειδικά γονίδια του ATCC 29192 που προβλέφθηκαν εδώ όντως ρυθμίζονται από την LexA και είναι όντως SOS γονίδια. Αν αποδειχθεί κάτι τέτοιο, τότε θα υπάρχουν SOS γονίδια μοναδικά στο κάθε στέλεχος, προσδίδοντας έτσι χαρακτηριστικά της SOS απόκρισης διαφορετικά από στέλεχος σε στέλεχος.

4. Συζήτηση

Κοιτώντας τις διαφορές μεταξύ των στελεχών στα χρωμοσωμικά SOS-ρυθμιζόμενα γονίδια, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων του CP4 για χειριστές με μία αλλαγή, με τα αποτελέσματα στο ZM4 (αποτελέσματα Σαββάκης Ι., MSc Διπλωματική εργασία 2011). Εντοπίστηκαν χειριστές σε 12 παραπάνω γονίδια στο ZM4 από ότι στο CP4. Τα 2 από αυτά τα γονίδια είναι μοναδικά στο ZM4. Μάλιστα το ένα από αυτά είναι γονίδιο με χαρακτηρισμό DNA-repair ATPase (το άλλο είναι αφυδρογονάση) υποδηλώνοντας ότι δύναται να υπάρχει πιθανό στελεχοειδικό επιδιορθωτικό γονίδιο στο ZM4 που πιθανόν είναι και SOS-ρυθμιζόμενο, τονίζοντας και εδώ τον στελεχοειδικό χαρακτήρα της SOS απόκρισης που αναφέρθηκε προηγουμένως, και δει στην επιδιόρθωση του DNA. Από τα υπόλοιπα, τα 9 γονίδια του ZM4 διαθέτουν ομόλογα γονίδια στο CP4, τα οποία στις αντίστοιχες θέσεις, με αυτές που εντοπίζονται οι χειριστές του ZM4, διαθέτουν πιθανούς χειριστές με 2, 3 ή 4 νουκλεοτιδικές αλλαγές. Φαίνεται, λοιπόν, ότι με το κριτήριο "έως μία νουκλεοτιδική αλλαγή" τα γονίδια αυτά εντοπίζονται στο ZM4 αλλά όχι στο CP4. Έτσι, έχουμε πρώτον, μία περίπτωση πιθανά SOS-ρυθμιζόμενων στελεχοειδικών γονιδίων (αυτών που είναι μοναδικά στο ZM4) και δεύτερον, ομόλογα γονίδια με ελαφρώς διαφορετικούς χειριστές. Θα ενδιέφερε να φανεί αν τα γονίδια που έχουν ελαφρά διαφορετικούς χειριστές στο ZM4 και στο CP4 ρυθμίζονται στο ένα από τα δύο στελέχη, και στα δύο ή σε κανένα από αυτά, για να φανεί αν αυτές οι νουκλεοτιδικές αλλαγές που φέρουν επηρεάζουν και την ρύθμισή τους.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν τα πλασμιδιακά γονίδια που εντοπίστηκαν με πιθανούς SOS χειριστές. Πρώτα στο CP4, εντοπίστηκαν 10 πλασμιδιακά γονίδια. Από αυτά, μόνο 3 (ένα υποθετικό, ένα γονίδιο τρανσποζάσης και ένα γονίδιο υδρολάσης) έχουν ομόλογά τους σε άλλα στελέχη (ATCC 10988, NCIMB 11163, ATCC 29191), τα οποία όμως δεν βρέθηκαν να φέρουν πιθανούς χειριστές. Επομένως, έχουμε τόσο στελεχοειδικά πλασμιδιακά γονίδια που πιθανόν ρυθμίζονται όσο και πλασμιδιακά γονίδια που, παρόλο που έχουν ομόλογα σε άλλα στελέχη του οργανισμού, πιθανόν ρυθμίζονται μόνο στο CP4. Από ανάλυση σε ανάλυση γίνεται και πιο έντονο ότι υπάρχει περίπτωση η SOS απόκριση να περικλείει διαφορετικά γονίδια, άρα και χαρακτηριστικά, από το ένα στέλεχος στο άλλο.

Πιθανά SOS γονίδια εντοπίστηκαν και στα πλασμίδια των στελεχών NCIMB 11163, ATCC 10988, ATCC 29191 και ATCC 29192. 18 γονίδια συνολικά προβλέφθηκαν στα 4 στελέχη. Όλα αυτά τα γονίδια εντοπίζονται σε πλασμίδια μεγέθους 13 kb και άνω. Φαίνεται να προτιμούνται τα μεγαλύτερα πλασμίδια να στεγάζουν γονίδια που μπορεί να είναι μέλη του SOS συστήματος. Επίσης, αν αυτά τα γονίδια όντως ρυθμίζονται, η SOS απόκριση θα συμπεριλαμβάνει και λειτουργίες που θα ρυθμίζονται από κατεξοχήν πλασμιδιακά γονίδια. Από αυτά τα προβλεπόμενα γονίδια, μόνο 6 γονίδια έχουν ομόλογά τους σε άλλα στελέχη, και από τα 6 μόνο 2 (γονίδιο πρωτεΐνης TraJ και υποθετικό γονίδιο του NCIMB 11163) φαίνεται να έχουν ομόλογα με πιθανούς χειριστές σε άλλο στέλεχος (στο ATCC 10988). Έτσι, όχι μόνο εντοπίστηκαν πλασμιδιακά γονίδια που πιθανόν ρυθμίζονται σε περισσότερα τους ενός στελέχη, αλλά βρέθηκαν και γονίδια που παρόλο δεν είναι στελεχοειδικά, πιθανόν η ρύθμισή τους περιορίζεται σε μόνο ένα στέλεχος.

Συμπερασματικά, διακρίνεται καταρχάς η ύπαρξη ενός κοινού πυρήνα SOS γονιδίων σε όλα τα στελέχη, με πιο χαρακτηριστικά τα πρωταγωνιστικά *recA* και *lexA*. Έτσι, η ρύθμιση θα περιλαμβάνει χαρακτηριστικά απαραίτητα και κοινά μεταξύ των στελεχών του οργανισμού. Πέρα, όμως, από τα κοινά γονίδια, φαίνεται να υπάρχουν στελεχοειδικά γονίδια και κατά συνέπεια μεταβολικά μονοπάτια που θα ρυθμίζονται από την SOS απόκριση σε ένα ή σε λίγα στελέχη του *Z. mobilis* και όχι

4. Συζήτηση

σε όλα, δίνοντας σε αυτά τα στελέχη μοναδικές ιδιότητες στο SOS σύστημά τους. Να σημειωθεί ότι κανένα πλασμιδιακό γονίδιο που εντοπίστηκε από την παραπάνω ανάλυση δεν έχει χρωμοσωμικό ομόλογο γονίδιο, δείχνοντας την πιθανότητα ότι τα μέλη του SOS συστήματος εξαπλώνονται και πέρα από το χρωμόσωμα και ενισχύοντας την υπόθεση μοναδικών και ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του συστήματος ανά στέλεχος.

4.4 Ποιοτικός έλεγχος των αποτελεσμάτων αλληλούχησης και ποσοτικοποίηση των αλληλουχημένων μεταγράφων

Μετά την αλληλούχηση των δειγμάτων RNA, ακολούθησε ο ποιοτικός έλεγχος της αλληλούχησης και των αποτελεσμάτων της. Έλεγχος των αλληλουχημένων ακολουθιών με συστήματα της Illumina έδειξε ότι το λάθος αλληλούχησης είναι μικρότερο από 1 στις 1000 βάσεις, ένα πολύ καλό ποσοστό για αλληλούχηση και αξιοποίηση των αποτελεσμάτων της.

Μετά τον ποιοτικό έλεγχο, υπολογίστηκε ο βαθμός συσχέτισης του κάθε δείγματος τόσο με το βιολογικά επαναληπτικό του όσο και με τα υπόλοιπα δείγματα του ίδιου στελέχους. Στην παρούσα εργασία παρουσιάστηκαν οι συγκρίσεις μεταξύ των δειγμάτων του CP4 και μεταξύ των δειγμάτων του UA1. Μεταξύ του κάθε δείγματος του CP4 και του βιολογικά επαναληπτικού του παρουσιάστηκαν ομοιότητες του 98% και άνω, ενώ οι αντίστοιχες ομοιότητες στα δείγματα του UA1 ήταν 100%, γεγονός που θα σχολιασθεί μαζί με τα αποτελέσματα της μη επαγωγιμότητας του UA1 υπό SOS-επαγόμενες συνθήκες και την απόδειξη του μόνιμα κατασταλαμένου SOS φαινοτύπου του. Βλέπουμε, λοιπόν, τις μεγάλες ομοιότητες, έως και απόλυτες για την περίπτωση του UA1, μεταξύ των βιολογικών επαναληπτικών δειγμάτων, κάτι που θα μας προσφέρει μεγαλύτερη αξιοπιστία στα αποτελέσματα των συγκρίσεων μεταξύ των συνθηκών. Συγκεκριμένα στα δείγματα του CP4 φάνηκε μια ομάδα ομοιότητας 98% και άνω μεταξύ των δειγμάτων 0-1 mM, μια δεύτερη ομάδα ομοιότητα 94% και άνω στα δείγματα των 10 και 15 mM και μια τρίτη ομάδα μόνο το 5 mM, που πλησιάζει περισσότερο τα δείγματα 0-1 mM (ομοιότητα 90-97%) από τα 10 και 15 mM (ομοιότητα 73-85%), αλλά δεν ταυτίζεται με κανένα εκτός του βιολογικά επαναληπτικού του. Αυτές οι ομοιότητες των δειγμάτων θα σχολιασθούν στην συνέχεια μαζί με το πρότυπο της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων του CP4 στις διαφορετικές συγκεντρώσεις, που θα βοηθήσει στην εξήγηση αυτών των επιπέδων ομοιότητας.

Ακολούθησε στοίχιση των αλληλουχιών που εντοπίστηκαν στις βιβλιοθήκες, και άρα μεταγράφονται, με τα γονίδια που είχαν προβλεφθεί και κατατεθεί στο γονιδίωμα του CP4. Παρόλο που υπάρχει η δυνατότητα από αλληλούχηση RNA να κατασκευαστεί η αλληλουχία του γονιδιώματος του οργανισμού, ιδιαίτερα όταν αυτή δεν είναι γνωστή, με βάση τα πλαίσια ανάγνωσης που μεταγράφονται, στην παρούσα εργασία δεν χρειάστηκε εφόσον ήταν ήδη αλληλουχημένο στο στέλεχος. Από το σύνολο των πρωτεϊνικών προβλεπόμενων πλαισίων ανάγνωσης στην GenBank, το 97% για τα χρωμοσωμικά και 89% για τα πλασμιδιακά πρωτεϊνικά γονίδια βρέθηκαν να μεταγράφονται. Να σημειωθεί ότι σε αυτούς του υπολογισμούς, δεν συνυπολογίζονται τα γονίδια των rRNAs και tRNAs. Τα rRNAs αφαιρέθηκαν κατά την ετοιμασία των δειγμάτων για την κατασκευή των βιβλιοθηκών με kit της Illumina στο JGI. Τα tRNAs δεν μπορούν να αλληλουχηθούν με τον τρόπο που γίνεται η συγκεκριμένη αλληλούχηση και χρειάζεται ειδικές διαδικασίες για την αλληλούχηση τους (Zheng *et al.* 2015).

4. Συζήτηση

Αναζητώντας τα πλαίσια ανάγνωσης που δεν βρέθηκαν να μεταγράφονται, βρέθηκε ότι τα περισσότερα από αυτά είναι υποθετικών γονιδίων και ψευδογονιδίων. Όμως, σε 8 χρωμοσωμικά και 3 πλασμιδιακά γονίδια που δεν βρέθηκαν μετάγραφα τους στις βιβλιοθήκες, είχαν προβλεφθεί και προσδιοριστεί οι πρωτεΐνες τους. Μάλιστα, 5 χρωμοσωμικά είναι γονίδια αζωτοδέσμευσης και 1 μαστιγίου, ενώ και τα 3 πλασμιδιακά γονίδια είναι γονίδια φάγου. Πιθανόν, τα γονίδια φάγου κατά την ενσωμάτωσή τους να απενεργοποιήθηκαν και να μην μπορούν πλέον να μεταγραφούν. Για τα χρωμοσωμικά γονίδια αξίζει να διερευνηθεί αν όντως δεν μεταγράφονται και σε άλλες συνθήκες, και πώς αυτό μπορεί να επηρεάσει τον οργανισμό, με πιο αξιοπερίεργη την περίπτωση πέντε γονιδίων που εντοπίζονται σε κοινή περιοχή του χρωμοσώματος: τριών *nif* γονιδίων (*nifH*, *nifQ*, *nifW*), του γονιδίου της φεριτίνης και του γονιδίου που φέρει σίδηρο. Ανάμεσα σε αυτά ανήκει το *nifH*, που παίζει δομικό ρόλο στην συγκρότηση της νιτρογενάσης του μολυβδενίου, και το *nifQ*, που συμμετέχει στον μεταβολισμό του μολυβδενίου (Rubio and Ludden 2008, Poza-Carrion *et al.* 2014). Αξίζει να μελετηθεί αν αυτή η περιοχή εκφράζεται υπό άλλες συνθήκες (π.χ. παρουσία αζώτου) και ποιο είναι το προφίλ της.

Μετά έγινε σύγκριση του αριθμού των μεταγράφων για το κάθε γονίδιο στην κάθε συνθήκη με τον αντίστοιχο αριθμό στο αντίστοιχο βιολογικό επαναληπτικό δείγμα. Αφαιρούνταν ο αριθμός που διέφερε κατά 1,5 φορά από τον αντίστοιχο του στο επαναληπτικό. Ο λόγος που γινόταν η αφαίρεση ήταν επειδή μια τέτοια διαφορά μεταξύ των δύο αριθμών μεταγράφων για το ίδιο το γονίδιο και την ίδια συνθήκη δύναται να δώσει ψευδώς διαφορική έκφραση του γονιδίου μετά τον υπολογισμό μέσων όρων. Με αυτό το τρόπο αφαιρέθηκε το 0,9% του συνόλου του αριθμού των μεταγράφων ανά γονίδιο, ένας μικρός αριθμός που δεν θα επηρεάσει τις αναλύσεις μας και τα αποτελέσματά μας. Αντιθέτως, θα ενισχυθούν τα αποτελέσματα των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων.

Όσον αφορά την διαφορική έκφραση, αυτή τέθηκε ως υπερέκφραση όταν σε ένα γονίδιο ο λόγος μεταγράφων συνθήκης/μεταγράφων μάρτυρα είναι 1,45 και άνω, και ως υποέκφραση όταν ο αντίστροφος λόγος (-μεταγράφων μάρτυρα/μεταγράφων συνθήκης) είναι -1,45 και κάτω. Η αιτία που χρησιμοποιήθηκαν αυτοί οι λόγοι ήταν κατά βάση 4 επιδιορθωτικά γονίδια (*lexA*, *uvrA*, *ruvC*, *ruvA*), που συναντώνται ως SOS-επαγόμενα σε άλλα βακτήρια (Erill *et al.* 2007), και βρέθηκαν να ξεκινούν να υπερεκφράζονται στο CP4 με λόγους 1,46-1,49. Επομένως, για να συμπεριληφθούν αυτά τα γονίδια ως υπερεκφραζόμενα στις συνθήκες που ξεκινούν να έχουν αυτούς τους λόγους έκφρασης, το κριτήριο υπερέκφρασης τέθηκε στο 1,46 (και αντιστοίχως υποέκφρασης στο -1,46). Να σημειωθεί βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί αναλύσεις που βασίστηκαν με αντίστοιχους ή παρόμοιους (1,5) λόγους έκφρασης (Smoot *et al.* 2001, Desikan *et al.* 2001, Stintzi 2003).

4.5 Σύγκριση μεταγραφωμάτων του CP4 και του UA1 παρουσία του μεταλλαξογόνου παράγοντα MMS

Για την σύγκριση του προφίλ της απόκρισης του UA1 έναντι του CP4, υπολογίστηκαν οι λόγοι έκφρασης για όλα τα γονίδια και σε όλα τα δείγματα των CP4 και UA1 με βάση τα όρια διαφορικής έκφρασης που τέθηκαν όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως. Ύστερα έγινε η σύγκριση των προτύπων έκφρασης του UA1 με του CP4 στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του MMS. Ήδη από τα heatmaps των δύο στελεχών φάνηκε η διαφορική έκφραση πολλών γονιδίων στο CP4 σε σύγκριση με

4. Συζήτηση

την έλλειψη διαφορεικά εκφραζόμενων στο UA1. Συγκεκριμένα, 67 γονίδια στο CP4 και μόλις 9 στο UA1 έχουν διαφορεική έκφραση στις κοινές συγκεντρώσεις του MMS. Ο χαμηλός αριθμός διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων στο UA1, με λόγους έκφρασης που κυμαίνονται από 1,46 έως 1,58 στα υπερεκφραζόμενα και από -1,46 έως -1,61 στα υποεκφραζόμενα, προϋποθέτει για τον μη-επαγωγικό φαινότυπο του στελέχους και εξηγεί και το γεγονός ότι τα όλα τα δείγματα του UA1 έχουν ομοιότητα 99-100%, ανεξαρτήτου συνθήκης. Δηλαδή, οι τρεις συνθήκες ομοιάζουν πολύ τόσο μεταξύ τους όσο και με την συνθήκη-μάρτυρα. Μεταξύ των δύο στελεχών μόνο δύο γονίδια δείχνουν να μοιράζονται κοινή τάση διαφορεικής έκφρασης, συγκεκριμένα υπερεκφράζονται και στα δύο στελέχη: ένα γονίδιο μιας πρωτεΐνης που φέρνει TPR επαναλήψεις (επαναλήψεις δομικού μοτίβου που παρουσιάζεται σε πολλές και διαφορετικές κατηγορίες πρωτεϊνών) και ένα υποθετικό γονίδιο.

Για να αποσαφηνιστεί ο μόνιμα SOS-κατασταλμένος φαινότυπος του UA1, αναζητήθηκε η ταυτότητα των επιδιορθωτικών γονιδίων που επάγονται στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του MMS (0.05, 0.1 και 0.2 mM) στο CP4, και ποια είναι η τύχη τους στο UA1. Τα *lexA*, *runA* και *runC* βρέθηκαν να υπερεκφράζονται (το *lexA* και στις 3 συγκεντρώσεις, τα *runC* και *runA* μόνο στις 0,05 και 0,1 mM) στο CP4, γονίδια που ομολογία τους είναι SOS γονίδια σε άλλα βακτήρια (βλ. Εισαγωγή Παραγράφους 1.1.5 και 1.1.6). Όμως, στο UA1 ο λόγος τους δεν ξεπερνά το 1,2 δείχνοντας την σταθερή έκφρασή τους παρουσία του MMS, και μάλιστα σε συγκεντρώσεις που ρίχνει την βιωσιμότητα του στελέχους έως και 10 φορές (οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις δεν επηρεάζουν την βιωσιμότητα του CP4). Παρατηρώντας, λοιπόν, την έλλειψη επαγωγιμότητας επιδιορθωτικών γονιδίων στο UA1 παρουσία του MMS, αποδεικνύεται ο μόνιμα κατασταλμένος φαινότυπος του UA1 και η ανικανότητά του να ανταποκριθεί στην παρουσία ενός μεταλλαξογόνου και SOS-επαγωγικού παράγοντα. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται από το ότι είχε αποδειχθεί η ευαισθησία του στελέχους στο MMS και στην υπεριώδους ακτινοβολίας. Επιπλέον, τα δείγματα του UA1 έδειχναν όλα να μοιάζουν μεταξύ τους, συμπεριλαμβανομένου της συνθήκης-μάρτυρα, σε βαθμό 99% και άνω παρόλο που η μεγαλύτερη δοκιμασμένη συγκέντρωση στο UA1 (0.2 mM) έριχνε την βιωσιμότητα του στελέχους μία δεκαδική τάξη (ενώ σχολιάστηκε στη Παράγραφο 4.4 ότι παρατηρήθηκαν ομάδες ομοιότητας στα δείγματα του CP4 ανάλογα τις συγκεντρώσεις). Τα δεδομένα της μεταγραφωματικής ανάλυσης, λοιπόν, καταδεικνύουν τον μόνιμα SOS-κατασταλμένο φαινότυπο του UA1, παρουσιάζοντας έλλειψη γονιδίων, ιδιαίτερα επιδιορθωτικών γονιδίων, που επάγονται παρουσία του MMS.

4.6 Μελέτη του προφίλ της διαφορεικής έκφρασης των γονιδίων του CP4 που ανταποκρίνονται υπό SOS επαγωγή

Μετά την ανάλυση του UA1, ακολούθησε η ανάλυση του προφίλ του CP4 σε όλες τις δοκιμασμένες συγκεντρώσεις του MMS. Το heatmap του CP4 έδειξε μια ενδιαφέρουσα εικόνα: ενώ μέχρι και το 1 mM έχουμε έναν μικρό αριθμό γονιδίων που έχουν διαφορεική έκφραση (από 60 στα 0,05 mM έως 39 στο 1 mM), ο αριθμός τους φτάνει στα 472 στα 5 mM και αυξάνει ακόμη παραπάνω στα 10 (1091) και 15 mM (1215). Έτσι, εξηγείται η εικόνα ομάδων ομοιότητας ανάμεσα στα δείγματα του CP4: τα δείγματα 0-1 mM, λόγω του μικρού αριθμού διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων μοιάζουν μεταξύ τους, το δείγμα των 5 mM ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα, και των 10 και 15 mM μοιάζουν αρκετά μεταξύ τους λόγω του αριθμούς των διαφορεικά

4. Συζήτηση

εκφραζόμενων γονιδίων που διαθέτουν και ξεπερνά τα 1000. Επίσης, είναι αξιοσημείωτο ότι το CP4 ξεκινά να έχει το 3,3% των μεταγραφόμενων γονιδίων ως διαφορετικά εκφραζόμενα στην χαμηλότερη συγκέντρωση, δείχνοντας ότι και η χαμηλότερη δοκιμασμένη συγκέντρωση MMS προκαλεί επαγωγές (σε σύγκριση με το μόνιμα κατασταλαμένο UA1 που όπως σχολιάστηκε προηγουμένως δεν υφίσταται επαγωγή των γονιδίων του). Η μέγιστη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (15 mM) έφτασε να προκαλεί την διαφορετική έκφραση του 67,5% των μεταγραφόμενων γονιδίων. Αυτό δείχνει το εύρος του SOS stimulation στον οργανισμό μας: ξεπερνώντας τα 1200 διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια σε μία συνθήκη που ρίχνει τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων κατά 10 φορές, σκιαγραφείται το γεγονός ότι όχι μόνο επιδιορθωτικά συστήματα αλλά και άλλες διεργασίες του κυττάρου θα ανταποκριθούν παρουσία του μεταλλαξογόνου παράγοντα. Η καθολική αυτή απόκριση έχει σκοπό την προσαρμογή και επιβίωση του κυττάρου στο στρες που έχει υποστεί.

Μέσα από το εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν και το διαφορετικό βαθμό απόκρισης που προκάλεσαν, διαφαίνεται η σημαντικότητα της χρήσης πολλών και διαφορετικών συγκεντρώσεων του MMS. Αν είχε χρησιμοποιηθεί η συγκέντρωση του 1 mM, που είθισται να είναι η ενδεδειγμένη στην βιβλιογραφία (Boitueux *et al.* 1984, Tolmasky *et al.* 1992, Grzesiuk & Janion 1996, Falnes *et al.* 2002, Shen *et al.* 2007), θα είχαν χαθεί εκατοντάδες γονίδια που αλλάζουν την έκφρασή τους μόνο σε μεγαλύτερες του 1 mM συγκεντρώσεις, καθώς και γονίδια που αλλάζουν το πρότυπο έκφρασής τους από τις μικρότερες στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (από υποέκφραση σε υπερέκφραση και το αντίστροφο).

Μεγάλος αριθμός γονιδίων που ανταποκρίνονται υπό SOS επαγωγή έχει παρατηρηθεί σε μεταγραφωματικές αναλύσεις και άλλων βακτηρίων. Στο *E. coli*, πάνω από 1000 γονίδια έχουν βρεθεί να επάγονται παρουσία μιτομυκίνης C (Khil & Camerini-Otero 2002) ενώ 277 γονίδια έχουν βρεθεί να επάγονται μετά από UV ακτινοβολία (Quillardet *et al.* 2003). Εκτός του καλά μελετημένου *E. coli*, στο *P. aeruginosa* εντοπίστηκαν 604 γονίδια να έχουν διαφορετική έκφραση παρουσία ciproflaxin (Cirz *et al.* 2006) και στο *B. thailandensis* εντοπίστηκαν 344 γονίδια να έχουν διαφορετική έκφραση παρουσία ciproflaxin (Ulrich *et al.* 2013). Όμως, σε όλες αυτές τις περιπτώσεις δεν ελέγχθηκε εύρος συγκεντρώσεων (ή διάρκειας ακτινοβολίας στην περίπτωση της UV) για να φανούν οι αλλαγές στο προφίλ της διαφορετικής έκφρασης. Στην παρούσα εργασία, με την χρήση ενός εύρους συγκεντρώσεων, σκιαγραφείται ο τρόπος που αλλάζει η έκφραση των γονιδίων από τις χαμηλές στις υψηλές συγκεντρώσεις, δηλαδή με την αύξηση του στρες και του αριθμού των κυττάρων που πεθαίνουν. Επιπλέον, μία διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ της απόκρισης του CP4 και των αναλύσεων των υπολοίπων βακτηρίων που αναφέρθηκαν είναι στην κατανομή των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων μεταξύ των υπερ- και υποεκφραζόμενων. Από τα 5 mM MMS και άνω, ο αριθμός των υπερεκφραζόμενων γονιδίων του CP4 (243 στα 5 mM, 549 στα 10 mM και 611 στα 15 mM) είναι σχεδόν ίσος με αυτός των υποεκφραζόμενων (229 στα 5 mM, 542 στα 10 mM και 604 στα 15 mM). Στην περίπτωση του *E. coli*, υπό UV ακτινοβολία ο αριθμός των υπερεκφραζόμενων (268) επικρατεί κατά κράτος τον αριθμό των υποεκφραζόμενων (9), ενώ σε όλες τις υπόλοιπες εργασίες που αναφέρθηκαν στην παρούσα παράγραφο ο αριθμός των υποεκφραζόμενων είναι 2-3 φορές μεγαλύτερος από των υπερεκφραζόμενων. Φαίνεται, λοιπόν, ότι σε διαφορετικούς οργανισμούς και σε διαφορετικούς στρεσογόνους παράγοντες το μέγεθος της απόκρισης, και άρα και ο αριθμός των γονιδίων που ανταποκρίνονται, διαφέρει πολύ. Όμως, σε

4. Συζήτηση

αποκρίσεις τέτοιου μεγέθους πολλά και διαφορετικά μονοπάτια του κυττάρου αναμένονται να επηρεάζονται. Παρακάτω που θα συζητηθεί και η ταυτότητα των μεταβολικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα γονίδια που έχουν διαφορετική έκφραση, θα αναλυθεί αν ίδια μονοπάτια επάγονται ή καταστέλλονται στην SOS απόκριση και άλλων βακτηρίων.

Μέσα από την αλλαγή του προφίλ της διαφορετικής έκφρασης ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις, πρέπει να σημειωθεί το εξής που παρατηρήθηκε: ενώ στα 0,05 και 0,1 mM είχαμε σχεδόν τον ίδιο αριθμό διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων, στο 0,2 mM και στο 1 mM ο αριθμός μειώνεται σχεδόν στο μισό. 38 γονίδια φαίνεται να σταματούν να υπερ/υποεκφράζονται από τα 0,05-0,1 mM στα 0,2-1 mM. Το πρότυπο διαφορετικής έκφρασης σταθεροποιείται από το 1 mM και πέρα, όπου όποιο γονίδιο εκφράζεται διαφορετικά, κρατά το ίδιο πρότυπο και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Ανάμεσα στα γονίδια που σταματούν να υπερεκφράζονται ξεχωρίζουν τα *rivA*, *rivC*, ένας μεταγραφικός παράγοντας του μεταβολισμού της ριβόζης (RpiR), γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (MarC-related protein) καθώς και πρωτεΐνη μεταγωγής σήματος. Ανάμεσα σε αυτά που σταματούν να υποεκφράζονται χαρακτηριστικά είναι γονίδιο του κυτοχρώματος *c*, δύο γονίδια που συμμετέχουν σε αποκρίσεις έναντι στρες (*osmC*, *csbD*), δύο γονίδια μαστιγίων (flagellin/flagellar hook associated protein, flagellar hook capping protein), ανθεκτικότητας στον υδράργυρο (*merC*) και δέσμευσης αζώτου (*nifX*). Δεν φαίνεται να επικρατεί κάποια συγκεκριμένη κατηγορία πρωτεϊνών που αλλάζει πρότυπο έκφρασης. Επίσης, δεν φαίνεται να σκιαγραφείται κάποια τάση, με βάση τα γονίδια που αλλάζουν διαφορετική έκφραση, που να εξηγεί τον λόγο που υπάρχει αυτή η αλλαγή έκφρασης σε αυτές τις μικρές συγκεντρώσεις, οι οποίες ούτε επηρεάζουν έντονα την βιωσιμότητα των κυττάρων ούτε επάγουν την έκφραση πολύ μεγάλου ποσοστού μεταγραφόμενων γονιδίων

Πέρα από τα γονίδια που το προφίλ τους αλλάζει, υπάρχουν και γονίδια (39 σε αριθμό, 26 υπερεκφραζόμενα και 13 υποεκφραζόμενα) που κρατούν το ίδιο πρότυπο διαφορετικής έκφρασης από τις μικρότερες δοκιμασμένες συγκεντρώσεις (0,05-1 mM) ως τις μεγαλύτερες (10-15 mM). Κατηγοριοποιώντας αυτά τα γονίδια με βάση τον κώδικα των COG του NCBI (Clusters of Orthologous Groups), παρατηρήσαμε ότι επιδιορθωτικά γονίδια (συγκεκριμένα τα *recA*, *lexA* και *uvrA*) και γονίδια συγκρότησης φάγων υπερεκφράζονται σταθερά ενώ γονίδια μεταβολισμού αμινοξέων και μεταφορέων σταθερά υποεκφράζονται. Η SOS απόκριση, όπως έχει αναφερθεί διεξοδικά σε αυτήν την εργασία, είχε πρωτοχαρακτηριστεί σαν επαγόμενη επιδιόρθωση (Radman 1975). Επιδιορθωτικά γονίδια ήταν τα πρώτα γονίδια που βρέθηκαν σαν επαγόμενα μέλη του SOS συστήματος (Little & Mount 1982, Walker 1984). Επιπλέον, ένας από τους πρώτους φαινοτύπους της απόκρισης ήταν και η επαγωγή των φάγων (Witkin 1976). Στην παρούσα εργασία, σε ανάλυση περιοχών του χρωμοσώματος που είχαν κοινό πρότυπο διαφορετικής έκφρασης, εντοπίστηκε ολόκληρη περιοχή (cluster) με υπερεκφραζόμενα υποθετικά γονίδια καταναμημένα σε 3 συνεργιώματα. Στοίχιση με BLAST έδειξε ότι τα υποθετικά γονίδια αυτής της περιοχής ομοιάζουν με γονίδια συγκρότησης φάγων. Επομένως, όπως αναμένεται από μία SOS απόκριση, εμφανίστηκε επαγωγή τόσο κλασσικών SOS επιδιορθωτικών γονιδίων όπως τα *recA*, *lexA* και *uvrA*, καθώς και γονιδίων συγκρότησης φάγων. Από την άλλη, φαίνεται ότι το κύτταρο ελαττώνει την έκφραση άλλων γονιδίων. Ήδη φάνηκαν γονίδια μεταβολισμού αμινοξέων και μεταφορέων να υποεκφράζονται σταθερά από τις μικρές συγκεντρώσεις. Αναζήτηση περιοχών του χρωμοσώματος με γονίδια που έχουν κοινά πρότυπα έκφρασης κατέδειξε περιοχή με υποεκφραζόμενα

4. Συζήτηση

γονίδια που συμμετέχουν στην ρευστότητα της μεμβράνης, στον σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και στον μεταβολισμό του DNA. Πιθανόν, το κύτταρο προσπαθεί να μειώσει την κατανάλωση ενέργειας μειώνοντας την δράση μεταβολικών μονοπατιών που δεν χρειάζονται σε εντατικούς ρυθμούς στην προκειμένη στρεσογόνο κατάσταση, έως ότου το κύτταρο βρεθεί σε καλύτερη κατάσταση ή περιβάλλον.

Επόμενη κατηγορία γονιδίων με διαφορετική έκφραση που αναλύθηκε ήταν τα υπερεκφραζόμενα γονίδια με λόγο υπερέκφρασης άνω του 10 σε μία τουλάχιστον συγκέντρωση MMS, και τα υποεκφραζόμενα με λόγο υποέκφρασης κάτω του -10 σε μία τουλάχιστον συγκέντρωση (εντόνως υπερ- και υποεκφραζόμενα γονίδια αντίστοιχα). Ανάμεσα στα εντόνως υπερεκφραζόμενα γονίδια εντοπίζουμε τα επιδιορθωτικά γονίδια *uvrA*, *uvrB* και *recA*, γονίδια απόκρισης σε στρεσογόνες συνθήκες (*pscB*, *pspC*, *hrcA*, *hsp20*, *osmC*, μεταγραφικός παράγοντας που ανταποκρίνεται σε οξειδωτικό στρες και μεμβρανική πρωτεΐνη σχετιζόμενη με όξινο στρες) και σε ανθεκτικότητα στον υδράργυρο (*merC*). Φαίνεται ότι το κύτταρο επάγει αποκρίσεις έναντι διαφορετικών στρεσογόνων συνθηκών, όπως η μεταλλαξογένεση, το θερμικό σοκ, το οσμωτικό στρες και το οξειδωτικό στρες, για να αντιμετωπίσει την κατάσταση που βρίσκεται. Ακόμη δύο γονίδια που υπερεκφράζονται ήταν γονίδια διπλώματος πρωτεϊνών (*clpA*, *clpB*) πιθανόν για την εξασφάλιση του σωστού διπλώματος των πρωτεϊνών, που μπορεί να επηρεάζεται από το στρες που υπόκειται το κύτταρο. Στα εντόνως υποεκφραζόμενα γονίδια χαρακτηριστικός ήταν ο εντοπισμός γονιδίων ριβοσωμικών πρωτεϊνών (11 από τα 26 συνολικά εντόνως υποεκφραζόμενα). 2 από αυτά εντοπίζονται σε καθολικά υποεκφραζόμενη περιοχή (cluster) του χρωμοσώματος που διαθέτει γονίδια ριβοσωμικών πρωτεϊνών και παραγόντων επιμήκυνσης. Μία τέτοια αντίδραση θυμίζει ένα ακόμη είδος απόκρισης σε στρες, την stringent απόκριση (stringent response) όπου γονίδια της μεταφραστικής μηχανής υποεκφράζονται. Είναι ένα είδος απόκρισης σε αμινοξική πενία, πενία λιπαρών οξέων και έλλειψη σιδήρου (Haseltine & Brock 1973, Vinella *et al.* 2005, Battesti & Bouveret 2006), και βασική επίδρασή της είναι η υποέκφραση των γονιδίων ριβοσωμικών πρωτεϊνών (Traxler *et al.* 2008). Ο λόγος που φαίνεται να γίνεται αυτό στην συγκεκριμένη απόκριση είναι η έλλειψη των αμινοξέων για την σύνθεση πρωτεϊνών. Δεδομένου, ότι δεν έχουμε κατάσταση πενίας (τα επωασμένα με MMS κύτταρα αναπτύσσονταν σε πλήρες θρεπτικό υλικό), η ίδια απόκριση φαίνεται να οδηγείται από το στρες του μεταλλαξογόνου παράγοντα και να προκαλεί την μείωση του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης είτε για την αποφυγή σύνθεσης πρωτεϊνών που προέρχονται από μεταλλαγμένα γονίδια είτε πιθανόν για εξοικονόμηση ενέργειας, και ανακατεύθυνσή της σε διαδικασίες που χρειάζονται περισσότερο, όπως η επιδιόρθωση του DNA.

Οι κατηγορίες των γονιδίων που υπερ- ή υποεκφράζονται στο CP4, βρέθηκαν αντιστοίχως να υπερ-/υποεκφράζονται σε SOS αποκρίσεις και άλλων βακτηρίων. Παραλείποντας τα επιδιορθωτικά γονίδια, μια κατηγορία που θα συζητηθεί στη συνέχεια ξεχωριστά στα πλαίσια των SOS γονιδίων, γονίδια φάγων έχουν παρατηρηθεί να υπερεκφράζονται σε κάποιους οργανισμούς στους οποίους έχει γίνει μεταγραφωματική ανάλυση της SOS απόκρισής τους: στο *E. coli* (Quillardet *et al.* 2003), στο *P. aeruginosa* (Cirz *et al.* 2006), στο *S. aureus* (Anderson *et al.* 2006, Cirz *et al.* 2007) και στο *B. thailandensis* (Ulrich *et al.* 2013). Επιπλέον, έχει βρεθεί μέχρι στιγμής στο *E. coli* να υπερεκφράζονται γονίδια απόκρισης σε αλλά είδη στρες, γονίδια διπλώματος πρωτεϊνών καθώς και γονίδιο αλκοολικής αφυδρογονάσης (Courcelle *et al.* 2001, Khil & Camerini-Otero 2002). Όσον αφορά τα

4. Συζήτηση

υποεκφραζόμενα γονίδια, φαίνεται ότι στο *E. coli* (Khil & Camerini-Otero 2002) και στο *P. fluorescens* (Jin *et al.* 2007) υποεκφράζονται γονίδια της μεταφραστικής μηχανής: Η αντίδραση αυτή όμως δεν παρατηρείται σε όλα τα βακτήρια (Cirz *et al.* 2006, Cirz *et al.* 2007) ενώ φαίνεται να συμβαίνει το ανάποδο στο *B. thailandensis* (Ulrich *et al.* 2013). Φαίνεται ότι υπάρχουν κοινές πτυχές, πέρα της επιδιόρθωσης, ανάμεσα στις SOS αποκρίσεις διαφορετικών βακτηρίων που πιθανόν εξελικτικά έχουν διατηρηθεί, με χαρακτηριστικό παράδειγμα η επαγωγή αποκρίσεων σε διαφορετικά είδη στρες. Από κει και πέρα, φαίνεται ότι διαφορετικά μονοπάτια ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο στην SOS επαγωγή του κάθε βακτηρίου, μοναδικότητα η οποία θα φανεί και στα μέλη του SOS συστήματος (το οποίο θα σχολιασθεί παρακάτω).

4.7 Επιδιορθωτικά γονίδια στο CP4

Η επιδιόρθωση του DNA είναι η κατεξοχήν λειτουργία του κυττάρου που χαρακτηρίζει την SOS απόκριση (Little & Mount 1982, Walker 1984). Επιδιορθωτικά γονίδια του CP4 που αναδείχθηκαν να υπερεκφράζονται παρουσία του MMS είναι τα *recA*, *lexA*, *uvrA* και *uvrB*. Κρίθηκε απαραίτητο, λοιπόν, να βρεθούν όλα τα επιδιορθωτικά γονίδια του CP4 και τα πρότυπα έκφρασής τους στις συγκεντρώσεις του MMS.

Συγκριτικά με 59 επιδιορθωτικά γονίδια του *E. coli* (Eisen & Hanawalt 1999), εντοπίστηκαν 34 επιδιορθωτικά γονίδια στο CP4. Χαρακτηριστικά συστήματα που φαίνονται να είναι παρόντα στον οργανισμό μας είναι το σύστημα επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων, σύστημα επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων, τα γονίδια του μονοπατιού RecF, γονίδια λύσης δομών Holliday, το γονίδιο της φωτολύσης στο σύστημα φωτοεπιδιόρθωσης, καθώς και γλυκοζυλάσες για την επιδιόρθωση μέσω εκτομής βάσεων.

Η σύγκριση των επιδιορθωτικών συστημάτων μεταξύ του CP4 και του *E. coli* έδειξε ότι απουσιάζουν επιδιορθωτικά γονίδια που απαρτίζουν ολόκληρα συστήματα επιδιόρθωσης. Χαρακτηριστική είναι η απουσία των *recB*, *recC* και *recD* γονιδίων που πρωταγωνιστούν στην RecBCD επιδιόρθωση (Cox *et al.* 2000, Lusetti & Cox 2002). Το RecBCD μονοπάτι, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού με την βοήθεια της RecA, επιδιορθώνει τα δίκλινα σπασίματα του DNA (Anderson & Kowalczykowski 1997). Έχει, όμως, παρατηρηθεί ότι απουσία του RecBCD συστήματος λόγω μεταλλαγών, το RecF μονοπάτι αναλαμβάνει την επιδιόρθωση δίκλωνων σπασιμάτων (Morimatsu & Kowalczykowski 2003). Παρατηρώντας ότι το CP4 διαθέτει τα γονίδια *recF*, *recO* και *recR*, το RecF μονοπάτι στο CP4 πιθανόν αναλαμβάνει τόσο το δικό του ρόλο επιδιόρθωσης μονόκλωνων χασμάτων όσο και την επιδιόρθωση δίκλωνων σπασιμάτων, ελλείψει των *recB*, *recC* και *recD*, αντικαθιστώντας το αντίστοιχο μονοπάτι. Άλλη χαρακτηριστική έλλειψη είναι των *umuC* και *umuD* γονιδίων, δύο χαρακτηριστικών SOS γονιδίων που απαρτίζουν την επιρρεπή σε λάθη PolV (UmuD₂C) πολυμεράση, η οποία είναι υπεύθυνη και για την SOS μεταλλαξογένεση (Walker 1984, Fuchs *et al.* 2004). Πιθανόν, το *Z. mobilis* κατά την SOS απόκριση δεν καταφεύγει στην "SOS λύση" της αντιγραφής του DNA, δηλαδή σε μία αντιγραφή που δεν εμποδίζεται από τις βλάβες του DNA και ολοκληρώνεται εισάγοντας πολλές μεταλλαγές αλλά με απώτερο σκοπό την επιβίωση του κυττάρου. Μία ακόμη έλλειψη συστήματος είναι τα γονίδια *alkA*, *alkB* και *ada* που απαρτίζουν το Ada σύστημα απόκρισης. Είναι ένα σύστημα που απαρτίζεται από τα *alkA*, *alkB*, *ada* και *aidB* και ενεργοποιείται παρουσία αλκυλιωτικών παραγόντων (Lindhahl *et al.* 1988, Landini &

4. Συζήτηση

Volkert 2000). Η Ada είναι μια μεθυλοτρανσφεράση και ο μεταγραφικός ενεργοποιητής του *ada-alkB* συνεργώματος, του *alkA* και του *aidB*. Η AlkB είναι μία διοξυγενάση, η AlkA μία γλυκοζυλάση ενώ ο ρόλος της AidB δεν έχει προσδιοριστεί και ομοιάζει με acyl-CoA αφυδρογονάσες (Mielecki & Grzesiuk 2014). Φαίνεται ότι, λόγω έλλειψης αυτών των γονιδίων, το αντίστοιχο σύστημα απόκρισης λείπει από το *Z. mobilis*. Πιθανόν, άλλα γονίδια μεθυλοτρανσφερασών και γλυκοζυλασών να αντικαθιστούν μερικώς, και ίσως όχι τόσο συντονισμένα όσο το Ada σύστημα, τις συγκεκριμένες επιδιορθωτικές λειτουργίες των *alkA*, *alkB*, *ada*. Τέλος, ένα ακόμη γονίδιο που απουσιάζει είναι το *mutH* που συμμετέχει στην επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων. Στο *E. coli* η MutH κόβει την αμεθυλιώτη αλυσίδα του DNA που έχει την αταίριαστη βάση. Έχουν, όμως, παρατηρηθεί βακτήρια που τον ρόλο αυτόν τον αναλαμβάνει η MutL (Fukui 2010). Φαίνεται, ότι το *Z. mobilis* να ανήκει σε αυτά τα βακτήρια που τους λείπει το *mutH* χωρίς να σημαίνει ότι τους λείπει το σύστημα επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα στο CP4 με τα επιδιορθωτικά γονίδια που έχουν αναζητηθεί και εντοπιστεί σε ένα άλλο α-πρωτεοβακτήριο, το *C. crescentus* (Martins-Pinheiro *et al.* 2007), παρατηρούνται αρκετές ομοιότητες αλλά και κάποιες διαφορές. Ομοίως, στο *C. crescentus* δεν εντοπίζονται τα *recB*, *recC* και *recD*, *umuDC* και *mutH*. Μάλιστα, όσον αφορά την έλλειψη των *umuDC*, υπήρξαν και προσπάθειες αναζήτησης άλλων πολυμερασών, επαγόμενες από μεταλλαξογόνες συνθήκες και επιρρεπείς σε λάθη, που αναλαμβάνουν να αντικαταστήσουν την δράση της PolV (Galhardo *et al.* 2005). Επιπλέον κοινές ελλείψεις που φέρουν και τα δυο α-πρωτεοβακτήρια είναι στην επιδιόρθωση με ανασυνδυασμό τα ομόλογα των *recT* (recombinase) και *recX* (ρυθμίζει την RecA), *rus* (endodeoxyribonuclease Rus), *sbcBCD* (exodeoxyribonuclease I) και στην επιδιόρθωση με εκτομή βάση τα ομόλογα των *nfi* (endonuclease V), *nfo* (endonuclease IV) και *nei* (endonuclease VIII). Από κει και πέρα φαίνεται ότι παρόλο που τα δύο βακτήρια ανήκουν στην ίδια κλάση, υπάρχουν και διαφορές μεταξύ τους και συγκεκριμένα σε επιδιορθωτικά γονίδια που φέρει το *C. crescentus* και όχι το CP4: στο *C. crescentus* εντοπίζονται ομόλογα των *ada* και *alkB*, του *ogt* (O-6-alkylguanine-DNA/cysteine-protein methyltransferase), του *vsr* (Very short patch repair protein), του *tag* (3-methyl-adenine DNA glycosylase) και του *mutT* (dGTP-preferring nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase). Σκιαγραφούνται, λοιπόν, διαφορές στα επιδιορθωτικά συστήματα από βακτήριο σε βακτήριο, ακόμα και σε αυτά που ανήκουν στην ίδια κλάση, με αποτέλεσμα να αναμένονται και διαφορές στα μονοπάτια που ρυθμίζονται από το SOS σύστημα.

4.8 Το SOS σύστημα στο CP4

4.8.1 Τα μέλη του SOS συστήματος στο CP4

Μετά την εύρεση των επιδιορθωτικών γονιδίων στο CP4, αναζητήθηκαν οι λόγοι έκφρασης αυτών στις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Βρέθηκε ότι 17 από αυτά (*mutM*, *mutY*, *ung*, *xthA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *recA*, *recR*, *recO*, *recG*, *ruvA*, *ruvB*, *ruvC*, *lexA* και *radC*) υπερεκφράζονται σε τουλάχιστον μία συγκέντρωση του MMS. Από αυτά, τα 10 (*mutY*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *recA*, *ruvA*, *ruvB*, *ruvC* και *lexA*) είναι ομόλογα κλασικών SOS γονιδίων (Fernández De Henestrosa *et al.* 2000, Courcelle *et al.* 2001, Erill *et al.* 2007, da Rocha *et al.* 2008). Τα υπόλοιπα 7 (*mutM*, *ung*, *xthA*, *recR*, *recO*, *recG* και *radC*) δεν είναι τυπικά SOS γονίδια και εντοπίστηκαν μόνο στην παρούσα εργασία να υπερεκφράζονται και συνεπώς να είναι

4. Συζήτηση

SOS-επαγόμενα. Βλέπουμε, λοιπόν, ότι εκτός από αναμενόμενα συστήματα και γονίδια επιδιόρθωσης που ομόλογά τους υπερεκφράζονται σε SOS-επαγόμενες συνθήκες σε άλλους οργανισμούς, εντοπίστηκαν και νέα επιδιορθωτικά γονίδια που υπερεκφράζονται σε τέτοιες συνθήκες, τα οποία συμμετέχουν στην επιδιόρθωση εκτομής βάσης και στην επιδιόρθωση μέσω ανασυνδυασμού. Εντοπίστηκαν, όμως, και ομόλογα SOS γονιδίων που δεν υπερεκφράζονται: τα *ssb*, *dnaE*, *recN* και το δεύτερο ομόλογο *uvrD-ZCP4_0705* (στο CP4 εντοπίστηκαν δύο ομόλογα *uvrD* γονίδια, όπου το ZCP4_1662 υπερεκφράζεται και το ZCP4_0705 υποεκφράζεται).

Αν θεωρηθεί η αύξηση των συγκεντρώσεων του MMS με χρονικότητα επαγωγής, παρατηρήθηκε ότι από την πρώτη επαγωγή (0,05 mM), έχουμε την υπερέκφραση των SOS ομόλογων *lexA*, *ruvA*, *ruvC*. Ενώ το *lexA*, αυξάνει συνεχώς το λόγο υπερέκφρασης του μέχρι τα 10 mM (όπου παραμένει ίσος με των 15 mM), τα *ruvA* και *ruvC* σταματούν να υπερεκφράζονται μετά τα 0.1 mM ενώ υποεκφράζονται στα 10 και 15 mM. Επόμενα σε σειρά υπερέκφρασης είναι τα SOS ομόλογα *recA* και *uvrA*, που ξεκινούν στο 1 mM, και ακολουθεί ακόμη ένα SOS ομόλογο το *uvrB* στα 5 mM. Όλα τα υπόλοιπα επαγόμενα επιδιορθωτικά γονίδια υπερεκφράζονται από τα 10 mM, εκτός του *ruvB* που υπερεκφράζεται μόνο στα 15 mM. Στις μικρές συγκεντρώσεις, λοιπόν, έχουμε την επαγωγή κλασσικών SOS γονιδίων (*lexA*, *recA*, *uvrA*, *ruvA*, *ruvC*) για την επιδιόρθωση βλαβών και την αντιμετώπιση του. Τα *lexA*, *recA* και *uvrA* έχουν παρατηρηθεί ότι είναι από τα πρώτα γονίδια που επάγονται και στο *E. coli* (Janion 2008). Στη συνέχεια, όμως, που η ποσότητα του SOS-επαγωγικού μεταλλαξογόνου παράγοντα είναι πολύ μεγαλύτερη, και επομένως οι βλάβες πιο εκτεταμένες, επάγονται επιπλέον επιδιορθωτικά γονίδια, τόσο κλασσικών SOS-επαγόμενων συστημάτων (*uvrB*, *uvrC*, *uvrD*) όσο και άλλων επιδιορθωτικών συστημάτων (*mutM*, *mutY*, *ung*, *xthA*, *recR*, *recO*, *recG*). Αξιοσημείωτο είναι το φαινόμενο ότι "κλείνουν" τα *ruvA* και *ruvC* στις μεγάλες συγκεντρώσεις, υποδηλώνοντας μια ελαττωμένη ανάγκη των συγκεκριμένων επιδιορθωτικών στις υψηλές συγκεντρώσεις. Το ερώτημα που τέθηκε στη συνέχεια είναι αν τόσο τα SOS-ομόλογα και επαγόμενα επιδιορθωτικά γονίδια του CP4 όσο και τα υπόλοιπα επαγόμενα επιδιορθωτικά γονίδια του είναι LexA-ρυθμιζόμενα στο *Z. mobilis*.

Ανοδικά των 17 υπερεκφραζόμενων επιδιορθωτικών γονιδίων αναζητήθηκαν αλληλουχίες που συμφωνούν με το μοτίβο του SOS χειριστή των α-πρωτεοβακτηρίων. Και στα 17 γονίδια βρέθηκαν τέτοιες αλληλουχίες, και σε απόσταση από 4 βάσεις εντός του πλαισίου ανάγνωσης (περίπτωση *uvrC*) έως 271 βάσεις (περίπτωση *ruvC*) ανοδικά της μεταφραστικής έναρξης. Οι αλληλουχίες αυτές διέθεταν από 0 έως και 3 νουκλεοτιδικές αλλαγές σε σύγκριση με το συντηρημένο SOS μοτίβο των α-πρωτεοβακτηρίων (GTTCN₇GTTC / GAACN₇GAAC). Βλέπουμε ότι όλα τα υπερεκφραζόμενα επιδιορθωτικά γονίδια του CP4 έχουν πιθανούς SOS χειριστές. Πρέπει εδώ να σημειωθεί το ότι αν δεν είχε γίνει συλλογή δειγμάτων από το συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων MMS (0.05-15 mM) θα υπήρχαν επιδιορθωτικά γονίδια που δεν θα είχαν φανεί να υπερεκφράζονται, με πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα τα SOS-ομόλογα *uvrB* (επάγεται στα 5 mM), *uvrC* (επάγεται στα 10 mM) και *ruvB* (επάγεται στα 15 mM). Μάλιστα, φαίνεται ότι όλα τα επιδιορθωτικά γονίδια που επάγονται στις δεδομένες συγκεντρώσεις φέρουν και πιθανούς SOS χειριστές, κάτι που δεν θα είχε βρεθεί αν δεν είχαν συμπεριληφθεί οι συγκεντρώσεις του MMS που χρησιμοποιήθηκαν στην παρό'υσα εργασία. Επιπλέον, σημαντικό εύρημα είναι ότι εκτός των 10 SOS-ομόλογων επιδιορθωτικών γονιδίων, και τα υπόλοιπα 7 επαγόμενα επιδιορθωτικά γονίδια του CP4 (*recG*, *mutM*, *ung*, *xthA*, *recR*, *recO* και *radC*) φέρουν SOS χειριστές. Να σημειωθεί ότι στο *V.*

4. Συζήτηση

parahaemolyticus έχει βρεθεί (σε πειράματα αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-DNA) ότι η LexA προσδένεται ανοδικά του *recG* γονιδίου, αλλά δεν έχει δειχθεί ακόμη αν επάγεται σε SOS-επαγωγικές συνθήκες (Sanchez-Alberola *et al.* 2012). Πάραυτα, τα υπόλοιπα 6 επιδιορθωτικά γονίδια (*mutM*, *ung*, *xthA*, *recR*, *recO* και *radC*) πρώτη φορά φαίνονται να επάγονται σε τέτοιες συνθήκες και να φέρουν πιθανούς SOS χειριστές. Ανάλογες περιπτώσεις, όπου επιδιορθωτικά γονίδια που δεν είναι κλασσικά SOS γονίδια έχουν βρεθεί πρώτη φορά να είναι SOS-ρυθμιζόμενα, έχουν παρατηρηθεί μεμονωμένα και σε άλλα βακτήρια. Στο *V. parahaemolyticus* που αναφέρθηκε ήδη, εκτός του *recG*, έχει βρεθεί και το *mutH* να ρυθμίζεται από την LexA (Sanchez-Alberola *et al.* 2012). Στο *C. crescentus* βρέθηκε γονίδιο ομόλογο του γονιδίου της ενδονουκλεάσης III (*nth*) να είναι SOS γονίδιο (da Rocha *et al.* 2008). Στο *B. subtilis* έχουν βρεθεί γονίδια ομόλογα με επιδιορθωτικά γονίδια μεθυλοτρανσφερασών, ενδονουκλεάσης και αλκυλοτρανσφεράσης να είναι SOS γονίδια στο βακτήριο αυτό (Au *et al.* 2015). Στο *M. tuberculosis* έχει βρεθεί SOS-ρυθμιζόμενο γονίδιο που μοιάζει με το *alkB* (Davis *et al.* 2002). Στο *P. fluorescens* βρέθηκαν να είναι SOS-ρυθμιζόμενα γονίδια ομόλογα των *radA* και γλυκοζυλασών μεθυλαδεδίνης (Jin *et al.* 2007) και στο *P. aeruginosa* γονίδιο όμοιο με φωτολύσης (Cirz *et al.* 2006). Τέλος, στο *S. aureus* βρέθηκαν σαν SOS γονίδια ομόλογα των εξονουκλεασών *sbcDC* (Anderson *et al.* 2006, Cirz *et al.* 2007). Φαίνεται ότι το SOS σύστημα αρκετών βακτηρίων δεν περιορίζεται στα κλασσικά SOS επιδιορθωτικά γονίδια που εξελικτικά έχουν περάσει σε όλα τα βακτήρια με SOS σύστημα. Πιθανόν το SOS σύστημα επεκτείνεται σε επιπλέον επιδιορθωτικά συστήματα, διαφορετικά στο κάθε βακτήριο, ώστε να καλύπτεται αποτελεσματικά η επιδιόρθωση κατά την SOS απόκριση. Αυτό ίσως εξηγεί και την σχετική χρονικότητα που σχολιάστηκε προηγουμένως: τα κλασσικά SOS γονίδια επάχθηκαν από τις μικρότερες συγκεντρώσεις ενώ τα νεοευρισκόμενα επάχθηκαν σε μεγαλύτερες, πιθανόν επειδή είναι πιο εκτεταμένες οι βλάβες και χρειάζονται επιπλέον επιδιορθωτικά συστήματα για την αντιμετώπισή τους.

Ανάμεσα στους χειριστές των επιδιορθωτικών γονιδίων, υπήρχαν ιδιάζουσες περιπτώσεις. Στην περίπτωση των χειριστών των *recA* και *lexA* είχαμε 2 συμπτυγμένους χειριστές ανοδικά του κάθε γονιδίου, συγκεκριμένα της μορφής GTTTN₇GTTCN₇GTTC για το *lexA* και GTTCN₇GTTCN₈GTTC για το *recA* (η ύπαρξη περισσότερων ενδιάμεσα μη συντηρημένων νουκλεοτιδίων θα συζητηθεί παρακάτω). Επιπλέον, το *mutY* έφερε τρεις χειριστές με τους δύο να είναι σχεδόν συντηγμένοι (TTTCN₇ATTIGN₇ATTC). Άλλα επιδιορθωτικά γονίδια είχαν δύο διακριτούς χειριστές (*ruvC*, *uvrA*). Φαίνεται ότι η ύπαρξη περισσότερων χειριστών, και δη σε συμπτυγμένη διάταξη, δεν είναι παράδοξη ιδιαίτερα όταν εμφανίζεται σε χειριστές γονιδίων όπως τα *recA*, *lexA* και *uvrA*, γονίδια που παρευρίσκονται σε όλα τα SOS συστήματα. Επιπλέον, εντοπίστηκαν περιπτώσεις επιδιορθωτικών γονιδίων που ανήκουν σε κοινό συνεργίωμα (*ruvCA*, *uvrC-recO*) με αποτέλεσμα όλα τα μέλη του εκάστοτε συνεργιώματος να ρυθμίζονται από τον ίδιο χειριστή. Να υπενθυμιστεί ότι έχουν παρατηρηθεί SOS γονίδια οργανωμένα σε συνεργιώματα: κλασσικές περιπτώσεις τέτοιων συνεργιωμάτων είναι τα *umuDC* και *ruvAB* στο *E. coli* (Courcelle *et al.* 2001). SOS συνεργιώματα έχουν βρεθεί μέσα από μεταγραφωματική ανάλυση και στα *S. aureus* (Cirz *et al.* 2007) και *P. aeruginosa* (Cirz *et al.* 2006).

Με βάση την εύρεση και τα χαρακτηριστικά των SOS χειριστών ανοδικά των υπερεκφραζόμενων επιδιορθωτικών γονιδίων, αναζητήθηκαν με τα ίδια κριτήρια SOS χειριστές τόσο σε υπερεκφραζόμενο όσο και σε υποεκφραζόμενα γονίδια. Η λογική

4. Συζήτηση

για την αναζήτηση SOS-ρυθμιζόμενων γονιδίων σε όλες τις κατηγορίες των διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων είναι ότι με την απομάκρυνση της LexA κατά την SOS επαγωγή, δύναται άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, τόσο ενεργοποιητές όσο και πιο ισχυροί καταστολείς από την LexA, να προσδένονται σε δικούς τους χειριστές ανοδικά του ίδιου SOS-ρυθμιζόμενου γονιδίου. Έτσι, εντοπίστηκαν 340 υπερεκφραζόμενα και 310 υποεκφραζόμενα γονίδια που φέρουν SOS χειριστές με μηδέν έως τρεις νουκλεοτιδικές αλλαγές σε διαγονιδιακές περιοχές σε απόσταση -300 (ανοδικά) έως +10 (καθοδικά) βάσεις από την μεταφραστική έναρξη του ρυθμιζόμενου γονιδίου. Τα γονίδια αυτά εντοπίζονται τόσο στο χρωμόσωμα όσο και στα 5 πλασμίδια του στελέχους. Κατατάσσοντας τα γονίδια σύμφωνα με τον κώδικα των COGs, φάνηκε ότι αρκετά SOS γονίδια συμμετέχουν στην επιδιόρθωση, στη μεταφορά ουσιών, στο δίπλωμα πρωτεϊνών, στην μεταγραφή και στον μεταβολισμό υδατανθράκων. Αρκετά υποεκφραζόμενα γονίδια, από την άλλη, συμμετέχουν στην μετάφραση, στον μεταβολισμό αμινοξέων και στην παραγωγή ενέργειας. Φαίνεται ότι μέσα από διεργασίες, όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, ο μεταβολισμός αμινοξέων και η παραγωγή ενέργειας που μειώνονται και το δίπλωμα πρωτεϊνών που αυξάνονται, γίνεται προσπάθεια εξοικονόμησης ενέργειας ή/και αποφυγής κατασκευής ελαττωματικών πρωτεϊνών, ενώ με την επιδιόρθωση και την ρύθμιση της μεταγραφής γίνεται συντονισμένη προσπάθεια αντιμετώπισης του μεταλλακτικού στρες και ελέγχου της ταυτότητας των γονιδίων μεταγράφονται με στόχο την επιβίωση του κυττάρου. Επιπλέον, βρέθηκαν γονίδια που συμμετέχουν στην κίνηση του κυττάρου να υπερεκφράζονται, πιθανώς σε μια συμπεριφορά απομάκρυνσης του κυττάρου από τον στρεσογόνο παράγοντα.

Μέσα από αυτήν την ανάλυση ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων, τα περισσότερα εκ των οποίων δεν έχουν χαρακτηριστεί σαν SOS γονίδια σε άλλα βακτήρια, φαίνεται να υπόκεινται σε SOS ρύθμιση στο CP4. Πέρα από αυτά της αντιγραφής, επιδιόρθωσης και ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, που συναντώνται ευρέως σαν SOS γονίδια, επιπλέον γονίδια έχουν χαρακτηριστεί σαν SOS γονίδια σε άλλα βακτήρια. Ήδη έχει αναφερθεί στην Εισαγωγή (Παράγραφος 1.1.5) ο εντοπισμός SOS γονιδίων κολισινών, ιντεγκρασών και τοξινών στο *E. coli*, SOS γονιδίων που συμμετέχουν στην ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και στην δημιουργία βιοφίλμ σε γ -πρωτεοβακτήρια (Da Re *et al.* 2009, Gotoh *et al.* 2010) και SOS γονιδίων που συμμετέχουν στην παθογένεια, την κινητικότητα και την σποριογένεση στα Firmicutes (Ubeda *et al.* 2007, Walter *et al.* 2014). Επιπλέον στο *E. coli*, έχουν εντοπιστεί σαν SOS γονίδια γονίδιο σταθεροποίησης πλασμιδίων, γονίδιο τρανσποζάσης, γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη για την ρύθμιση του μεταβολισμού μολυβδαινίου, γονίδια πρωτεϊνών-συνοδών που επάγονται από το θερμικό σοκ, γονίδιο πρωτεάσης που συμμετέχει στην άμυνα του κυττάρου έναντι φάγων και γονίδιο γλουταρεδοξίνης (Fernandez de Henestrosa *et al.* 2000, Courcelle *et al.* 2001). Σε α -πρωτεοβακτήρια έχουν βρεθεί μεμονωμένα σαν SOS γονίδια το *comM* και γονίδιο κινάσης που συμμετέχει στην σύνθεση ισοπρενοϊδίων στο *S. meliloti* (Erill *et al.* 2004) και γονίδιο σύνθεση γλουταμίνης στο *C. crescentus* (da Rocha *et al.* 2008). Ακόμη, μεμονωμένα σαν SOS γονίδια έχουν βρεθεί γονίδιο που συμμετέχει στην σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στο *B. subtilis* (Au *et al.* 2015) και γονίδια μεταφορέων και ριβοσωμικής πρωτεΐνης στο *C. difficile* (Walter *et al.* 2014). Μέσα από την εύρεση τέτοιων SOS γονιδίων, όπως και στη παρούσα εργασία, δείχνεται ότι το SOS σύστημα επεκτείνεται, περιλαμβάνει και ρυθμίζει έξτρα λειτουργίες του κυττάρου πέρα από τις κλασσικές και γνωστές SOS λειτουργίες (αντιγραφή, επιδιόρθωση, ρύθμιση κυτταρικού κύκλου και μεταλλαξογένεση). Στην περίπτωση

4. Συζήτηση

του CP4, όμως, βρέθηκαν άνω των 600 διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων σαν SOS γονίδια, σε αντίθεση με την εύρεση ενός μικρού αριθμού μεμονωμένων γονιδίων στα βακτήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Με το να ρυθμίζεται ένας τόσο μεγάλος αριθμός γονιδίων σημαίνει ότι ρυθμίζονται και περισσότερα μονοπάτια στο κύτταρο. Να σημειωθεί ότι η εύρεση ενός τέτοιου συνόλου SOS γονιδίων δεν θα ήταν εφικτή χωρίς να είχε γίνει πείραμα ελέγχου του μεταγραφικού προφίλ. Στις προαναφερθείσες εργασίες, είχαν ελεγχθεί επιλεκτικά γονίδια που έφεραν ιδανικούς χειριστές (με 0 ή 1 αλλαγή). Ήδη φαίνεται ότι τέτοιες προσεγγίσεις περικλείουν την πιθανότητα αποκλεισμού επιπλέον SOS γονιδίων, κάτι που θα σχολιασθεί και στην συνέχεια στη διασταύρωση προβλέψεων με πειραματικές προσεγγίσεις. Επιπλέον, SOS-ρυθμιζόμενες διεργασίες που βρέθηκαν στο CP4 έχουν εντοπιστεί να είναι SOS-επαγόμενες σε άλλα βακτήρια. Αυτό σημαίνει ότι, παρόμοια με το CP4, έχουν δειχθεί να επάγονται διεργασίες όπως η μεταφορά ουσιών, το δίπλωμα πρωτεϊνών στο *E. coli*, η κίνηση του κυττάρου, ο μεταβολισμός υδατανθράκων και η μεταφορά ουσιών στο *B. thailandensis* και ο μεταβολισμός του DNA στο *S. aureus* ενώ διεργασίες όπως η μεταγραφή στο *E. coli*, ο μεταβολισμός αμινοξέων στο *B. thailandensis* και μεταβολισμός αμινοξέων και η παραγωγή ενέργειας στο *S. aureus* και έχουν δειχθεί να καταστέλλονται (Courcelle *et al.* 2001, Khil & Camerini-Otero 2002, Quillardet *et al.* 2003, Cirz *et al.* 2007, Ulrich *et al.* 2013). Η διαφορά όμως των προαναφερθέντων αναλύσεων με την παρούσα ανάλυση είναι ότι εδώ αναζητήθηκαν και βρέθηκαν, με κριτήριο τους χειριστές που βρέθηκαν ανοδικά των επιδιορθωτικών γονιδίων, πιθανοί SOS χειριστές ανοδικά των γονιδίων που συμμετέχουν στις προαναφερθείσες διεργασίες με αποτέλεσμα τα αντίστοιχα μονοπάτια να έγκεινται στην ρύθμιση της LexA.

Οι αναλύσεις εντόπισαν και πλασμιδιακά SOS γονίδια. Συγκεκριμένα, 55 πλασμιδιακά γονίδια βρέθηκαν να είναι SOS-ρυθμιζόμενα. Λειτουργίες όπως η συγκρότηση φάγων, η μετάθεση του DNA, η αντιγραφή πλασμιδίων, σύστημα τοξίνης-αντιτοξίνης και περιοριστικά συστήματα καλύπτονται εξολοκλήρου από SOS πλασμιδιακά γονίδια. Γονίδια συγκρότησης φάγων, τοξινών και μετάθεσης του DNA έχουν αποδειχθεί σαν SOS-επαγόμενα και στα *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. thailandensis* (Quillardet *et al.* 2003, Cirz *et al.* 2006, Anderson *et al.* 2006, Cirz *et al.* 2007, Ulrich *et al.* 2013) αλλά σαν SOS-ρυθμιζόμενα μόνο στα γ -πρωτεοβακτήρια (Aleshkin *et al.* 1998, Fernandez de Henestrosa *et al.* 2000, Vogel *et al.* 2004, Weel-Sneve *et al.* 2008, Guerin *et al.* 2009, Cambray *et al.* 2011, Hocquet *et al.* 2012).

Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν και ποια πλασμιδιακά SOS γονίδια του CP4 είναι στελεχοειδικά. Αναζήτηση γονιδίων ομόλογων με των πλασμιδιακών SOS γονιδίων στα υπόλοιπα στελέχη κατέδειξε ότι μόνο 15 από τα 55 SOS-ρυθμιζόμενα πλασμιδιακά γονίδια του CP4 έχουν ομόλογα στα στελέχη NCIMB 11163, ATCC 10988, ATCC 29191 και ATCC 29192. Τα 40, επομένως, είναι στελεχοειδικά του CP4, δίνοντας αντιστοίχως και πιθανά στελεχοειδικά χαρακτηριστικά της SOS απόκρισης στο CP4. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε αν όλα τα ομόλογα γονίδια των υπολοίπων στελεχών έχουν τους ίδιους χειριστές με του CP4. Από το σύνολο των ομολόγων στα NCIMB 11163, ATCC 10988, ATCC 29191 και ATCC 29192, μόνο 4 βρέθηκαν να έχουν ίδιους χειριστές με του CP4. Βλέπουμε, λοιπόν, ότι η ομολογία μεταξύ των στελεχών δεν συνεπάγεται και ομολογία χειριστών. Συνεπώς, γονίδια SOS-ρυθμιζόμενα, άρα και λειτουργίες SOS-ρυθμιζόμενες, στο ένα στέλεχος δεν συνεπάγεται ότι είναι ρυθμιζόμενα, κι ας είναι παρόντα, και στα υπόλοιπα στελέχη. Επίσης, σημειώθηκε και η εξής ενδιαφέρουσα περίπτωση: περιοριστικής πρωτεΐνης του συστήματος M είναι SOS γονίδια στο CP4. Ομόλογο της αφυδρογονάσης στο

4. Συζήτηση

ATCC 10988 και ομόλογο της περιοριστικής πρωτεΐνης του συστήματος Μ στο ATCC 29191 είχαν προβλεφθεί με το FITOM να έχουν χειριστές με μία αλλαγή. Οι χειριστές αυτοί είναι διαφορετικοί (GATCTTTCTGCGTTC στην αφυδρογονάση του ATCC 10988, GAACATTGCTCGATC του περιοριστικού συστήματος στο ATCC 29191) από αυτούς που φέρουν τα ομόλογά τους στο CP4 (TTTTGGGTATAGTTT και GAAGCCAGTCCGAAG αντίστοιχα). Σε αυτές τις περιπτώσεις φαίνεται ότι, παρόλο που δεν έχουμε ίδιους χειριστές, οι αντίστοιχες ίδιες λειτουργίες πιθανόν να είναι SOS-ρυθμιζόμενες ανάμεσα στα στελέχη. Μπορεί το επίπεδο της ρύθμισης να είναι διαφορετικό από στέλεχος σε στέλεχος, και να αλλάζει η συγγένεια της LexA με τον κάθε διαφορετικό χειριστή, αλλά σαν αποτέλεσμα οι διεργασίες που συμμετέχουν αυτά τα γονίδια πιθανόν να ανήκουν στο SOS σύστημα του εκάστοτε στελέχους.

Οι SOS χειριστές που εντοπίστηκαν ανοδικά των SOS γονιδίων του CP4 και αναλύθηκαν, υπακούν στο μοτίβο GTTCN₇GTTC ή GACCN₇GAAC και είναι διαγονιδιακοί. Όμως, αναζητήθηκαν και πιθανά SOS γονίδια με χειριστές που υπακούουν σε διαφορετικά κριτήρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, ο ένας από τους δύο συντηγμένους χειριστές του *recA* που περιέχει 8 αντί για 7 ενδιάμεσα άτυπα νουκλεοτίδια. Αναζήτηση χειριστών με N₆ ή N₈ χειριστές, υπέδειξε 8 υπερεκφραζόμενα γονίδια με N₆ χειριστές με μία αλλαγή και 4 υπερεκφραζόμενα γονίδια με N₈ χειριστές με μία αλλαγή. Εκτός του *recA*, κανένα άλλο υπερεκφραζόμενο γονίδιο δεν διαθέτει τέλεια συντηρημένους χειριστές με διαφορετικό αριθμό ενδιάμεσων άτυπων νουκλεοτιδίων. Άλλη μία αναζήτηση χειριστών με διαφορετικό κριτήριο, ενδογονιδιακούς αντί για διαγονιδιακούς χειριστές, υπέδειξε 46 γονίδια με ενδογονιδιακούς χειριστές (χειριστές που εντοπίζονται εντός του πλαισίου ανάγνωσης του ανοδικού γονιδίου από το γονίδιο που ρυθμίζουν), κανένας από αυτούς, όμως, δεν ήταν τέλεια συντηρημένος. Όλοι οι ενδογονιδιακοί χειριστές έφεραν από 1 έως 3 νουκλεοτιδικές αλλαγές. Συμπερασματικά, βρέθηκαν SOS χειριστές διαγονιδιακοί με 0 έως και 3 νουκλεοτιδικές αλλαγές σε αποστάσεις -300 έως +10 βάσεις από την μεταφραστική έναρξη του εκάστοτε SOS γονιδίου, ενδογονιδιακοί με 1 έως 3 αλλαγές και χειριστές με N₆ ή N₈ αντί για N₇ ενδιάμεσα μη συντηρημένα νουκλεοτίδια. Επιπλέον, βρέθηκαν πολλαπλοί ξεχωριστοί χειριστές ανοδικά των SOS γονιδίων καθώς και χειριστές που ήταν συμπτυγμένοι. Παραδείγματα πολλαπλών χειριστών έχουν παρατηρηθεί ανοδικά κλασικών SOS γονιδίων στο *E. coli* (*lexA*, *umuDC*, *uvrA*, *recN* και *dinG*, Courcelle *et al.* 2001), ανοδικά του *lexA* στο *B. subtilis* (Haijema *et al.* 1996) και ανοδικά του *recA* σε α-πρωτεοβακτήρια (Tapias & Barbe 1998, Fernandez de Henestrosa *et al.* 1998, Labazi *et al.* 1999, Dumay *et al.* 1999, Vial *et al.* 2004). Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, ενδιαφέρει μελλοντικά να απομονωθούν και μελετηθούν χειριστές αντιπροσωπευτικοί της κάθε κατηγορίας. Ήδη έχει αναφερθεί, και θα σχολιασθεί παρακάτω, ότι στη παρούσα εργασία αναπτύχθηκε ένα ετερόλογο σύστημα (στο *E. coli*) μελέτης της καταστολής και ένα δεύτερο σύστημα μελέτης (στο *A. tumefaciens*) της αποκαταστολής σε SOS-επαγωγικές συνθήκες. Άτυποι χειριστές ή/και με νουκλεοτιδικές αλλαγές θα μπορούσαν να μελετηθούν σε αυτά τα συστήματα συγκριτικά με τους τέλεια συντηρημένους χειριστές, και να συγκριθεί η κατασταλτική ισχύς τους. Επιπλέον, σειριακές ελλείψεις σε πολλαπλούς ή συντηγμένους χειριστές θα βοηθήσουν να διευκρινιστεί αν όλοι οι πιθανοί SOS χειριστές ανοδικά ενός SOS γονιδίου αναγνωρίζονται από την LexA ή κάποιοι λειτουργούν προσελκύνοντας την LexA ώστε αυτή να προσδεθεί στον πιο συντηρημένο ή κοντινότερο της μεταφραστικής έναρξης. Να σημειωθεί ότι σε αντίστοιχες μελέτες έχει δειχθεί ότι και οι δύο χειριστές ανοδικά κοινού γονιδίου

4. Συζήτηση

είναι αναγνωρίσιμοι από την LexA (Tapias & Barbe 1998, Fernandez de Henestrosa *et al.* 1998, Labazi *et al.* 1999). Μια δεύτερη στρατηγική μελέτης των αλληλεπιδράσεων LexA-SOS χειριστές είναι να δειχθεί η πρόσδεσή της LexA πάνω στους υπό μελέτη χειριστές σε *in vitro* πειράματα όπου θα χρησιμοποιηθεί η LexA του CP4. Για τέτοια πειράματα θα χρειαστεί απομόνωση της πρωτεΐνης. Προσπάθειες απομόνωσης της πρωτεΐνης είχαν γίνει στο παρελθόν (Σκρέκας X., Διπλωματική εργασία 2014) χωρίς όμως τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Παράλληλα με την εύρεση των SOS γονιδίων, διερευνήθηκε και η αλλαγή της μεταγραφικής ισχύς μέσα σε ένα SOS συνεργίωμα. Σε επιδιορθωτικά SOS γονίδια και σε επιλεγμένα λοιπά SOS γονίδια, αναλύθηκε το πώς αλλάζει ο λόγος διαφορικής έκφρασης από το πρώτο στα επόμενα γονίδια του συνεργιώματος. Φάνηκε ότι ο λόγος διαφορικής έκφρασης δεν είναι προβλέψιμος μιας και βρέθηκαν περιπτώσεις όπου μειώνεται, παραμένει σταθερός ή να αυξάνεται από το πρώτο στα επόμενα γονίδια. Οι αλληλουχίες που εντοπίζονται ενδιάμεσα των γονιδίων-μελών τέτοιων συνεργιωμάτων θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε κατασκευές κλωνοποίησης και έκφρασης ξένων γονιδίων εντός τους CP4, όπου τα υπό έκφραση κλωνοποιημένα γονίδια μπορούν να τοποθετηθούν διαδοχικά και ανάμεσά τους οι κλωνοποιημένες επιθυμητές ενδιάμεσες αλληλουχίες προσομοιώνοντας ένα συνεργίωμα που η έκφρασή του δεν μειώνεται με την πρόοδο της μεταγραφής.

4.8.2 Το μοτίβο του SOS χειριστή στο CP4

Έχοντας εντοπίσει τους χειριστές των SOS γονιδίων του CP4, ήταν δυνατό να διευκρινιστεί το SOS μοτίβο του στελέχους. Βιβλιογραφικά, *in silico* ανάλυση SOS χειριστών από επιδιορθωτικά SOS γονίδια (*recA*, *lexA*, *uvrA*, *uvrD*, *ruvC*, *sulA*, *ssb*, *dnaE*, *dinP*) από διαφορετικά α -πρωτεοβακτήρια (Erill *et al.* 2004) είχε καταδείξει το GTTCN₇GTTC / GAACN₇GAAC σαν μοτίβο των α -πρωτεοβακτηρίων, δείχνοντας μεγαλύτερη συντήρηση για GTT και AC στα αντίστοιχα συντηρημένα τετρανουκλεοτίδια, καθώς και τάση για T και A στα ενδιάμεσα N₇ νουκλεοτίδια. Διαθέτοντας στην παρούσα εργασία μόνο έναν οργανισμό μεν αλλά έχοντας αποτελέσματα από την έκφραση των γονιδίων του σε SOS επαγωγικές συνθήκες, επιλέχθηκε σαν ομάδα καλύτερων SOS γονιδίων με τους πιο χαρακτηριστικούς SOS χειριστές τα υπερεκφραζόμενα SOS γονίδια με χειριστές με μηδέν ή μία αλλαγή και σε δεύτερη στοίχιση αυτούς τους χειριστές μαζί και με τους χειριστές όλων των επιδιορθωτικών υπερεκφραζόμενων γονιδίων. Και στις δύο περιπτώσεις η ανάλυση κατέδειξε τη μεγάλη συντήρηση στα TT και AA των συντηρημένων GTTC και GAAC τετρανουκλεοτιδίων αντίστοιχα. Ιδιαίτερα TT η προτίμηση των TT για συντήρηση ήταν 2,5 φορές μεγαλύτερη από των εκατέρωθεν G και C στα GTTC τετρανουκλεοτίδια. Επιπλέον, παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του *Z. mobilis* μια τάση για A και T στα ενδιάμεσα άτυπα N₇ νουκλεοτίδια. Δηλαδή τα αποτελέσματα συμφωνούσαν με τα αποτελέσματα των Erill και συνεργατών, και να τονιστεί ότι στις παρούσες στοίχισεις επιλέχθηκαν γονίδια που ήταν γνωστό ότι υπερεκφραζόνταν σε επαγωγικές συνθήκες, στα οποία δεν συγκαταλέγονται μόνο γνωστά ομόλογα SOS γονίδια αλλά και γονίδια που πρώτη φορά εδώ χαρακτηρίστηκαν ως SOS.

Στη συνέχεια, για την επιβεβαίωση αυτών των τάσεων προτίμησης, έγινε στοίχιση και ανάλυση πρώτα των χειριστών με τις λιγότερες αλλαγές από το κάθε SOS γονίδιο (υπερ- και υποεκφραζόμενα) και μετά όλων των χειριστών από όλα τα SOS γονίδια. Τόσο η πρώτη όσο και η δεύτερη ανάλυση επιβεβαίωσαν και ενίσχυσαν τις προηγούμενες παρατηρήσεις: προτίμηση άνω του 95% για τα ενδιάμεσα TT και AA στα τετρανουκλεοτίδια (σε σύγκριση με το 30-40% των G και C των

4. Συζήτηση

τετρανουκλεοτιδίων) καθώς και τάση (~60-70%) για A/T στα ενδιάμεσα άτυπα N₇ νουκλεοτίδια. Φάνηκε, λοιπόν, ότι στο SOS μοτίβο του CP4 να υπάρχει προτίμηση για A και T τόσο στην αντίστοιχη θέση τους στα τετρανουκλεοτίδια όσο και ως ενδιάμεσα άτυπα νουκλεοτίδια. Πιθανόν αυτές οι τάσεις να έχουν αντίκτυπο στην δομή του DNA στην περιοχή του SOS χειριστή και να παίζουν ρόλο στην αναγνώρισή του από την LexA και την πρόσδεσή της σε αυτόν. Από όσα είναι γνωστά από την κρυσταλλογραφική ανάλυση (Zhang *et al.* 2010) του συμπλόκου LexA-SOS χειριστή στο *E. coli* (το οποίο διαθέτει σαν SOS μοτίβο το CTGTN₈ACAG, Butala *et al.* 2009), τα ενδιάμεσα νουκλεοτίδια δεν αναγνωρίζονται και δεν αλληλεπιδρούν με τον καταστολέα (στην αντίστοιχη θέση εντοπίζονται "φτερά" της LexA που δεν σχηματίζουν δεσμούς με τα μη συντηρημένα νουκλεοτίδια), παρά υπάρχουν μόνο και μόνο για να χωράει σαν διμερές ο καταστολέας και να προσδένεται στα συντηρημένα τετρανουκλεοτίδια του αντίστοιχου SOS χειριστή. Ίσως για χωροταξικούς λόγους να προτιμάται στην περίπτωση του CP4 μια πιο ανοιχτή δομή του DNA σε αυτό το σημείο, μέσω της ύπαρξης αρκετών A και T, η οποία, όμως, δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τον καταστολέα και για αυτό δεν έχει υψηλή συντήρηση στο μοτίβο. Αντιθέτως, τα συντηρημένα AA και TT πιθανόν παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση με την LexA. Στην κρυσταλλογράφιση LexA-SOS χειριστή (Zhang *et al.* 2010) φάνηκε ότι από τους 5 υδρογονικούς δεσμούς που γίνονται μεταξύ της LexA και του CTGT τετρανουκλεοτιδίου, οι 3 γίνονται με τα ενδιάμεσα TG νουκλεοτίδια. Μπορεί στην περίπτωση του CP4 να συντηρούνται τα TT και AA των τετρανουκλεοτιδίων για τον ίδιο λόγο, δηλαδή να γίνονται αλληλεπιδράσεις της LexA με αυτά τα ενδιάμεσα AA και TT νουκλεοτίδια.

Επιπλέον ανάλυση εκατέρωθεν των χειριστών ανέδειξε ομοίως προτίμηση για A και T σε διάστημα δέκα βάσεων ανοδικά και καθοδικά των χειριστών. Η προτίμηση αυτή φαίνεται να είναι σε ποσοστό ~60-65%. Να σημειωθεί ότι στο γονιδίωμα του CP4 το περιεχόμενο σε GC είναι 46%. Επομένως, ένα ποσοστό σε A και T άνω του 54%, όπως στην περίπτωσή μας, έχει πιθανώς κάποια σημασία. Φαίνεται, λοιπόν, ότι και γύρω από τους χειριστές, όπως και στο μη συντηρημένο εσωτερικό τους, προτιμούνται τα A και T. Η προτίμηση αυτή, όπως αναφέρθηκε και για την περίπτωση των ενδιάμεσα N₇ άτυπων νουκλεοτιδίων, δεν παίζει ρόλο στην αναγνώριση του χειριστή με την LexA αλλά πιθανόν παίζει ρόλο στην γενικότερη χωροδιάταξη της περιοχής του συμπλόκου LexA-SOS χειριστή.

Ακόμη, αναζητήθηκε το εύρος της απόστασης ανοδικά των SOS γονιδίων που εντοπίζεται η πλειοψηφία των SOS χειριστών. Βρέθηκε ότι το 50% των χειριστών εντοπίζονται σε απόσταση -100 έως +10 βάσεις από την μεταφραστική έναρξη των SOS γονιδίων, το 87% σε απόσταση έως 200 βάσεων, ενώ μόνο το 5.5% των χειριστών σε απόσταση 250 έως 300 βάσεις ανοδικά. Πιθανόν, το εύρος των 200 βάσεων (και ίσως όχι άνω των 300 βάσεων) είναι η κατάλληλη απόσταση μεταξύ της μεταφραστικής έναρξης και του SOS χειριστή ώστε να μπορεί να δράσει κατασταλτικά η LexA και να παρεμποδίσει την RNA πολυμεράση από το να μεταγράψει το SOS γονίδιο, έως ότου γίνει επαγωγή του SOS συστήματος.

Προηγούμενος στην μελέτη των μοτίβων αλλά και των αποστάσεων δείχθηκε ότι υπήρχε μία ομάδα με τους καλύτερους χειριστές (με τις λιγότερες αλλαγές) από το κάθε SOS γονίδιο και μία ομάδα με όλους τους χειριστές. Τα αποτελέσματα τόσο από την ανάλυση των μοτίβων όσο και από την ανάλυση των αποστάσεων δεν διέφεραν από την μία ομάδα στην άλλη. Φάνηκε ότι δεν υπήρχε διαφορά ανάμεσα στα αποτελέσματα των δύο ομάδων, καθιστώντας όχι μόνο μη απαραίτητο έναν τέτοιο διαχωρισμό αλλά ενισχύοντας και τα αποτελέσματα που παρήχθησαν από την χρήση

4. Συζήτηση

αυτών των ομάδων, εφόσον μέσα από την ομοιότητα των αποτελεσμάτων φαινόταν ότι δεν πρέπει να υπάρχουν επί το πλείστον σημαντικές διαφορές μεταξύ των πολλών χειριστών σε ένα SOS γονίδιο.

4.9 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεταγραφωματικής ανάλυσης και των *in silico* αναλύσεων: σύγκλιση της βιοπληροφορικής πρόβλεψης μελών του SOS συστήματος με τη πειραματική προσέγγιση εύρεσης SOS γονιδίων

Οι βιοπληροφορικές προβλέψεις για την εύρεση πιθανών SOS γονιδίων στο γονιδίωμα του CP4 έγιναν αναζητώντας χειριστές ανοδικά γονιδίων με βάση το SOS μοτίβο των α -πρωτεοβακτηρίων και δεδομένου ότι σε ανάλογες αναζητήσεις σε άλλα βακτήρια επιτρεπόταν έως μία νουκλεοτιδική αλλαγή (Fernández de Henestrosa 2000, Courcelle *et al.* 2001, Davis *et al.* 2002, Erill *et al.* 2004, da Rocha *et al.* 2008, Walter *et al.* 2014, Sanchez-Alberola *et al.* 2015). Με αυτά τα κριτήρια, οι προβλέψεις της παρούσας εργασίας εντόπισαν 11 γονίδια με τέλεια συντηρημένο χειριστή και 67 γονίδια με χειριστή με μία αλλαγή. Από την μεταγραφωματική ανάλυση, δεν βρέθηκαν όλα αυτά τα ευρισκόμενα γονίδια να έχουν διαφορετική έκφραση παρουσία του MMS. Εξαιρώντας τις περιπτώσεις των γονιδίων των οποίων μετάγραφα δεν βρέθηκαν στις βιβλιοθήκες, βρέθηκαν 9 από τα 10 γονίδια με τέλειους χειριστές και 45 από τα 64 γονίδια με χειριστές με μία αλλαγή να έχουν διαφορετική έκφραση. Παρατηρήθηκε, λοιπόν, μια επιβεβαίωση των προβλέψεων κατά 90% στην περίπτωση των τέλειων συντηρημένων χειριστών και 70% στην περίπτωση των χειριστών με μία αλλαγή. Τα ποσοστά αυτά είναι ικανοποιητικά, ιδιαίτερα για την περίπτωση των τέλειων χειριστών, και είναι αναμενόμενο ότι εισάγοντας νουκλεοτιδικές αλλαγές θα μειώνεται το ποσοστό επιτυχίας, εφόσον δύναται να μην είναι ισάξια επιτρεπτές όλες οι νουκλεοτιδικές αλλαγές σε όλες τις θέσεις. Όμως, θεωρώντας ότι ο χειριστής που βρίσκεται ανοδικά ενός συνεργιώματος θα ρυθμίζει όλα τα γονίδια του συνεργιώματος, τα παραπάνω ποσοστά αλλάζουν σε 91,7% για τους τέλειους χειριστές και 53,5% στα γονίδια με χειριστές με μία αλλαγή. Παρατηρήθηκε ότι ενώ το ποσοστό στις προβλέψεις τέλειων χειριστών βελτιώθηκε, το ποσοστό στις προβλέψεις χειριστών με μία αλλαγή μειώθηκε αισθητά. Αυτό συνέβη γιατί ο αριθμός των 64 γονιδίων, που είχαν αρχικά εντοπιστεί με χειριστές με μία αλλαγή, αυξήθηκε στα 114 γονίδια λόγω συνεργιωμάτων. Συμπεραίνεται ότι αυξάνοντας ταυτόχρονα τους βαθμούς ελευθερίας των προβλέψεων (από τέλειους χειριστές σε χειριστές με μία αλλαγή και από ρύθμιση ενός γονιδίου σε ρύθμιση συνεργιώματος) μειώνεται και η επιτυχία των προβλέψεων.

Από τις μεταγραφωματικές αναλύσεις, βρέθηκαν χειριστές με μηδέν έως και τρεις νουκλεοτιδικές αλλαγές σε υπερεκφραζόμενα επιδιορθωτικά γονίδια. Με βάση αυτό το κριτήριο, εντοπίστηκαν τα SOS-ρυθμιζόμενα γονίδια στο CP4, τα οποία αριθμούνται σε 340 υπερεκφραζόμενα και 310 υποεκφραζόμενα. Ανάμεσα σε αυτά τα γονίδια ανήκουν και όσα είχαν προβλεφθεί και επιβεβαιωθεί από τις *in silico* αναλύσεις. Όμως, γίνεται αντιληπτό ότι ο αριθμός των ευρισκόμενων SOS γονιδίων είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτών των προβλέψεων: τα επιβεβαιωμένα προβλεπόμενα SOS γονίδια είναι μόλις το 9,4% του συνόλου των SOS γονιδίων. Έτσι διαφαίνεται το πώς μέσα από την πειραματική προσέγγιση προσεγγίζεται η ταυτότητα των SOS γονιδίων, ενώ δεν θα μπορούσε να είχε καλυφθεί μέσα από τις προβλέψεις. Φάνηκε ότι αυξάνοντας τον αριθμό των νουκλεοτιδικών αλλαγών από 0 σε 1 και συνυπολογίζοντας τα συνεργιώματα, επιβεβαιώθηκε μόνο το 53.5% των

4. Συζήτηση

προβλέψεων. Γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η πρόβλεψη γονιδίων, και συνεργιωμάτων, με χειριστές με 2 ή 3 αλλαγές θα είχε πολύ μεγάλο ποσοστό ψευδών SOS γονιδίων και πολύ μικρό ποσοστό επιβεβαίωσης πρόβλεψης. Μόνο η γνώση προτίμησης του μοτίβου στον οργανισμό θα μπορούσε να βοηθήσει σε αυτήν την περίπτωση: δείχθηκε ότι προτιμούνται τα AA και TT στα GAAC/GTTC τετρανουκλεοτίδια περισσότερο από τα G και C. Αυτή η γνώση θα μπορούσε να βοηθήσει στις προβλέψεις. Όμως, από την μία θα χάνονταν περιπτώσεις που κάποια αλλαγή εντοπίστηκε στα AA ή στα TT, ενώ από την άλλη τέτοια γνώση προήλθε εκ των υστέρων, μέσα από την μεταγραφική ανάλυση των δειγμάτων. Έτσι, σκιαγραφούνται τα όρια που μπορεί να φτάσει μια πρόβλεψη και τα οποία μπορεί να ξεπεράσει μία πειραματική προσέγγιση.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασία φαίνεται ότι είναι λάθος να υπάρχει προκατάληψη για προβλέψεις με περισσότερες της μίας νουκλεοτιδικές αλλαγές. Ο λόγος είναι ότι έχουν βρεθεί και βιβλιογραφικά SOS χειριστές με πάνω από 1 αλλαγή. Το *recA* του α -πρωτεοβακτηρίου *Acidiphilium facilis* φέρει χειριστή με 2 αλλαγές (Tapias & Barbe 1999). Σε είδη Κυανοβακτηρίων έχουν εντοπιστεί χειριστές ανοδικά των *recA*, *lexA* και *ssb* με 2 και 3 αλλαγές (Li *et al.* 2010). Μέσα από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, βρέθηκαν στο *M. tumefaciens* χειριστές που προσδένουν την LexA και φέρουν 2 και 3 αλλαγές, μάλιστα ένας από αυτούς ανήκει στο *ruvA* (Smollett *et al.* 2012). Σε β -πρωτεοβακτήρια και σε *Verrucomicrobia* εντοπίζονται χειριστές με 2 αλλαγές ανοδικά των *lexA* γονιδίων τους (Sanchez-Alberola *et al.* 2015, Erill *et al.* 2016). Φαίνεται να υπάρχει μια ανεκτικότητα σε νουκλεοτιδικές αλλαγές στους SOS χειριστές και για αυτό ίσως πρέπει να μην περιορίζονται τα κριτήρια αναζήτησης, ιδιαίτερα σε γονίδια που είναι ομόλογα SOS γονιδίων ή/και επάγονται σε στρεσογόνες συνθήκες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μια εργασία πάνω στο *D. radiodurans* που έγιναν *in silico* προβλέψεις, χωρίς όμως ακόμη πειραματική επιβεβαίωση, για χειριστές με έως και 3 αλλαγές ανοδικά επιδιορθωτικών γονιδίων και γονιδίων που συμμετέχουν σε απόκριση έναντι θερμικού, οσμωτικού, αλκαλικού, οξειδωτικού στρες, στρες πείνας, παρουσίας τοξινών και παρουσίας φάγων (Khan *et al.* 2008). Να σημειωθεί, όμως, ότι η περίπτωση του *D. radiodurans* είναι ιδιαίτερη και χρήζει περισσότερης μελέτης εφόσον φέρει 2 ομόλογα *lexA* του οποίου η κάθε πρωτεΐνη φέρει διαφορετική αλληλουχία στο αμινοτελικό άκρο (το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται στους SOS χειριστές), υπονοώντας ότι η κάθε μία μπορεί να συμμετέχει στην ρύθμιση διαφορετικών γονιδίων (Sato *et al.* 2006). Όσον αφορά την ανεκτικότητα των νουκλεοτιδικών αλλαγών, έχουν γίνει μελέτες που αφορούσαν το ποιες αλλαγές επηρεάζουν συγκεκριμένους SOS χειριστές στα *A. tumefaciens*, *R. meliloti*, *R. sphaeroides*, *R. capsulatus*, *S. meliloti*, *R. etli* και *M. tuberculosis* (Tapias & Barbe 1998, Fernandez de Henestrosa *et al.* 1998, Labazi *et al.* 1999, Tapias & Barbe 1999, Davis *et al.* 2002). Μέσα από τέτοια πειράματα δείχνεται αν και ποιες αλλαγές είναι ανεκτές στο SOS μοτίβο ενός βακτηρίου, με αποτέλεσμα να δύναται να κατασκευαστεί και ένα εξειδικευμένο μοτίβο, όπως στην περίπτωση του *M. tuberculosis* (Davis *et al.* 2002), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί πιο αποτελεσματικά στις προβλέψεις SOS γονιδίων. Για να είναι δυνατή μια ανάλογη μελέτη χειριστών στο *Z. mobilis*, στην παρούσα εργασία έγινε, όπως ήδη έγινε στα Αποτελέσματα (Παράγραφος 3.9) και θα σχολιασθεί στην συνέχεια, προσπάθεια κατασκευής ετερόλογου συστήματος μελέτης της μοριακής αλληλεπίδρασης LexA με SOS χειριστή.

4.10 Χρήση των υποκινητών των *recA* και *lexA* γονιδίων του CP4 ως μοντέλα μελέτης της αλληλεπίδρασης μεταξύ της LexA και των SOS χειριστών

Με στόχο την κατασκευή μοντέλων μοριακής αλληλεπίδρασης της LexA με SOS χειριστές, έγινε ενίσχυση των ευρύτερων περιοχών ανοδικά και της μεταφραστικής αρχής των *recA* και *lexA* γονιδίων του CP4 και σύντηξή τους με το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*). Το *lacZ*, χωρίς τον υποκινητή του, είναι ένα εργαλείο για την επίτευξη αυτού του στόχου και έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τον εντοπισμό και την μελέτη SOS χειριστών στα α-πρωτοεβακτήρια με χρήση μεταγραφικών συντήξεων με υποκινητές SOS γονιδίων. Πρώτα παραδείγματα χρήσης είναι με την ευρύτερη περιοχή ανοδικά του *recA* του *R. sphaeroides* και του *R. phaseoli* για μελέτη της ρύθμισης της επαγωγής παρουσία μιτομυκίνης C (Calero *et al.* 1993, Fernandez de Henestrosa & Barbe 1994) Μετά την εύρεση του μοτίβου του SOS χειριστή των α-πρωτοεβακτηρίων, η στρατηγική εφαρμόστηκε για το πώς μεταλλαγές στους SOS χειριστές επηρεάζουν την ρύθμιση των SOS γονιδίων. Τέτοιες μελέτες έχουν γίνει με τον χειριστή του *recA* των *R. etli*, *R. sphaeroides*, *R. capsulatus*, *R. palustris* και *P. denitrificans* και του *uvrA* των *R. sphaeroides*, *S. meliloti* και *P. denitrificans* (Tapias *et al.* 1997, Tapias & Barbe 1998, Fernandez de Henestrosa *et al.* 1998, Labazi *et al.* 1999, Tapias & Barbe 1999, Dumay *et al.* 1999, del Rey *et al.* 1999). Στην παρούσα εργασία δεν έγιναν μεταλλαγές στους υπό μελέτη χειριστές των *recA* και *lexA* αλλά έγιναν τα πρώτα πειράματα εγκαθίδρυσης ανάλογων συστημάτων μελέτης για το *Z. mobilis*.

Αναφέρθηκε στην παρούσα διατριβή ότι ανοδικά των *recA* και *lexA* του CP4 εντοπίζονται στο καθένα 2 αλληλεπικαλυπτόμενες αλληλουχίες SOS χειριστή α-πρωτοεβακτηρίων, μία τέλειαι και μίας ατελής (με μία αλλαγή για το *lexA*, με ένα έξτρα άτυπο ενδιάμεσο νουκλεοτίδιο για το *recA*). Οι ευρύτερες περιοχές ανοδικά των γονιδίων που ενισχύθηκαν και κλωνοποιήθηκαν διαθέτουν τόσο αυτές τις ρυθμιστικές αλληλουχίες όσο και στοιχεία υποκίνησης (αλληλουχίες -35, -10 και θέση πρόσδεσης ριβοσώματος RBS). Οι περιοχές αυτές κλωνοποιήθηκαν σε μεταφραστική σύντηξη με το *lacZ* γονίδιο του φορέα ελέγχου μεταγραφικής ενεργότητας pRA302 (Akakura & Winans 2002), το οποίο γονίδιο δεν διαθέτει υποκινητή. Επομένως, οποιαδήποτε ρύθμισή του στα πειράματά μας οφειλόταν στην ύπαρξη των υποκινητών των *recA* και *lexA*.

Οι κατασκευές που περιείχαν τους υποκινητές των *recA* και *lexA* εισήχθησαν επιτυχώς σε κύτταρα *E. coli* DH5α και *A. tumefaciens* KYC55, αλλά όχι σε κύτταρα CP4. Στα κύτταρα του CP4 θα μπορούσαμε να έχουμε άμεση αλληλεπίδραση της φυσικής LexA με τους υποκινητές που η ίδια ρυθμίζει φυσιολογικά στα κύτταρα του οργανισμού. Αποτυγχάνοντας στην εισαγωγή των κατασκευών στο CP4, οι προσπάθειες προσανατολίστηκαν στην εγκαθίδρυση των άλλων δύο συστημάτων. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί προηγούμενη βιβλιογραφική προσπάθεια μελέτης υποκινητών SOS γονιδίων α-πρωτοεβακτηρίων σε ανάλογα συστήματα. Οι Riera και συνεργάτες είχαν δει ότι μεταγραφικές συντήξεις του κάθε υποκινητή των *recA* γονιδίων των *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. sphaeroides* και *A. tumefaciens* με το *lacZ* επάγονταν παρουσία μιτομυκίνης C σε όλα τα προαναφερθέντα α-πρωτοεβακτήρια, δείχνοντας ότι η LexA καθενός από αυτά τα α-πρωτοεβακτήρια αναγνώριζε τους SOS χειριστές του εκάστοτε *recA* υποκινητή. Στο *E. coli*, όμως,

4. Συζήτηση

παρατηρήθηκαν βασικά επίπεδα έκφρασης αλλά όχι επαγωγές αυτών των συντήξεων παρουσία μιτομυκίνης C (Riera *et al.* 1994). Ο λόγος ήταν ότι δεν υπήρχε αναγνώριση και καταστολή των υποκινητών αυτών των α -πρωτεοβακτηρίων από την LexA του *E. coli*. Στην παρούσα εργασία αναμενόταν να αναγνωρίζει η LexA του *A. tumefaciens* τους υποκινητές των *recA* και *lexA* του CP4, λόγω μεγάλης ομοιολογίας με την LexA του *Z. mobilis*, αλλά στην περίπτωση του *E. coli* έπρεπε εντός των κυττάρων του να κλωνοποιηθεί και να εκφραστεί το *lexA* του CP4.

Πρώτο βήμα για την χρήση των συστημάτων ήταν να διερευνηθούν τα επίπεδα έκφρασης των συντήξεων. Η έκφραση του *lacZ* γονιδίου σε κατασκευές βασιζόμενες στον pRA302 μπορεί να μετρηθεί σε δοκιμασία Miller. Με αυτό το τρόπο υπολογίστηκε η ενεργότητα των κλωνοποιημένων υποκινητών των *recA* και *lexA* του CP4 στα στελέχη DH5 α και KYC55. Βρέθηκε ότι ο υποκινητής του *recA* δίνει μεγαλύτερη ενεργότητα από του *lexA* και στους δυο οργανισμούς. Ανάλυση των αλληλουχιών ανοδικά των *recA* και *lexA* γονιδίων του CP4 έδειξε ότι το *recA* διαθέτει πιο συντηρημένες αλληλουχίες -35, -10 και RBS. Από ότι φαίνεται αυτές οι αλληλουχίες αναγνωρίζονται καλύτερα από τις αντίστοιχες του *lexA* και στο *E. coli* και στο *A. tumefaciens* και συνεπώς να διαφαίνεται ότι το *recA* να διαθέτει πιο ισχυρό υποκινητή στα συγκεκριμένα συστήματα. Επιπλέον, να σημειωθεί ότι οι δύο υποκινητές δίνουν μεγαλύτερες ενεργότητες στο *A. tumefaciens* από ότι στο *E. coli*. Φαίνεται ότι αναγνωρίζονται καλύτερα στο *A. tumefaciens*, αναμενόμενο εφόσον το *A. tumefaciens* είναι α -πρωτεοβακτήριο όπως το *Z. mobilis* και τα στοιχεία υποκίνησής τους είναι πιο όμοια και πιο κοντά εξελικτικά κοντά από ότι με του *E. coli*.

Μετά την επιτυχή λειτουργία των υποκινητών, ιδιαίτερα του *recA*, σε δύο διαφορετικά είδη βακτηρίων, στόχος ήταν να προσομοιωθεί και να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των υποκινητών με τον καταστολέα LexA. Στο *E. coli*, λόγω του γεγονότος ότι η LexA των γ -πρωτεοβακτηρίων αναγνωρίζει διαφορετική αλληλουχία SOS χειριστή, εισήχθη το *lexA* γονίδιο από το CP4. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πλασμίδια. Το ένα είναι το pGS223 (που είχε χρησιμοποιηθεί σαν βάση κατασκευών χρήσιμων για την δημιουργία *lexA* στελέχους) όπου το *lexA* γονίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του δικού του υποκινητή. Το δεύτερο είναι βασισμένο στον φορέα υπερέκφρασης pRSETA όπου η κωδική περιοχή του *lexA* κλωνοποιήθηκε καθοδικά και τέθηκε υπό την ρύθμιση του υποκινητή T7 (χωρίς να υπάρχει πρόθεση χρήσης του). Το κάθε πλασμίδιο που έφερε την κωδική περιοχή του *lexA* κλωνοποιήθηκε ξεχωριστά σε DH5 α στέλεχος που διέθετε την *PrecA-lacZ* κατασκευή. Διαπιστώθηκε ότι μόνο όταν το *lexA* ήταν στο pRSETA εμφανιζόταν πτώση της ενεργότητας β -γαλακτοσιδάσης στο *PrecA-lacZ*, πτώση που οφειλόταν στην μεταγραφή και μετάφραση του κλωνοποιημένου *lexA* γονιδίου με συνέπεια την καταστολή του *PrecA* από την παραγόμενη LexA. Στην περίπτωση της ρύθμισης του *lexA* από το δικό του υποκινητή δεν παρατηρήθηκε πτώση της ενεργότητας του *PrecA-lacZ*.

Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης των στελεχών που φέρουν το *PrecA-lacZ* με και χωρίς το P_{T7}-*lexA*. Παρατηρήθηκε ότι μέγιστη καταστολή (57%) παρουσιάστηκε σε στατική ανάπτυξη των στελεχών στους 30°C, συνθήκες ανάπτυξης που δεν χαρακτηρίζουν το *E. coli*, που φιλοξενεί τα πλασμίδια, αλλά χαρακτηρίζουν το *Z. mobilis* όπου ανήκουν ο υποκινητής του *recA* και το γονίδιο *lexA*. Άρα, σε συνθήκες ανάπτυξης κατάλληλες του *Z. mobilis* είχαμε και την καλύτερη αλληλεπίδραση του υποκινητή του *recA* με την LexA.

4. Συζήτηση

Εκτός της καταστολής, παρατηρήθηκε και περίπτωση που ο υποκινητής του *recA* έχει μεγαλύτερη ενεργότητα παρουσία της LexA κατά την μελέτη διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, και συγκεκριμένα σε συνθήκες ανάπτυξης 37°C και στατικά. Η αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή του *recA* παρουσία της LexA μπορεί να υποδεικνύει έναν πιθανό ενεργοποιητικό ρόλο της πρωτεΐνης. Σε ένα άλλο α-πρωτεοβακτήριο, το *R. sphaeroides*, έχει παρατηρηθεί ότι η LexA, ενώ παγιδεύει την RNA πολυμεράση πάνω στον υποκινητή και την εμποδίζει να συνεχίσει, αν βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα λειτουργεί ενεργοποιητικά στην μεταγραφή των SOS γονιδίων (Tariyas *et al.* 2002). Τα επίπεδά της πρέπει να είναι χαμηλότερα από της RNA πολυμεράσης ώστε να μπορεί να την "οδηγήσει" στον υποκινητή αλλά να μην μπορεί να την συγκρατεί, με αποτέλεσμα να την βοηθάει να προσδέεται. Πιθανόν, στις παρούσες περιπτώσεις που εμφανίστηκε μεγαλύτερη ενεργότητα του υποκινητή του *recA* παρουσία της LexA, παρατηρούταν ένα παρόμοιο συμβάν. Οι συνθήκες που σημειώθηκε αύξηση της ενεργότητας ήταν όταν το *lexA* ήταν υπό την ρύθμιση του υποκινητή του, που είδαμε ότι δεν λειτουργεί αρκετά καλά στο *E. coli*, και στην ανάπτυξη των στελεχών στους 37°C και στατικά. Πιθανόν, λόγω της μικρής ενεργότητας του υποκινητή στην πρώτη περίπτωση και της υψηλότερης θερμοκρασίας στην δεύτερη, η παραγωγή της LexA ήταν μειωμένη με συνέπεια να δείχνει ένα ενεργοποιητικό αντί για κατασταλτικό ρόλο.

Φάνηκε, λοιπόν, ότι μπορεί να αναπαρασταθεί η κατασταλτική δράση της LexA στο σύστημα του *E. coli*. Ο φορέας pRA302 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κλωνοποίηση περεταιίρω υποκινητών SOS γονιδίων που φέρουν χαρακτηριστικούς SOS χειριστές με αντιπροσωπευτικές αλλαγές για να μελετηθεί η αναγνώρισή τους από την LexA. Επιπλέον, το ίδιο σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε πειράματα όπου έχουν αλλοιωθεί οι πιθανοί SOS χειριστές π.χ. προκαλώντας σημειακές μεταλλαγές στα συντηρημένα τετρανουκλεοτίδια του SOS χειριστή, αυξάνοντας ή μειώνοντας τα ενδιάμεσα μη συντηρημένα νουκλεοτίδια, κρατώντας έναν από τους πολλαπλούς SOS χειριστές για να δειχθεί ποιος αναγνωρίζεται ισχυρότερα ή αν πρέπει να συνυπάρχουν όλοι, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τις περιπτώσεις των αλληλεπικαλυπτόμενων χειριστών των *recA* και *lexA* αλλά και την περίπτωση του *invA* γονιδίου που υπάρχουν 2 ξεχωριστοί χειριστές με μία νουκλεοτιδική αλλαγή ο καθένας. Θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί και η περίπτωση του υποκινητή του T7. Στα πειράματα αυτής της δουλειάς δεν έγινε χρήση της αντίστοιχης T7 πολυμεράσης, επομένως δεν είχαμε και υπερέκφραση του γονιδίου. Θα ενδιέφερε να αξιοποιηθεί αυτός ο υποκινητής για υπερέκφραση του *lexA* σε παρόμοιους κύκλους πειραμάτων που πιθανόν να έδειχνε μεγαλύτερη καταστολή του *recA* υποκινητή, και επομένως να βοήθαγε και σε πειράματα μελέτης επιπλέον SOS χειριστών.

Εκτός του *E. coli*, οι κατασκευές *PlexA-lacZ* και *PrecA-lacZ* εισήχθησαν και σε κύτταρα *A. tumefaciens*. Το *A. tumefaciens* είναι ένα α-πρωτεοβακτήριο που διαθέτει SOS σύστημα απόκρισης με χειριστές που ακολουθούν το SOS μοτίβο των α-πρωτεοβακτηρίων (Tariyas and Barbe 1999, Erill *et al.* 2004). Επομένως, αναμένεται η φυσική LexA του *A. tumefaciens*, που μοιάζει κατά 85% με του *Z. mobilis*, να αναγνωρίζει και να προσδέεται στους SOS χειριστές των κλωνοποιημένων υποκινητών των *lexA* και *recA* του CP4. Το στέλεχος KYC55 που χρησιμοποιήθηκε και εισήχθησαν οι *lacZ* κατασκευές φέρει λειτουργική RecA και LexA πρωτεΐνη. Η χρήση ενός α-πρωτεοβακτηρίου όπως το *A. tumefaciens*, εφόσον δεν κατέστη δυνατή η εισαγωγή των πλασμιδίων στο CP4, εξυπηρετούσε στο να μελετηθεί η αποκαταστολή των κλωνοποιημένων υποκινητών σε SOS επαγωγικές

4. Συζήτηση

συνθήκες. Σαν παράγοντας που επάγει τέτοιες συνθήκες επιλέχθηκε το MMS, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς και στην μελέτη της SOS απόκρισης στο CP4 μέσω μεταγραφωματικής ανάλυσης.

Σαν συνθήκες απενεργοποίησης της LexA και αποκαταστολής του SOS συστήματος στο KYC55 επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 10 και 15 mM MMS, στις οποίες παρατηρήθηκε 50% και 70% πτώση βιωσιμότητας αντίστοιχα. Αυτού του μεγέθους πτώσεις βιωσιμότητας είναι ικανοποιητικές σε βαθμό επαγωγής της SOS απόκρισης αλλά δεν είναι μεγάλες ώστε να προκαλούν μεγάλη θνησιμότητα που θα επηρέαζε τα πειράματα. Επιλέγοντας, λοιπόν, αυτές τις συγκεντρώσεις για απενεργοποίηση της LexA και αποκαταστολή, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες Miller σε KYC55 κύτταρα που έφεραν τις κατασκευές *PlexA-lacZ* και *PrecA-lacZ* και είχαν επωαστεί στα 10 και 15 mM MMS. Σε σύγκριση με την συνθήκη-μάρτυρα (0 mM MMS), παρατηρήθηκε αύξηση των ενεργοτήτων και των 2 υποκινητών. Συγκεκριμένα, έως 1.2 φορές αύξηση της ενεργοποίησης του υποκινητή του *recA* και έως 2.7 φορές αύξηση ενεργότητας του υποκινητή του *lexA*. Να σημειωθεί ότι οι μονάδες β-γαλακτοσιδάσης είχαν αναχθεί ανά αριθμό κυττάρων που έχουν επιβιώσει μετά την επίδραση με MMS ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα με την συνθήκη-μάρτυρα. Σημειώθηκε, λοιπόν, αύξηση των ενεργοτήτων που υποδηλώνει ότι υπήρχε στις φυσιολογικές συνθήκες καταστολή των υποκινητών από την ενδογενή LexA του *A. tumefaciens* και με την παρουσία του MMS είχαμε απενεργοποίηση της LexA και αποκαταστολή των υποκινητών. Ενώ μεν ο υποκινητής του *recA* έδειξε την μεγαλύτερη ενεργότητα, ο υποκινητής του *lexA* έδειξε την μεγαλύτερη αποκαταστολή που ίσως δείχνει μια προτίμηση της LexA περισσότερο για τους SOS χειριστές του *lexA* από του *recA*. Συμπερασματικά για την περίπτωση του *A. tumefaciens* έχουμε σε ένα ετερόλογο σύστημα την ανασύσταση της αποκαταστολής των υποκινητών παρουσία SOS-επαγωγικών παραγόντων. Το σύστημα αυτό έχει δυνατότητες αξιοποίησης στην μελέτη της αποκαταστολής και έκφρασης υπό SOS επαγωγικές συνθήκες υποκινητών και άλλων SOS γονιδίων και με διαφορετικούς SOS-επαγωγικούς μεταλλαξογόνους παράγοντες, πέρα του MMS (π.χ. UV ακτινοβολία).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

5. Παράρτημα

5. Παράρτημα

Πίνακας 5.1. Αποτελέσματα της εφαρμογής του προγράμματος FITOM για την αναζήτηση SOS χειριστών με μία νουκλεοτιδική αλλαγή στο γονιδίωμα του στελέχους CP4

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Ακολουθία πιθανών SOS χειριστών	d
Χρωμοσωμικά γονίδια				
1	ZCP4_0641	flagellar capping protein	<u>GAA</u> A AAACAAAGAAC	-98
2	ZCP4_0043	fumarase. class I. homodimeric	GTT C AGGAGGCGTTT	-22
3	ZCP4_0044	hemolysin A		-286
4	ZCP4_1412	gluconate permease GntT	<u>GAC</u> C AAAAAAAGAAC	-27
5	ZCP4_1413	thymidylate synthase		-259
6	ZCP4_0294	ribonucleoside-triphosphate reductase class III	<u>GTT</u> C CTACAGAGTTT	-289
7	ZCP4_1373	putative phosphatase	<u>GTT</u> C TGACCAG C TTC	-160
8	ZCP4_1650	amino acid/polyamine/organocation transporter	T AACTATTTGAG A AC	-98
9	ZCP4_0344	hopanoid biosynthesis associated glycosyl	i) <u>GAA</u> A GGCATAAGAAC ii) <u>GAAC</u> G GGTTCATG A TC	i)-38 ii)-26
10	ZCP4_0969	hypothetical protein		-179
11	ZCP4_0968	RND family efflux transporter, MFP subunit	<u>GAA</u> A TAAAAATGAAC	-186
12	ZCP4_0835	haloacid dehalogenase superfamily protein	T AACGGTCAAAGAAC	-40
13	ZCP4_0014	putative metalloprotease	<u>GTT</u> C TGCAAGCGTTT	-107
14	ZCP4_0013	tRNA-Asn		-70
14	ZCP4_0620	Excinuclease ABC subunit C UvrC	T TTCAAAGATCG T TC	+4
15	ZCP4_1741	thiol:disulfide interchange protein	<u>GAA</u> A GATTTCTGAAC	-101
16	ZCP4_1742	gamma-glutamyltransferase 1		-149
17	ZCP4_1256	collagenase-like protease	<u>GTT</u> C GCTTTGTGT C C	-111
18	ZCP4_1487	protein-disulfide isomerase	C AACAGAAAGCGAAC	-17
19	ZCP4_0678	flagellar hook-associated protein FlgK	<u>GAA</u> T AACAAAAGAAC	-72
20	ZCP4_1728	metalloendopeptidase-like membrane protein	<u>GAA</u> A ATGATTTGAAC	-108
21	ZCP4_1471	hypothetical protein	<u>GTT</u> C CCTCGCCTGTT G	-102
22	ZCP4_0093	lactate dehydrogenase-like oxidoreductase	<u>GTT</u> C TATAAAAGTT A	-103
23	ZCP4_0413	outer membrane receptor protein	<u>GTT</u> C ATCGTAT A TTC	-79
24	ZCP4_1387	hypothetical protein	<u>GAA</u> A GTATTGAGAAC	-66
25	ZCP4_0105	exonuclease RecJ	<u>GTT</u> C TTTATCT C TTC	-60
26	ZCP4_0106	GTP cyclohydrolase I		-104
27	ZCP4_0824	Formate-tetrahydrofolate ligase	<u>GTT</u> C CAACCCTGTT I	-253
28	ZCP4_0788	drug resistance transporter. Bcr/CflA subfamily	<u>GG</u> A CAATTAAGAAC	-54
29	ZCP4_1433	serine O-acetyltransferase	i) <u>GAA</u> G CCTTGT C GAAC ii) <u>TTT</u> C TAAAACCG T TC	i)-43 ii)-190
30	ZCP4_0217	NADH dehydrogenase. FAD-containing subunit	<u>GTT</u> C TTCGTTAGTT A	-96
31	ZCP4_0218	intracellular septation protein A		-184
32	ZCP4_0134	ribose-5-phosphate isomerase	<u>GAA</u> A TGCTTAAGAAC	-107
33	ZCP4_1615	Fe ²⁺ transport system protein A	<u>GAAC</u> A GGATA A TAAC	-16
34	ZCP4_1616	DNA polymerase III, alpha subunit		-251
35	ZCP4_1584	short-chain alcohol dehydrogenase	<u>GAAC</u> C GGAAATG A GC	-103
36	ZCP4_1228	glucose-inhibited division protein A	T TTCTCTCTCTG T TC	-138

5. Παράρτημα

37	ZCP4_1227	gluconolactonase		-260
38	ZCP4_1011	ATP synthase F1 subcomplex delta subunit	<u>GAACCGGGACGGAA</u> T	-53
39	ZCP4_1013	periplasmic serine protease. Do/DeqQ family	A <u>TTCAAAAAAGG</u> TTC	-220
40	ZCP4_1012	ATPase involved in chromosome partitioning		-331
41	ZCP4_0895	ATP-dependent proteinase		-68
42	ZCP4_0894	HhH-GPD superfamily base excision DNA repair protein	<u>GAACCCAGAAAG</u> A T C	-142
43	ZCP4_1568	Excinuclease ABC subunit A	i) <u>GAACGGTAGCAGA</u> A T ii) <u>GAACAAAGGGGGA</u> A T	i)-166 ii)-94
44	ZCP4_1211	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	<u>GAACAGGAATAG</u> A G C	-70
45	ZCP4_1519	hypothetical protein	A <u>TTCATCTTGGG</u> TTC	-114
46	ZCP4_0604	putative dehydrogenase	<u>GAACCATGACGG</u> A T C	-55
47	ZCP4_1097	pyridoxal phosphate enzyme YggS family	T <u>TTTCGGGCTTTG</u> TTC	-54
48	ZCP4_1098	protein tyrosine phosphatase		-300
49	ZCP4_1046	SOS-response transcriptional repressor LexA	<u>GTT</u> T <u>CCTACACG</u> TTC	-108
50	ZCP4_0119	hypothetical protein	<u>GAACCGTATCCG</u> A C C	-34
51	ZCP4_0622	FOF1-type ATP synthase. beta subunit	T <u>TTTCAGCCGGT</u> G TTC	-84
52	ZCP4_1394	aminopeptidase N	<u>GTT</u> A <u>AAGATAGG</u> TTC	-187
53	ZCP4_1395	hypothetical protein		-283
54	ZCP4_1551	septum formation initiator	<u>GTC</u> C <u>CCTGATTCG</u> TTC	-56
55	ZCP4_1539	DNA primase	<u>GCT</u> C <u>CTTTTTG</u> TTC	-209
56	ZCP4_1415	flavodoxin reductase family protein	<u>GAACAATAAAGG</u> A T C	-117
56	ZCP4_0485	16S rRNA (cytosine(1402)-N(4))-methyltransferase	<u>GAAC</u> T <u>TTCATTCG</u> A G C	-299
58	ZCP4_0601	peroxiredoxin. Ohr subfamily	<u>GCT</u> C <u>TTCAGGC</u> G TTC	-114
Πλασμιδιακά γονίδια (σε παρένθεση ο κωδικός GenBank του πλασμιδίου)				
1	ZCP4_RS09280 (NC_022902)	hypothetical	A <u>TTCTGTCTATG</u> TTC	-289
2	ZCP4_RS09275 (NC_022902)	hypothetical		-298
3	ZCP4_RS09420 (NC_022903)	transposase	<u>GTTCCCATGTGGG</u> TTC	-68
4	ZCP4_RS09415 (NC_022903)	IS5 family transposase	G <u>TTTTGAGGT</u> C <u>G</u> TTC	-227
5	ZCP4_RS09410 (NC_022903)	hypothetical		-245
6	ZCP4_RS09525 (NC_022910)	autotransporter-associated beta strand repeat	<u>GTT</u> C <u>ATATCGG</u> T TTC	-119
7	ZCP4_RS09540 (NC_022910)	alpha/beta hydrolase	<u>GTT</u> G <u>AATATCTG</u> TTC	-88
8	ZCP4_RS09685 (NC_022910)	hypothetical	<u>GTT</u> G <u>AACAAGT</u> G TTC	-10
9	ZCP4_RS09225 (NC_022913)	efflux transporter RND family MFP subunit	<u>GTT</u> G <u>ACAAATTG</u> TTC	-61

Υπογραμμίζονται όλα τα τετρανουκλεοτίδια *GTTC* και *GAAC* από τα μοτίβα *GTTCN₇GTTC* και *GAACN₇GAAC* και με κόκκινα γράμματα υποδηλώνονται οι νουκλεοτιδικές αλλαγές σε σύγκριση με το τέλειο μοτίβο. *d*: η απόσταση ανοδικά του κωδικονίου μεταφραστικής έναρξης του εκάστοτε γονιδίου μέχρι το πρώτο νουκλεοτίδιο από το πιθανό μοτίβο (το + υποδηλώνει θέση μοτίβου καθοδικά της μεταφραστικής έναρξης). Στα κελιά που ένα μοτίβο αντιστοιχεί σε δύο γονίδια, υποδηλώνεται ότι τα δύο γονίδια είναι αντιδιαμετρικά και φέρουν κοινό μοτίβο στην κοινή διαγονιδιακή τους θέση.

5. Παράρτημα

Πίνακας 5.2. Προβλεπόμενα γονίδια στο χρωμόσωμα του CP4 των οποίων μετάγραφα δεν βρέθηκαν στις RNASeq βιβλιοθήκες των CP4 και UA1

Υποθετικές πρωτεΐνες		Ψευδογονίδια		Γονίδια προβλεπόμενων πρωτεϊνών	
Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Locus tag	Προϊόν γονιδίου
ZCP4_0053	hypothetical protein	ZCP4_0360	pseudo	ZCP4_1113	Cys-tRNA(Pro) deacylase
ZCP4_0080	hypothetical protein	ZCP4_0361	pseudo	ZCP4_1348	ferredoxin III, nif-specific
ZCP4_0117	hypothetical protein	ZCP4_0565	pseudo	ZCP4_0656	flagellar hook-basal body complex protein FliE
ZCP4_0129	hypothetical protein			ZCP4_1346	Iron-sulfur cluster assembly accessory protein
ZCP4_0174	hypothetical protein			ZCP4_1355	Mo-nitrogenase iron protein subunit NifH
ZCP4_0244	hypothetical protein			ZCP4_1347	NifQ family protein
ZCP4_0255	hypothetical protein			ZCP4_1342	Nitrogen fixation protein NifW
ZCP4_0348	hypothetical protein			ZCP4_1285	protein translocase subunit yajC
ZCP4_0383	hypothetical protein				
ZCP4_0387	hypothetical protein				
ZCP4_0398	hypothetical protein				
ZCP4_0414	hypothetical protein				
ZCP4_0419	hypothetical protein				
ZCP4_0508	hypothetical protein				
ZCP4_0594	hypothetical protein				
ZCP4_0687	hypothetical protein				
ZCP4_0793	hypothetical protein				
ZCP4_0839	hypothetical protein				
ZCP4_0887	hypothetical protein				
ZCP4_0888	hypothetical protein				
ZCP4_0899	hypothetical protein				
ZCP4_0957	arylsulfate sulfotransferase-like protein				
ZCP4_0988	hypothetical protein				
ZCP4_1027	hypothetical protein				
ZCP4_1049	hypothetical protein				
ZCP4_1051	hypothetical protein				
ZCP4_1101	Sell repeat-containing protein				
ZCP4_1102	Sell repeat-containing protein				
ZCP4_1144	hypothetical protein				
ZCP4_1177	hypothetical protein				
ZCP4_1225	putative oxidoreductase				
ZCP4_1345	thioredoxin-like protein				
ZCP4_1349	putative nitrogen fixation protein				
ZCP4_1358	probable nitrogen fixation protein				
ZCP4_1526	hypothetical protein				
ZCP4_1535	putative membrane protein				

5. Παράρτημα

ZCP4_1540	hypothetical protein				
ZCP4_1668	hypothetical protein				
ZCP4_1762	hypothetical protein				
ZCP4_1763	hypothetical protein				
ZCP4_RS09625	hypothetical protein				

Πίνακας 5.3. Προβλεπόμενα γονίδια στα πλασμίδια του CP4 των οποίων μετάγραφα δεν βρέθηκαν στις RNaseq βιβλιοθήκες των CP4 και UA1

Υποθετικά γονίδια			Γονίδια προβλεπόμενων πρωτεϊνών		
Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Κατάθεση πλασμιδίου	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Κατάθεση πλασμιδίου
ZCP4_RS08885	hypothetical	NC_022901	ZCP4_RS09030	phage tail protein I	NC_022901
ZCP4_RS08895	hypothetical	NC_022901	ZCP4_RS09080	small terminase subunit	NC_022901
ZCP4_RS08935	hypothetical	NC_022901	ZCP4_RS09070	tail X family protein	NC_022901
ZCP4_RS09285	hypothetical	NC_022902			
ZCP4_RS09320	hypothetical	NC_022902			
ZCP4_RS09345	hypothetical	NC_022902			
ZCP4_RS09390	hypothetical	NC_022903			
ZCP4_RS09395	hypothetical	NC_022903			
ZCP4_RS09535	hypothetical	NC_022910			
ZCP4_RS09685	hypothetical	NC_022910			
ZCP4_RS09590	hypothetical	NC_022910			
ZCP4_RS09605	hypothetical	NC_022910			

5. Παράρτημα

Πίνακας 5.4. Οι λόγοι έκφρασης των γονιδίων του UA1 σε τρεις συγκεντρώσεις του MMS που δοκιμάστηκαν στα πλαίσια της μεταγραφωματικής ανάλυσης

Locus Tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)		
		0.05	0.1	0.2
ZCP4_0001	chromosomal replication initiation protein	-1,00	-1,01	-1,01
ZCP4_0002	ABC transporter related protein	1,02	-1,02	1,00
ZCP4_0003	OmpA/MotB domain protein	1,01	1,04	1,03
ZCP4_0004	hypothetical protein	1,01	1,03	1,04
ZCP4_0005	hypothetical protein	1,03	1,04	1,06
ZCP4_0006	Carboxymethylenebutenolidase	1,03	1,01	-1,01
ZCP4_0007	molybdopterin binding domain protein	1,08	1,06	1,05
ZCP4_0008	methionine aminopeptidase, type I	-1,04	1,01	-1,01
ZCP4_0009	aromatic amino acid beta-eliminating lyase/threonine aldolase	-1,02	-1,04	1,02
ZCP4_0010	hypothetical protein	-1,03	1,01	1,03
ZCP4_0011	aminopeptidase N	1,03	1,02	1,03
ZCP4_0012	aldo/keto reductase	1,01	1,03	-1,06
ZCP4_0014	hypothetical protein	1,05	1,06	1,06
ZCP4_0015	major facilitator superfamily MFS_1	1,26	1,21	1,08
ZCP4_0016	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	-1,03	1,04	1,03
ZCP4_0017	hydroquinone detoxification protein	1,28	1,14	1,22
ZCP4_0018	transcriptional activator of hydroquinone detoxification gene	1,19	1,03	1,11
ZCP4_0019	TrpR binding protein WrbA	-1,00	1,04	1,06
ZCP4_0020	YceI family protein	1,03	1,01	-1,01
ZCP4_0021	MscS Mechanosensitive ion channel	-1,01	-1,01	1,03
ZCP4_0022	NAD(+) kinase	-1,02	1,00	-1,05
ZCP4_0023	tRNA/rRNA methyltransferase (SpoU)	1,12	1,03	-1,01
ZCP4_0024	phosphocarrier, HPr family	1,16	1,05	1,10
ZCP4_0025	PTS fructose transporter subunit IIA	1,15	1,07	1,08
ZCP4_0026	hypothetical protein	1,04	1,02	-1,03
ZCP4_0027	HPr kinase	1,04	1,06	1,02
ZCP4_0028	histidine kinase related to acid and other stresses	-1,10	-1,08	-1,05
ZCP4_0029	two-component response regulator for acid and other stresses	-1,02	-1,04	-1,05
ZCP4_0030	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	1,01	1,02	1,01
ZCP4_0031	Fmu (Sun) domain protein	1,02	-1,01	1,01
ZCP4_0032	outer membrane-related protein	-1,01	1,00	1,09
ZCP4_0033	conserved predicted protein with nucleoside triphosphate hydrolase domain	-1,02	1,01	1,03
ZCP4_0034	Nucleotide kinase-like enzyme affecting the cell wall	1,04	1,00	-1,03
ZCP4_0035	polysaccharide biosynthesis protein	1,08	1,01	-1,06
ZCP4_0036	hypothetical protein	1,01	-1,01	1,02
ZCP4_0037	dimethyladenosine transferase	-1,04	1,03	-1,05
ZCP4_0038	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	1,05	1,06	1,05
ZCP4_0039	PpiC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-1,00	1,01	1,01
ZCP4_0040	Organic solvent tolerance protein	-1,06	-1,03	1,02
ZCP4_0041	leucyl aminopeptidase	1,08	1,03	1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_0042	DNA polymerase III subunit chi	1,11	-1,02	-1,03
ZCP4_0043	hydro-lyase, Fe-S type, tartrate/fumarate subfamily, alpha subunit	-1,01	-1,01	-1,02
ZCP4_0044	hemolysin A	1,00	1,07	1,08
ZCP4_0045	hypothetical protein	-1,02	1,02	-1,03
ZCP4_0046	Protein of unknown function DUF1790	1,02	-1,03	-1,01
ZCP4_0047	pyrroline-5-carboxylate reductase	1,07	1,01	1,06
ZCP4_0048	lipoate-protein ligase B	1,16	-1,05	1,06
ZCP4_0049	TonB-dependent receptor plug	-1,02	-1,02	-1,04
ZCP4_0050	hypothetical protein	1,03	1,00	1,01
ZCP4_0051	organic radical activating-like protein	1,08	-1,00	-1,04
ZCP4_0052	N-acetylmuramic acid-6-phosphate etherase	1,04	1,05	1,01
ZCP4_0054	peptidase S10 serine carboxypeptidase	1,07	1,03	-1,01
ZCP4_0055	Transglycosylase-associated protein	1,45	1,00	-1,20
ZCP4_0056	major facilitator superfamily MFS_1	-1,00	1,12	1,00
ZCP4_0057	sorbitol dehydrogenase small subunit	-1,07	-1,07	1,08
ZCP4_0058	glucose-methanol-choline oxidoreductase	-1,10	-1,04	-1,03
ZCP4_0059	cytochrome c, mono- and diheme variants family	-1,06	1,07	-1,09
ZCP4_0060	transcriptional regulator, LacI family	1,02	-1,00	1,03
ZCP4_0061	acyl carrier protein	1,00	-1,01	1,00
ZCP4_0062	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase 2	1,04	-1,00	1,05
ZCP4_0063	aminodeoxychorismate lyase	1,02	1,00	1,01
ZCP4_0064	hypothetical protein	-1,08	1,01	-1,09
ZCP4_0065	threonine dehydratase	1,03	-1,01	1,01
ZCP4_0066	Amidohydrolase 3	1,02	1,04	-1,04
ZCP4_0067	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	1,03	1,07	1,01
ZCP4_0068	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	1,05	1,06	1,16
ZCP4_0069	8-amino-7-oxononanoate synthase	1,02	1,00	-1,02
ZCP4_0070	hypothetical protein (NCBI)	1,09	1,11	-1,00
ZCP4_0071	hypothetical protein	1,06	1,20	-1,00
ZCP4_0072	GMP synthetase	1,05	1,02	1,01
ZCP4_0073	Protein of unknown function DUF1847	-1,05	-1,07	-1,04
ZCP4_0074	Mandelate racemase/muconate lactonizing protein	1,17	1,06	1,04
ZCP4_0075	aliphatic sulfonate ABC transporter ATP-binding protein	1,18	1,21	1,06
ZCP4_0076	binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	-1,11	1,18	-1,07
ZCP4_0077	extracellular solute-binding protein family 3	-1,00	1,02	-1,02
ZCP4_0078	TonB-dependent receptor	-1,02	1,09	1,10
ZCP4_0079	heme exporter protein CcmC	1,10	1,05	1,00
ZCP4_0081	CcmE/CycJ protein	1,04	1,02	-1,03
ZCP4_0082	cytochrome c assembly protein	-1,03	-1,05	-1,06
ZCP4_0083	Redoxin domain protein	1,21	-1,03	1,12
ZCP4_0084	cytochrome C biogenesis protein	-1,00	-1,14	-1,09
ZCP4_0085	cytochrome c biogenesis factor-like protein	1,01	1,02	-1,04
ZCP4_0086	hypothetical protein	-1,02	1,04	-1,03
ZCP4_0087	hypothetical protein	-1,03	1,03	1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_0088	hypothetical protein	1,02	1,12	1,09
ZCP4_0089	50S ribosomal protein L36P	1,34	-1,05	1,12
ZCP4_0090	hypothetical protein	1,00	1,02	-1,06
ZCP4_0091	peptidase M14 carboxypeptidase A	-1,08	-1,05	-1,04
ZCP4_0092	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	1,06	1,05	1,02
ZCP4_0093	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding protein	1,03	1,13	1,20
ZCP4_0094	zinc-dependent alcohol dehydrogenase	1,00	1,01	1,06
ZCP4_0095	ferric uptake regulator, Fur family	1,02	1,00	1,03
ZCP4_0096	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	1,02	1,02	-1,01
ZCP4_0097	mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase	1,01	1,02	1,02
ZCP4_0098	glycosyl transferase	1,03	-1,03	1,42
ZCP4_0099	ABC transporter	1,04	-1,06	1,04
ZCP4_0100	hypothetical protein	-1,15	-1,12	-1,03
ZCP4_0101	hypothetical protein	-1,23	-1,28	1,10
ZCP4_0102	nucleoside-diphosphate sugar epimerase	-1,21	-1,18	1,07
ZCP4_0103	GDP-mannose 4,6-dehydratase	-1,01	1,01	1,09
ZCP4_0105	single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ	1,10	1,02	-1,03
ZCP4_0106	GTP cyclohydrolase I	1,02	-1,03	-1,04
ZCP4_0107	Mandelate racemase/muconate lactonizing protein	1,02	-1,06	-1,04
ZCP4_0108	50S ribosomal protein L9	1,09	1,05	1,02
ZCP4_0109	30S ribosomal protein S18	-1,02	1,01	1,02
ZCP4_0110	30S ribosomal protein S6	1,10	1,05	1,08
ZCP4_0111	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	-1,00	-1,04	-1,00
ZCP4_0112	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	-1,01	1,03	1,03
ZCP4_0113	hypothetical protein	-1,01	-1,01	1,01
ZCP4_0114	twin arginine translocase protein A	-1,01	1,00	-1,03
ZCP4_0115	twin-arginine translocation protein, TatB subunit	-1,00	-1,00	-1,02
ZCP4_0116	Sec-independent protein translocase, TatC subunit	-1,21	-1,06	-1,04
ZCP4_0118	signal transduction histidine kinase	1,05	1,05	1,14
ZCP4_0119	hypothetical protein	1,05	1,05	1,16
ZCP4_0120	DEAD/DEAH box helicase domain protein	1,01	1,01	1,00
ZCP4_0121	hypothetical protein	1,31	1,18	-1,28
ZCP4_0122	glucose-6-phosphate isomerase	1,01	-1,01	1,01
ZCP4_0123	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase dimerization region	-1,03	1,01	1,00
ZCP4_0125	potassium transporter Kup	1,02	-1,02	-1,01
ZCP4_0127	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase	1,14	1,08	1,07
ZCP4_0128	transcriptional activator of secretion-related protein zliE	1,10	1,19	-1,01
ZCP4_0130	hypothetical protein	-1,04	1,13	-1,01
ZCP4_0131	RNA methyltransferase, TrmH family, group 1	-1,06	-1,05	-1,04
ZCP4_0132	transcriptional regulator NrdR	-1,04	-1,03	-1,01
ZCP4_0133	serine hydroxymethyltransferase	-1,03	-1,06	-1,03
ZCP4_0134	sugar-phosphate isomerase, RpiB/LacA/LacB family	-1,04	-1,05	1,02
ZCP4_0135	5-aminolevulinic acid synthase	1,03	1,01	1,02
ZCP4_0136	glutamate racemase	-1,03	-1,05	-1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_0137	major facilitator superfamily MFS_1	1,02	-1,03	-1,03
ZCP4_0138	hypothetical protein	1,00	1,01	-1,03
ZCP4_0139	DNA protecting protein DprA	-1,04	1,00	-1,00
ZCP4_0140	DNA topoisomerase I	1,01	1,01	1,02
ZCP4_0141	UBA/THIF-type NAD/FAD binding protein	1,07	1,07	1,05
ZCP4_0142	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase Dut	-1,01	-1,06	-1,02
ZCP4_0143	bifunctional phosphopantothencysteine decarboxylase/phosphopantothenate synthase	-1,10	-1,04	1,02
ZCP4_0144	2-polyprenylphenol 6-hydroxylase	-1,09	-1,07	-1,01
ZCP4_0145	ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase	-1,10	-1,04	-1,04
ZCP4_0147	formamidopyrimidine-DNA glycosylase	1,00	-1,02	1,05
ZCP4_0148	Lytic transglycosylase catalytic	-1,09	-1,01	1,02
ZCP4_0149	Uracil-DNA glycosylase superfamily	-1,36	-1,29	-1,09
ZCP4_0150	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	-1,05	-1,05	-1,00
ZCP4_0151	TPR repeat-containing protein	-1,10	-1,08	1,00
ZCP4_0152	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	-1,03	1,04	1,03
ZCP4_0153	N-formylglutamate amidohydrolase	-1,02	1,06	1,00
ZCP4_0154	carbohydrate kinase, YjeF related protein	1,05	1,03	1,04
ZCP4_0155	(Uracil-5)-methyltransferase	-1,07	-1,07	-1,06
ZCP4_0156	Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	-1,03	1,06	1,01
ZCP4_0157	two component transcriptional regulator, winged helix family	1,03	-1,03	1,01
ZCP4_0158	histidine kinase	1,09	1,06	1,08
ZCP4_0159	surface antigen (D15)	-1,02	-1,01	-1,02
ZCP4_0160	hypothetical protein	-1,01	1,00	-1,02
ZCP4_0161	succinylarginine dihydrolase	1,06	1,07	1,03
ZCP4_0162	Beta-N-acetylhexosaminidase	1,12	1,10	1,05
ZCP4_0163	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	-1,03	1,10	1,00
ZCP4_0164	ATPase BadF/BadG/BcrA/BcrD type	1,08	1,06	-1,03
ZCP4_0165	peptidase S15	1,06	1,05	1,09
ZCP4_0166	recombinase A	1,04	1,04	1,02
ZCP4_0167	amidophosphoribosyltransferase	1,01	-1,05	-1,12
ZCP4_0168	two component transcriptional regulator PhoB, winged helix family	-1,02	-1,01	-1,00
ZCP4_0169	phosphate uptake regulator, PhoU	-1,07	1,02	-1,05
ZCP4_0170	histidine kinase	-1,06	-1,02	-1,03
ZCP4_0171	phosphatidylserine decarboxylase	-1,03	-1,03	1,02
ZCP4_0172	CDP-diacylglycerol/serine O-phosphatidyltransferase	-1,02	1,00	1,00
ZCP4_0173	hypothetical protein	-1,24	-1,20	1,01
ZCP4_0175	30S ribosomal protein S2	-1,02	-1,01	-1,02
ZCP4_0176	elongation factor Ts	-1,02	-1,04	-1,03
ZCP4_0177	UMP kinase	-1,03	-1,04	1,01
ZCP4_0178	ribosome recycling factor	-1,01	-1,03	-1,02
ZCP4_0179	undecaprenyl pyrophosphate synthase	-1,00	1,01	1,02
ZCP4_0180	phosphatidate cytidyltransferase	-1,03	-1,04	-1,03
ZCP4_0181	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	1,02	1,00	-1,03
ZCP4_0182	membrane-associated zinc metalloprotease	1,06	1,05	1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_0183	outer membrane protein assembly complex, YaeT protein	1,01	1,03	1,00
ZCP4_0184	outer membrane chaperone Skp (OmpH)	-1,00	1,01	1,03
ZCP4_0185	beta-hydroxyacyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase FabZ	-1,01	1,03	-1,01
ZCP4_0186	50S ribosomal protein L31	1,02	-1,03	-1,03
ZCP4_0187	VanZ family protein	1,05	1,17	1,16
ZCP4_0188	chloramphenicol acetyltransferase	1,17	-1,05	1,07
ZCP4_0189	thioredoxin reductase	-1,02	1,03	1,04
ZCP4_0190	ketol-acid reductoisomerase	1,03	-1,02	-1,00
ZCP4_0191	acetolactate synthase 3 regulatory subunit	-1,07	-1,11	-1,03
ZCP4_0192	acetolactate synthase, large subunit, biosynthetic type	-1,01	-1,04	1,01
ZCP4_0193	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase	1,04	1,05	1,03
ZCP4_0194	phosphoserine phosphatase SerB	1,05	1,03	-1,00
ZCP4_0195	Cytochrome-c peroxidase	1,02	1,01	1,03
ZCP4_0196	peptidase U62 modulator of DNA gyrase	-1,05	1,01	-1,05
ZCP4_0197	hypothetical protein	1,15	1,14	1,18
ZCP4_0198	Carbonate dehydratase	1,00	1,05	1,09
ZCP4_0199	lipoyl synthase	1,05	1,03	1,01
ZCP4_0200	cyclase/dehydrase	1,02	1,04	1,01
ZCP4_0201	CinA domain protein	1,04	1,09	1,07
ZCP4_0202	hypothetical protein	-1,01	1,02	1,05
ZCP4_0203	bifunctional enzyme IspD/IspF	1,05	1,01	1,01
ZCP4_0204	TIM-barrel protein, nifR3 family	-1,01	1,00	-1,01
ZCP4_0206	histidine kinase	-1,00	1,00	1,01
ZCP4_0207	two component, sigma54 specific, transcriptional regulator, Fis family	1,00	-1,02	-1,03
ZCP4_0209	integration host factor, alpha subunit	1,02	1,04	-1,04
ZCP4_0210	transcriptional regulator, MerR family	1,05	1,04	1,08
ZCP4_0211	Glutathione S-transferase domain protein	1,06	1,02	1,06
ZCP4_0212	Glutamate synthase (ferredoxin)	1,05	-1,01	-1,05
ZCP4_0213	putative oxidoreductase	1,05	-1,04	-1,04
ZCP4_0214	undecaprenol kinase	1,11	1,13	1,06
ZCP4_0216	phage SPO1 DNA polymerase-related protein	-1,05	1,06	1,03
ZCP4_0217	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	1,01	1,03	1,03
ZCP4_0218	intracellular septation protein A	1,07	1,04	1,02
ZCP4_0219	major facilitator superfamily MFS_1	-1,01	1,07	-1,00
ZCP4_0220	hypothetical protein	1,00	1,04	1,05
ZCP4_0221	transcriptional regulator, AsnC family	1,00	-1,01	-1,01
ZCP4_0222	histidine kinase	1,04	1,01	1,06
ZCP4_0224	histidine kinase	1,10	1,01	1,05
ZCP4_0225	hypothetical protein	1,01	1,02	-1,03
ZCP4_0226	Nucleotidyl transferase	-1,03	1,03	-1,03
ZCP4_0227	double-strand break repair protein AddB	-1,05	-1,01	-1,01
ZCP4_0228	double-strand break repair helicase AddA	1,08	1,07	1,03
ZCP4_0229	thioredoxin	1,07	1,18	1,04
ZCP4_0230	ribonuclease R	1,04	1,03	1,03

5. Παράρτημα

ZCP4_0231	nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase	-1,23	-1,10	1,03
ZCP4_0232	beta-lactamase domain protein	-1,02	1,01	1,03
ZCP4_0233	hydrolase, TatD family	1,05	1,08	1,03
ZCP4_0234	methionyl-tRNA synthetase	-1,01	1,00	1,03
ZCP4_0235	DNA polymerase III, delta prime subunit	-1,02	1,02	1,06
ZCP4_0236	dTMP kinase	-1,00	1,02	1,01
ZCP4_0237	Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	1,01	1,02	-1,00
ZCP4_0238	rare lipoprotein A	-1,13	-1,09	-1,02
ZCP4_0239	lytic murein transglycosylase	-1,00	1,08	1,05
ZCP4_0240	Cellulase	1,03	1,05	-1,04
ZCP4_0241	cellulose synthase operon C domain protein	1,03	-1,01	1,03
ZCP4_0242	cellulose synthase regulator protein	1,05	1,03	-1,02
ZCP4_0243	cellulose synthase catalytic subunit (UDP-forming)	1,08	1,05	1,07
ZCP4_0245	hypothetical protein	-1,07	-1,06	-1,03
ZCP4_0246	hypothetical protein	1,04	-1,02	-1,19
ZCP4_0247	50S ribosomal protein L19	1,02	1,03	-1,02
ZCP4_0248	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	-1,01	-1,02	1,04
ZCP4_0249	16S rRNA processing protein RimM	-1,03	-1,03	-1,06
ZCP4_0250	30S ribosomal protein S16	1,02	1,02	-1,04
ZCP4_0251	signal recognition particle protein	-1,05	-1,07	-1,08
ZCP4_0252	diaminopimelate epimerase	-1,04	-1,02	-1,05
ZCP4_0253	MiaB-like tRNA modifying enzyme	-1,02	-1,05	-1,03
ZCP4_0254	signal recognition particle-docking protein FtsY	1,05	1,02	-1,01
ZCP4_0257	heat shock protein DnaJ domain protein	1,12	1,11	1,01
ZCP4_0258	hypothetical protein	1,06	1,01	1,02
ZCP4_0259	Fe-S metabolism associated SufE	-1,01	1,00	-1,09
ZCP4_0260	hypothetical protein	-1,06	-1,08	1,00
ZCP4_0261	phage shock protein C, PspC	-1,40	-1,00	-1,03
ZCP4_0262	phage shock protein B	-1,07	-1,07	-1,11
ZCP4_0263	phage shock protein A, PspA	1,11	1,06	1,13
ZCP4_0264	hypothetical protein	-1,05	1,06	1,17
ZCP4_0265	sigma54 specific transcriptional activator, PspF, Fis family	-1,05	1,02	-1,08
ZCP4_0266	Superoxide dismutase	1,03	1,08	1,02
ZCP4_0267	dihydroneopterin aldolase	-1,01	-1,01	-1,16
ZCP4_0268	GCN5-related N-acetyltransferase	1,11	1,02	1,06
ZCP4_0269	Polynucleotide adenyltransferase region	-1,00	-1,02	1,01
ZCP4_0270	diguanylate cyclase/phosphodiesterase	1,04	1,02	1,02
ZCP4_0271	DNA topoisomerase IV subunit A	-1,03	-1,00	-1,00
ZCP4_0272	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	1,03	1,03	1,01
ZCP4_0273	phosphate ABC transporter, ATPase subunit	1,02	1,01	-1,05
ZCP4_0274	phosphate ABC transporter, inner membrane subunit PstA	1,02	1,01	1,00
ZCP4_0275	phosphate ABC transporter, inner membrane subunit PstC	-1,02	-1,05	1,02
ZCP4_0276	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein	1,06	1,07	1,05
ZCP4_0277	phosphate-selective porin O and P	1,03	1,06	-1,11

5. Παράρτημα

ZCP4_0278	large conductance mechanosensitive channel protein	1,02	-1,00	1,02
ZCP4_0279	LemA family protein	-1,00	1,02	1,04
ZCP4_0280	hypothetical protein	-1,00	1,01	1,02
ZCP4_0281	NUDIX hydrolase	-1,00	-1,06	-1,06
ZCP4_0283	TonB-dependent receptor	1,04	-1,02	-1,03
ZCP4_0284	ribonucleoside-diphosphate reductase, alpha subunit	-1,08	-1,10	-1,16
ZCP4_0286	argininosuccinate synthase	1,00	-1,05	-1,04
ZCP4_0287	Calcium-binding EF-hand-containing protein	-1,12	-1,02	-1,09
ZCP4_0288	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	-1,02	1,05	-1,02
ZCP4_0289	radical SAM enzyme, Cfr family	1,02	1,05	-1,00
ZCP4_0290	hypothetical protein	-1,05	-1,01	-1,07
ZCP4_0291	ABC transporter related protein	-1,03	-1,02	-1,01
ZCP4_0292	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein	-1,01	1,03	1,02
ZCP4_0293	hypothetical protein	1,00	1,14	1,05
ZCP4_0294	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	-1,01	-1,03	-1,04
ZCP4_0295	exsB protein	1,09	1,08	1,06
ZCP4_0296	Cysteine desulfurase	1,00	-1,01	1,00
ZCP4_0297	alpha/beta fold family hydrolase-like protein	-1,04	1,00	-1,03
ZCP4_0298	Orn/DAP/Arg decarboxylase 2	1,00	1,01	1,02
ZCP4_0299	deoxyhypusine synthase-like protein	1,03	1,03	1,01
ZCP4_0300	permease component of cell envelope-related ABC transporter	1,08	-1,02	1,00
ZCP4_0301	ATP-binding component of cell envelope-related ABC transporter	1,07	1,04	1,07
ZCP4_0302	periplasmic component of cell envelope-related ABC transporter	1,02	-1,01	-1,03
ZCP4_0303	DUF330, putative component of cell envelope-related ABC transporter	-1,06	-1,01	-1,02
ZCP4_0304	translation initiation factor IF-1	-1,01	-1,04	-1,02
ZCP4_0305	maf protein	1,09	1,04	1,15
ZCP4_0306	hypothetical protein	-1,01	-1,06	-1,01
ZCP4_0307	hypothetical protein	1,36	1,01	1,14
ZCP4_0309	hypothetical protein	1,17	1,13	1,15
ZCP4_0310	SapC family protein	1,03	1,02	-1,02
ZCP4_0311	FAD linked oxidase domain protein	1,05	1,02	1,04
ZCP4_0312	hypothetical protein	-1,01	1,05	1,08
ZCP4_0313	dihydropteroate synthase	-1,01	-1,01	1,00
ZCP4_0314	DNA methylase N-4/N-6 domain protein	1,06	1,06	1,04
ZCP4_0315	Ribonuclease H	1,01	-1,02	-1,02
ZCP4_0316	phosphomethylpyrimidine kinase	1,03	1,02	1,00
ZCP4_0317	phosphoglucosamine mutase	1,09	1,02	1,02
ZCP4_0318	amino acid/peptide transporter	1,13	1,03	-1,12
ZCP4_0319	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine S-methyltransferase	-1,01	1,01	1,01
ZCP4_0320	Sua5/YciO/YrdC/YwC family protein	-1,07	-1,01	-1,16
ZCP4_0321	peptide methionine sulfoxide reductase	1,08	1,07	1,07
ZCP4_0322	2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase	1,07	1,05	1,02
ZCP4_0323	MscS Mechanosensitive ion channel	1,04	1,01	1,01
ZCP4_0324	hypothetical protein	1,00	1,03	1,05

5. Παράρτημα

ZCP4_0325	peptidase S10 serine carboxypeptidase	1,05	-1,01	-1,01
ZCP4_0326	heat shock protein Hsp20	1,06	1,08	1,20
ZCP4_0327	hypothetical protein	-1,00	1,01	1,14
ZCP4_0329	transcriptional regulator, TraR/DksA family	-1,01	-1,00	-1,12
ZCP4_0330	seryl-tRNA synthetase	-1,02	-1,01	-1,01
ZCP4_0331	stationary phase survival protein SurE	-1,01	-1,01	1,02
ZCP4_0332	Peptidase M23	-1,02	-1,02	-1,01
ZCP4_0333	inner membrane component of cell envelope ABC transporter	1,01	-1,01	1,01
ZCP4_0334	inner membrane component of cell envelope-related ABC transporter	-1,04	1,01	1,03
ZCP4_0335	ATPase component of cell envelope-related ABC transporter	-1,08	-1,03	-1,11
ZCP4_0336	DNA polymerase III subunit beta	1,01	1,00	-1,01
ZCP4_0337	TonB-dependent receptor	1,04	1,06	1,04
ZCP4_0338	periplasmic binding protein	1,15	-1,04	1,05
ZCP4_0339	aldo/keto reductase	1,00	1,02	1,04
ZCP4_0341	conserved hypothetical membrane spanning protein	1,07	1,03	-1,00
ZCP4_0342	hopanoid biosynthesis associated protein HpnK	1,02	1,01	1,02
ZCP4_0343	hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnJ	-1,00	1,01	1,01
ZCP4_0344	hopanoid biosynthesis associated glycosyl transferase protein HpnI	1,00	1,02	1,01
ZCP4_0345	adenosine deaminase	1,01	1,03	1,02
ZCP4_0346	purine nucleoside permease	1,04	1,02	1,04
ZCP4_0347	Xanthine/uracil/vitamin C permease	1,04	1,03	-1,02
ZCP4_0349	Na ⁺ dependent nucleoside transporter domain protein	1,22	1,02	-1,00
ZCP4_0350	MFS transporter	1,01	1,00	-1,00
ZCP4_0351	efflux pump membrane protein	-1,00	-1,03	1,00
ZCP4_0352	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	1,00	-1,01	-1,04
ZCP4_0353	transcriptional regulator, TetR family	1,06	-1,03	-1,02
ZCP4_0354	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	1,02	1,02	-1,04
ZCP4_0355	cytochrome c class I	1,04	1,13	1,08
ZCP4_0356	monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylase	1,04	-1,06	1,02
ZCP4_0357	cytochrome c I	-1,03	1,05	-1,01
ZCP4_0358	Cytochrome b/b6 domain protein	1,11	1,04	1,05
ZCP4_0359	ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit	1,13	-1,01	-1,14
ZCP4_0362	tRNA/rRNA methyltransferase (SpoU)	-1,11	-1,04	-1,02
ZCP4_0363	coproporphyrinogen III oxidase	1,01	1,10	1,08
ZCP4_0364	GCN5-related N-acetyltransferase	-1,08	-1,09	-1,13
ZCP4_0365	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	1,03	1,02	1,03
ZCP4_0366	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	1,01	1,03	1,05
ZCP4_0367	glycosyltransferase involved in cell wall biogenesis	-1,04	-1,02	1,02
ZCP4_0368	trigger factor	-1,02	1,00	-1,02
ZCP4_0370	Aldose 1-epimerase	-1,00	-1,02	-1,08
ZCP4_0372	sucrose-6-phosphate hydrolase	1,07	1,04	1,07
ZCP4_0374	NAD-dependent epimerase/dehydratase	-1,04	1,10	-1,06
ZCP4_0375	transcriptional regulator, MarR family	1,11	1,08	-1,03
ZCP4_0376	guanine deaminase	1,00	1,02	-1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_0377	type I phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase	1,05	-1,05	-1,06
ZCP4_0378	aromatic amino acid aminotransferase	-1,06	1,04	-1,03
ZCP4_0379	hypothetical protein	1,08	1,13	-1,02
ZCP4_0380	Glutathione S-transferase domain protein	-1,05	1,00	-1,01
ZCP4_0381	secretion-related protein	1,15	-1,06	1,02
ZCP4_0382	hypothetical protein	1,55	1,56	1,20
ZCP4_0384	hypothetical protein	1,06	-1,08	1,31
ZCP4_0385	peptidase S58 DmpA	1,20	1,05	1,05
ZCP4_0386	leucyl/phenylalanyl-tRNA--protein transferase	1,03	1,02	1,04
ZCP4_0388	Mammalian cell entry related domain protein	1,06	1,07	1,07
ZCP4_0389	cold-shock DNA-binding domain protein	1,00	1,00	-1,01
ZCP4_0390	preprotein translocase subunit SecA	1,05	1,04	1,03
ZCP4_0391	bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase protein	-1,00	1,04	1,04
ZCP4_0392	helix-turn-helix domain-containing protein	1,02	1,10	1,13
ZCP4_0393	hypothetical protein	-1,00	1,01	1,06
ZCP4_0394	hypothetical protein	-1,07	1,03	1,07
ZCP4_0395	diguanylate cyclase with beta propeller sensor	-1,14	-1,12	-1,03
ZCP4_0396	Catalase	1,02	1,04	1,08
ZCP4_0397	2-nitropropane dioxygenase, NPD	1,05	1,02	1,01
ZCP4_0399	Heavy metal transport/detoxification protein	-1,03	-1,17	1,01
ZCP4_0400	copper-translocating P-type ATPase	1,06	1,05	1,06
ZCP4_0401	Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	1,01	-1,02	1,03
ZCP4_0402	branched-chain amino acid aminotransferase	1,04	-1,01	1,01
ZCP4_0403	hypothetical protein	-1,02	1,01	-1,02
ZCP4_0404	periplasmic protein for capsular polysaccharide export	1,04	-1,02	-1,00
ZCP4_0405	ATPase component of polysaccharide export system	-1,07	1,02	1,06
ZCP4_0406	glycosyl transferase group 1	-1,14	-1,08	-1,06
ZCP4_0407	lipopolysaccharide biosynthesis protein	-1,12	-1,09	-1,01
ZCP4_0409	glycosyl transferase family 2	1,00	-1,01	-1,03
ZCP4_0410	glucan biosynthesis protein D	1,01	1,04	1,03
ZCP4_0411	Beta-galactosidase	-1,02	1,04	-1,03
ZCP4_0412	2-isopropylmalate synthase	1,02	1,05	1,04
ZCP4_0413	TonB-dependent receptor	-1,00	1,02	-1,06
ZCP4_0415	glutamyl-tRNA synthetase	1,04	1,04	1,01
ZCP4_0416	NAD synthetase	1,02	1,02	-1,00
ZCP4_0417	hypothetical protein	1,02	1,04	-1,02
ZCP4_0420	NERD domain protein	-1,02	-1,03	-1,01
ZCP4_0421	beta-lactamase	1,05	1,01	1,06
ZCP4_0422	helicase c2	1,08	-1,02	1,09
ZCP4_0423	lysine--tRNA ligase	1,03	1,01	-1,03
ZCP4_0424	Aldose 1-epimerase	-1,06	-1,02	-1,05
ZCP4_0425	Resolvase domain protein	1,02	-1,01	-1,01
ZCP4_0426	hypothetical protein	1,10	1,12	-1,02
ZCP4_0427	hypothetical protein	1,20	1,04	1,02

5. Παράρτημα

ZCP4_0428	50S ribosomal protein L13	1,02	1,06	1,00
ZCP4_0429	30S ribosomal protein S9	1,06	1,05	1,06
ZCP4_0430	methyl-accepting chemotaxis protein	-1,08	-1,00	1,01
ZCP4_0432	chemotaxis protein	-1,16	-1,11	1,06
ZCP4_0433	chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase	1,00	1,02	1,01
ZCP4_0434	hypothetical protein	-1,03	-1,10	-1,07
ZCP4_0435	hopanoid biosynthesis associated membrane protein HpnM	1,06	1,06	1,04
ZCP4_0436	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	-1,04	-1,03	-1,01
ZCP4_0437	hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnH	1,00	-1,01	-1,03
ZCP4_0438	hopanoid-associated phosphorylase	1,13	1,06	-1,03
ZCP4_0439	squalene-hopene cyclase	1,01	-1,04	-1,06
ZCP4_0440	squalene-associated FAD-dependent desaturase	-1,02	-1,02	-1,05
ZCP4_0441	squalene synthase HpnD	1,02	-1,04	-1,01
ZCP4_0442	squalene synthase HpnC	1,02	1,03	1,03
ZCP4_0443	hopene-associated glycosyltransferase HpnB	1,03	1,06	-1,01
ZCP4_0444	hopanoid-associated sugar epimerase	-1,02	-1,02	-1,02
ZCP4_0445	cation diffusion facilitator family transporter	1,05	1,07	1,08
ZCP4_0446	replicative DNA helicase	1,00	1,05	1,05
ZCP4_0447	cytidine deaminase	-1,00	-1,09	-1,05
ZCP4_0448	deoxycytidine triphosphate deaminase	1,04	1,05	-1,03
ZCP4_0449	hypothetical protein	1,08	1,00	-1,02
ZCP4_0450	DNA polymerase III subunits gamma and tau	-1,01	-1,01	1,00
ZCP4_0452	ferredoxin	-1,02	1,13	1,02
ZCP4_0453	aminotransferase class V	1,04	1,08	-1,06
ZCP4_0454	hypothetical protein	1,01	1,04	1,02
ZCP4_0455	exodeoxyribonuclease VII small subunit	1,00	1,03	1,01
ZCP4_0456	Polyprenyl synthetase	-1,04	-1,01	1,02
ZCP4_0457	pantetheine-phosphate adenyltransferase	-1,06	-1,08	-1,00
ZCP4_0458	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin type	1,08	1,08	1,07
ZCP4_0459	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	1,03	1,03	1,05
ZCP4_0460	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	1,07	1,09	-1,00
ZCP4_0461	sigma54 specific transcriptional regulator, Fis family	1,04	1,02	1,04
ZCP4_0462	Alg9 family protein mannosyltransferase	1,18	1,05	1,13
ZCP4_0463	sodium/hydrogen exchanger	-1,00	1,02	1,02
ZCP4_0464	sodium/hydrogen exchanger	1,04	1,00	-1,04
ZCP4_0465	alanyl-tRNA synthetase	-1,02	-1,00	-1,00
ZCP4_0466	Sporulation domain protein	-1,05	-1,01	-1,03
ZCP4_0467	arginyl-tRNA synthetase	-1,04	-1,03	-1,03
ZCP4_0468	deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase	1,00	-1,02	-1,05
ZCP4_0469	Chloride channel core	1,14	-1,00	-1,04
ZCP4_0470	Sporulation domain protein	1,04	-1,01	1,02
ZCP4_0471	cell division protein FtsZ	-1,01	-1,01	-1,02
ZCP4_0472	cell division protein FtsA	1,03	-1,02	1,01
ZCP4_0473	cell division protein FtsQ	1,06	1,02	1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_0474	D-alanine--D-alanine ligase	1,00	-1,01	-1,03
ZCP4_0475	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	-1,03	-1,02	-1,06
ZCP4_0476	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	-1,02	-1,04	-1,04
ZCP4_0477	undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase	1,02	-1,01	-1,03
ZCP4_0478	cell division protein FtsW	-1,04	-1,04	-1,03
ZCP4_0479	UDP-N-acetylmuramoylalanine/D-glutamate ligase	1,02	1,03	-1,07
ZCP4_0480	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	1,11	-1,05	-1,09
ZCP4_0481	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2, 6-diaminopimelate/D-alanyl-D-alanyl ligase	1,08	-1,03	-1,05
ZCP4_0482	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2, 6-diaminopimelate ligase	-1,03	1,01	-1,04
ZCP4_0483	Peptidoglycan glycosyltransferase	1,01	-1,01	-1,04
ZCP4_0484	hypothetical protein	-1,01	1,04	-1,02
ZCP4_0485	S-adenosyl-methyltransferase MraW	-1,01	-1,04	-1,02
ZCP4_0486	hypothetical protein	1,02	-1,02	1,02
ZCP4_0487	cysteine synthase A	-1,03	1,01	-1,04
ZCP4_0488	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	-1,02	-1,01	-1,01
ZCP4_0489	nucleotide sugar dehydrogenase	1,04	1,01	-1,02
ZCP4_0490	queuosine biosynthesis protein QueD	1,05	1,04	-1,05
ZCP4_0491	hypothetical protein	-1,11	1,08	-1,12
ZCP4_0492	hypothetical protein	-1,00	-1,03	-1,00
ZCP4_0493	peptide deformylase	-1,04	1,02	-1,05
ZCP4_0494	recombination protein RecR	1,03	-1,05	-1,02
ZCP4_0495	methionyl-tRNA formyltransferase	-1,12	-1,07	-1,16
ZCP4_0496	tRNA pseudouridine synthase A	1,08	1,03	-1,09
ZCP4_0497	hypothetical protein	1,01	-1,02	-1,03
ZCP4_0498	ribosomal protein S12 methylthiotransferase	1,01	1,00	-1,02
ZCP4_0499	Leucyl aminopeptidase	-1,01	1,01	1,01
ZCP4_0500	NLP/P60 protein	1,01	1,08	1,03
ZCP4_0501	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	-1,01	-1,04	-1,03
ZCP4_0502	putative regulator of peptidoglycan cycling and attachment to outer membrane	1,01	1,04	1,05
ZCP4_0503	secretion protein HlyD family protein	-1,07	-1,09	-1,02
ZCP4_0504	ABC transporter related protein	-1,16	-1,04	-1,03
ZCP4_0505	ABC-2 type transporter	-1,11	1,03	-1,01
ZCP4_0506	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	1,02	1,10	1,02
ZCP4_0507	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,01	-1,06	-1,12
ZCP4_0509	TonB-dependent receptor plug	1,00	1,01	1,02
ZCP4_0510	Prolyl oligopeptidase	-1,03	1,01	1,03
ZCP4_0511	hypothetical protein	1,21	-1,02	1,01
ZCP4_0512	Dihydroorotase	1,03	-1,00	-1,00
ZCP4_0513	aspartate carbamoyltransferase	-1,01	-1,02	-1,06
ZCP4_0514	hypothetical protein	-1,29	-1,29	1,01
ZCP4_0515	TonB-dependent receptor	1,01	1,10	1,05
ZCP4_0516	Gluconate 2-dehydrogenase (acceptor)	1,00	-1,02	-1,02
ZCP4_0517	glucose-methanol-choline oxidoreductase	-1,03	-1,05	-1,00
ZCP4_0518	hypothetical protein	-1,00	1,08	1,05

5. Παράρτημα

ZCP4_0519	Holliday junction resolvase YqgF	1,03	1,08	1,05
ZCP4_0520	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, C subunit	1,05	1,03	1,05
ZCP4_0521	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	-1,10	-1,05	1,02
ZCP4_0522	aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	-1,02	1,00	1,02
ZCP4_0523	transcriptional regulator, LysR family	-1,01	-1,01	-1,05
ZCP4_0524	outer membrane protein of efflux system ZMO0780:ZMO0788	-1,01	-1,06	-1,07
ZCP4_0525	membrane fusion protein of efflux system ZMO0780:ZMO0778	1,02	1,04	-1,04
ZCP4_0526	inner membrane transporter of efflux system ZMO0780:ZMO0778	-1,01	1,00	-1,01
ZCP4_0527	beta-lactamase domain protein	1,09	1,07	1,03
ZCP4_0528	methyltransferase type 12	1,05	-1,03	-1,10
ZCP4_0530	transcriptional regulator, LysR family	1,00	-1,09	1,06
ZCP4_0531	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin type	1,00	1,04	-1,10
ZCP4_0532	magnesium transporter	-1,01	1,04	1,03
ZCP4_0533	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA	1,03	-1,01	-1,03
ZCP4_0534	hypothetical protein	1,09	1,17	-1,12
ZCP4_0535	Outer membrane-related protein	-1,02	1,01	1,00
ZCP4_0536	PII uridylyl-transferase	-1,00	-1,01	-1,08
ZCP4_0537	threonyl-tRNA synthetase	1,00	-1,02	-1,02
ZCP4_0538	alpha/beta hydrolase fold protein	-1,04	-1,04	-1,06
ZCP4_0539	Tetratricopeptide domain protein	-1,01	1,05	1,05
ZCP4_0540	lactoylglutathione lyase	1,03	-1,01	1,00
ZCP4_0541	hydroxyacylglutathione hydrolase	-1,03	-1,03	-1,01
ZCP4_0542	isochorismatase hydrolase	1,05	1,10	1,02
ZCP4_0543	TPR repeat-containing protein	1,01	1,04	-1,00
ZCP4_0544	TPR repeat-containing protein	-1,04	-1,02	-1,03
ZCP4_0545	Sterol-binding domain protein	1,08	1,11	1,10
ZCP4_0546	glutaredoxin 3	1,00	1,02	1,04
ZCP4_0547	hypothetical protein	1,05	1,05	1,01
ZCP4_0548	Mov34/MPN/PAD-1 family protein	-1,02	-1,22	-1,00
ZCP4_0549	pseudouridine synthase, RluA family	-1,00	1,10	1,02
ZCP4_0550	RNA polymerase factor sigma-32	1,01	1,05	1,08
ZCP4_0551	cysteine synthase	-1,01	1,03	1,07
ZCP4_0552	hypothetical protein	1,05	1,10	1,06
ZCP4_0553	hypothetical protein	-1,00	-1,01	-1,01
ZCP4_0555	hypothetical protein	1,06	1,01	-1,12
ZCP4_0556	hypothetical protein	1,05	1,14	1,16
ZCP4_0557	peptide chain release factor 3	1,01	1,00	-1,01
ZCP4_0558	CsbD family protein	-1,09	1,02	1,14
ZCP4_0559	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	-1,05	-1,03	-1,02
ZCP4_0560	bifunctional sulfur carrier protein/thiazole synthase protein	1,04	1,01	1,03
ZCP4_0561	3-dehydroquinate dehydratase	1,02	-1,00	-1,00
ZCP4_0562	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein	1,02	1,03	-1,03
ZCP4_0563	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase	-1,04	1,00	-1,07
ZCP4_0564	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase	1,01	1,03	1,02

5. Παράρτημα

ZCP4_0566	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	-1,01	-1,03	-1,02
ZCP4_0567	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	-1,01	-1,01	1,02
ZCP4_0568	50S ribosomal protein L7/L12	-1,07	-1,11	-1,12
ZCP4_0569	50S ribosomal protein L10	-1,09	-1,07	-1,03
ZCP4_0570	50S ribosomal protein L1	-1,01	1,04	-1,01
ZCP4_0571	50S ribosomal protein L11	-1,01	-1,06	-1,03
ZCP4_0572	NusG antitermination factor	1,06	1,05	-1,00
ZCP4_0573	preprotein translocase subunit SecE (NCBI)	1,02	1,12	1,11
ZCP4_0575	Endothelin-converting enzyme 1	1,01	-1,00	1,04
ZCP4_0576	SsrA-binding protein	-1,03	-1,03	1,01
ZCP4_0577	dihydrodipicolinate synthase	1,00	-1,01	1,03
ZCP4_0578	Lytic transglycosylase catalytic	1,03	1,02	-1,03
ZCP4_0579	transcription elongation factor GreB	-1,03	-1,03	-1,07
ZCP4_0580	hypothetical protein	1,01	-1,01	1,02
ZCP4_0581	aspartyl-tRNA synthetase	-1,01	-1,02	-1,00
ZCP4_0582	ribonuclease D	-1,06	1,02	-1,05
ZCP4_0583	Ppx/GppA phosphatase	1,04	1,02	-1,05
ZCP4_0584	polyphosphate kinase	1,05	1,06	1,07
ZCP4_0585	DNA replication initiation ATPase	-1,02	-1,08	-1,04
ZCP4_0586	hypothetical protein	1,15	1,09	1,02
ZCP4_0587	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	1,03	-1,00	-1,02
ZCP4_0588	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	-1,03	-1,10	-1,10
ZCP4_0589	dihydrodipicolinate reductase	-1,09	-1,04	-1,03
ZCP4_0590	endonuclease III	-1,09	1,01	-1,02
ZCP4_0591	regulatory protein RecX	1,02	-1,06	-1,01
ZCP4_0592	AMP-dependent synthetase and ligase	1,02	-1,01	-1,01
ZCP4_0593	peptidase S9 prolyl oligopeptidase active site domain protein	1,04	1,04	1,00
ZCP4_0595	hypothetical protein	-1,12	-1,01	1,06
ZCP4_0596	small multidrug resistance protein	1,10	1,08	-1,03
ZCP4_0598	hypothetical protein	-1,14	1,03	1,02
ZCP4_0600	hypothetical protein	-1,00	1,03	1,03
ZCP4_0601	OsmC family protein	1,02	1,01	-1,04
ZCP4_0602	DNA gyrase subunit A	-1,00	1,01	1,01
ZCP4_0603	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase Gid	1,01	1,01	-1,00
ZCP4_0604	oxidoreductase domain protein	1,05	1,04	-1,03
ZCP4_0605	Auxin Efflux Carrier	1,06	1,00	1,05
ZCP4_0606	acetolactate synthase	-1,02	-1,04	-1,02
ZCP4_0607	signal transduction protein	-1,16	-1,06	1,12
ZCP4_0608	CRISPR-associated protein, Csy4 family	-1,07	-1,02	1,01
ZCP4_0609	CRISPR-associated protein, Csy3 family	-1,01	-1,00	-1,04
ZCP4_0610	CRISPR-associated protein, Csy2 family	1,02	1,02	1,07
ZCP4_0611	CRISPR-associated protein, Csy1 family	-1,11	-1,02	1,03
ZCP4_0612	CRISPR-associated helicase Cas3 family	1,07	1,09	1,07
ZCP4_0613	CRISPR-associated protein Cas1	1,17	1,17	1,13

5. Παράρτημα

ZCP4_0614	nitroreductase	-1,00	1,00	1,02
ZCP4_0615	3-isopropylmalate dehydrogenase	-1,00	-1,05	-1,02
ZCP4_0616	Cystathionine gamma-synthase	-1,03	-1,07	-1,02
ZCP4_0617	transcriptional regulator, LysR family	-1,01	1,02	1,04
ZCP4_0618	hypothetical protein	-1,02	1,08	1,02
ZCP4_0619	DNA repair protein RecO	1,02	-1,01	1,06
ZCP4_0620	excinuclease ABC subunit C	-1,07	-1,00	-1,00
ZCP4_0621	H ⁺ transporting two-sector ATPase B/B' subunit	1,01	-1,02	-1,01
ZCP4_0622	ATPase	-1,03	-1,02	-1,01
ZCP4_0623	H ⁺ transporting two-sector ATPase C subunit	1,01	1,04	1,03
ZCP4_0624	F0F1 ATP synthase subunit A	1,01	-1,01	1,01
ZCP4_0625	hypothetical protein	1,01	1,04	1,04
ZCP4_0626	hypothetical protein	1,06	1,06	1,13
ZCP4_0627	hypothetical protein	-1,03	-1,02	-1,04
ZCP4_0628	hypothetical protein	-1,01	1,01	-1,03
ZCP4_0629	DNA repair protein RadC	-1,07	-1,04	1,00
ZCP4_0630	adenylosuccinate lyase	1,02	1,05	1,04
ZCP4_0631	chaperone protein DnaJ	1,01	-1,07	-1,04
ZCP4_0632	molecular chaperone DnaK	1,03	-1,00	1,03
ZCP4_0633	HAD-superfamily subfamily IB hydrolase, TIGR01490	-1,05	1,02	-1,01
ZCP4_0634	hypothetical protein	1,17	1,05	1,03
ZCP4_0635	arginine/ornithine succinyltransferase subunit	-1,03	1,02	1,03
ZCP4_0636	phosphoribosyltransferase	-1,00	1,01	-1,02
ZCP4_0637	adenosine/AMP deaminase	-1,04	-1,01	-1,03
ZCP4_0638	polysaccharide deacetylase	-1,03	-1,02	-1,01
ZCP4_0639	hypothetical protein	1,03	-1,01	1,01
ZCP4_0640	flagellar protein FliS	1,03	1,01	-1,01
ZCP4_0641	flagellar hook-associated 2 domain protein	1,05	1,06	1,00
ZCP4_0642	flagellar biosynthesis protein FlhB	-1,01	-1,10	-1,06
ZCP4_0643	flagellar biosynthetic protein FliR	1,05	-1,04	-1,05
ZCP4_0644	export protein FliQ family 3	1,24	1,02	-1,04
ZCP4_0645	flagellar biosynthesis protein FliP	1,00	-1,01	1,00
ZCP4_0646	hypothetical protein	-1,01	1,07	-1,14
ZCP4_0647	flagellar motor switch protein FliN	-1,05	-1,05	-1,06
ZCP4_0648	surface presentation of antigens (SPOA) protein	1,01	-1,01	-1,03
ZCP4_0649	flagellar basal body-associated protein FliL	1,02	1,02	-1,01
ZCP4_0650	hypothetical protein	-1,10	-1,06	1,02
ZCP4_0651	hypothetical protein	-1,17	1,07	1,05
ZCP4_0652	flagellum-specific ATP synthase FliI	1,10	1,05	1,03
ZCP4_0653	hypothetical protein	-1,15	-1,07	-1,14
ZCP4_0654	flagellar motor switch protein FliG	1,05	-1,13	-1,08
ZCP4_0655	flagellar M-ring protein FliF	-1,12	-1,18	-1,19
ZCP4_0657	sigma54 specific transcriptional regulator, Fis family	-1,27	-1,02	1,06
ZCP4_0658	flagellin/flagellar hook associated protein	1,05	1,16	1,05

5. Παράρτημα

ZCP4_0659	hypothetical protein	-1,01	1,02	-1,06
ZCP4_0660	hypothetical protein	-1,06	-1,08	-1,01
ZCP4_0661	RNA polymerase, sigma 28 subunit, FliA/WhiG	-1,02	1,09	1,02
ZCP4_0662	Cobyrinic acid ac-diamide synthase	-1,02	-1,03	-1,01
ZCP4_0663	flagellar biosynthesis protein FlhA	1,04	1,06	1,05
ZCP4_0664	hypothetical protein	-1,03	1,01	-1,01
ZCP4_0665	Anti-sigma-28 factor FlgM family protein	1,04	1,03	1,07
ZCP4_0666	hypothetical protein	-1,05	-1,00	1,04
ZCP4_0667	flagellar motor protein	-1,01	-1,08	-1,05
ZCP4_0668	flagellar motor component	1,07	-1,02	-1,10
ZCP4_0669	flagellar basal-body rod protein FlgB	1,18	1,01	-1,43
ZCP4_0670	flagellar basal-body rod protein FlgC	-1,28	1,00	-1,10
ZCP4_0671	flagellar hook capping protein	1,04	1,04	1,04
ZCP4_0672	flagellar hook-basal body protein	-1,01	1,01	1,04
ZCP4_0673	flagellar basal-body rod protein FlgF	-1,01	1,00	1,02
ZCP4_0674	flagellar basal-body rod protein FlgG	-1,01	1,02	-1,04
ZCP4_0675	flagellar L-ring protein	-1,15	-1,09	-1,07
ZCP4_0676	flagellar basal body P-ring protein	1,09	1,06	1,06
ZCP4_0677	hypothetical protein	-1,11	-1,01	-1,10
ZCP4_0678	flagellar hook-associated protein FlgK	1,03	1,05	1,06
ZCP4_0679	flagellin domain protein	-1,08	-1,01	1,02
ZCP4_0680	flagellar motor protein MotA	1,04	1,03	1,01
ZCP4_0681	OmpA/MotB domain protein	1,05	1,03	1,01
ZCP4_0683	histidine kinase	1,09	1,03	1,07
ZCP4_0684	acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha	1,03	1,04	1,01
ZCP4_0685	integrase family protein	-1,08	-1,06	1,02
ZCP4_0686	hypothetical protein	1,03	1,01	-1,02
ZCP4_0688	Shikimate kinase	-1,03	-1,03	-1,05
ZCP4_0689	3-dehydroquinate synthase	-1,02	-1,03	-1,04
ZCP4_0690	hypothetical protein	1,06	1,10	1,12
ZCP4_0691	NifU-like involved in Fe-S cluster formation	1,08	1,03	1,02
ZCP4_0692	Colicin V production protein	1,03	-1,08	1,02
ZCP4_0693	DNA repair protein RadA	-1,02	-1,00	-1,13
ZCP4_0694	hypothetical protein	1,02	-1,04	-1,06
ZCP4_0695	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	-1,02	-1,01	1,02
ZCP4_0696	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	-1,02	1,04	1,01
ZCP4_0697	tryptophan synthase subunit beta	-1,06	-1,05	-1,01
ZCP4_0698	tryptophan synthase subunit alpha	-1,05	-1,06	-1,06
ZCP4_0699	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, beta subunit	-1,02	1,02	-1,02
ZCP4_0700	FolC bifunctional protein	-1,01	-1,03	-1,01
ZCP4_0701	major facilitator superfamily MFS_1	1,03	-1,01	1,05
ZCP4_0702	sodium:dicarboxylate symporter	1,02	-1,02	1,01
ZCP4_0703	pseudouridine synthase	-1,05	-1,06	-1,06
ZCP4_0704	methyltransferase	-1,01	-1,06	1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_0705	UvrD/REP helicase	1,00	1,02	-1,02
ZCP4_0706	glutaredoxin 2	1,05	-1,05	1,03
ZCP4_0707	ABC transporter, conserved site	-1,02	-1,03	1,01
ZCP4_0708	binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	-1,00	1,01	1,01
ZCP4_0710	ribosomal L11 methyltransferase	-1,01	1,03	-1,01
ZCP4_0711	succinate dehydrogenase, cytochrome b subunit	1,09	1,06	-1,04
ZCP4_0712	hypothetical protein	1,01	1,03	1,01
ZCP4_0713	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	1,03	1,02	-1,03
ZCP4_0714	major facilitator superfamily MFS_1	1,00	1,03	-1,03
ZCP4_0715	ATP-dependent helicase HrpB	1,03	-1,01	-1,03
ZCP4_0716	Polyprenyl synthetase	1,02	-1,02	-1,03
ZCP4_0717	chorismate mutase	1,07	1,02	-1,03
ZCP4_0718	PLP-dependent enzyme, histidinol-phosphate	1,11	1,14	1,16
ZCP4_0719	hypothetical protein	1,10	1,02	-1,01
ZCP4_0720	glucose sorbosone dehydrogenase	1,03	-1,01	-1,02
ZCP4_0721	hypothetical protein	1,02	-1,02	-1,01
ZCP4_0722	transcription elongation factor NusA	1,00	-1,00	-1,02
ZCP4_0723	hypothetical protein	-1,03	-1,02	1,01
ZCP4_0724	translation initiation factor IF-2	-1,13	-1,05	-1,00
ZCP4_0725	ribosome-binding factor A	-1,02	1,01	1,01
ZCP4_0726	thymidine kinase	-1,01	1,11	1,09
ZCP4_0727	tRNA pseudouridine synthase B	1,08	1,01	1,04
ZCP4_0728	ribosomal protein S15	1,01	-1,05	-1,06
ZCP4_0729	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	1,03	-1,01	-1,01
ZCP4_0730	signal transduction histidine kinase	-1,01	1,00	-1,02
ZCP4_0732	Chloride channel core	1,02	1,02	-1,01
ZCP4_0734	sulphate transporter	1,04	1,02	-1,04
ZCP4_0735	indole-3-glycerol-phosphate synthase	1,02	-1,02	1,01
ZCP4_0736	isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent	1,06	1,01	-1,01
ZCP4_0737	aconitate hydratase	-1,01	-1,02	1,04
ZCP4_0739	50S ribosomal protein L17	1,05	-1,01	-1,01
ZCP4_0740	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	1,03	-1,03	1,02
ZCP4_0741	30S ribosomal protein S11	1,06	-1,00	1,01
ZCP4_0742	30S ribosomal protein S13	1,07	1,03	1,04
ZCP4_0743	Adenylate kinase	-1,01	-1,02	-1,02
ZCP4_0744	preprotein translocase subunit SecY	1,05	1,02	-1,00
ZCP4_0745	50S ribosomal protein L15	1,01	1,01	-1,01
ZCP4_0746	50S ribosomal protein L30	-1,10	-1,01	-1,09
ZCP4_0747	30S ribosomal protein S5	-1,03	-1,04	-1,05
ZCP4_0748	50S ribosomal protein L18	-1,04	-1,00	1,04
ZCP4_0749	50S ribosomal protein L6	-1,03	-1,07	-1,02
ZCP4_0750	30S ribosomal protein S8	-1,06	-1,03	-1,07
ZCP4_0751	30S ribosomal protein S14	1,01	1,04	1,03
ZCP4_0752	50S ribosomal protein L5	-1,07	-1,07	-1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_0753	50S ribosomal protein L24	-1,06	-1,04	-1,03
ZCP4_0754	ribosomal protein L14	-1,11	-1,08	-1,02
ZCP4_0755	ribosomal protein S17	-1,10	-1,07	-1,07
ZCP4_0756	50S ribosomal protein L29	-1,03	1,01	-1,04
ZCP4_0757	50S ribosomal protein L16	-1,05	-1,00	1,04
ZCP4_0758	30S ribosomal protein S3	-1,02	-1,05	-1,02
ZCP4_0759	50S ribosomal protein L22	-1,10	-1,10	1,00
ZCP4_0760	ribosomal protein S19	-1,02	1,00	1,01
ZCP4_0761	50S ribosomal protein L2	-1,07	-1,05	1,01
ZCP4_0762	50S ribosomal protein L23	-1,02	-1,02	-1,00
ZCP4_0763	50S ribosomal protein L4	-1,01	1,01	1,01
ZCP4_0764	50S ribosomal protein L3	-1,04	-1,07	-1,04
ZCP4_0765	30S ribosomal protein S10	-1,04	-1,06	1,02
ZCP4_0766	elongation factor Tu	-1,04	-1,04	-1,04
ZCP4_0767	elongation factor G	-1,02	1,00	-1,01
ZCP4_0768	30S ribosomal protein S7	1,02	1,00	1,01
ZCP4_0769	ribosomal protein S12	-1,05	-1,09	-1,04
ZCP4_0770	phosphoesterase PA-phosphatase related protein	1,01	-1,02	-1,02
ZCP4_0771	dihydrolipoamide dehydrogenase	1,04	-1,05	-1,05
ZCP4_0772	thioesterase superfamily protein	-1,02	-1,04	-1,09
ZCP4_0773	pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase	-1,03	-1,02	-1,02
ZCP4_0774	hypothetical protein	1,02	-1,01	-1,02
ZCP4_0775	GCN5-related N-acetyltransferase	-1,02	-1,07	1,03
ZCP4_0776	GAF domain-containing protein	-1,04	-1,08	-1,17
ZCP4_0777	aminoacyl-tRNA hydrolase	-1,22	-1,12	1,08
ZCP4_0778	RNA pseudouridine synthase	-1,00	-1,01	-1,05
ZCP4_0779	glycosyl transferase family 2	1,03	1,01	-1,01
ZCP4_0780	cell wall component synthesis or export	1,02	1,01	-1,05
ZCP4_0781	GtrA family protein	1,04	1,05	-1,02
ZCP4_0782	hypothetical protein	1,06	1,02	-1,01
ZCP4_0783	penicillin-binding protein, 1A family	-1,01	1,00	-1,03
ZCP4_0784	bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase	1,03	-1,04	-1,07
ZCP4_0785	phosphoglycolate phosphatase	1,04	1,06	-1,05
ZCP4_0786	outer membrane biogenesis protein	1,00	1,02	1,02
ZCP4_0787	outer membrane biogenesis protein	-1,02	1,05	1,05
ZCP4_0788	drug resistance transporter, Bcr/CflA subfamily	1,05	1,05	-1,00
ZCP4_0789	type I glutamate--ammonia ligase	1,02	-1,01	1,01
ZCP4_0790	nitrogen regulatory protein P-II	-1,00	-1,01	1,02
ZCP4_0791	peptidase M24	1,06	1,03	1,01
ZCP4_0792	Oligopeptidase B	1,06	1,06	1,01
ZCP4_0795	hypothetical protein	-1,06	-1,02	-1,00
ZCP4_0796	HpcH/HpaI aldolase	1,11	1,05	1,06
ZCP4_0797	hypothetical protein	1,05	1,03	1,06
ZCP4_0798	acyl-CoA dehydrogenase domain protein	1,00	1,02	1,05

5. Παράρτημα

ZCP4_0799	MgtC/SapB transporter	-1,03	-1,03	1,09
ZCP4_0800	Homoserine dehydrogenase	-1,04	-1,03	-1,02
ZCP4_0801	fructose-1 6-bisphosphatase class II	-1,02	-1,02	1,02
ZCP4_0802	hypothetical protein	1,10	1,11	-1,08
ZCP4_0803	histidine kinase for ZMO0478	-1,01	-1,04	-1,01
ZCP4_0804	Peptidoglycan-binding LysM	1,04	1,09	-1,00
ZCP4_0805	two-component response regulator affecting the cell wall	1,02	1,04	1,05
ZCP4_0806	hypothetical protein	-1,03	1,08	-1,00
ZCP4_0807	riboflavin biosynthesis protein RibD	1,04	1,02	1,02
ZCP4_0808	riboflavin synthase subunit alpha	-1,04	-1,00	1,02
ZCP4_0809	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	1,00	1,03	1,03
ZCP4_0810	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	1,02	1,02	-1,02
ZCP4_0811	rpsU-divergently transcribed protein	1,02	1,01	1,00
ZCP4_0812	transcriptional regulator, LysR family	1,03	1,01	-1,04
ZCP4_0813	hypothetical protein	-1,03	1,00	1,02
ZCP4_0814	anthranilate synthase component I	-1,02	-1,01	-1,03
ZCP4_0815	PpiC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1,00	-1,01	-1,01
ZCP4_0816	Triose-phosphate isomerase	1,00	1,02	1,03
ZCP4_0817	preprotein translocase, SecG subunit	1,02	1,00	1,04
ZCP4_0818	CTP synthetase	-1,01	-1,01	-1,01
ZCP4_0819	prolyl-tRNA synthetase	-1,00	-1,02	1,01
ZCP4_0820	lipoprotein releasing system, transmembrane protein, LolC/E family	1,01	1,03	-1,01
ZCP4_0821	ABC transporter related protein	-1,02	1,03	-1,07
ZCP4_0822	transcriptional regulator, AsnC family	-1,12	-1,03	-1,00
ZCP4_0824	Formate--tetrahydrofolate ligase	1,02	-1,02	-1,04
ZCP4_0825	GTP-binding protein EngA	-1,03	-1,05	-1,05
ZCP4_0826	Pyrrolo-quinoline quinone	1,01	-1,02	1,01
ZCP4_0827	hypothetical protein	1,00	-1,00	-1,00
ZCP4_0829	cell wall hydrolase SleB	-1,02	-1,02	-1,01
ZCP4_0830	lipid synthesis related and affects the cell envelope	1,04	-1,14	1,04
ZCP4_0831	lipid O-acetyltransferase affecting the cell envelope	-1,04	-1,02	-1,04
ZCP4_0832	lipolytic enzyme affecting the cell envelope	1,01	1,01	-1,01
ZCP4_0833	Lipolytic protein affecting the cell envelope	1,00	-1,02	-1,03
ZCP4_0834	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	1,02	-1,03	-1,09
ZCP4_0835	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 3	-1,01	-1,00	-1,03
ZCP4_0836	ATP12 ATPase	-1,03	-1,02	-1,01
ZCP4_0837	hypothetical protein	1,03	1,09	1,04
ZCP4_0838	pseudouridine synthase, RluA family	-1,00	-1,03	-1,04
ZCP4_0840	hypothetical protein	1,10	1,13	-1,05
ZCP4_0841	hypothetical protein	1,06	1,04	1,05
ZCP4_0842	17 kDa surface antigen	1,05	1,15	-1,04
ZCP4_0843	guanylate kinase	-1,00	-1,02	-1,01
ZCP4_0844	Arginase/agmatinase/formiminoglutamase	1,03	1,03	1,03
ZCP4_0845	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate N-succinyltransferase	1,03	1,00	-1,02

5. Παράρτημα

ZCP4_0846	pyrimidine 5'-nucleotidase	1,02	1,01	-1,04
ZCP4_0847	iron-sulfur cluster assembly accessory protein	-1,03	1,09	1,02
ZCP4_0848	FeS assembly SUF system protein	1,07	1,03	1,02
ZCP4_0849	cysteine desulfurase, SufS subfamily	-1,05	-1,01	1,01
ZCP4_0850	SufBD protein	1,00	-1,02	1,01
ZCP4_0851	ABC transporter ATP-binding protein	1,00	-1,01	1,02
ZCP4_0852	cysteine desulfurase activator complex subunit SufB	-1,03	-1,03	1,03
ZCP4_0853	transcriptional regulator, BadM/Rrf2 family	-1,08	-1,06	-1,03
ZCP4_0854	histidinol-phosphate aminotransferase	-1,03	-1,00	-1,01
ZCP4_0855	Arogenate dehydrogenase	-1,03	-1,02	-1,05
ZCP4_0856	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	1,04	-1,02	-1,03
ZCP4_0857	hypothetical protein	1,07	-1,01	-1,04
ZCP4_0858	hypothetical protein	-1,00	1,01	1,04
ZCP4_0859	cell division ATP-binding protein FtsE	-1,02	-1,01	-1,06
ZCP4_0860	MJ0042 family finger-like protein	-1,08	-1,05	-1,07
ZCP4_0861	hypothetical protein	-1,07	1,06	-1,06
ZCP4_0862	multiple antibiotic resistance (MarC)-related protein	1,06	1,05	-1,00
ZCP4_0863	DNA topoisomerase IV subunit B	1,04	-1,03	-1,04
ZCP4_0864	Hsp33 protein	1,12	-1,01	-1,04
ZCP4_0865	ornithine carbamoyltransferase	1,00	-1,02	-1,03
ZCP4_0866	acetylornithine transaminase protein	-1,01	1,00	-1,02
ZCP4_0867	GcrA cell cycle regulator	1,00	-1,00	1,01
ZCP4_0868	ABC-2 type transporter	-1,02	1,01	-1,02
ZCP4_0869	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	1,02	1,03	1,07
ZCP4_0871	Ppx/GppA phosphatase	1,01	1,03	-1,04
ZCP4_0872	ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FtsJ	1,01	1,14	1,02
ZCP4_0873	diguanylate cyclase/phosphodiesterase	1,12	1,04	1,13
ZCP4_0874	hypothetical protein	1,02	1,03	1,01
ZCP4_0875	hypothetical protein	1,04	1,05	-1,05
ZCP4_0876	hypothetical protein	-1,05	1,14	1,12
ZCP4_0877	hypothetical protein	-1,06	-1,06	1,24
ZCP4_0878	hypothetical protein	1,06	1,14	-1,14
ZCP4_0879	hypothetical protein	1,18	1,19	1,07
ZCP4_0880	hypothetical protein	-1,22	-1,25	-1,16
ZCP4_0881	hypothetical protein	1,45	1,50	1,53
ZCP4_0882	hypothetical protein	1,22	-1,20	1,30
ZCP4_0883	hypothetical protein	1,06	1,11	-1,01
ZCP4_0884	constituent protein	1,18	1,14	-1,24
ZCP4_0885	hypothetical protein	-1,02	-1,50	-1,06
ZCP4_0886	putative phage major head protein	1,11	-1,04	1,01
ZCP4_0889	hypothetical protein	1,18	1,14	1,08
ZCP4_0890	hypothetical protein	1,17	-1,30	-1,28
ZCP4_0891	hypothetical protein	-1,02	1,03	-1,08
ZCP4_0892	phage terminase, large subunit, PBSX family	-1,22	1,03	1,06

5. Παράρτημα

ZCP4_0893	hypothetical protein	1,12	1,17	1,17
ZCP4_0894	HhH-GPD family protein	1,15	1,13	1,13
ZCP4_0895	ATP-dependent protease La	-1,02	1,02	1,07
ZCP4_0897	Levansucrase	-1,05	1,12	1,00
ZCP4_0898	Levansucrase	1,03	1,02	-1,01
ZCP4_0900	hypothetical protein	-1,40	-1,22	1,38
ZCP4_0901	transcriptional regulator, AsnC family	-1,11	1,01	1,07
ZCP4_0902	aspartate racemase	1,08	1,08	-1,03
ZCP4_0903	glucokinase	1,05	1,02	1,01
ZCP4_0904	phosphogluconate dehydratase	1,07	-1,06	-1,05
ZCP4_0905	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1,02	-1,01	1,01
ZCP4_0906	sugar transporter	-1,02	-1,02	1,00
ZCP4_0907	DNA ligase, NAD-dependent	-1,02	-1,01	-1,01
ZCP4_0908	queuine tRNA-ribosyltransferase	1,10	1,00	-1,00
ZCP4_0909	excinuclease ABC subunit B	1,03	1,07	1,03
ZCP4_0910	hypothetical protein	1,13	1,04	1,02
ZCP4_0911	rod shape-determining protein RodA	1,05	1,03	-1,03
ZCP4_0912	penicillin-binding protein 2	1,01	-1,01	-1,08
ZCP4_0913	hypothetical protein	-1,06	1,03	-1,08
ZCP4_0914	rod shape-determining protein MreC	-1,05	-1,02	-1,03
ZCP4_0915	rod shape-determining protein MreB	-1,03	-1,05	-1,03
ZCP4_0916	DNA mismatch repair protein	1,05	1,04	1,07
ZCP4_0917	4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase	1,05	1,06	1,01
ZCP4_0918	hypothetical protein	1,04	1,04	1,01
ZCP4_0919	putative DNA helicase	1,04	1,03	-1,02
ZCP4_0920	Putative ParB-like nuclease	1,09	1,06	1,03
ZCP4_0921	hypothetical protein	-1,06	-1,02	-1,04
ZCP4_0922	GTP-binding protein HflX	1,05	1,03	1,08
ZCP4_0923	RNA-binding protein Hfq	1,05	1,04	1,09
ZCP4_0924	ammonium transporter	1,01	1,01	-1,01
ZCP4_0925	Endonuclease/exonuclease/phosphatase	1,02	1,03	1,02
ZCP4_0926	microcin-processing peptidase 2	-1,00	1,03	-1,01
ZCP4_0927	aminotransferase class IV	1,09	1,03	1,04
ZCP4_0928	aminotransferase class I and II	1,05	1,05	1,02
ZCP4_0929	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,09	1,08	1,05
ZCP4_0930	Phosphomannomutase	1,03	1,01	1,02
ZCP4_0931	heat shock protein DnaJ domain protein	1,09	-1,05	1,09
ZCP4_0932	ATPase MipZ	1,11	1,06	-1,00
ZCP4_0933	thiamine-phosphate pyrophosphorylase	1,02	-1,01	-1,00
ZCP4_0934	Peptidase related to the outer membrane	1,02	-1,03	-1,13
ZCP4_0935	Inositol-phosphate phosphatase	-1,03	-1,01	-1,05
ZCP4_0936	elongation factor P	1,01	-1,02	-1,04
ZCP4_0937	cystathionine beta-lyase	1,03	1,02	1,03
ZCP4_0938	7-cyano-7-deazaguanine reductase	1,08	1,04	-1,11

5. Παράρτημα

ZCP4_0939	hypothetical protein	-1,02	-1,02	-1,03
ZCP4_0940	lipoprotein signal peptidase	1,04	-1,02	1,00
ZCP4_0941	isoleucine--tRNA ligase	-1,08	-1,10	1,01
ZCP4_0942	riboflavin biosynthesis protein RibF	1,05	-1,10	-1,05
ZCP4_0943	dihydrofolate reductase region	1,03	-1,06	-1,07
ZCP4_0945	WGR domain protein	-1,30	-1,11	-1,05
ZCP4_0946	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,10	1,02	1,03
ZCP4_0947	hypothetical protein	-1,14	-1,12	1,02
ZCP4_0948	phospholipase D/Transphosphatidylase	-1,07	1,02	-1,03
ZCP4_0949	hypothetical protein	1,12	1,17	1,14
ZCP4_0950	amidohydrolase	1,01	-1,01	1,02
ZCP4_0951	pyrroline-5-carboxylate reductase	1,02	1,04	1,01
ZCP4_0952	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,02	1,10	1,06
ZCP4_0953	Capsule polysaccharide biosynthesis protein	1,06	1,03	1,00
ZCP4_0954	glycosyl transferase group 1	1,02	1,01	1,04
ZCP4_0955	Stress responsive alpha-beta barrel domain protein	-1,04	-1,03	1,03
ZCP4_0956	ferrochelatase	1,02	1,11	1,06
ZCP4_0958	PepSY-associated TM helix domain protein	-1,04	-1,01	1,00
ZCP4_0959	exodeoxyribonuclease VII, large subunit	1,05	-1,03	-1,04
ZCP4_0960	phosphoribosylamine/glycine ligase	-1,04	1,01	-1,02
ZCP4_0961	hypothetical protein	-1,00	1,09	-1,02
ZCP4_0962	hypothetical protein	1,02	1,05	1,03
ZCP4_0963	CMP/dCMP deaminase zinc-binding protein	1,02	1,03	-1,08
ZCP4_0964	ribosomal protein L28	1,11	1,04	1,04
ZCP4_0965	sugar transporter	-1,05	-1,06	1,01
ZCP4_0966	prolipoprotein diacylglyceryl transferase	-1,04	1,08	-1,07
ZCP4_0967	hypothetical protein	1,15	1,14	1,18
ZCP4_0968	efflux transporter, RND family, MFP subunit	1,04	1,02	1,01
ZCP4_0969	hypothetical protein	-1,00	1,09	1,11
ZCP4_0970	outer membrane efflux protein with ZMO0282:ZMO0283	-1,03	-1,02	-1,03
ZCP4_0971	RND multidrug efflux transport with ZMO0282,ZMO0285	-1,02	-1,02	-1,01
ZCP4_0972	MFP subunit of efflux transporter, with ZMO0283,ZMO0285	-1,01	1,02	1,03
ZCP4_0973	repressor of efflux system ZMO0282:ZMO0285	-1,14	-1,07	-1,01
ZCP4_0974	cold-shock DNA-binding domain protein	1,04	1,04	-1,05
ZCP4_0975	3'-5' exonuclease	1,06	-1,01	-1,04
ZCP4_0976	hypothetical protein	-1,03	-1,05	-1,06
ZCP4_0977	OstA family protein	-1,00	1,01	-1,02
ZCP4_0978	ABC transporter related protein	-1,02	1,00	1,06
ZCP4_0979	RNA polymerase factor sigma-54	-1,01	1,03	1,04
ZCP4_0980	S-adenosylmethionine synthetase	1,00	-1,03	-1,03
ZCP4_0981	apolipoprotein N-acyltransferase	1,04	-1,01	-1,02
ZCP4_0982	hypothetical protein	-1,41	-1,12	-1,19
ZCP4_0983	hypothetical protein	-1,29	-1,14	1,02
ZCP4_0984	hypothetical protein	-1,11	1,02	1,04

5. Παράρτημα

ZCP4_0985	hypothetical protein	-1,01	-1,08	-1,06
ZCP4_0986	hypothetical protein	-1,07	-1,03	1,05
ZCP4_0987	hypothetical protein	-1,02	-1,03	-1,03
ZCP4_0989	hypothetical protein	-1,34	-1,32	1,02
ZCP4_0990	hypothetical protein	-1,15	-1,06	-1,10
ZCP4_0991	cytochrome c-type biogenesis protein CcmB	1,11	1,11	1,08
ZCP4_0992	heme exporter protein CcmA	-1,00	1,02	1,04
ZCP4_0993	histidine kinase	1,03	1,00	1,04
ZCP4_0994	two component transcriptional regulator, winged helix family	1,02	1,01	1,04
ZCP4_0995	D-lactate dehydrogenase	1,03	1,01	1,01
ZCP4_0996	type I secretion membrane fusion protein, HlyD family	1,20	1,16	1,03
ZCP4_0997	type I secretion system ATPase	1,00	-1,05	-1,07
ZCP4_0998	type I secretion outer membrane protein, TolC family	-1,25	1,04	-1,30
ZCP4_0999	major intrinsic protein	1,12	1,07	1,08
ZCP4_1000	Endoribonuclease L-PSP	1,05	1,06	1,01
ZCP4_1001	response regulator receiver protein	1,01	1,07	1,11
ZCP4_1002	50S ribosomal protein L33	-1,02	-1,01	1,04
ZCP4_1003	ATP-dependent protease ATP-binding subunit HslU	1,04	1,01	1,02
ZCP4_1004	ATP-dependent protease peptidase subunit	1,04	1,01	-1,01
ZCP4_1005	histone family protein DNA-binding protein	1,10	1,08	1,03
ZCP4_1006	hypothetical protein	-1,03	-1,00	-1,07
ZCP4_1007	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	-1,03	1,03	-1,01
ZCP4_1008	F0F1 ATP synthase subunit beta	1,01	-1,01	1,02
ZCP4_1009	F0F1 ATP synthase subunit gamma	-1,01	-1,04	-1,00
ZCP4_1010	F0F1 ATP synthase subunit alpha	-1,01	-1,02	-1,01
ZCP4_1011	ATP synthase F1, delta subunit	-1,02	-1,01	1,02
ZCP4_1012	chromosome partitioning ATPase	1,07	1,07	1,06
ZCP4_1013	protease Do	-1,04	-1,01	-1,02
ZCP4_1014	hypothetical protein	-1,12	-1,16	-1,16
ZCP4_1016	RNA methyltransferase, TrmH family, group 3	1,03	1,02	-1,01
ZCP4_1017	hypothetical protein	1,08	1,07	1,03
ZCP4_1018	ABC transporter related protein	1,13	1,05	1,03
ZCP4_1019	transport system permease protein	-1,04	-1,02	-1,08
ZCP4_1020	polysaccharide biosynthesis protein	-1,01	-1,02	-1,02
ZCP4_1021	DNA polymerase I	-1,00	-1,03	-1,03
ZCP4_1022	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,07	1,06	1,05
ZCP4_1023	homoserine O-acetyltransferase	-1,01	-1,04	-1,07
ZCP4_1024	methionine biosynthesis protein MetW	1,18	1,08	1,05
ZCP4_1025	hypothetical protein	-1,03	-1,05	-1,09
ZCP4_1026	hypothetical protein	-1,15	-1,12	1,07
ZCP4_1028	transcriptional regulator, CarD family	1,12	-1,01	-1,01
ZCP4_1029	4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain protein	1,05	-1,01	1,01
ZCP4_1030	helicase domain protein	1,06	1,01	1,02
ZCP4_1031	Peptidase M23	-1,01	1,04	1,03

5. Παράρτημα

ZCP4_1032	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	1,15	1,10	1,12
ZCP4_1033	MATE efflux family protein	-1,02	-1,10	-1,01
ZCP4_1034	outer membrane autotransporter barrel domain protein	-1,10	-1,04	-1,04
ZCP4_1035	50S ribosomal protein L21	-1,02	1,05	-1,08
ZCP4_1036	50S ribosomal protein L27	-1,03	-1,04	-1,19
ZCP4_1037	GCN5-related N-acetyltransferase	1,01	1,03	-1,00
ZCP4_1038	GTPase ObgE	-1,01	-1,02	-1,07
ZCP4_1039	gamma-glutamyl kinase	-1,09	-1,08	-1,04
ZCP4_1040	NAD-dependent epimerase/dehydratase	-1,02	1,00	-1,01
ZCP4_1041	cation efflux protein	1,02	1,09	-1,01
ZCP4_1042	transcriptional regulator, MerR family	-1,06	1,01	-1,14
ZCP4_1043	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	-1,02	-1,01	-1,03
ZCP4_1044	glutamine amidotransferase of anthranilate synthase	1,03	1,01	-1,02
ZCP4_1045	anthranilate phosphoribosyltransferase	1,02	1,00	-1,03
ZCP4_1046	LexA repressor	-1,06	-1,00	-1,08
ZCP4_1047	peptide chain release factor 2	1,02	1,04	-1,00
ZCP4_1048	penicillin-binding protein, 1A family	-1,01	-1,01	-1,01
ZCP4_1050	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	-1,10	-1,10	-1,02
ZCP4_1052	hypothetical protein	1,00	-1,03	1,03
ZCP4_1053	ribonuclease, Rne/Rng family	-1,06	-1,03	-1,03
ZCP4_1054	peptidase M48 Ste24p	1,06	-1,01	1,10
ZCP4_1055	DSBA oxidoreductase	1,05	1,01	1,06
ZCP4_1056	transcriptional regulator, RpiR family	-1,03	-1,02	1,03
ZCP4_1057	L-serine dehydratase 1	-1,01	-1,02	-1,02
ZCP4_1058	TonB-dependent siderophore receptor	-1,10	-1,06	-1,03
ZCP4_1060	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	-1,01	1,00	1,03
ZCP4_1061	cysteinyl-tRNA synthetase	-1,03	-1,01	-1,02
ZCP4_1062	hypothetical protein	1,00	1,00	1,00
ZCP4_1063	putative ABC transporter ATP-binding protein	-1,02	-1,01	1,02
ZCP4_1064	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	1,04	-1,01	-1,04
ZCP4_1065	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	-1,01	1,02	-1,01
ZCP4_1066	fructose-bisphosphate aldolase	1,11	1,07	1,03
ZCP4_1067	phosphoglycerate kinase	-1,01	-1,01	1,03
ZCP4_1068	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-1,05	-1,05	-1,00
ZCP4_1069	transketolase	1,02	-1,02	1,00
ZCP4_1070	hypothetical protein	1,19	1,24	-1,10
ZCP4_1071	SnoaL	1,16	1,10	1,22
ZCP4_1072	hypothetical protein	1,03	1,13	1,08
ZCP4_1074	thiamine biosynthesis protein ThiC	1,04	1,05	1,01
ZCP4_1075	outer membrane receptor protein	-1,07	1,05	-1,05
ZCP4_1076	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	-1,01	-1,05	-1,04
ZCP4_1077	peptidoglycan-associated lipoprotein	1,04	1,02	1,04
ZCP4_1078	protein TolB	-1,03	-1,04	-1,00
ZCP4_1079	hypothetical protein	1,01	-1,02	-1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_1080	protein TolR	1,02	-1,03	1,01
ZCP4_1081	MotA/TolQ/ExbB proton channel	-1,03	-1,04	1,02
ZCP4_1082	thioesterase superfamily protein	-1,03	-1,03	-1,03
ZCP4_1083	Holliday junction DNA helicase RuvB	1,03	1,03	-1,00
ZCP4_1084	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding protein	1,01	1,03	-1,04
ZCP4_1085	hypothetical protein	-1,07	-1,04	-1,00
ZCP4_1086	Holliday junction DNA helicase RuvA	1,19	-1,01	-1,04
ZCP4_1087	Holliday junction resolvase	1,02	1,04	-1,03
ZCP4_1088	hypothetical protein	1,05	-1,02	-1,00
ZCP4_1089	hypothetical protein	1,08	1,06	-1,06
ZCP4_1090	pyruvate kinase	1,01	1,00	1,00
ZCP4_1091	GCN5-related N-acetyltransferase	1,03	1,01	-1,05
ZCP4_1092	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	-1,08	-1,02	-1,08
ZCP4_1093	hypothetical protein	-1,09	-1,01	-1,03
ZCP4_1094	peptidase M28	1,00	1,00	-1,07
ZCP4_1095	L-aspartate oxidase	1,01	-1,04	-1,06
ZCP4_1096	ABC transporter related protein	1,00	1,01	-1,07
ZCP4_1097	alanine racemase domain protein	1,01	-1,02	-1,03
ZCP4_1098	protein tyrosine phosphatase	1,10	1,08	1,07
ZCP4_1099	aminoglycoside phosphotransferase	-1,03	1,03	-1,05
ZCP4_1100	hypothetical protein	-1,05	-1,03	1,11
ZCP4_1103	Sell domain protein repeat-containing protein	1,13	1,03	-1,02
ZCP4_1104	Sell domain protein repeat-containing protein	1,17	1,20	-1,05
ZCP4_1105	Outer-membrane-associated acid tolerance proteins	1,02	1,02	-1,01
ZCP4_1106	hypothetical protein	1,56	1,11	1,19
ZCP4_1108	Outer membrane-associated acid tolerance protein	-1,07	-1,01	1,02
ZCP4_1109	metallophosphoesterase	1,02	1,04	-1,01
ZCP4_1110	Acid phosphatase	-1,07	1,01	-1,08
ZCP4_1111	TonB-dependent receptor	1,01	1,04	-1,03
ZCP4_1112	S1/P1 nuclease	1,06	1,02	1,03
ZCP4_1114	ybaK/ebcC protein	-1,05	1,03	-1,01
ZCP4_1115	ATPase-like protein	-1,02	1,02	-1,00
ZCP4_1116	hypothetical protein	1,03	1,03	1,01
ZCP4_1117	recombination factor protein RarA	1,07	1,02	1,01
ZCP4_1118	short chain dehydrogenase	1,12	1,07	1,14
ZCP4_1119	LysR family transcriptional regulator	-1,02	-1,04	-1,02
ZCP4_1120	dihydroorotate dehydrogenase	1,03	1,01	-1,00
ZCP4_1121	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaA	1,06	1,06	-1,21
ZCP4_1122	hydroxylamine reductase	1,04	1,02	1,05
ZCP4_1123	transcriptional regulator responding to oxidative stress	1,02	1,04	1,04
ZCP4_1124	aminotransferase class IV	1,06	1,06	1,04
ZCP4_1125	glutamine amidotransferase of anthranilate synthase	-1,04	-1,00	-1,02
ZCP4_1126	para-aminobenzoate synthase, subunit I	1,04	1,01	1,05
ZCP4_1127	putative substrate of glutamine cyclotransferase	-1,00	-1,02	1,05

5. Παράρτημα

ZCP4_1128	ABC transporter related protein	-1,02	1,01	1,01
ZCP4_1129	hypothetical protein	-1,09	-1,23	1,00
ZCP4_1130	hypothetical protein	1,01	1,14	-1,07
ZCP4_1131	small multidrug resistance protein	1,02	-1,01	-1,11
ZCP4_1132	NDP-sugar transferase related to glycolipid synthesis	1,02	1,04	1,02
ZCP4_1133	isopropylmalate isomerase small subunit	1,12	1,07	-1,03
ZCP4_1134	isopropylmalate isomerase large subunit	1,03	1,01	-1,01
ZCP4_1135	beta-lactamase	1,08	1,06	1,02
ZCP4_1136	NAD-dependent epimerase/dehydratase	1,04	1,03	-1,02
ZCP4_1137	transcriptional activator of ZMO0101	1,12	1,41	1,01
ZCP4_1138	major facilitator superfamily MFS_1	-1,01	-1,02	-1,08
ZCP4_1139	CDP-diacylglycerol/glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	1,03	1,03	-1,00
ZCP4_1140	hypothetical protein	-1,22	1,15	1,04
ZCP4_1141	biotin synthase	-1,02	-1,01	-1,01
ZCP4_1142	hypothetical protein	-1,02	-1,01	1,02
ZCP4_1143	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,03	1,09	1,06
ZCP4_1145	hypothetical protein	-1,03	1,08	-1,09
ZCP4_1146	(p)ppGpp synthetase I, SpoT/RelA	1,03	1,02	1,01
ZCP4_1147	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	1,01	-1,04	-1,02
ZCP4_1148	CheX protein	1,02	-1,06	1,01
ZCP4_1149	CheA signal transduction histidine kinase	1,03	1,03	1,04
ZCP4_1150	MCP methyltransferase, CheR-type	1,01	-1,00	-1,00
ZCP4_1151	chemotaxis-specific methylesterase	1,01	-1,02	-1,02
ZCP4_1152	CheD	1,04	1,05	1,01
ZCP4_1153	response regulator receiver protein	-1,00	1,00	1,04
ZCP4_1154	CheW protein	1,04	1,01	1,02
ZCP4_1155	(dimethylallyl)adenosine tRNA methylthiotransferase	-1,01	-1,03	-1,03
ZCP4_1156	PhoH family protein	1,01	1,05	1,03
ZCP4_1157	hypothetical protein	-1,08	-1,05	-1,05
ZCP4_1158	CBS domain containing protein	-1,06	-1,02	-1,07
ZCP4_1159	NHL repeat-containing protein	-1,02	1,04	1,01
ZCP4_1160	glutaredoxin 2	1,08	1,10	1,03
ZCP4_1161	major tail tube protein	1,07	-1,04	1,00
ZCP4_1162	Sell domain protein repeat-containing protein	1,01	-1,01	-1,03
ZCP4_1163	Carbohydrate-selective porin OprB	1,07	1,00	1,01
ZCP4_1164	aldo/keto reductase	-1,04	1,00	-1,00
ZCP4_1165	histidine acid phosphatase	1,02	1,03	1,03
ZCP4_1166	hypothetical protein	1,02	1,03	1,01
ZCP4_1167	Glycerate kinase	1,12	-1,08	-1,04
ZCP4_1168	phage protein	-1,06	1,04	1,01
ZCP4_1169	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	1,06	1,01	1,04
ZCP4_1171	transcriptional regulator, MarR family	1,01	-1,02	-1,07
ZCP4_1172	alpha/beta hydrolase fold protein	-1,13	-1,17	-1,17
ZCP4_1173	major facilitator superfamily MFS_1	1,17	1,21	1,04

5. Παράρτημα

ZCP4_1174	transcriptional regulator, LysR family	-1,00	-1,04	1,03
ZCP4_1175	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	1,03	1,29	1,29
ZCP4_1176	SelI domain protein repeat-containing protein	-1,09	1,02	-1,01
ZCP4_1178	Maf family protein	-1,03	1,14	-1,02
ZCP4_1179	shikimate 5-dehydrogenase	-1,08	1,02	-1,01
ZCP4_1180	dephospho-CoA kinase	-1,05	1,14	1,03
ZCP4_1181	DNA polymerase III, epsilon subunit	1,06	1,08	1,08
ZCP4_1182	sigma 54 modulation protein/ribosomal protein S30EA	1,02	1,02	1,04
ZCP4_1183	putative PTS IIA-like nitrogen-regulatory protein PtsN	1,01	1,01	1,06
ZCP4_1184	hypothetical protein	1,07	1,14	1,05
ZCP4_1185	Ankyrin	-1,05	-1,04	-1,06
ZCP4_1186	hypothetical protein	-1,14	-1,03	-1,13
ZCP4_1187	TonB-dependent receptor	1,05	1,05	1,11
ZCP4_1189	SelI domain protein repeat-containing protein	-1,03	1,00	-1,00
ZCP4_1190	restriction endonuclease	1,10	1,03	1,02
ZCP4_1191	inosine monophosphate cyclohydrolase	1,02	-1,03	-1,02
ZCP4_1192	SelI domain protein repeat-containing protein	-1,07	-1,02	-1,16
ZCP4_1193	hypothetical protein	-1,01	-1,00	-1,04
ZCP4_1194	transcriptional regulator, AsnC family	1,06	1,08	1,05
ZCP4_1195	hypothetical protein	1,08	1,08	1,13
ZCP4_1196	hypothetical protein	1,04	1,01	1,08
ZCP4_1197	hypothetical protein	-1,01	-1,01	-1,11
ZCP4_1198	Heparinase II/III family protein	-1,02	-1,00	-1,05
ZCP4_1199	Ribulose-phosphate 3-epimerase	-1,01	-1,04	-1,09
ZCP4_1200	Fmu (Sun) domain protein	-1,04	-1,06	-1,01
ZCP4_1201	GrpE protein	-1,03	-1,03	-1,01
ZCP4_1202	HrcA family transcriptional regulator	1,01	1,01	1,03
ZCP4_1203	ribonuclease PH	-1,04	1,07	1,02
ZCP4_1204	putative deoxyribonucleotide triphosphate pyrophosphatase	1,04	1,02	1,03
ZCP4_1205	coproporphyrinogen III oxidase	-1,25	-1,13	-1,12
ZCP4_1206	hypothetical protein	-1,25	-1,33	-1,35
ZCP4_1207	hypothetical protein	1,17	1,19	-1,04
ZCP4_1208	sulfite reductase subunit alpha	1,03	-1,00	1,01
ZCP4_1209	sulfite reductase subunit beta	-1,03	-1,07	-1,04
ZCP4_1210	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	-1,03	-1,04	-1,04
ZCP4_1211	uroporphyrin-III C-methyltransferase	-1,02	-1,00	-1,03
ZCP4_1212	sulfate adenylyltransferase subunit 2	1,04	1,01	-1,01
ZCP4_1213	sulfate adenylyltransferase	1,01	1,03	-1,02
ZCP4_1214	adenylylsulfate kinase	1,06	-1,02	-1,02
ZCP4_1215	aminotransferase class I and II	1,22	1,10	-1,01
ZCP4_1216	TonB-dependent receptor plug	1,11	-1,01	1,00
ZCP4_1217	uroporphyrinogen decarboxylase	1,17	1,11	-1,01
ZCP4_1218	Protoporphyrinogen IX oxidase, novel form	1,07	1,02	1,00
ZCP4_1219	transcription termination factor Rho	1,02	1,01	-1,00

5. Παράρτημα

ZCP4_1220	Alcohol dehydrogenase GroES domain protein	1,11	-1,01	-1,02
ZCP4_1221	dienelactone hydrolase-like enzyme	1,09	1,01	1,08
ZCP4_1222	methylated-DNA/protein-cysteine methyltransferase	1,07	1,12	1,02
ZCP4_1223	tRNA modification GTPase TrmE	-1,01	1,02	-1,01
ZCP4_1224	TonB-dependent receptor plug	-1,00	1,01	-1,06
ZCP4_1226	aldo/keto reductase	-1,03	-1,09	-1,09
ZCP4_1227	SMP-30/Gluconolactonase/LRE domain protein	-1,04	1,00	-1,03
ZCP4_1228	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme GidA	1,00	-1,03	-1,10
ZCP4_1229	methyltransferase GidB	-1,02	1,03	-1,07
ZCP4_1230	Cobyrinic acid ac-diamide synthase	1,05	1,05	1,03
ZCP4_1231	parB-like partition protein	1,03	1,09	1,06
ZCP4_1232	major facilitator superfamily MFS_1	-1,08	-1,04	-1,07
ZCP4_1233	hypothetical protein	1,09	-1,01	-1,01
ZCP4_1234	ornithine cyclodeaminase	1,02	1,09	-1,06
ZCP4_1235	chromosome replication initiation inhibitor protein	1,08	1,08	1,05
ZCP4_1236	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	1,35	1,30	1,24
ZCP4_1237	pantoate/beta-alanine ligase	1,07	1,12	1,03
ZCP4_1238	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	1,07	-1,00	1,03
ZCP4_1239	hypothetical protein	1,01	1,04	1,02
ZCP4_1240	Beta-lactamase	1,01	-1,05	1,22
ZCP4_1241	hypothetical protein	-1,09	-1,32	1,20
ZCP4_1242	ComEC/Rec2-related protein	1,10	1,02	1,07
ZCP4_1243	glutamate--tRNA ligase 2	-1,06	-1,01	-1,01
ZCP4_1244	citrate (Si)-synthase	1,05	1,05	1,02
ZCP4_1245	histidine kinase	-1,17	-1,11	1,02
ZCP4_1246	hypothetical protein	-1,31	-1,16	1,00
ZCP4_1247	hypothetical protein	-1,06	-1,12	1,24
ZCP4_1248	hypothetical protein	-1,22	-1,11	-1,06
ZCP4_1249	hypothetical protein	1,00	1,02	1,06
ZCP4_1250	glycosyl transferase group 1	-1,01	1,04	-1,01
ZCP4_1251	DNA repair protein RecN	1,01	-1,02	1,00
ZCP4_1252	malate dehydrogenase	-1,02	-1,00	1,02
ZCP4_1253	molecular chaperone GroEL	-1,04	-1,04	1,03
ZCP4_1254	co-chaperonin GroES	1,02	1,02	1,07
ZCP4_1255	signal peptide peptidase SppA	1,06	1,03	1,05
ZCP4_1256	peptidase U32	1,02	1,02	-1,02
ZCP4_1257	peptidase U32	1,06	1,02	-1,02
ZCP4_1258	capsular polysaccharide biosynthesis protein RkpI (phosphoglycerol transferase?)	-1,03	-1,03	-1,03
ZCP4_1259	Capsule polysaccharide biosynthesis protein	-1,00	-1,02	-1,13
ZCP4_1260	primosome assembly protein PriA	1,05	1,05	1,04
ZCP4_1261	hypothetical protein	1,03	1,09	1,06
ZCP4_1262	thiol-disulfide isomerase	1,10	1,08	1,09
ZCP4_1263	adenosylmethionine--8-amino-7-oxononanoate transaminase	1,07	1,10	1,08
ZCP4_1264	8-amino-7-oxononanoate synthase	-1,07	-1,03	-1,05

5. Παράρτημα

ZCP4_1265	pimeloyl-[acp] methyl ester esterase	1,07	1,06	1,07
ZCP4_1266	dethiobiotin synthase	-1,09	-1,01	-1,06
ZCP4_1267	site-specific tyrosine recombinase XerC	1,11	1,09	1,02
ZCP4_1268	glutathione synthetase	-1,01	-1,04	-1,06
ZCP4_1269	GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD	-1,05	-1,01	-1,00
ZCP4_1270	peptidyl-tRNA hydrolase	-1,02	-1,02	-1,02
ZCP4_1271	ribosomal 5S rRNA E-loop binding protein Ctc/L25/TL5	1,01	1,01	-1,03
ZCP4_1272	hypothetical protein	-1,06	-1,04	-1,04
ZCP4_1273	SmpA/OmlA domain protein	1,04	1,04	1,05
ZCP4_1274	DNA mismatch repair protein MutS	1,01	1,04	1,02
ZCP4_1275	translation initiation factor IF-3	-1,03	-1,02	-1,05
ZCP4_1277	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)(+))	-1,00	-1,01	-1,05
ZCP4_1278	putative DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease	-1,01	-1,03	-1,02
ZCP4_1279	porphobilinogen deaminase	1,04	1,04	1,01
ZCP4_1280	uroporphyrinogen III synthase HEM4	-1,11	-1,11	1,05
ZCP4_1281	hypothetical protein	-1,08	1,00	1,02
ZCP4_1283	putative glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsX	-1,02	-1,04	1,01
ZCP4_1284	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III	1,02	-1,01	-1,03
ZCP4_1286	preprotein translocase, YajC subunit	-1,02	-1,01	-1,00
ZCP4_1287	preprotein translocase subunit SecD	-1,06	-1,05	-1,00
ZCP4_1288	protein-export membrane protein SecF	-1,04	-1,05	-1,01
ZCP4_1289	PfkB domain protein	1,00	1,00	1,03
ZCP4_1290	involved in peptidoglycan recycling or outer membrane attachment	1,01	1,02	-1,04
ZCP4_1291	threonine synthase	1,02	1,00	-1,00
ZCP4_1292	Mitochondrial processing peptidase-like protein	1,01	-1,01	1,01
ZCP4_1293	SAM-dependent methyltransferase-like protein	1,07	1,01	-1,02
ZCP4_1295	isochorismatase hydrolase	1,08	-1,02	-1,04
ZCP4_1296	membrane protein AbrB duplication	1,04	-1,05	-1,06
ZCP4_1297	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	1,08	-1,00	-1,01
ZCP4_1298	hypothetical protein	-1,01	1,03	-1,06
ZCP4_1299	glyoxylate/hydroxypyruvate reductase A	-1,00	-1,02	-1,01
ZCP4_1300	membrane protein AbrB duplication	1,00	1,02	-1,03
ZCP4_1302	hypothetical protein	-1,06	-1,04	-1,01
ZCP4_1303	delta-aminolevulinic acid dehydratase	1,06	1,09	-1,06
ZCP4_1304	valyl-tRNA synthetase	-1,04	-1,05	-1,06
ZCP4_1305	glutamine cyclotransferase	1,02	1,03	1,03
ZCP4_1306	hypothetical protein	1,02	1,02	-1,01
ZCP4_1307	FeS cluster repair with bolA	1,02	1,00	1,03
ZCP4_1308	ATP-binding protein	1,09	1,04	1,13
ZCP4_1309	glutaredoxin-like protein	1,03	1,00	1,02
ZCP4_1310	hypothetical protein	-1,02	-1,02	1,03
ZCP4_1311	quinolinate synthetase	1,03	1,01	1,01
ZCP4_1312	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	1,02	-1,01	-1,03
ZCP4_1313	Ribonuclease I-like protein	1,01	-1,01	1,03

5. Παράρτημα

ZCP4_1314	biotin/acetyl-CoA-carboxylase ligase	1,05	1,02	1,01
ZCP4_1315	pantothenate kinase	1,00	1,01	-1,05
ZCP4_1316	beta-lactamase domain protein	-1,01	-1,02	-1,03
ZCP4_1323	hypothetical protein	1,01	1,01	1,03
ZCP4_1324	hypothetical protein	-1,01	-1,01	-1,02
ZCP4_1325	RES domain-containing protein	-1,04	-1,02	1,01
ZCP4_1326	glutamine amidotransferase	1,14	1,07	-1,04
ZCP4_1327	transcriptional regulator, GntR family with aminotransferase domain	1,10	1,06	1,06
ZCP4_1328	dihydrodipicolinate synthase family protein	1,06	1,04	1,04
ZCP4_1329	flavodoxin FldA	-1,04	-1,04	-1,08
ZCP4_1330	hypothetical protein	-1,10	-1,12	-1,14
ZCP4_1331	hypothetical protein	-1,14	-1,02	-1,27
ZCP4_1332	periplasmic binding protein	1,11	1,18	1,15
ZCP4_1333	transport system permease protein	1,11	1,04	1,22
ZCP4_1334	ABC transporter related protein	-1,01	1,12	1,05
ZCP4_1335	PhnA protein	1,01	1,06	-1,03
ZCP4_1336	oxidoreductase domain protein	1,01	1,00	1,07
ZCP4_1337	ApbE family lipoprotein	-1,01	1,01	-1,01
ZCP4_1338	Functions with Rnf and may reduce SoxR	1,03	1,05	1,07
ZCP4_1339	isochorismatase hydrolase	-1,00	1,03	1,06
ZCP4_1340	TOBE domain protein	-1,24	1,02	-1,11
ZCP4_1341	modD protein	1,01	-1,08	-1,06
ZCP4_1343	homocitrate synthase	1,07	-1,00	-1,02
ZCP4_1344	cysteine desulfurase NifS	1,02	1,10	-1,23
ZCP4_1350	nitrogen fixation protein NifX	1,42	1,14	-1,09
ZCP4_1351	nitrogenase molybdenum-cofactor biosynthesis protein NifN	-1,09	-1,21	1,00
ZCP4_1352	nitrogenase molybdenum-cofactor biosynthesis protein NifE	-1,24	-1,13	1,07
ZCP4_1353	nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	1,14	1,08	1,00
ZCP4_1354	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	1,03	-1,03	-1,01
ZCP4_1356	TonB-dependent siderophore receptor	-1,08	-1,08	-1,09
ZCP4_1357	hypothetical protein	-1,00	1,07	-1,16
ZCP4_1359	NifZ family protein	-1,13	-1,19	-1,36
ZCP4_1360	4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain protein	1,18	-1,00	-1,00
ZCP4_1361	nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB	1,01	1,14	-1,04
ZCP4_1362	transcriptional regulator, NifA, Fis Family	-1,34	-1,17	1,08
ZCP4_1363	TonB-dependent siderophore receptor	1,19	-1,10	1,08
ZCP4_1364	electron transport complex, RnfABCDGE type, A subunit	1,00	-1,03	-1,08
ZCP4_1365	electron transport complex, RnfABCDGE type, B subunit	-1,04	-1,04	1,03
ZCP4_1366	electron transport complex, RnfABCDGE type, C subunit	-1,01	1,01	-1,03
ZCP4_1367	electron transport complex, RnfABCDGE type, D subunit	-1,02	-1,05	-1,04
ZCP4_1368	electron transport complex, RnfABCDGE type, G subunit	-1,01	-1,07	-1,09
ZCP4_1369	electron transport complex RsxE subunit	1,03	1,04	-1,01
ZCP4_1370	electron transport complex, RnfABCDGE type, H subunit	1,11	1,04	-1,12
ZCP4_1371	TonB-dependent receptor	-1,13	-1,13	-1,09

5. Παράρτημα

ZCP4_1372	Maltose O-acetyltransferase	1,09	-1,07	1,01
ZCP4_1373	Haloacid dehalogenase domain protein hydrolase	-1,03	-1,02	-1,03
ZCP4_1374	amino acid permease-associated region	1,12	1,06	-1,01
ZCP4_1375	integration host factor, beta subunit	1,00	1,06	-1,14
ZCP4_1376	phenazine biosynthesis protein PhzF family	1,07	1,08	-1,02
ZCP4_1377	30S ribosomal protein S1	-1,01	-1,01	-1,01
ZCP4_1378	cytidylate kinase	1,03	-1,02	-1,01
ZCP4_1379	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	1,03	1,00	1,00
ZCP4_1380	hypothetical protein	1,04	1,03	1,06
ZCP4_1382	transcriptional regulator, LysR family	1,10	1,08	-1,34
ZCP4_1383	dihydroxy-acid dehydratase	-1,04	-1,06	-1,07
ZCP4_1384	hypothetical protein	-1,00	1,05	-1,06
ZCP4_1385	ABC transporter	1,04	-1,01	1,03
ZCP4_1386	hypothetical protein	1,05	1,04	1,08
ZCP4_1387	hypothetical protein	-1,31	-1,15	1,08
ZCP4_1388	hypothetical protein	-1,06	-1,05	-1,03
ZCP4_1389	mechanosensitive ion channel protein MscS	-1,01	-1,02	1,00
ZCP4_1390	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	-1,02	-1,01	1,03
ZCP4_1391	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	1,01	1,00	1,06
ZCP4_1392	hypothetical protein	1,03	1,02	1,02
ZCP4_1393	hypothetical protein	-1,07	-1,08	-1,24
ZCP4_1394	aminopeptidase N	-1,00	-1,01	1,01
ZCP4_1395	hypothetical protein	-1,11	-1,03	-1,05
ZCP4_1397	aldo/keto reductase	1,06	1,05	1,00
ZCP4_1398	NAD(P)H quinone oxidoreductase, PIG3 family	1,16	1,14	1,12
ZCP4_1399	iron-containing alcohol dehydrogenase	1,02	1,02	1,03
ZCP4_1400	argininosuccinate lyase	-1,03	-1,02	-1,00
ZCP4_1401	hypothetical protein	-1,07	-1,07	-1,12
ZCP4_1402	diaminopimelate decarboxylase	-1,04	-1,06	-1,01
ZCP4_1403	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	1,00	1,02	1,01
ZCP4_1404	Mg2 transporter protein CorA family protein	1,02	1,04	1,04
ZCP4_1405	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein	1,06	1,04	-1,02
ZCP4_1406	hypothetical protein	-1,05	1,01	-1,02
ZCP4_1407	hypothetical protein	-1,11	1,10	-1,29
ZCP4_1408	Uroporphyrin-III C/tetrapyrrole (Corrin/Porphyrin) methyltransferase	1,04	1,02	-1,01
ZCP4_1409	Extracellular ligand-binding receptor	-1,01	1,02	1,01
ZCP4_1410	outer membrane assembly lipoprotein YfiO	-1,03	1,02	-1,03
ZCP4_1411	carbohydrate kinase, thermoresistant glucokinase family	1,06	1,02	-1,01
ZCP4_1412	gluconate transporter	1,00	-1,02	1,00
ZCP4_1413	Thymidylate synthase	1,05	1,01	-1,01
ZCP4_1414	Aldehyde Dehydrogenase	1,06	1,09	1,17
ZCP4_1415	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	-1,05	-1,00	1,05
ZCP4_1416	hypothetical protein	-1,10	-1,04	-1,02
ZCP4_1417	hypothetical protein	-1,06	1,00	1,00

5. Παράρτημα

ZCP4_1418	hypothetical protein	-1,07	1,03	1,04
ZCP4_1419	VacJ family lipoprotein	1,04	1,01	-1,04
ZCP4_1420	transcriptional regulator, ArsR family	-1,00	-1,04	-1,02
ZCP4_1421	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	1,01	1,07	1,05
ZCP4_1422	homocysteine S-methyltransferase	1,04	1,02	1,02
ZCP4_1423	methionine synthase	1,01	1,01	-1,01
ZCP4_1424	biotin transporter BioY	1,08	1,07	-1,04
ZCP4_1425	GTP-binding protein LepA	1,04	-1,02	-1,03
ZCP4_1426	hypothetical protein	1,13	1,12	1,04
ZCP4_1427	putatively essential histidine kinase for ZMO1739	-1,02	-1,03	-1,02
ZCP4_1428	putatively essential response regulator	-1,01	1,02	1,04
ZCP4_1429	glycosyl transferase group 1	1,02	1,05	-1,02
ZCP4_1430	UDP glycosyltransferase-like enzyme in cell wall synthesis	1,15	1,13	1,05
ZCP4_1431	transcriptional regulator	1,06	1,03	-1,02
ZCP4_1432	alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen	1,00	1,00	1,00
ZCP4_1433	Serine O-acetyltransferase	1,08	1,08	1,04
ZCP4_1434	hypothetical protein	1,01	1,01	1,02
ZCP4_1435	hypothetical protein	-1,03	1,02	1,04
ZCP4_1436	aminotransferase	-1,00	1,06	-1,00
ZCP4_1437	ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS	1,12	1,05	-1,02
ZCP4_1438	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	1,04	1,03	-1,01
ZCP4_1439	hypothetical protein	1,04	1,06	1,08
ZCP4_1440	Laccase involved in oxidative stress resistance	1,02	-1,00	-1,03
ZCP4_1441	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase/class III alcohol dehydrogenase	1,08	1,00	-1,04
ZCP4_1442	extradiol dioxygenase	1,05	1,06	1,05
ZCP4_1443	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	1,06	1,05	1,02
ZCP4_1444	ROK family protein	-1,00	1,01	1,00
ZCP4_1445	part of an outer membrane integrity system	-1,10	-1,10	1,09
ZCP4_1446	tonB-like protein involved in outer membrane integrity	-1,06	-1,00	1,04
ZCP4_1447	MotA/TolQ/ExbB proton channel	1,03	1,02	1,01
ZCP4_1448	Biopolymer transport protein ExbD/TolR	1,03	1,04	1,06
ZCP4_1449	biopolymer transport protein ExbD/TolR (NCBI)	-1,01	-1,01	-1,01
ZCP4_1450	30S ribosomal protein S21	-1,01	-1,04	-1,07
ZCP4_1451	peptidylprolyl isomerase FKBP-type	1,06	-1,01	1,03
ZCP4_1452	hypothetical protein	-1,02	1,02	1,02
ZCP4_1453	signal peptidase I	-1,01	1,01	1,00
ZCP4_1454	holo-acyl-carrier-protein synthase	1,07	1,06	1,01
ZCP4_1455	pyridoxine 5'-phosphate synthase	1,00	-1,02	-1,03
ZCP4_1456	orotate phosphoribosyltransferase	1,05	1,04	1,00
ZCP4_1457	Thioredoxin domain protein	1,15	1,13	1,16
ZCP4_1458	peptidase S16 lon domain protein	1,05	1,08	1,05
ZCP4_1459	Ubiquinone biosynthesis hydroxylase, UbiH/UbiF/VisC/COQ6 family	1,03	1,05	1,02
ZCP4_1460	cell divisionFtsK/SpoIIIE	1,05	-1,02	-1,07
ZCP4_1461	outer membrane lipoprotein carrier protein LolA	-1,03	-1,03	-1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_1462	hypothetical protein	-1,10	-1,31	1,11
ZCP4_1463	exodeoxyribonuclease III Xth	1,01	1,00	-1,02
ZCP4_1464	GTP cyclohydrolase II	-1,04	-1,06	-1,00
ZCP4_1465	transcriptional regulator, HxLR family	-1,06	-1,14	-1,08
ZCP4_1466	zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	1,04	1,06	1,06
ZCP4_1467	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein	1,26	1,09	1,04
ZCP4_1468	TonB-dependent receptor	1,05	1,01	-1,03
ZCP4_1469	chorismate synthase	-1,00	-1,05	-1,03
ZCP4_1470	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,03	-1,00	-1,01
ZCP4_1471	ribonuclease BN	1,04	1,02	1,01
ZCP4_1472	chaperone DnaJ domain protein	1,07	1,06	-1,04
ZCP4_1473	dihydroorotase multifunctional complex type	1,02	1,02	1,00
ZCP4_1474	folate-binding protein YgfZ	1,04	1,04	1,01
ZCP4_1475	adenylosuccinate synthetase	1,00	-1,00	-1,03
ZCP4_1476	ATP phosphoribosyltransferase	-1,02	1,02	-1,01
ZCP4_1477	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1,02	1,05	1,00
ZCP4_1478	phosphoserine aminotransferase	-1,01	1,02	-1,01
ZCP4_1479	L-asparaginase	-1,01	1,01	-1,07
ZCP4_1480	aspartate aminotransferase	-1,06	-1,06	-1,03
ZCP4_1481	YidE/YbjL duplication	-1,04	-1,04	-1,03
ZCP4_1482	Extensin family protein	1,02	1,10	1,02
ZCP4_1483	hypothetical protein	1,06	1,04	1,07
ZCP4_1484	prephenate dehydratase	-1,04	-1,06	-1,06
ZCP4_1485	A/G-specific adenine glycosylase	1,07	1,07	1,02
ZCP4_1486	hypothetical protein	1,06	1,08	1,06
ZCP4_1487	protein-disulfide isomerase-like protein	1,01	1,00	1,03
ZCP4_1488	aldo/keto reductase	1,06	1,01	1,03
ZCP4_1489	hypothetical protein	1,02	-1,01	-1,01
ZCP4_1490	hypothetical protein	1,03	1,02	-1,11
ZCP4_1491	hypothetical protein	1,02	-1,09	-1,08
ZCP4_1492	Ubiquinone biosynthesis protein COQ7	-1,01	1,05	1,03
ZCP4_1493	hypothetical protein	1,00	-1,01	-1,05
ZCP4_1494	carboxyl-terminal protease	-1,07	-1,02	-1,05
ZCP4_1495	Peptidase M23	-1,08	1,05	1,03
ZCP4_1496	hypothetical protein	-1,05	1,08	-1,01
ZCP4_1497	iojap-like protein	1,03	1,02	-1,01
ZCP4_1498	nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase	-1,05	-1,09	-1,04
ZCP4_1499	gamma-glutamyl-phosphate reductase	-1,02	-1,01	-1,05
ZCP4_1500	hypothetical protein	-1,06	1,05	-1,05
ZCP4_1501	ATP-dependent metalloprotease FtsH	-1,01	1,02	1,02
ZCP4_1502	tRNA(Ile)-lysine synthetase	-1,03	-1,03	-1,02
ZCP4_1503	hypothetical protein	-1,03	-1,07	-1,07
ZCP4_1504	transcriptional regulator, XRE family	-1,02	-1,02	1,02
ZCP4_1505	antioxidant, AhpC/TSA family protein	1,03	-1,03	1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_1506	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	1,05	1,05	1,06
ZCP4_1507	aspartate kinase	1,01	-1,01	-1,05
ZCP4_1508	2-nitropropane dioxygenase NPD	1,08	-1,07	-1,10
ZCP4_1509	PTSINtr with GAF domain, PtsP	1,02	-1,03	-1,00
ZCP4_1510	beta-lactamase	-1,02	-1,05	-1,08
ZCP4_1511	Gluconolactonase	1,01	-1,03	-1,06
ZCP4_1512	uracil-DNA glycosylase	1,02	1,02	-1,01
ZCP4_1513	2-amino-4-hydroxy-6- hydroxymethyldihydropteridine pyrophosphokinase	-1,04	1,01	1,01
ZCP4_1515	transcription-repair coupling factor	1,05	1,05	1,03
ZCP4_1516	DEAD/DEAH box helicase domain protein	1,03	-1,02	1,01
ZCP4_1517	tyrosyl-tRNA synthetase	1,02	-1,03	-1,04
ZCP4_1518	anhydro-N-acetylmuramic acid kinase	1,03	1,02	-1,03
ZCP4_1519	hypothetical protein	1,00	1,03	-1,10
ZCP4_1520	tryptophanyl-tRNA synthetase	-1,09	-1,07	-1,05
ZCP4_1521	integral membrane protein MviN	-1,08	-1,04	-1,02
ZCP4_1522	protein-export protein SecB	-1,01	1,03	1,02
ZCP4_1523	import inner membrane translocase subunit Tim44	1,02	1,03	1,05
ZCP4_1524	hypothetical protein	1,03	-1,01	1,04
ZCP4_1525	MltA domain protein	1,01	-1,01	-1,02
ZCP4_1527	hypothetical protein	-1,06	-1,09	-1,08
ZCP4_1528	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	-1,02	-1,02	-1,03
ZCP4_1529	TonB-dependent receptor component of system for siderophore uptake and catechol efflux	-1,02	-1,03	-1,08
ZCP4_1530	component of system for siderophore uptake and catechol efflux	-1,01	-1,04	-1,05
ZCP4_1531	component of system for siderophore uptake and catechol efflux	1,03	-1,02	-1,04
ZCP4_1533	ribosome biogenesis GTP-binding protein YsxC	1,04	1,03	1,01
ZCP4_1534	putative inner membrane protein translocase component YidC	-1,02	-1,02	-1,04
ZCP4_1536	ribonuclease P protein component	1,05	1,09	-1,03
ZCP4_1537	Mg chelataase, subunit ChII	1,08	1,04	-1,01
ZCP4_1538	RNA polymerase sigma factor RpoD	-1,02	-1,01	1,01
ZCP4_1539	DNA primase	-1,01	1,02	1,01
ZCP4_1541	GatB/YqeY domain-containing protein	1,03	1,07	-1,02
ZCP4_1542	carbamoyl phosphate synthase small subunit	-1,02	1,06	-1,02
ZCP4_1543	carbamoyl phosphate synthase large subunit	-1,00	-1,00	-1,03
ZCP4_1544	transcription elongation factor GreA	1,00	-1,00	-1,06
ZCP4_1545	Rhomboid family protein	1,04	1,00	-1,01
ZCP4_1546	toluene tolerance family protein	1,02	1,05	1,07
ZCP4_1547	hypothetical protein	-1,00	1,04	1,07
ZCP4_1548	hypothetical protein	-1,01	1,04	1,07
ZCP4_1549	hypothetical protein	-1,14	-1,06	1,05
ZCP4_1550	enolase	1,05	1,00	1,05
ZCP4_1551	Septum formation initiator	1,03	1,04	1,05
ZCP4_1552	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component, alpha subunit	1,01	-1,00	-1,01
ZCP4_1553	pyruvate dehydrogenase subunit beta	-1,01	1,02	1,03
ZCP4_1554	Phosphodiesterase I	-1,05	1,01	-1,03

5. Παράρτημα

ZCP4_1555	hypothetical protein	1,04	1,01	1,01
ZCP4_1556	hypothetical protein	1,05	1,01	-1,01
ZCP4_1557	ribonuclease H	1,00	-1,02	-1,04
ZCP4_1558	homoserine kinase	-1,02	1,04	1,00
ZCP4_1559	hopanoid biosynthesis associated RND transporter like protein HpnN	1,02	1,02	-1,00
ZCP4_1560	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	1,03	1,01	-1,02
ZCP4_1561	iron-containing alcohol dehydrogenase	1,06	1,05	1,10
ZCP4_1562	peptidase M61 domain protein	1,01	1,02	1,00
ZCP4_1563	alanine racemase	1,03	1,03	1,00
ZCP4_1564	permease component of efflux system for aromatic compounds	1,01	1,01	-1,04
ZCP4_1565	ATPase component of system for efflux of aromatic compounds	-1,00	1,05	1,07
ZCP4_1566	tRNA-binding protein	1,02	-1,05	-1,06
ZCP4_1567	hypothetical protein	1,09	1,05	-1,12
ZCP4_1568	excinuclease ABC subunit A	-1,02	1,01	1,04
ZCP4_1569	hypothetical protein	-1,07	1,04	1,08
ZCP4_1570	bacterioferritin	-1,07	1,00	-1,01
ZCP4_1571	recombination protein F	1,01	-1,01	-1,13
ZCP4_1572	DNA gyrase subunit B	1,01	-1,02	-1,02
ZCP4_1573	Uracil-DNA glycosylase superfamily	1,03	1,08	-1,11
ZCP4_1574	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	-1,01	-1,04	-1,13
ZCP4_1581	hydrolases of the alpha/beta superfamily; K06889	-1,15	-1,06	-1,00
ZCP4_1582	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,20	1,11	1,08
ZCP4_1583	major facilitator superfamily MFS_1	1,16	1,08	1,11
ZCP4_1584	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,07	1,10	1,05
ZCP4_1585	transcriptional regulator, LysR family	-1,06	-1,02	1,00
ZCP4_1586	peroxidase regulated by ZMO0116	-1,03	-1,01	-1,04
ZCP4_1587	hypothetical protein	1,04	1,05	1,00
ZCP4_1588	cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II	-1,06	-1,04	-1,03
ZCP4_1589	cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit I	-1,05	-1,04	-1,04
ZCP4_1590	formate acetyltransferase	1,00	-1,02	1,00
ZCP4_1591	pyruvate formate-lyase I-activating enzyme	1,00	1,01	-1,00
ZCP4_1592	TonB-dependent receptor	1,00	-1,00	-1,01
ZCP4_1593	aminoglycoside phosphotransferase	1,03	1,07	-1,01
ZCP4_1594	hypothetical protein	1,28	1,04	1,26
ZCP4_1595	nicotinamide mononucleotide transporter PnuC	1,03	-1,04	-1,12
ZCP4_1597	hypothetical protein	1,01	-1,00	1,04
ZCP4_1598	NUDIX hydrolase	1,06	1,05	1,00
ZCP4_1599	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,03	-1,02	1,04
ZCP4_1600	amidophosphoribosyltransferase	-1,00	1,00	-1,01
ZCP4_1601	glutamate/cysteine ligase	-1,01	1,00	1,00
ZCP4_1602	16S ribosomal RNA methyltransferase RsmE	-1,01	1,03	1,01
ZCP4_1603	thiamine-monophosphate kinase	1,02	1,01	-1,03
ZCP4_1604	NusB antitermination factor	-1,02	1,01	-1,05
ZCP4_1605	Histidinol dehydrogenase	1,03	-1,02	-1,04

5. Παράρτημα

ZCP4_1606	ATP phosphoribosyltransferase	1,01	-1,02	-1,10
ZCP4_1607	BolA family protein	1,12	1,14	1,06
ZCP4_1608	squalene-hopene cyclase	1,01	1,04	1,03
ZCP4_1609	transcriptional regulator, TetR family	-1,02	-1,02	-1,06
ZCP4_1610	heat shock protein DnaJ domain protein	1,00	-1,00	1,02
ZCP4_1611	cobalt chelatase, pCobS small subunit	-1,01	-1,01	1,04
ZCP4_1612	cobalt chelatase, pCobT subunit	1,03	1,00	1,04
ZCP4_1613	single-strand binding protein	1,17	1,00	-1,15
ZCP4_1614	ferrous iron transport protein B	-1,03	-1,03	-1,01
ZCP4_1615	FeoA family protein	-1,03	1,02	1,04
ZCP4_1616	DNA polymerase III, alpha subunit	1,03	1,04	-1,01
ZCP4_1618	hypothetical protein	1,09	1,09	1,12
ZCP4_1619	phosphoribosylformylglycinamidine synthase I	1,04	1,01	1,01
ZCP4_1620	phosphoribosylformylglycinamidine synthase, purS	1,06	-1,01	-1,05
ZCP4_1621	Capsular polysaccharide synthesis protein	-1,00	-1,01	1,01
ZCP4_1622	membrane fusion component of efflux system ZMO1529:ZMO1525	-1,05	-1,03	-1,03
ZCP4_1623	inner membrane component of efflux system ZMO1529:ZMO1525	1,00	1,03	1,01
ZCP4_1624	inner membrane component of efflux system ZMO1529:ZMO1525	1,01	-1,03	-1,06
ZCP4_1625	efflux transporter outer membrane factor lipoprotein	1,02	1,02	1,04
ZCP4_1626	hypothetical protein	1,03	1,04	1,01
ZCP4_1627	TonB-dependent receptor	1,02	1,06	1,05
ZCP4_1628	hypothetical protein	1,00	-1,08	1,00
ZCP4_1629	hypothetical protein	1,01	1,06	-1,06
ZCP4_1630	ribose-phosphate pyrophosphokinase	1,02	1,01	1,01
ZCP4_1631	fructose 1,6-bisphosphatase	-1,01	-1,06	-1,03
ZCP4_1633	50S ribosomal protein L20	-1,01	-1,07	-1,08
ZCP4_1634	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	1,02	1,01	1,01
ZCP4_1635	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	1,01	-1,03	-1,03
ZCP4_1636	ABC transporter related protein	1,05	1,00	-1,05
ZCP4_1637	hypothetical protein	-1,00	1,01	-1,02
ZCP4_1638	protein-(glutamine-N5) methyltransferase, release factor-specific	-1,08	-1,05	1,00
ZCP4_1639	peptide chain release factor 1	1,00	-1,00	1,00
ZCP4_1640	histidyl-tRNA synthetase	1,03	1,02	1,01
ZCP4_1641	Inorganic diphosphatase	1,03	1,03	-1,08
ZCP4_1642	hypothetical protein	-1,03	-1,02	-1,01
ZCP4_1643	hypothetical protein	1,01	1,01	1,02
ZCP4_1644	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	1,01	-1,02	-1,03
ZCP4_1645	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	-1,04	-1,07	-1,10
ZCP4_1646	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	-1,02	-1,09	-1,02
ZCP4_1647	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	-1,05	-1,07	-1,07
ZCP4_1648	phosphoribosyl-ATP diphosphatase	1,03	1,08	1,02
ZCP4_1649	histidine triad (HIT) protein	-1,03	1,05	1,01
ZCP4_1650	amino acid permease-associated region	1,02	-1,05	-1,06
ZCP4_1651	Phosphoenolpyruvate carboxylase	-1,01	-1,01	-1,00

5. Παράρτημα

ZCP4_1652	ATP/cobalamin adenosyltransferase	1,04	1,02	-1,03
ZCP4_1653	acetylglutamate kinase	1,00	-1,02	-1,04
ZCP4_1654	hypothetical protein	1,07	1,09	1,07
ZCP4_1655	hypothetical protein	-1,04	-1,07	-1,03
ZCP4_1656	hypothetical protein	-1,04	1,02	-1,04
ZCP4_1657	3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	1,06	1,05	1,06
ZCP4_1658	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	-1,02	1,02	1,02
ZCP4_1659	diguanylate phosphodiesterase	1,10	1,02	1,08
ZCP4_1661	deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase	1,10	1,20	1,16
ZCP4_1662	UvrD/REP helicase	1,09	-1,03	1,01
ZCP4_1663	outer membrane autotransporter barrel domain protein	1,08	1,06	1,06
ZCP4_1664	succinate--CoA ligase subunit beta	-1,05	-1,01	-1,01
ZCP4_1665	Electron transfer flavoprotein alpha/beta-subunit	-1,00	-1,01	1,04
ZCP4_1666	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	-1,03	-1,02	1,03
ZCP4_1667	6-phosphogluconolactonase	1,02	1,03	1,04
ZCP4_1669	TonB-dependent receptor plug	1,06	1,03	1,04
ZCP4_1670	hypothetical protein	-1,26	-1,30	1,01
ZCP4_1671	GTP-binding protein TypA	-1,00	-1,01	1,03
ZCP4_1672	Transglycosylase domain protein	1,10	1,09	1,14
ZCP4_1673	alpha/beta hydrolase fold protein	1,11	1,20	1,16
ZCP4_1674	hypothetical protein	-1,00	-1,06	-1,06
ZCP4_1675	hypothetical protein	1,08	1,17	1,18
ZCP4_1676	hypothetical protein	-1,06	-1,07	-1,10
ZCP4_1677	major facilitator superfamily MFS_1	-1,03	-1,02	-1,08
ZCP4_1678	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	1,11	1,05	-1,01
ZCP4_1679	Resolvase domain protein	1,03	1,04	-1,05
ZCP4_1680	major facilitator superfamily MFS_1	1,01	1,01	-1,02
ZCP4_1681	purine nucleoside permease	1,04	1,02	1,07
ZCP4_1682	Deoxyribodipyrimidine photo-lyase	-1,07	1,02	1,02
ZCP4_1683	Mannitol dehydrogenase domain protein	1,03	1,09	1,12
ZCP4_1684	hypothetical protein	-1,14	-1,10	1,02
ZCP4_1686	GumN family protein	1,11	1,05	1,08
ZCP4_1687	glycyl-tRNA synthetase subunit alpha	-1,01	-1,02	-1,00
ZCP4_1688	glycyl-tRNA synthetase, beta subunit	-1,04	-1,03	-1,03
ZCP4_1689	polysaccharide biosynthesis protein	1,04	-1,02	1,00
ZCP4_1690	hypothetical protein	1,02	1,04	-1,03
ZCP4_1691	FAD dependent oxidoreductase	-1,02	-1,02	-1,05
ZCP4_1692	hypothetical protein	1,09	1,01	-1,04
ZCP4_1693	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase	1,00	1,04	1,03
ZCP4_1694	transcriptional regulator, AsnC family	1,05	1,10	-1,03
ZCP4_1695	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	1,06	1,01	1,04
ZCP4_1696	hypothetical protein	1,01	-1,00	-1,03
ZCP4_1697	leucyl-tRNA synthetase	-1,05	-1,06	-1,02
ZCP4_1698	hypothetical protein	-1,01	-1,04	-1,04

5. Παράρτημα

ZCP4_1699	DNA polymerase III, delta subunit	1,01	-1,01	1,00
ZCP4_1700	component of efflux system ZMO1432:ZMO1429	-1,02	-1,04	-1,04
ZCP4_1701	component of efflux system ZMO1432:ZMO1429	1,13	-1,06	-1,02
ZCP4_1702	component of efflux system ZMO1432:ZMO1429	1,04	-1,03	-1,04
ZCP4_1703	outer membrane component of efflux system ZMO1432:ZMO1429	-1,03	-1,07	-1,07
ZCP4_1704	diacylglycerol kinase catalytic region	1,01	-1,02	-1,00
ZCP4_1706	thiamine phosphate synthase	1,15	-1,05	-1,01
ZCP4_1707	ATP-dependent chaperone ClpB	1,05	1,03	1,08
ZCP4_1708	peptidase M16 domain protein	1,03	-1,01	-1,01
ZCP4_1709	peptidase M16 domain protein	-1,02	-1,00	-1,02
ZCP4_1710	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	-1,02	-1,00	-1,02
ZCP4_1711	5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide mutase	1,03	-1,02	1,00
ZCP4_1712	4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase	-1,01	1,05	-1,02
ZCP4_1714	DEAD/DEAH box helicase domain protein	-1,00	-1,00	-1,03
ZCP4_1715	Scaffold protein Nfu/NifU	1,07	1,02	1,05
ZCP4_1716	peptidase M22 glycoprotease	1,09	1,05	1,08
ZCP4_1717	ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	1,08	1,11	1,04
ZCP4_1718	transcriptional regulator, MucR family	-1,06	-1,03	1,01
ZCP4_1719	ferric uptake regulator, Fur family	-1,03	-1,02	1,01
ZCP4_1720	bacterioferritin	-1,02	-1,02	-1,03
ZCP4_1721	BFD domain protein (2Fe-2S)-binding domain protein	1,06	1,10	-1,02
ZCP4_1722	inositol monophosphatase	1,04	1,05	1,02
ZCP4_1723	peptidase S9B dipeptidylpeptidase IV domain protein	-1,01	1,01	-1,04
ZCP4_1724	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	1,02	-1,01	1,01
ZCP4_1725	alpha/beta hydrolase fold protein	1,06	1,08	1,07
ZCP4_1726	two-component response regulator	1,01	1,01	-1,00
ZCP4_1727	RNA polymerase, sigma-24 subunit, ECF subfamily	1,02	-1,03	-1,01
ZCP4_1728	Peptidase M23	-1,01	1,02	1,01
ZCP4_1729	iron-sulfur cluster assembly accessory protein	-1,02	1,01	-1,03
ZCP4_1730	exodeoxyribonuclease III Xth	-1,04	-1,00	-1,02
ZCP4_1731	hypothetical protein	-1,00	1,00	1,00
ZCP4_1732	fatty acid hydroxylase	1,03	1,04	1,01
ZCP4_1733	hypothetical protein	1,28	1,25	1,33
ZCP4_1734	hypothetical protein	1,02	-1,00	1,03
ZCP4_1735	N-formylglutamate amidohydrolase	-1,04	-1,01	-1,02
ZCP4_1736	permease YjgP/YjgQ family protein	-1,00	-1,06	-1,01
ZCP4_1737	permease YjgP/YjgQ family protein	1,01	1,00	-1,00
ZCP4_1738	hypothetical protein	1,01	1,06	1,03
ZCP4_1739	sphingosine kinase	-1,01	-1,00	-1,03
ZCP4_1740	hypothetical protein	-1,01	1,01	-1,02
ZCP4_1741	cytochrome c biogenesis protein transmembrane region	1,07	1,03	-1,01
ZCP4_1742	gamma-glutamyltransferase	-1,03	-1,08	-1,02
ZCP4_1743	two component transcriptional regulator, winged helix family	-1,04	-1,03	1,04
ZCP4_1744	hypothetical protein	-1,03	1,04	1,11

5. Παράρτημα

ZCP4_1745	toxic anion resistance family protein	-1,01	1,05	1,06
ZCP4_1746	GTP-binding protein Era	1,02	1,02	1,06
ZCP4_1747	aminotransferase class-III	-1,21	-1,11	-1,12
ZCP4_1748	aminoglycoside phosphotransferase	1,58	1,04	1,05
ZCP4_1749	transcriptional regulator, AraC family	1,34	1,30	1,39
ZCP4_1750	ethanolamine transproter	-1,30	-1,08	-1,42
ZCP4_1751	hypothetical protein	1,11	1,11	1,06
ZCP4_1753	Ribonuclease III	1,04	1,03	1,01
ZCP4_1754	hypothetical protein	1,04	1,10	1,13
ZCP4_1755	short chain dehydrogenase	-1,02	-1,08	1,02
ZCP4_1757	N-carbamoylputrescine amidase	1,04	1,03	1,02
ZCP4_1758	Agmatine deiminase	1,06	1,05	1,01
ZCP4_1759	30S ribosomal protein S4	1,03	1,05	1,00
ZCP4_1760	diguanylate cyclase with beta propeller sensor	-1,03	-1,06	-1,03
ZCP4_1761	coproporphyrinogen III oxidase	-1,02	-1,02	1,08
ZCP4_1764	hypothetical protein	-1,06	-1,10	-1,18
ZCP4_1765	thiamine pyrophosphate protein TPP binding domain protein	1,02	-1,03	1,02
ZCP4_1766	30S ribosomal protein S20	1,09	1,10	1,09
ZCP4_1826	fructose-bisphosphate aldolase	-1,16	-1,12	1,03
ZCP4_1833	succinate semialdehyde dehydrogenase	-1,31	-1,36	1,03
ZCP4_1924	glycosyl transferase	1,07	1,05	1,09
ZCP4_RS00900	hypothetical protein	-1,10	1,37	1,49
ZCP4_RS01055	Fis family transcriptional regulator	-1,02	1,11	1,10
ZCP4_RS02420	hypothetical protein	1,00	-1,05	-1,08
ZCP4_RS02450	hypothetical protein	-1,03	1,06	1,06
ZCP4_RS04065	hypothetical protein	-1,06	-1,30	-1,20
ZCP4_RS04120	ferredoxin	-1,15	-1,04	-1,06
ZCP4_RS04935	hypothetical protein	-1,17	-1,09	1,08
ZCP4_RS05525	hypothetical protein	1,07	-1,03	-1,08
ZCP4_RS05670	hypothetical protein	-1,41	1,04	-1,27
ZCP4_RS06435	hypothetical protein	1,09	1,03	-1,06
ZCP4_RS07620	Smr protein/MutS2	1,04	1,06	1,10
ZCP4_RS08200	hypothetical protein	1,14	-1,02	-1,05
ZCP4_RS08335	hypothetical protein	1,12	1,02	-1,11
ZCP4_RS08520	DNA repair protein RadC	1,00	1,05	1,00
ZCP4_RS08815	hypothetical protein	-1,07	-1,08	-1,10
ZCP4_RS08845	DUF264 domain-containing protein	1,15	1,15	1,12
ZCP4_RS08850	phage portal protein	-1,02	1,03	1,11
ZCP4_RS08855	hypothetical protein	-1,01	1,14	1,12
ZCP4_RS08860	hypothetical protein	-1,02	-1,02	-1,05
ZCP4_RS08865	hypothetical protein	-1,17	-1,32	1,02
ZCP4_RS08870	hypothetical protein	-1,05	-1,05	1,13
ZCP4_RS08875	hypothetical protein	1,01	1,08	-1,01
ZCP4_RS08880	hypothetical protein	-1,07	-1,07	-1,07

5. Παράρτημα

ZCP4_RS08890	hypothetical protein	-1,61	-1,46	-1,04
ZCP4_RS08900	hypothetical protein	1,01	1,01	1,00
ZCP4_RS08905	DUF891 domain-containing protein	-1,18	-1,11	-1,03
ZCP4_RS08915	hypothetical protein	-1,32	-1,40	1,09
ZCP4_RS08920	hypothetical protein	-1,28	-1,38	1,08
ZCP4_RS08925	hypothetical protein	-1,22	-1,21	1,05
ZCP4_RS08930	DUF955 domain-containing protein	-1,33	-1,31	1,06
ZCP4_RS08940	addiction module antitoxin RelB	-1,15	-1,11	-1,01
ZCP4_RS08945	addiction module toxin, RelE/StbE family	-1,29	-1,16	1,09
ZCP4_RS08950	hypothetical protein	1,09	1,04	1,27
ZCP4_RS08955	hypothetical protein	-1,21	-1,18	-1,02
ZCP4_RS08960	hypothetical protein	-1,14	-1,11	1,15
ZCP4_RS08970	hypothetical protein	-1,12	-1,01	1,20
ZCP4_RS08975	hypothetical protein	-1,38	-1,11	1,16
ZCP4_RS08980	late control D family protein	-1,05	-1,06	-1,02
ZCP4_RS08995	phage tail tape measure protein	-1,04	1,10	1,07
ZCP4_RS09000	tail E family protein	-1,00	-1,10	-1,07
ZCP4_RS09005	hypothetical protein	-1,24	1,11	-1,13
ZCP4_RS09010	tail sheath protein	1,14	1,33	1,14
ZCP4_RS09015	phage baseplate assembly protein V	1,16	1,38	1,09
ZCP4_RS09035	baseplate assembly protein J	-1,09	-1,02	-1,00
ZCP4_RS09045	hypothetical protein	-1,09	-1,09	-1,07
ZCP4_RS09050	hypothetical protein	1,42	1,49	1,42
ZCP4_RS09055	hypothetical protein	-1,14	-1,23	-1,21
ZCP4_RS09060	N-acetylmuramyl-L-alanine amidase	-1,14	1,03	1,02
ZCP4_RS09065	hypothetical protein	1,12	-1,11	1,18
ZCP4_RS09075	head completion protein	-1,30	-1,24	-1,17
ZCP4_RS09085	phage capsid protein	1,09	1,05	-1,02
ZCP4_RS09090	NADPH dehydrogenase	1,05	1,07	1,09
ZCP4_RS09095	aspartate racemase	-1,13	-1,07	1,07
ZCP4_RS09100	D-cysteine desulhydrase	-1,04	-1,01	1,02
ZCP4_RS09105	iron-containing alcohol dehydrogenase	-1,02	1,04	1,06
ZCP4_RS09110	PfkB domain protein	1,08	1,11	1,05
ZCP4_RS09120	galactose mutarotase	-1,21	-1,18	-1,00
ZCP4_RS09125	fucose isomerase	-1,20	-1,08	1,04
ZCP4_RS09130	oxidoreductase	-1,13	-1,10	-1,01
ZCP4_RS09135	MFS transporter	1,09	1,07	1,10
ZCP4_RS09140	ligand-gated channel	1,02	1,08	1,05
ZCP4_RS09145	MFS transporter	-1,01	1,00	1,05
ZCP4_RS09155	GCN5-related N-acetyltransferase	-1,07	-1,03	1,03
ZCP4_RS09160	CopG family transcriptional regulator	-1,11	-1,01	-1,03
ZCP4_RS09165	hypothetical protein	-1,06	1,00	1,04

5. Παράρτημα

ZCP4_RS09170	CopG family transcriptional regulator	-1,03	-1,01	1,03
ZCP4_RS09175	hypothetical protein	-1,22	-1,04	1,06
ZCP4_RS09180	hypothetical protein	-1,28	-1,12	1,00
ZCP4_RS09185	hypothetical protein	-1,28	-1,11	1,01
ZCP4_RS09190	hypothetical protein	-1,11	-1,03	1,06
ZCP4_RS09195	hypothetical protein	-1,01	-1,00	1,01
ZCP4_RS09200	transcriptional regulator, HxIR family	1,01	1,01	-1,09
ZCP4_RS09205	NADP oxidoreductase coenzyme F420-dependent	1,06	1,11	1,11
ZCP4_RS09210	glutathione S-transferase	1,03	1,10	1,04
ZCP4_RS09215	RND transporter	1,06	1,04	1,06
ZCP4_RS09220	TetR family transcriptional regulator	1,05	1,05	1,06
ZCP4_RS09225	efflux transporter RND family, MFP subunit	1,01	1,04	1,01
ZCP4_RS09230	acriflavin resistance protein	1,04	1,02	1,02
ZCP4_RS09235	TonB-dependent receptor	1,07	1,07	1,04
ZCP4_RS09240	AraC family transcriptional regulator	-1,30	-1,27	1,09
ZCP4_RS09245	hypothetical protein	-1,19	-1,05	1,09
ZCP4_RS09250	protein parA	-1,05	1,01	1,05
ZCP4_RS09255	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,05	1,04	-1,02
ZCP4_RS09260	TonB-dependent receptor	-1,07	-1,05	-1,05
ZCP4_RS09265	addiction module toxin, RelE/StbE family	1,10	1,06	1,20
ZCP4_RS09270	translation repressor RelB	1,04	-1,02	1,09
ZCP4_RS09275	hypothetical protein	-1,02	-1,05	-1,01
ZCP4_RS09280	hypothetical protein	-1,09	-1,30	1,07
ZCP4_RS09290	hypothetical protein	-1,22	-1,09	1,08
ZCP4_RS09295	hypothetical protein	1,04	-1,12	1,14
ZCP4_RS09300	hypothetical protein	-1,10	1,12	-1,01
ZCP4_RS09305	hypothetical protein	1,10	1,22	1,06
ZCP4_RS09315	hypothetical protein	1,08	-1,12	-1,06
ZCP4_RS09325	hypothetical protein	-1,01	1,02	1,02
ZCP4_RS09330	hypothetical protein	-1,05	-1,00	1,01
ZCP4_RS09335	hypothetical protein	1,06	1,07	1,13
ZCP4_RS09350	secretory lipase	1,00	1,02	-1,03
ZCP4_RS09355	hypothetical protein	1,03	-1,04	-1,02
ZCP4_RS09360	lipoprotein	1,04	1,00	1,00
ZCP4_RS09365	ABC transporter related protein	-1,00	1,03	1,07
ZCP4_RS09370	ABC transporter related protein	1,04	1,08	1,07
ZCP4_RS09375	hypothetical protein	1,01	1,02	1,01
ZCP4_RS09380	hypothetical protein	-1,10	1,03	-1,20
ZCP4_RS09385	hypothetical protein	1,10	1,33	-1,12
ZCP4_RS09400	hypothetical protein	-1,04	1,05	1,13
ZCP4_RS09405	Appr-1-p processing domain protein	-1,01	1,03	1,04
ZCP4_RS09410	hypothetical protein	-1,05	-1,15	-1,08
ZCP4_RS09415	transposase	1,12	1,11	1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_RS09425	DNA adenine methylase	-1,15	-1,13	1,08
ZCP4_RS09430	hypothetical protein	-1,18	-1,39	1,12
ZCP4_RS09435	hypothetical protein	-1,06	-1,36	1,42
ZCP4_RS09440	hypothetical protein	1,04	-1,04	1,40
ZCP4_RS09445	TonB-dependent receptor	1,03	1,07	1,03
ZCP4_RS09450	hypothetical protein	1,08	1,04	1,06
ZCP4_RS09455	hypothetical protein	-1,02	1,06	1,03
ZCP4_RS09460	addiction module toxin, RelE/StbE family	-1,03	-1,02	1,04
ZCP4_RS09465	addiction module antitoxin RelB	-1,01	-1,00	-1,00
ZCP4_RS09470	hypothetical protein	1,06	-1,06	-1,05
ZCP4_RS09475	hypothetical protein	-1,06	-1,02	-1,06
ZCP4_RS09480	hypothetical protein	-1,00	1,06	1,04
ZCP4_RS09485	type I restriction-modification system subunit M	1,00	1,08	1,08
ZCP4_RS09490	restriction modification system DNA specificity	1,01	1,03	1,05
ZCP4_RS09495	anticodon nuclease PrrC	1,05	1,04	1,07
ZCP4_RS09500	type I site-specific deoxyribonuclease HsdR	1,04	1,02	1,00
ZCP4_RS09505	hypothetical protein	-1,01	1,03	-1,04
ZCP4_RS09510	death-on-curing family protein	-1,09	1,03	1,10
ZCP4_RS09515	hypothetical protein	-1,02	-1,26	-1,04
ZCP4_RS09520	chromosome partitioning protein ParA	-1,22	-1,15	1,02
ZCP4_RS09525	autotransporter-associated beta strand repeat protein	1,10	1,08	1,07
ZCP4_RS09530	hypothetical protein	1,10	1,09	1,13
ZCP4_RS09545	UDP-N-acetyl glucosamine 2-epimerase	-1,12	-1,16	1,06
ZCP4_RS09555	bacteriophage N4 receptor, outer membrane	1,03	1,05	1,06
ZCP4_RS09560	DUF4434 domain-containing protein	-1,07	-1,01	1,06
ZCP4_RS09565	RepA replicase	1,06	-1,06	-1,17
ZCP4_RS09570	hypothetical protein	1,51	1,58	1,56
ZCP4_RS09575	hypothetical protein	1,07	-1,05	1,14
ZCP4_RS09580	hypothetical protein	-1,16	-1,04	1,01
ZCP4_RS09595	hypothetical protein	1,06	-1,05	-1,20
ZCP4_RS09600	hypothetical protein	1,09	1,13	1,30
ZCP4_RS09610	DUF497 domain-containing protein	-1,15	-1,07	-1,05
ZCP4_RS09615	transcriptional regulator	-1,05	1,07	1,07
ZCP4_RS09620	transcriptional regulator	1,06	-1,04	1,01
ZCP4_RS09640	RNase P RNA	1,00	1,00	1,00
ZCP4_RS09645	phage capsid scaffolding protein	1,17	1,04	-1,30
ZCP4_RS09650	hypothetical protein	-1,28	-1,34	1,12
ZCP4_RS09655	P2 GpU family protein	1,08	-1,01	-1,06
ZCP4_RS09660	hypothetical protein	-1,03	-1,05	1,03
ZCP4_RS09665	hypothetical protein	1,12	1,01	1,02
ZCP4_RS09670	hypothetical protein	-1,18	-1,16	1,16
ZCP4_RS09675	hypothetical protein	1,32	1,23	1,25

5. Παράρτημα

ZCP4_RS09680	hypothetical protein	-1,04	1,05	1,14
ZCP4_RS09685	hypothetical protein	-1,15	-1,29	-1,12

Με διαφορετικές αποχρώσεις του πορτοκαλί στα κελιά συμβολίζονται οι διαφορετικοί λόγοι υπερέκφρασης (πορτοκαλί: 1,45-1,49, σκούρο πορτοκαλί: 1,50-1,99). Με πράσινο συμβολίζονται οι λόγοι υποέκφρασης.

Πίνακας 5.5. Γονίδια του CP4 που υπερεκφράζονται στις συγκεντρώσεις 0,05-0,2 mM MMS

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)		
			0.05	0.1	0.2
1	ZCP4_0434	hypothetical protein	1,96	2,07	1,15
2	ZCP4_1496	rRNA large subunit m3Psi methyltransferase RlmH	1,93	1,60	-1,09
3	ZCP4_RS09015	phage baseplate assembly protein V	1,80	1,70	1,83
4	ZCP4_RS00900	hypothetical protein	1,79	2,39	3,93
5	ZCP4_0076	ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system	1,79	1,88	1,53
6	ZCP4_0087	hypothetical protein	1,78	2,18	1,59
7	ZCP4_1341	putative molybdenum utilization protein ModD	1,76	1,43	1,76
8	ZCP4_1056	transcriptional regulator, RpiR family	1,74	1,85	1,33
9	ZCP4_RS09685	hypothetical protein	1,73	2,24	1,25
10	ZCP4_0313	dihydropteroate synthase	1,73	1,63	1,07
11	ZCP4_0064	hypothetical protein	1,70	1,72	-1,13
12	ZCP4_1714	DEAD/DEAH box helicase domain protein	1,62	1,52	1,01
13	ZCP4_0607	signal transduction protein	1,59	1,57	1,19
14	ZCP4_RS05670	hypothetical protein	1,59	1,82	2,14
15	ZCP4_1467	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein	1,59	1,87	1,32
16	ZCP4_RS09645	phage capsid scaffolding protein	1,59	1,49	1,85
17	ZCP4_RS09035	baseplate assembly protein J	1,54	1,59	1,56
18	ZCP4_1451	peptidylprolyl isomerase FKBP-type	1,51	1,51	1,08
19	ZCP4_0862	MarC-related protein	1,51	1,46	1,18
20	ZCP4_1323	5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase	1,51	1,59	1,10
21	ZCP4_1107	Sell repeat-containing protein	1,49	1,47	1,47
22	ZCP4_1087	Holliday junction endonuclease RuvC	1,49	1,51	1,15
23	ZCP4_1086	Holliday junction DNA helicase RuvA	1,48	1,61	1,04
24	ZCP4_1106	TPR repeat protein	1,46	1,55	1,04
25	ZCP4_RS09135	MFS transporter	1,46	1,50	-2,89
26	ZCP4_1046	SOS-response transcriptional repressor, LexA	1,46	1,85	2,09
27	ZCP4_0337	TonB-dependent receptor	1,46	1,46	1,43
28	ZCP4_RS09055	hypothetical protein	1,38	1,72	1,86
29	ZCP4_RS09600	hypothetical protein	1,31	1,58	1,52
30	ZCP4_1387	hypothetical protein	1,29	1,28	1,79

Με κλιμακώσεις του κόκκινου χρώματος στα κελιά συμβολίζονται οι διαφορετικοί λόγοι υπερέκφρασης (πορτοκαλί: 1,45-1,49, σκούρο πορτοκαλί: 1,50-1,99, κόκκινο: 2,00 και άνω). Με πράσινο συμβολίζονται οι λόγοι υποέκφρασης. Με πλάγια γράμματα των locus tags δίνονται τα πλασμιδιακά γονίδια.

Πίνακας 5.6. Γονίδια του CP4 που υποεκφράζονται στις συγκεντρώσεις 0,05-0,2 mM MMS

5. Παράρτημα

A/A	Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)		
			0.05	0.1	0.2
1	ZCP4_1362	transcriptional regulator, NifA, Fis Family	-2,37	-2,92	-1,40
2	ZCP4_0718	PLP-dependent enzyme, histidinol-phosphate	-2,23	-2,51	-1,49
3	ZCP4_0618	hypothetical protein	-2,11	-1,55	1,11
4	ZCP4_0952	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,97	-2,05	-1,14
5	ZCP4_RS04065	hypothetical protein	-1,94	-2,05	1,08
6	ZCP4_1032	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	-1,88	-1,49	1,14
7	ZCP4_1350	nitrogen fixation protein NifX	-1,87	-1,46	-1,20
8	ZCP4_1140	hypothetical protein	-1,81	-2,51	-1,63
9	ZCP4_1418	Chagasin family peptidase inhibitor I42	-1,81	-1,61	1,14
10	ZCP4_1340	TOBE domain protein	-1,79	-2,35	-1,35
11	ZCP4_0534	hypothetical protein	-1,77	-1,80	-1,27
12	ZCP4_0900	hypothetical protein	-1,75	-2,04	-1,56
13	ZCP4_0055	Transglycosylase-associated protein	-1,73	-1,37	-1,27
14	ZCP4_1826	fructose-bisphosphate aldolase	-1,72	-1,38	-2,39
15	ZCP4_RS09120	galactose mutarotase	-1,69	-1,34	-1,95
16	ZCP4_1457	Thioredoxin domain protein	-1,68	-1,46	1,23
17	ZCP4_0671	flagellar hook capping protein	-1,66	-1,47	-1,04
18	ZCP4_0969	SIMPL domain-containing protein	-1,66	-1,55	-1,03
19	ZCP4_1506	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	-1,64	-1,40	1,06
20	ZCP4_1363	TonB-dependent siderophore receptor	-1,63	-1,75	-1,34
21	ZCP4_0427	MerC mercury resistance protein	-1,62	-1,47	1,08
22	ZCP4_RS08955	Beta/Gamma crystallin-domain containing protein	-1,60	-1,55	1,15
23	ZCP4_0058	glucose-methanol-choline oxidoreductase	-1,60	-1,60	-1,12
24	ZCP4_1386	hypothetical protein	-1,60	-1,53	1,10
25	ZCP4_0558	CsbD family protein	-1,59	-1,62	1,18
26	ZCP4_1750	ethanolamine transproter	-1,59	-1,75	-1,56
27	ZCP4_0658	flagellin/flagellar hook associated protein	-1,58	-1,59	-1,34
28	ZCP4_0601	OsmC family protein	-1,58	-1,35	-1,04
29	ZCP4_RS09190	DUF2312 domain-containing protein	-1,58	-1,52	-1,85
30	ZCP4_RS09125	fucose isomerase	-1,57	-1,27	-1,67
31	ZCP4_1332	periplasmic binding protein	-1,54	-1,77	-1,38
32	ZCP4_0147	formamidopyrimidine-DNA glycosylase	-1,52	-1,50	1,09
33	ZCP4_0307	DUF329 domain-containing protein (zinc binding)	-1,43	-1,45	-1,24
34	ZCP4_0059	cytochrome c, mono- and diheme variants family	-1,43	-1,55	-1,19
35	ZCP4_1214	adenylylsulfate kinase	-1,32	-1,27	-2,50
36	ZCP4_1213	sulfate adenylyltransferase	-1,30	-1,19	-2,41
37	ZCP4_RS09140	ligand-gated channel	-1,29	-1,02	-3,60

5. Παράρτημα

Με κλιμακώσεις του πράσινου χρώματος στα κελιά συμβολίζονται οι διαφορετικοί λόγοι υπερέκφρασης (ανοιχτό πράσινο: -1,45 - -1,49, πράσινο: -1,50 - -1,99, σκούρο πράσινο: -2,00 και κάτω). Με πλάγια γράμματα των locus tags δίνονται τα πλασμιδιακά γονίδια.

Πίνακας 5.7. Οι λόγοι έκφρασης των γονιδίων του CP4 σε όλες τις συγκεντρώσεις του MMS που δοκιμάστηκαν στα πλαίσια της μεταγραφωματικής ανάλυσης

Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)						
		0.05	0.1	0.2	1	5	10	15
ZCP4_0001	chromosomal replication initiation protein	1,38	1,40	1,06	1,09	-1,04	-1,86	-2,12
ZCP4_0002	ABC transporter related protein	1,15	1,16	1,13	1,08	-1,12	-1,68	-1,51
ZCP4_0003	OmpA/MotB domain protein	1,07	-1,09	-1,14	-1,02	-1,06	-1,38	-1,55
ZCP4_0004	hypothetical protein	-1,07	1,04	1,09	1,10	1,41	1,21	1,16
ZCP4_0005	hypothetical protein	-1,21	-1,20	1,03	1,02	2,50	11,67	19,43
ZCP4_0006	Carboxymethylenebutenolidase	1,00	1,03	1,05	1,15	1,48	1,42	1,40
ZCP4_0007	molybdopterin binding domain protein	-1,10	-1,02	1,08	1,16	1,98	2,29	2,24
ZCP4_0008	methionine aminopeptidase, type I aromatic amino acid beta-eliminating lyase/threonine aldolase	1,04	1,10	-1,00	1,00	1,03	-1,20	-1,35
ZCP4_0009	hypothetical protein	1,01	-1,02	1,00	-1,02	-1,14	-1,78	-2,68
ZCP4_0010	aminopeptidase N	1,02	1,06	1,05	1,01	1,22	1,51	1,32
ZCP4_0011	aldo/keto reductase	-1,10	-1,06	1,04	1,05	1,12	-1,31	-2,13
ZCP4_0012	hypothetical protein	-1,12	-1,05	1,08	-1,04	1,07	-1,36	-2,37
ZCP4_0014	major facilitator superfamily MFS_1	-1,33	-1,27	1,13	-1,01	1,78	3,90	5,37
ZCP4_0015	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	-1,38	-1,40	-1,04	-1,01	2,31	8,43	12,45
ZCP4_0016	hydroquinone detoxification protein	1,04	-1,18	1,07	1,08	1,20	1,65	2,12
ZCP4_0017	transcriptional activator of hydroquinone detoxification gene	-1,14	-1,07	1,18	1,26	2,80	6,25	7,03
ZCP4_0018	TrpR binding protein WrbA	-1,30	-1,26	-1,09	-1,12	1,09	1,21	1,21
ZCP4_0019	YceI family protein	-1,29	-1,24	-1,06	1,22	3,37	11,60	12,31
ZCP4_0020	MscS Mechanosensitive ion channel	-1,32	-1,32	1,03	-1,02	1,89	2,33	2,08
ZCP4_0021	NAD(+) kinase	-1,03	-1,04	-1,01	-1,14	-1,18	1,06	1,34
ZCP4_0022	tRNA/rRNA methyltransferase (SpoU)	1,20	1,13	-1,04	1,08	-1,12	1,08	1,05
ZCP4_0023	phosphocarrier, HPr family	1,10	1,12	-1,02	-1,04	-1,13	1,03	1,04
ZCP4_0024	PTS fructose transporter subunit IIA	-1,18	-1,25	-1,15	-1,14	1,09	1,31	1,15
ZCP4_0025	hypothetical protein	-1,04	-1,13	-1,05	1,01	1,17	1,21	1,24
ZCP4_0026	HPr kinase	-1,02	-1,13	-1,09	1,06	1,61	3,36	4,30
ZCP4_0027	histidine kinase related to acid and other stresses	-1,06	-1,12	-1,10	-1,15	-1,11	1,02	-1,03
ZCP4_0028	two-component response regulator for acid and other stresses	1,11	1,02	-1,03	1,05	1,04	1,42	1,69
ZCP4_0029	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	1,44	1,40	1,07	1,09	-1,03	1,54	2,23
ZCP4_0030	Fmu (Sun) domain protein	1,01	-1,08	1,02	1,07	-1,28	-3,17	-3,66
ZCP4_0031	outer membrane-related protein	1,40	1,41	1,09	1,14	-1,18	-2,66	-3,51
ZCP4_0032	conserved predicted protein with nucleoside triphosphate hydrolase domain	1,02	1,06	1,02	1,12	1,00	-1,19	-1,22
ZCP4_0033	Nucleotide kinase-like enzyme affecting the cell wall	1,09	1,11	-1,02	-1,06	-1,50	-2,15	-2,22
ZCP4_0034	polysaccharide biosynthesis protein	1,12	1,13	-1,07	-1,25	-1,88	-3,07	-4,24
ZCP4_0035	hypothetical protein	1,13	1,14	-1,08	-1,14	-1,56	-3,30	-3,33
ZCP4_0036	dimethyladenosine transferase	1,07	1,11	1,07	1,07	-1,12	-2,17	-2,60
ZCP4_0037		1,15	1,08	-1,01	-1,07	-1,05	1,32	1,19

5. Παράρτημα

ZCP4_0038	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	1,11	1,11	1,05	1,09	1,28	2,17	2,26
ZCP4_0039	PpiC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1,11	1,13	1,06	1,03	1,17	1,90	1,75
ZCP4_0040	Organic solvent tolerance protein	1,28	1,29	1,03	1,03	-1,17	-1,47	-1,32
ZCP4_0041	leucyl aminopeptidase	-1,13	-1,23	-1,02	1,03	1,47	2,28	2,11
ZCP4_0042	DNA polymerase III subunit chi	1,22	1,19	1,07	-1,04	1,34	2,86	2,65
ZCP4_0043	hydro-lyase, Fe-S type, tartrate/fumarate subfamily, alpha subunit	1,07	-1,01	1,05	1,08	-1,13	-2,26	-2,18
ZCP4_0044	hemolysin A	1,14	1,17	1,12	1,17	1,01	-1,65	-2,35
ZCP4_0045	hypothetical protein	-1,04	-1,03	1,07	1,03	-1,03	1,24	1,22
ZCP4_0046	Protein of unknown function DUF1790	1,11	1,11	1,01	1,02	1,13	2,13	2,23
ZCP4_0047	pyrroline-5-carboxylate reductase	-1,06	-1,09	1,03	1,07	1,21	1,96	1,90
ZCP4_0048	lipoate-protein ligase B	-1,03	-1,14	-1,18	-1,21	-1,05	1,14	1,11
ZCP4_0049	TonB-dependent receptor plug	-1,14	-1,08	1,04	-1,03	-1,41	-1,01	1,23
ZCP4_0050	hypothetical protein	-1,08	-1,12	1,05	1,06	1,39	2,06	2,43
ZCP4_0051	organic radical activating-like protein	1,15	1,03	-1,00	1,05	-1,67	-5,69	-5,22
ZCP4_0052	N-acetylmuramic acid-6-phosphate etherase	1,25	1,16	1,07	1,06	-1,44	-3,69	-3,80
ZCP4_0054	peptidase S10 serine carboxypeptidase	-1,05	-1,00	1,19	1,20	1,51	3,00	3,48
ZCP4_0055	Transglycosylase-associated protein	-1,73	-1,37	-1,27	-1,31	1,71	3,69	4,79
ZCP4_0056	major facilitator superfamily MFS_1	1,06	-1,04	1,03	1,02	1,22	1,83	2,69
ZCP4_0057	sorbitol dehydrogenase small subunit	-1,44	-1,44	-1,19	1,05	1,46	5,51	6,01
ZCP4_0058	glucose-methanol-choline oxidoreductase	-1,60	-1,60	-1,12	-1,07	1,19	4,81	4,26
ZCP4_0059	cytochrome c, mono- and diheme variants family	-1,43	-1,55	-1,19	-1,12	1,13	4,92	4,43
ZCP4_0060	transcriptional regulator, LacI family	-1,14	-1,21	-1,03	1,13	1,36	2,28	2,55
ZCP4_0061	acyl carrier protein	1,10	1,12	1,10	1,03	-1,23	-3,62	-6,69
ZCP4_0062	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase 2	1,19	1,20	1,09	1,07	-1,00	-1,65	-2,15
ZCP4_0063	aminodeoxychorismate lyase	1,27	1,35	1,02	-1,20	-1,33	-1,40	-2,10
ZCP4_0064	hypothetical protein	1,70	1,72	-1,13	-1,33	-1,41	-1,78	-1,91
ZCP4_0065	threonine dehydratase	1,11	1,15	-1,02	1,02	1,05	-1,20	-1,22
ZCP4_0066	Amidohydrolase 3	1,04	-1,03	1,01	1,00	-1,35	-1,39	-1,28
ZCP4_0067	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	1,13	1,16	1,26	1,32	1,98	2,54	2,36
ZCP4_0068	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	-1,12	-1,13	-1,03	-1,02	1,66	4,12	6,52
ZCP4_0069	8-amino-7-oxononanoate synthase	-1,06	-1,03	1,05	1,04	1,01	-1,94	-2,49
ZCP4_0070	hypothetical protein (NCBI)	1,00	1,12	1,14	1,10	1,14	-1,82	-2,04
ZCP4_0071	hypothetical protein	1,03	1,03	1,08	1,20	1,36	1,58	1,83
ZCP4_0072	GMP synthetase	1,33	1,32	1,03	1,04	-1,06	-1,52	-1,53
ZCP4_0073	Protein of unknown function DUF1847	-1,19	-1,16	-1,06	1,05	-1,13	-1,21	1,05
ZCP4_0074	Mandelate racemase/muconate lactonizing protein	-1,20	-1,08	-1,09	-1,18	-1,07	1,16	-1,05
ZCP4_0075	aliphatic sulfonate ABC transporter ATP-binding protein	-1,27	1,00	-1,43	-1,17	-1,01	-1,14	-1,01
ZCP4_0076	binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	1,79	1,88	1,53	1,50	1,49	2,68	3,53
ZCP4_0077	extracellular solute-binding protein family 3	1,19	1,26	-1,19	-1,16	-1,71	-1,75	-1,29
ZCP4_0078	TonB-dependent receptor	1,07	1,05	1,16	-1,17	-1,12	-1,12	1,19
ZCP4_0079	heme exporter protein CcmC	-1,02	-1,01	-1,06	-1,31	-1,57	-1,34	-1,09
ZCP4_0081	CcmE/CycJ protein	1,09	1,08	-1,07	-1,18	-1,60	-1,61	-2,42

5. Παράρτημα

ZCP4_0082	cytochrome c assembly protein	-1,05	-1,10	-1,16	-1,33	-1,92	-1,78	-1,77
ZCP4_0083	Redoxin domain protein	-1,15	-1,09	-1,20	-1,26	-1,71	-1,60	-1,57
ZCP4_0084	cytochrome C biogenesis protein	-1,09	-1,11	-1,15	-1,19	-1,98	-1,96	-2,25
ZCP4_0085	cytochrome c biogenesis factor-like protein	1,25	1,07	-1,22	-1,01	-1,48	-1,72	-1,86
ZCP4_0086	hypothetical protein	1,04	1,05	-1,06	-1,07	-1,88	-4,23	-5,52
ZCP4_0087	hypothetical protein	1,78	2,18	1,59	1,29	1,26	-1,27	-1,73
ZCP4_0088	hypothetical protein	1,02	-1,04	-1,06	1,02	-1,18	-1,47	-1,80
ZCP4_0089	50S ribosomal protein L36P	1,43	1,37	-1,05	-1,11	-2,75	-10,00	-11,30
ZCP4_0090	hypothetical protein	1,02	-1,10	-1,10	1,26	1,00	-1,04	-1,12
ZCP4_0091	peptidase M14 carboxypeptidase A	-1,09	-1,24	-1,09	1,07	1,31	1,28	1,09
ZCP4_0092	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	-1,10	-1,08	1,01	1,02	1,09	-1,39	-2,13
ZCP4_0093	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding protein	-1,42	-1,23	1,16	1,18	4,19	31,37	30,32
ZCP4_0094	zinc-dependent alcohol dehydrogenase	-1,20	-1,10	1,05	1,17	4,24	6,93	5,62
ZCP4_0095	ferric uptake regulator, Fur family	-1,09	-1,15	1,03	1,09	1,39	3,47	3,81
ZCP4_0096	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	1,00	-1,10	-1,18	-1,20	-1,34	-1,04	-1,10
ZCP4_0097	mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase	1,04	1,02	-1,02	-1,01	-1,06	-1,33	-1,51
ZCP4_0098	glycosyl transferase	1,08	1,09	1,04	-1,12	-1,27	-1,22	1,27
ZCP4_0099	ABC transporter	-1,09	-1,07	-1,01	-1,00	1,04	1,39	1,58
ZCP4_0100	hypothetical protein	-1,01	1,03	1,02	-1,09	-1,21	-1,14	-1,17
ZCP4_0101	hypothetical protein	-1,05	-1,00	1,09	1,00	-1,07	-1,63	-1,80
ZCP4_0102	nucleoside-diphosphate sugar epimerase	1,01	-1,02	1,14	1,11	1,10	-1,24	-1,41
ZCP4_0103	GDP-mannose 4,6-dehydratase	-1,15	-1,07	1,12	1,15	1,03	-1,41	-1,53
ZCP4_0105	single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ	1,08	1,02	-1,03	1,02	-1,11	-1,34	-1,17
ZCP4_0106	GTP cyclohydrolase I	1,07	1,09	1,14	1,09	-1,40	-3,52	-4,33
ZCP4_0107	Mandelate racemase/muconate lactonizing protein	1,01	1,01	-1,02	1,13	-1,14	-1,84	-1,96
ZCP4_0108	50S ribosomal protein L9	1,13	1,31	1,12	-1,07	-1,59	-8,07	-14,12
ZCP4_0109	30S ribosomal protein S18	1,05	1,17	1,09	1,04	-1,17	-5,41	-8,91
ZCP4_0110	30S ribosomal protein S6	1,23	1,22	1,18	1,16	-1,12	-7,43	-11,81
ZCP4_0111	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	-1,04	-1,07	1,09	1,08	1,28	1,05	-1,02
ZCP4_0112	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	-1,21	-1,30	-1,18	1,06	1,07	1,13	-1,01
ZCP4_0113	hypothetical protein	1,06	1,03	1,05	1,07	1,10	1,33	1,55
ZCP4_0114	twin arginine translocase protein A	1,12	1,05	1,02	1,02	-1,29	-1,87	-2,30
ZCP4_0115	twin-arginine translocation protein, TatB subunit	1,14	1,08	-1,01	1,06	-1,03	-1,07	-1,16
ZCP4_0116	Sec-independent protein translocase, TatC subunit	1,01	-1,14	-1,19	-1,13	-1,14	1,23	1,28
ZCP4_0118	signal transduction histidine kinase	-1,39	-1,40	1,07	1,04	1,83	4,66	5,75
ZCP4_0119	hypothetical protein	-1,23	-1,25	1,02	1,03	1,26	2,69	2,18
ZCP4_0120	DEAD/DEAH box helicase domain protein	1,25	1,17	1,01	1,08	-1,03	-1,48	-1,72
ZCP4_0121	hypothetical protein	1,09	-1,06	-1,29	-1,09	-1,47	-1,09	1,01
ZCP4_0122	glucose-6-phosphate isomerase	1,03	1,02	1,07	1,02	1,38	2,62	3,10
ZCP4_0123	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase dimerization region	-1,23	-1,30	-1,24	1,04	1,39	1,23	1,08
ZCP4_0125	potassium transporter Kup	1,11	1,09	1,01	1,01	-1,21	-2,33	-2,71

5. Παράρτημα

ZCP4_0127	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase	-1,17	-1,27	1,13	1,01	1,35	1,09	-1,16
ZCP4_0128	transcriptional activator of secretion-related protein zliE	1,15	1,14	1,08	1,09	-1,06	-1,82	-1,40
ZCP4_0130	hypothetical protein	-1,53	-1,26	1,17	1,17	1,65	2,82	2,88
ZCP4_0131	RNA methyltransferase, TrmH family, group 1	1,34	1,31	1,05	-1,03	-1,71	-4,83	-5,98
ZCP4_0132	transcriptional regulator NrdR	1,24	1,15	-1,08	-1,04	-1,64	-3,51	-5,51
ZCP4_0133	serine hydroxymethyltransferase	-1,13	-1,19	-1,02	-1,05	-1,31	-2,92	-4,12
ZCP4_0134	sugar-phosphate isomerase, RpiB/LacA/LacB family	-1,10	-1,09	1,02	-1,04	-1,16	-2,72	-3,39
ZCP4_0135	5-aminolevulinatase synthase	-1,03	1,01	1,04	1,07	1,23	1,55	1,52
ZCP4_0136	glutamate racemase	1,02	-1,01	-1,04	1,14	-1,12	-1,26	-1,80
ZCP4_0137	major facilitator superfamily MFS 1	-1,20	-1,22	-1,04	-1,04	1,12	1,41	1,54
ZCP4_0138	hypothetical protein	1,07	1,03	1,03	1,06	1,01	1,51	1,86
ZCP4_0139	DNA protecting protein DprA	-1,03	-1,05	-1,15	-1,04	-1,43	-2,65	-2,17
ZCP4_0140	DNA topoisomerase I	-1,00	-1,11	-1,12	1,02	-1,07	1,60	1,83
ZCP4_0141	UBA/THIF-type NAD/FAD binding protein	-1,02	-1,02	-1,04	-1,11	-1,06	1,06	1,27
ZCP4_0142	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase Dut	-1,13	-1,13	-1,01	-1,19	-1,26	-1,02	1,08
ZCP4_0143	bifunctional phosphopantothoenylcysteine decarboxylase/phosphopantothenate synthase	1,08	1,14	1,06	-1,05	-1,08	1,24	1,54
ZCP4_0144	2-polyprenylphenol 6-hydroxylase	1,34	1,35	1,06	-1,05	1,02	1,13	1,31
ZCP4_0145	ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase	1,24	1,20	1,03	-1,06	-1,21	-1,59	-1,50
ZCP4_0147	formamidopyrimidine-DNA glycosylase	-1,52	-1,50	1,09	-1,18	1,29	4,45	5,47
ZCP4_0148	Lytic transglycosylase catalytic	-1,14	-1,13	1,01	-1,12	-1,20	1,05	1,30
ZCP4_0149	Uracil-DNA glycosylase superfamily	-1,08	-1,05	1,07	-1,10	1,06	2,19	3,62
ZCP4_0150	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	-1,03	1,03	1,13	1,16	1,29	-1,28	1,00
ZCP4_0151	TPR repeat-containing protein	1,01	1,05	1,06	1,04	-1,02	-1,34	-1,14
ZCP4_0152	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	1,06	1,09	1,12	1,08	1,18	1,88	2,48
ZCP4_0153	N-formylglutamate amidohydrolase	1,01	1,04	1,03	1,09	1,09	-1,03	-1,10
ZCP4_0154	carbohydrate kinase, YjeF related protein	-1,03	-1,02	1,00	1,02	1,01	1,45	1,85
ZCP4_0155	(Uracil-5)-methyltransferase	-1,01	-1,01	-1,04	-1,06	-1,21	1,02	1,24
ZCP4_0156	Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	-1,03	-1,01	1,20	1,05	1,10	1,11	1,22
ZCP4_0157	two component transcriptional regulator, winged helix family	1,01	1,01	1,08	1,07	1,15	1,62	1,83
ZCP4_0158	histidine kinase	1,27	1,25	1,11	-1,01	1,13	2,37	3,28
ZCP4_0159	surface antigen (D15)	1,28	1,29	1,19	1,06	-1,19	-1,44	-1,27
ZCP4_0160	hypothetical protein	1,22	1,22	1,13	-1,01	-1,33	-1,56	-1,33
ZCP4_0161	succinylarginine dihydrolase	-1,14	-1,17	1,04	1,06	1,05	1,09	1,12
ZCP4_0162	Beta-N-acetylhexosaminidase	-1,15	-1,20	-1,04	-1,05	-1,10	-1,27	-1,50
ZCP4_0163	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	-1,04	-1,05	-1,07	-1,04	-1,07	1,17	1,17
ZCP4_0164	ATPase BadF/BadG/BcrA/BcrD type	1,07	1,02	1,13	1,12	1,24	1,51	1,84
ZCP4_0165	peptidase S15	-1,04	-1,02	1,11	1,21	1,46	1,66	1,76
ZCP4_0166	recombinase A	1,09	1,14	1,18	1,75	3,22	9,32	10,23
ZCP4_0167	amidophosphoribosyltransferase	1,26	1,38	1,30	2,03	2,44	2,94	2,63
ZCP4_0168	two component transcriptional regulator PhoB, winged helix family	1,31	1,24	1,13	-1,04	1,40	1,84	1,89
ZCP4_0169	phosphate uptake regulator, PhoU	-1,20	-1,23	1,04	1,01	1,13	1,33	1,21

5. Παράρτημα

ZCP4_0170	histidine kinase	1,20	1,18	1,09	-1,06	1,10	1,51	1,71
ZCP4_0171	phosphatidylserine decarboxylase	1,22	1,18	1,02	-1,00	-1,01	1,00	1,24
ZCP4_0172	CDP-diacylglycerol/serine O-phosphatidyltransferase	1,06	1,09	1,02	1,02	1,14	1,52	1,94
ZCP4_0173	hypothetical protein	-1,19	-1,06	1,23	1,83	3,73	7,72	7,30
ZCP4_0175	30S ribosomal protein S2	1,14	1,07	1,03	1,09	-1,44	-2,78	-2,31
ZCP4_0176	elongation factor Ts	1,06	-1,06	-1,00	1,05	-1,62	-5,70	-8,31
ZCP4_0177	UMP kinase	1,13	1,09	1,01	-1,07	-1,28	-1,93	-2,24
ZCP4_0178	ribosome recycling factor	-1,10	-1,10	-1,02	1,02	-1,26	-1,45	-1,58
ZCP4_0179	undecaprenyl pyrophosphate synthase	1,10	1,09	1,00	-1,05	-1,11	1,00	-1,04
ZCP4_0180	phosphatidate cytidyltransferase	1,18	1,14	-1,07	-1,10	-1,18	-1,24	-1,17
ZCP4_0181	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	1,11	1,12	-1,01	-1,11	-1,50	-1,79	-1,72
ZCP4_0182	membrane-associated zinc metalloprotease	1,31	1,32	1,00	-1,15	-1,32	-1,15	-1,06
ZCP4_0183	outer membrane protein assembly complex, YaeT protein	1,17	1,19	1,06	-1,00	-1,28	-1,94	-1,78
ZCP4_0184	outer membrane chaperone Skp (OmpH)	1,02	-1,05	-1,03	1,04	-1,15	-2,64	-2,95
ZCP4_0185	beta-hydroxyacyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase FabZ	1,03	-1,02	-1,01	1,06	-1,18	-2,66	-3,45
ZCP4_0186	50S ribosomal protein L31	1,30	1,19	1,14	1,11	-1,12	-6,35	-8,44
ZCP4_0187	VanZ family protein	1,37	1,43	1,17	-1,01	-1,31	-2,84	-2,48
ZCP4_0188	chloramphenicol acetyltransferase	1,22	1,18	1,21	-1,09	-1,17	-1,67	-2,67
ZCP4_0189	thioredoxin reductase	-1,11	-1,07	-1,09	1,16	-1,01	-1,33	-1,14
ZCP4_0190	ketol-acid reductoisomerase	-1,13	-1,17	-1,22	-1,12	-1,85	-7,44	-10,27
ZCP4_0191	acetolactate synthase 3 regulatory subunit	-1,30	-1,34	-1,35	-1,19	-2,40	-5,16	-5,39
ZCP4_0192	acetolactate synthase, large subunit, biosynthetic type	-1,25	-1,27	-1,16	-1,02	-2,16	-4,08	-3,52
ZCP4_0193	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase	-1,27	-1,28	-1,15	-1,16	-1,99	-2,93	-3,29
ZCP4_0194	phosphoserine phosphatase SerB	1,04	1,08	1,04	1,03	1,17	-1,28	-1,38
ZCP4_0195	Cytochrome-c peroxidase	1,03	1,01	1,02	1,01	-1,07	-1,46	-1,72
ZCP4_0196	peptidase U62 modulator of DNA gyrase	1,00	-1,19	-1,28	-1,00	-1,09	-1,21	-1,23
ZCP4_0197	hypothetical protein	-1,14	-1,16	1,07	1,11	2,16	7,25	8,92
ZCP4_0198	Carbonate dehydratase	-1,38	-1,29	1,07	1,10	2,08	7,26	9,27
ZCP4_0199	lipoyl synthase	-1,04	-1,08	-1,04	1,01	1,19	1,75	1,97
ZCP4_0200	cyclase/dehydrase	1,01	1,03	-1,04	1,03	1,17	1,72	1,99
ZCP4_0201	CinA domain protein	1,16	1,07	-1,00	1,06	1,17	1,61	1,70
ZCP4_0202	hypothetical protein	1,18	1,09	-1,05	1,00	1,14	1,59	1,83
ZCP4_0203	bifunctional enzyme IspD/IspF	1,04	-1,01	1,07	1,12	1,16	-1,09	-1,17
ZCP4_0204	TIM-barrel protein, nifR3 family	1,26	1,30	1,10	1,02	1,08	-1,21	-1,31
ZCP4_0206	histidine kinase	1,03	1,04	1,01	-1,13	1,19	2,18	2,30
ZCP4_0207	two component, sigma54 specific, transcriptional regulator, Fis family	1,01	-1,05	1,01	1,01	1,07	1,70	1,75
ZCP4_0209	integration host factor, alpha subunit	-1,02	1,00	-1,03	-1,24	-1,28	-1,31	-1,42
ZCP4_0210	transcriptional regulator, MerR family	1,01	-1,02	-1,06	-1,07	1,29	1,83	1,64
ZCP4_0211	Glutathione S-transferase domain protein	1,33	1,26	-1,03	-1,03	-1,65	-1,95	-1,85
ZCP4_0212	Glutamate synthase (ferredoxin)	1,04	-1,01	-1,06	-1,14	-2,74	-11,59	-20,85
ZCP4_0213	putative oxidoreductase	1,07	1,08	-1,04	-1,12	-3,20	-16,72	-23,97
ZCP4_0214	undecaprenol kinase	1,08	1,11	1,21	1,18	1,17	-1,16	-1,15
ZCP4_0216	phage SPO1 DNA polymerase-related	-1,05	-1,11	-1,15	-1,02	-1,02	-1,71	-2,10

5. Παράρτημα

	protein							
ZCP4_0217	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	-1,25	-1,31	-1,08	1,06	1,74	1,95	1,97
ZCP4_0218	intracellular septation protein A	1,12	1,16	1,03	1,03	1,13	1,44	1,81
ZCP4_0219	major facilitator superfamily MFS_1	1,05	1,02	1,02	1,17	1,32	1,06	1,30
ZCP4_0220	hypothetical protein	-1,09	-1,06	1,04	1,08	1,27	1,21	-1,00
ZCP4_0221	transcriptional regulator, AsnC family	-1,03	1,00	-1,04	1,00	-1,32	-1,78	-1,65
ZCP4_0222	histidine kinase	1,02	1,10	-1,02	1,07	1,06	-1,12	-1,36
ZCP4_0224	histidine kinase	1,15	1,09	1,03	1,14	1,07	-1,02	-1,10
ZCP4_0225	hypothetical protein	-1,11	-1,06	-1,01	1,10	1,01	-1,47	-1,96
ZCP4_0226	Nucleotidyl transferase	-1,08	-1,27	-1,22	1,04	-1,67	-4,38	-5,36
ZCP4_0227	double-strand break repair protein AddB	1,04	-1,08	-1,18	1,01	-1,41	-2,05	-2,41
ZCP4_0228	double-strand break repair helicase AddA	1,04	1,02	1,01	-1,03	-1,25	-1,01	1,00
ZCP4_0229	thioredoxin	-1,15	-1,23	-1,10	1,00	-1,02	-1,13	1,08
ZCP4_0230	ribonuclease R	1,15	1,17	-1,01	-1,03	1,21	2,24	2,62
ZCP4_0231	nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase	-1,04	-1,01	1,09	1,05	-1,00	1,03	1,09
ZCP4_0232	beta-lactamase domain protein	1,19	1,22	1,01	1,02	-1,13	1,09	1,30
ZCP4_0233	hydrolase, TatD family	1,06	1,02	-1,03	-1,03	-1,03	-1,13	-1,19
ZCP4_0234	methionyl-tRNA synthetase	-1,02	-1,01	-1,02	1,01	-1,25	-1,87	-1,80
ZCP4_0235	DNA polymerase III, delta prime subunit	1,13	1,04	-1,07	-1,07	-1,16	-1,41	-1,59
ZCP4_0236	dTMP kinase	1,10	1,07	-1,01	-1,07	-1,01	-1,00	-1,36
ZCP4_0237	Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	-1,02	-1,05	-1,07	1,04	1,07	-1,03	-1,12
ZCP4_0238	rare lipoprotein A	-1,26	-1,40	-1,18	-1,09	1,21	1,82	1,85
ZCP4_0239	lytic murein transglycosylase	1,06	1,02	1,05	-1,01	1,15	1,41	1,61
ZCP4_0240	Cellulase	-1,03	-1,00	1,10	1,06	1,25	1,61	1,69
ZCP4_0241	cellulose synthase operon C domain protein	1,13	1,10	1,06	1,09	1,07	-1,18	-1,41
ZCP4_0242	cellulose synthase regulator protein	1,16	1,19	1,22	1,13	1,29	1,42	1,77
ZCP4_0243	cellulose synthase catalytic subunit (UDP-forming)	1,35	1,41	1,15	1,05	1,34	1,58	1,90
ZCP4_0245	hypothetical protein	1,17	1,24	1,08	1,07	-1,05	1,01	-1,16
ZCP4_0246	hypothetical protein	1,15	1,05	-1,32	-1,45	-1,79	-2,24	-3,53
ZCP4_0247	50S ribosomal protein L19	1,04	-1,07	-1,16	-1,17	-2,85	-10,19	-13,74
ZCP4_0248	tRNA (guanine-N(1)-methyltransferase	1,34	1,12	-1,05	-1,09	-2,19	-7,94	-8,79
ZCP4_0249	16S rRNA processing protein RimM	1,18	1,06	-1,03	1,01	-1,62	-3,33	-4,75
ZCP4_0250	30S ribosomal protein S16	1,07	-1,06	-1,03	1,04	-1,72	-4,31	-7,98
ZCP4_0251	signal recognition particle protein	1,16	1,03	-1,11	-1,11	-2,11	-3,78	-4,93
ZCP4_0252	diaminopimelate epimerase	1,01	-1,05	1,03	1,05	1,00	-1,06	1,07
ZCP4_0253	MiaB-like tRNA modifying enzyme	1,03	-1,01	1,09	1,09	-1,03	-1,04	1,02
ZCP4_0254	signal recognition particle-docking protein FtsY	1,03	-1,03	1,04	1,03	-1,28	-1,85	-1,92
ZCP4_0257	heat shock protein DnaJ domain protein	1,33	1,17	1,06	1,04	1,13	1,06	1,05
ZCP4_0258	hypothetical protein	1,14	1,13	1,10	-1,03	-1,13	1,11	1,24
ZCP4_0259	Fe-S metabolism associated SufE	1,28	1,36	1,05	-1,15	-1,35	-1,12	1,22
ZCP4_0260	hypothetical protein	1,12	1,32	1,26	1,40	2,21	6,20	7,44
ZCP4_0261	phage shock protein C, PspC	1,02	-1,01	1,29	1,54	2,73	9,37	17,65
ZCP4_0262	phage shock protein B	-1,21	1,07	1,10	1,18	2,23	5,99	10,55

5. Παράρτημα

ZCP4_0263	phage shock protein A, PspA	-1,22	-1,15	1,06	1,15	1,79	4,65	6,84
ZCP4_0264	hypothetical protein	-1,22	-1,19	1,10	1,25	2,15	6,34	8,46
ZCP4_0265	sigma54 specific transcriptional activator, PspF, Fis family	-1,07	-1,05	1,01	1,12	-1,24	-1,05	-1,02
ZCP4_0266	Superoxide dismutase	-1,39	-1,43	-1,23	1,07	1,70	3,26	3,18
ZCP4_0267	dihydroneopterin aldolase	1,12	1,06	-1,07	-1,16	-2,25	-5,35	-6,28
ZCP4_0268	GCN5-related N-acetyltransferase	1,08	1,12	1,02	-1,07	-1,30	-3,19	-3,06
ZCP4_0269	Polynucleotide adenyltransferase region	1,13	1,13	1,01	1,02	-1,38	-3,13	-4,52
ZCP4_0270	diguanylate cyclase/phosphodiesterase	1,16	1,19	1,07	1,07	1,42	1,48	1,73
ZCP4_0271	DNA topoisomerase IV subunit A	1,17	1,21	1,12	1,13	1,23	1,36	1,41
ZCP4_0272	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	1,01	-1,01	1,00	1,07	1,11	-2,07	-2,38
ZCP4_0273	phosphate ABC transporter, ATPase subunit	-1,06	-1,12	1,06	1,04	-1,11	-1,17	-1,17
ZCP4_0274	phosphate ABC transporter, inner membrane subunit PstA	1,17	1,23	1,14	1,13	1,21	1,39	1,58
ZCP4_0275	phosphate ABC transporter, inner membrane subunit PstC	1,09	1,08	1,08	1,03	1,11	1,26	1,54
ZCP4_0276	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein	-1,10	-1,04	1,12	1,11	1,62	2,35	2,26
ZCP4_0277	phosphate-selective porin O and P	1,31	1,14	1,15	-1,11	1,14	1,18	1,43
ZCP4_0278	large conductance mechanosensitive channel protein	1,05	1,06	1,18	-1,03	-1,18	-1,24	-1,37
ZCP4_0279	LemA family protein	-1,05	-1,15	-1,01	1,17	1,31	1,25	1,24
ZCP4_0280	hypothetical protein	1,09	1,07	1,00	1,10	1,26	1,78	1,98
ZCP4_0281	NUDIX hydrolase	1,00	-1,08	-1,07	1,16	1,03	-1,01	1,21
ZCP4_0283	TonB-dependent receptor	1,06	-1,03	1,01	-1,09	1,06	1,06	1,18
ZCP4_0284	ribonucleoside-diphosphate reductase, alpha subunit	1,38	1,43	-1,04	-1,04	-1,09	-1,01	1,23
ZCP4_0286	argininosuccinate synthase	1,03	-1,00	1,06	1,03	-1,54	-5,01	-8,28
ZCP4_0287	Calcium-binding EF-hand-containing protein	-1,24	-1,39	-1,36	1,05	1,39	4,21	5,67
ZCP4_0288	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	-1,07	-1,12	-1,01	1,04	1,22	1,74	1,87
ZCP4_0289	radical SAM enzyme, Cfr family	1,21	1,16	1,08	1,08	-1,06	-1,34	-1,40
ZCP4_0290	hypothetical protein	1,41	1,34	1,07	1,06	1,35	1,57	2,29
ZCP4_0291	ABC transporter related protein	1,39	1,37	1,21	1,15	1,15	-1,12	-1,14
ZCP4_0292	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein	1,62	1,37	1,29	1,37	2,06	2,52	2,90
ZCP4_0293	hypothetical protein	-1,10	1,00	1,12	1,02	1,21	-1,12	-1,14
ZCP4_0294	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	1,15	1,13	1,06	1,27	1,43	-1,26	-1,31
ZCP4_0295	exsB protein	1,17	1,20	1,13	1,14	1,44	1,15	1,16
ZCP4_0296	Cysteine desulfurase	1,21	1,24	1,22	1,23	1,34	-1,10	-1,05
ZCP4_0297	alpha/beta fold family hydrolase-like protein	-1,08	-1,20	-1,10	-1,03	-1,02	1,97	2,80
ZCP4_0298	Orn/DAP/Arg decarboxylase 2	1,19	1,12	-1,01	1,09	-1,20	-2,80	-2,76
ZCP4_0299	deoxyhypusine synthase-like protein	1,05	1,03	1,03	1,15	1,08	-2,67	-3,58
ZCP4_0300	permease component of cell envelope-related ABC transporter	1,42	1,44	1,11	1,07	1,14	1,05	1,16
ZCP4_0301	ATP-binding component of cell envelope-related ABC transporter	1,14	1,21	1,03	-1,01	-1,02	-1,16	-1,19
ZCP4_0302	periplasmic component of cell envelope-related ABC transporter	1,10	1,13	1,02	-1,06	1,04	1,22	1,24
ZCP4_0303	DUF330, putative component of cell envelope-related ABC transporter	1,07	-1,05	1,03	1,10	1,14	1,47	1,43
ZCP4_0304	translation initiation factor IF-1	1,32	1,44	1,03	1,06	-1,62	-4,16	-5,28
ZCP4_0305	maf protein	1,40	1,38	1,11	1,08	-1,48	-5,54	-11,71

5. Παράρτημα

ZCP4_0306	hypothetical protein	1,41	1,43	1,01	-1,06	-1,83	-6,14	-15,35
ZCP4_0307	hypothetical protein	-1,43	-1,45	-1,24	-1,27	1,39	3,43	4,05
ZCP4_0309	hypothetical protein	-1,14	-1,22	-1,10	-1,08	-1,08	1,21	1,43
ZCP4_0310	SapC family protein	1,09	1,12	1,10	1,02	-1,07	-1,27	-1,18
ZCP4_0311	FAD linked oxidase domain protein	-1,29	-1,31	1,03	1,03	1,40	2,07	2,20
ZCP4_0312	hypothetical protein	-1,32	-1,20	-1,04	-1,13	1,18	2,62	2,96
ZCP4_0313	dihydropteroate synthase	1,73	1,63	1,07	1,04	-1,22	-1,47	-1,65
ZCP4_0314	DNA methylase N-4/N-6 domain protein	1,04	1,07	1,05	-1,04	1,06	1,19	1,17
ZCP4_0315	Ribonuclease H	1,17	1,07	1,08	1,02	1,04	-1,37	-1,54
ZCP4_0316	phosphomethylpyrimidine kinase	-1,00	1,00	1,02	1,08	-1,07	-1,57	-1,75
ZCP4_0317	phosphoglucosamine mutase	1,05	1,06	1,04	1,07	1,07	-1,44	-1,53
ZCP4_0318	amino acid/peptide transporter	1,02	1,05	1,24	1,01	1,21	2,22	2,72
ZCP4_0319	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	-1,09	-1,03	1,19	-1,02	-1,48	-2,32	-3,39
ZCP4_0320	Sua5/YciO/YrdC/YwIc family protein	1,13	1,02	-1,13	1,02	-1,35	-1,14	-1,29
ZCP4_0321	peptide methionine sulfoxide reductase	-1,49	-1,34	1,10	-1,01	2,04	6,25	6,28
ZCP4_0322	2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase	-1,13	-1,06	1,02	1,07	1,10	-1,46	-1,60
ZCP4_0323	MscS Mechanosensitive ion channel	1,44	1,50	1,13	1,12	1,40	2,45	3,43
ZCP4_0324	hypothetical protein	-1,37	-1,27	1,00	1,12	2,00	1,85	1,61
ZCP4_0325	peptidase S10 serine carboxypeptidase	1,02	1,04	1,05	1,07	-1,23	-1,50	-1,35
ZCP4_0326	heat shock protein Hsp20	-1,02	-1,04	1,40	1,57	4,18	9,43	10,80
ZCP4_0327	hypothetical protein	-1,02	1,06	-1,26	-1,15	1,08	1,65	1,72
ZCP4_0329	transcriptional regulator, TraR/DksA family	1,27	1,08	-1,08	1,00	1,22	1,79	1,67
ZCP4_0330	seryl-tRNA synthetase	1,11	1,16	1,12	1,09	-1,27	-2,17	-3,15
ZCP4_0331	stationary phase survival protein SurE	1,04	1,07	1,13	1,12	-1,03	-1,46	-1,59
ZCP4_0332	Peptidase M23	1,32	1,20	1,04	1,08	1,01	1,32	1,34
ZCP4_0333	inner membrane component of cell envelope ABC transporter	1,04	1,08	1,02	-1,24	-1,16	1,20	1,72
ZCP4_0334	inner membrane component of cell envelope-related ABC transporter	1,18	1,14	1,12	1,12	1,11	-1,17	1,54
ZCP4_0335	ATPase component of cell envelope-related ABC transporter	1,10	1,08	-1,03	-1,06	-1,38	-1,92	-2,56
ZCP4_0336	DNA polymerase III subunit beta	1,12	1,12	1,08	1,10	1,31	1,23	1,28
ZCP4_0337	TonB-dependent receptor	1,46	1,46	1,43	1,46	-1,07	-4,03	-4,37
ZCP4_0338	periplasmic binding protein	1,16	1,08	1,14	1,28	1,96	3,51	3,98
ZCP4_0339	aldo/keto reductase	-1,34	-1,26	-1,05	1,10	1,77	5,39	5,63
ZCP4_0341	conserved hypothetical membrane spanning protein	1,35	1,17	1,02	1,23	-1,34	-4,56	-6,30
ZCP4_0342	hopanoid biosynthesis associated protein HpnK	1,21	1,19	1,02	1,09	1,07	-1,13	-1,01
ZCP4_0343	hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnJ	1,07	1,01	1,02	1,09	-1,07	-1,40	-1,31
ZCP4_0344	hopanoid biosynthesis associated glycosyl transferase protein HpnI	1,42	1,38	1,06	1,08	-1,02	-2,73	-3,05
ZCP4_0345	adenosine deaminase	1,11	1,11	1,18	1,24	-1,12	-2,45	-2,61
ZCP4_0346	purine nucleoside permease	1,05	-1,02	1,03	1,10	-1,24	-1,29	-1,46
ZCP4_0347	Xanthine/uracil/vitamin C permease	1,27	1,20	-1,00	1,08	-1,11	-1,32	-1,05
ZCP4_0349	Na ⁺ dependent nucleoside transporter domain protein	1,15	1,19	-1,01	1,00	1,04	1,51	1,75
ZCP4_0350	MFS transporter	1,02	1,05	1,03	-1,02	-1,04	1,22	1,28

5. Παράρτημα

ZCP4_0351	efflux pump membrane protein	1,08	1,06	1,09	1,11	-1,01	-1,08	-1,12
ZCP4_0352	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	1,14	1,11	1,05	1,06	-1,03	-1,28	-1,17
ZCP4_0353	transcriptional regulator, TetR family	-1,04	1,00	1,04	1,09	-1,00	-1,72	-1,51
ZCP4_0354	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	1,18	1,14	1,03	1,08	-1,00	-2,03	-2,43
ZCP4_0355	cytochrome c class I	1,21	1,27	1,13	-1,02	1,09	-1,03	-1,21
ZCP4_0356	monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylase	-1,38	-1,43	-1,04	1,10	1,17	1,59	1,50
ZCP4_0357	cytochrome c1	1,10	1,18	1,13	1,13	-1,15	-1,14	1,03
ZCP4_0358	Cytochrome b/b6 domain protein	-1,04	-1,05	-1,04	-1,16	-1,10	-1,05	1,14
ZCP4_0359	ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit	1,08	1,14	1,16	1,17	1,06	-1,66	-1,48
ZCP4_0362	tRNA/rRNA methyltransferase (SpoU)	1,03	1,01	-1,02	1,08	1,24	1,71	1,53
ZCP4_0363	coproporphyrinogen III oxidase	1,05	1,13	1,01	1,14	1,61	2,53	2,17
ZCP4_0364	GCN5-related N-acetyltransferase	-1,17	-1,12	-1,01	1,04	1,05	1,34	1,03
ZCP4_0365	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	1,08	1,03	1,03	1,07	1,71	4,64	4,73
ZCP4_0366	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	-1,06	-1,02	1,10	1,07	2,31	6,45	7,03
ZCP4_0367	glycosyltransferase involved in cell wall biogenesis	1,31	1,29	1,05	1,00	-1,26	-2,90	-4,05
ZCP4_0368	trigger factor	1,10	1,09	1,05	1,19	-1,48	-5,13	-8,27
ZCP4_0370	Aldose 1-epimerase	1,07	1,02	-1,15	-1,29	-1,80	-2,31	-2,76
ZCP4_0372	sucrose-6-phosphate hydrolase	-1,36	-1,24	1,02	1,01	1,97	5,13	5,38
ZCP4_0374	NAD-dependent epimerase/dehydratase	-1,41	-1,47	1,05	-1,17	1,48	6,31	8,00
ZCP4_0375	transcriptional regulator, MarR family	-1,17	-1,21	1,06	1,05	1,23	1,91	2,08
ZCP4_0376	guanine deaminase	-1,12	-1,17	1,04	1,06	1,44	2,83	3,74
ZCP4_0377	type I phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase	1,03	-1,02	-1,06	-1,12	-1,21	-1,34	-1,59
ZCP4_0378	aromatic amino acid aminotransferase	-1,03	1,04	1,38	1,39	2,49	2,50	1,92
ZCP4_0379	hypothetical protein	1,33	1,40	1,39	1,27	2,45	4,86	6,59
ZCP4_0380	Glutathione S-transferase domain protein	-1,45	-1,30	1,03	1,05	1,65	3,01	3,11
ZCP4_0381	secretion-related protein	-1,21	1,03	1,39	2,60	1,45	1,99	2,10
ZCP4_0382	hypothetical protein	-1,06	-1,05	1,16	2,39	1,77	2,95	2,59
ZCP4_0384	hypothetical protein	-1,05	1,39	1,04	1,98	1,89	2,84	1,88
ZCP4_0385	peptidase S58 DmpA	1,18	1,16	1,13	-1,02	1,07	1,30	1,19
ZCP4_0386	leucyl/phenylalanyl-tRNA--protein transferase	1,02	1,04	1,07	-1,00	1,42	2,10	1,75
ZCP4_0388	Mammalian cell entry related domain protein	1,26	1,39	1,14	-1,03	1,08	1,47	1,54
ZCP4_0389	cold-shock DNA-binding domain protein	1,10	1,14	1,13	-1,02	-1,03	1,57	1,93
ZCP4_0390	preprotein translocase subunit SecA	1,08	1,07	1,09	1,09	1,12	1,23	1,43
ZCP4_0391	bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase protein	-1,14	-1,25	-1,14	1,10	1,11	1,02	-1,07
ZCP4_0392	helix-turn-helix domain-containing protein	-1,07	-1,12	-1,01	1,03	1,15	2,45	4,42
ZCP4_0393	hypothetical protein	-1,30	-1,34	1,07	1,05	1,63	4,44	7,55
ZCP4_0394	hypothetical protein	-1,45	-1,36	1,08	-1,25	1,27	3,61	4,04
ZCP4_0395	diguanylate cyclase with beta propeller sensor	1,26	1,22	1,06	-1,17	1,10	2,63	2,94
ZCP4_0396	Catalase	-1,37	-1,21	-1,02	1,07	2,49	9,15	9,26
ZCP4_0397	2-nitropropane dioxygenase, NPD	1,04	1,07	1,07	-1,01	-1,05	1,21	1,63
ZCP4_0399	Heavy metal transport/detoxification protein	-1,66	-1,41	-1,06	1,05	1,00	1,51	1,31

5. Παράρτημα

ZCP4_0400	copper-translocating P-type ATPase	-1,34	-1,27	-1,01	1,02	1,04	2,42	3,06
ZCP4_0401	Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	-1,07	-1,08	-1,08	1,02	-1,56	-2,79	-3,00
ZCP4_0402	branched-chain amino acid aminotransferase	-1,04	-1,02	1,02	1,03	-1,46	-3,35	-4,75
ZCP4_0403	hypothetical protein	1,11	1,13	1,17	1,08	-1,05	1,32	1,65
ZCP4_0404	periplasmic protein for capsular polysaccharide export	1,16	1,13	1,02	-1,00	-1,36	-2,00	-1,95
ZCP4_0405	ATPase component of polysaccharide export system	-1,18	-1,15	1,03	-1,07	1,23	1,69	1,63
ZCP4_0406	glycosyl transferase group 1	1,03	1,07	1,07	-1,02	1,12	1,33	1,50
ZCP4_0407	lipopolysaccharide biosynthesis protein	1,08	1,13	1,06	1,01	-1,16	-1,37	-1,16
ZCP4_0409	glycosyl transferase family 2	1,15	1,16	1,11	1,03	-1,00	-1,13	-1,19
ZCP4_0410	glucan biosynthesis protein D	1,05	1,10	1,10	1,04	-1,05	-1,30	-1,39
ZCP4_0411	Beta-galactosidase	-1,05	-1,08	1,03	-1,01	1,30	2,21	2,74
ZCP4_0412	2-isopropylmalate synthase	1,05	-1,03	1,00	1,18	1,13	-1,22	-1,14
ZCP4_0413	TonB-dependent receptor	1,10	1,09	1,18	1,13	6,42	22,73	25,43
ZCP4_0415	glutamyl-tRNA synthetase	-1,04	-1,06	-1,01	1,02	-1,09	-1,28	-1,46
ZCP4_0416	NAD synthetase	1,08	1,06	1,04	1,04	1,09	1,13	1,14
ZCP4_0417	hypothetical protein	1,21	1,22	1,10	1,06	1,27	-1,43	-1,52
ZCP4_0420	NERD domain protein	1,10	-1,02	1,02	-1,01	-1,24	-1,48	-1,73
ZCP4_0421	beta-lactamase	-1,26	-1,23	-1,02	-1,07	1,17	1,61	1,36
ZCP4_0422	helicase c2	1,06	1,11	1,07	-1,03	1,26	2,22	2,80
ZCP4_0423	lysine--tRNA ligase	1,02	-1,01	1,06	1,14	1,05	-1,27	-1,92
ZCP4_0424	Aldose 1-epimerase	-1,01	-1,01	1,18	1,22	1,24	-2,05	-3,73
ZCP4_0425	Resolvase domain protein	-1,00	1,10	1,19	1,17	1,06	1,45	1,54
ZCP4_0426	hypothetical protein	-1,07	-1,02	-1,01	-1,06	-1,58	-3,32	-3,19
ZCP4_0427	hypothetical protein	-1,62	-1,47	1,08	1,39	6,44	39,87	68,93
ZCP4_0428	50S ribosomal protein L13	1,00	-1,05	1,02	1,10	-1,29	-7,51	-14,49
ZCP4_0429	30S ribosomal protein S9	1,09	1,08	-1,04	1,04	-1,31	-6,96	-14,61
ZCP4_0430	methyl-accepting chemotaxis protein	1,32	1,36	1,09	1,01	-1,13	-1,25	-1,21
ZCP4_0432	chemotaxis protein	1,08	1,14	1,20	1,10	1,30	1,26	1,39
ZCP4_0433	chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	1,03	-1,01	1,04	1,21	1,14	-1,23	-1,26
ZCP4_0434	hypothetical protein	1,96	2,07	1,15	1,19	1,15	1,10	-1,15
ZCP4_0435	hopanoid biosynthesis associated membrane protein HpnM	-1,14	-1,18	-1,04	-1,01	1,07	-1,05	1,01
ZCP4_0436	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	1,24	1,22	1,07	1,01	-1,47	-2,48	-2,44
ZCP4_0437	hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnH	1,01	1,02	1,10	1,02	-1,40	-2,44	-2,71
ZCP4_0438	hopanoid-associated phosphorylase	-1,02	-1,06	-1,06	-1,04	-1,33	-2,08	-2,47
ZCP4_0439	squalene-hopene cyclase	1,31	1,31	1,02	-1,14	-1,81	-3,41	-4,41
ZCP4_0440	squalene-associated FAD-dependent desaturase	1,07	1,05	1,00	-1,19	-1,91	-2,84	-3,23
ZCP4_0441	squalene synthase HpnD	1,01	-1,04	-1,03	-1,09	-1,59	-2,20	-2,34
ZCP4_0442	squalene synthase HpnC	-1,05	-1,00	1,03	-1,03	-1,33	-1,64	-1,64
ZCP4_0443	hopene-associated glycosyltransferase HpnB	1,13	1,13	1,13	-1,01	-1,31	-1,33	-1,20
ZCP4_0444	hopanoid-associated sugar epimerase	1,27	1,23	1,06	-1,01	-1,91	-4,07	-4,51
ZCP4_0445	cation diffusion facilitator family transporter	1,18	1,21	1,01	-1,04	-1,09	-1,57	-1,57
ZCP4_0446	replicative DNA helicase	1,10	1,10	1,03	1,04	1,23	-1,02	-1,01

5. Παράρτημα

ZCP4_0447	cytidine deaminase	-1,15	-1,23	-1,09	-1,15	-1,61	-2,89	-5,28
ZCP4_0448	deoxycytidine triphosphate deaminase	-1,03	1,01	1,02	-1,06	-1,77	-5,07	-8,28
ZCP4_0449	hypothetical protein	-1,18	-1,20	-1,02	-1,01	-1,68	-4,27	-5,77
ZCP4_0450	DNA polymerase III subunits gamma and tau	1,28	1,24	1,03	1,03	-1,19	-1,71	-1,99
ZCP4_0452	ferredoxin	-1,25	-1,20	-1,17	-1,02	1,06	1,35	2,15
ZCP4_0453	aminotransferase class V	-1,04	-1,19	-1,18	1,01	-1,35	-1,80	-1,96
ZCP4_0454	hypothetical protein	1,16	1,09	1,06	1,19	-1,19	-5,83	-10,65
ZCP4_0455	exodeoxyribonuclease VII small subunit	1,21	1,07	1,14	1,22	-1,02	-4,21	-7,71
ZCP4_0456	Polyprenyl synthetase	1,05	1,04	1,03	1,04	-1,12	-3,10	-5,30
ZCP4_0457	pantetheine-phosphate adenylyltransferase	-1,01	-1,02	-1,06	-1,08	-1,18	-2,75	-2,77
ZCP4_0458	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin type	1,08	-1,00	1,07	1,14	1,10	1,20	1,03
ZCP4_0459	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	-1,04	-1,03	-1,01	-1,03	-1,12	1,05	-1,05
ZCP4_0460	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	1,11	1,12	1,06	-1,03	-1,38	-1,24	-1,33
ZCP4_0461	sigma54 specific transcriptional regulator, Fis family	1,11	1,18	1,13	1,05	1,26	1,27	1,44
ZCP4_0462	Alg9 family protein mannosyltransferase	1,02	1,05	1,16	1,01	1,18	1,58	2,35
ZCP4_0463	sodium/hydrogen exchanger	1,29	1,33	1,17	1,10	-1,09	-1,42	-1,21
ZCP4_0464	sodium/hydrogen exchanger	-1,04	-1,03	-1,01	-1,02	1,30	1,68	1,97
ZCP4_0465	alanyl-tRNA synthetase	1,03	1,01	1,05	1,05	-1,12	-2,23	-3,30
ZCP4_0466	Sporulation domain protein	-1,02	-1,02	1,01	-1,02	-1,01	1,03	-1,19
ZCP4_0467	arginyl-tRNA synthetase	-1,01	-1,03	1,01	1,00	-1,43	-1,98	-1,97
ZCP4_0468	deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase	-1,01	-1,05	1,01	1,09	1,08	1,16	1,07
ZCP4_0469	Chloride channel core	1,07	1,04	-1,10	-1,22	-1,54	-1,67	-1,64
ZCP4_0470	Sporulation domain protein	-1,02	1,01	1,00	1,01	-1,39	-2,45	-3,13
ZCP4_0471	cell division protein FtsZ	1,03	-1,08	-1,03	-1,01	-1,07	1,07	1,15
ZCP4_0472	cell division protein FtsA	-1,20	-1,19	1,06	-1,02	1,41	2,97	3,42
ZCP4_0473	cell division protein FtsQ	1,12	1,13	1,01	-1,11	-1,29	1,06	1,04
ZCP4_0474	D-alanine--D-alanine ligase	-1,04	-1,04	1,02	-1,14	-1,64	-1,91	-2,19
ZCP4_0475	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	-1,05	-1,05	1,04	-1,15	-1,60	-1,91	-1,85
ZCP4_0476	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	-1,02	1,02	1,01	-1,14	-1,60	-1,69	-1,59
ZCP4_0477	undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase	1,01	-1,05	-1,07	-1,14	-1,34	-1,24	-1,15
ZCP4_0478	cell division protein FtsW	-1,02	-1,14	-1,14	-1,30	-1,77	-1,59	-1,49
ZCP4_0479	UDP-N-acetylmuramoylalanine/D-glutamate ligase	-1,03	-1,03	-1,07	-1,29	-2,05	-2,88	-2,70
ZCP4_0480	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	1,03	1,16	1,00	-1,26	-1,57	-1,43	-1,30
ZCP4_0481	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2, 6-diaminopimelate/D-alanyl-D-alanyl ligase	1,07	1,16	1,06	-1,15	-1,71	-2,46	-2,88
ZCP4_0482	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2, 6-diaminopimelate ligase	1,10	1,09	1,03	-1,12	-1,67	-1,84	-1,80
ZCP4_0483	Peptidoglycan glycosyltransferase	1,25	1,20	-1,00	-1,12	-1,58	-1,72	-1,40
ZCP4_0484	hypothetical protein	1,20	1,14	1,03	-1,10	-1,36	-1,14	1,06
ZCP4_0485	S-adenosyl-methyltransferase MraW	1,34	1,35	1,04	-1,07	-1,17	-1,08	1,02
ZCP4_0486	hypothetical protein	1,01	1,03	-1,10	-1,12	-1,11	-1,27	-1,51
ZCP4_0487	cysteine synthase A	1,04	-1,07	1,05	1,03	1,16	-1,22	-1,47
ZCP4_0488	phosphoribosylformylglycinamide	1,04	1,01	1,00	1,12	-1,23	-2,76	-3,53

5. Παράρτημα

	synthase II							
ZCP4_0489	nucleotide sugar dehydrogenase	1,02	1,01	1,04	1,01	1,09	1,01	1,24
ZCP4_0490	queuosine biosynthesis protein QueD	-1,17	-1,11	1,07	-1,04	-1,28	-1,53	-1,50
ZCP4_0491	hypothetical protein	1,15	-1,11	-1,40	-1,07	-1,52	-1,63	-2,18
ZCP4_0492	hypothetical protein	1,17	1,17	1,06	1,01	-1,07	1,58	1,63
ZCP4_0493	peptide deformylase	1,22	1,28	1,14	1,07	1,03	1,79	2,16
ZCP4_0494	recombination protein RecR	1,19	1,18	-1,06	-1,08	1,08	1,93	2,51
ZCP4_0495	methionyl-tRNA formyltransferase	1,08	-1,11	-1,26	-1,09	-1,83	-2,61	-4,16
ZCP4_0496	tRNA pseudouridine synthase A	1,18	1,11	-1,04	1,00	-1,25	-1,16	-1,08
ZCP4_0497	hypothetical protein	1,07	-1,00	-1,25	-1,08	-1,57	-2,13	-2,14
ZCP4_0498	ribosomal protein S12 methylthiotransferase	1,09	1,01	-1,08	-1,07	-1,71	-5,53	-7,87
ZCP4_0499	Leucyl aminopeptidase	-1,08	-1,10	-1,01	1,11	1,47	1,49	1,27
ZCP4_0500	NLP/P60 protein	-1,09	-1,05	1,02	1,06	1,45	1,79	1,82
ZCP4_0501	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	-1,13	-1,20	-1,05	1,12	1,12	-1,09	-1,11
ZCP4_0502	putative regulator of peptidoglycan cycling and attachment to outer membrane	1,14	1,13	1,11	1,24	1,14	-1,43	-2,03
ZCP4_0503	secretion protein HlyD family protein	1,28	1,39	1,19	1,15	1,08	1,33	1,11
ZCP4_0504	ABC transporter related protein	-1,07	-1,01	-1,02	-1,26	1,02	1,27	1,39
ZCP4_0505	ABC-2 type transporter	1,00	-1,12	-1,06	1,14	1,23	2,70	3,81
ZCP4_0506	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	-1,03	-1,03	1,05	-1,07	1,06	1,57	2,34
ZCP4_0507	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,07	-1,12	1,05	1,31	1,73	1,67	1,07
ZCP4_0509	TonB-dependent receptor plug	-1,31	-1,33	-1,01	1,19	3,30	7,40	9,21
ZCP4_0510	Prolyl oligopeptidase	1,06	1,08	1,19	1,29	2,19	4,07	4,52
ZCP4_0511	hypothetical protein	-1,00	1,04	1,16	1,10	-1,01	-2,11	-2,19
ZCP4_0512	Dihydroorotase	1,13	1,05	-1,05	-1,04	-1,33	-1,44	-1,12
ZCP4_0513	aspartate carbamoyltransferase	1,37	1,31	-1,01	1,00	-1,32	-1,81	-1,51
ZCP4_0514	hypothetical protein	1,14	1,18	-1,21	-1,51	-2,49	-3,67	-3,70
ZCP4_0515	TonB-dependent receptor	1,46	1,30	1,22	1,01	1,08	2,06	2,69
ZCP4_0516	Gluconate 2-dehydrogenase (acceptor)	-1,23	-1,22	-1,04	-1,10	1,02	2,07	2,13
ZCP4_0517	glucose-methanol-choline oxidoreductase	-1,26	-1,20	-1,05	-1,07	1,08	1,66	1,50
ZCP4_0518	hypothetical protein	-1,28	-1,36	-1,02	-1,14	1,10	1,26	1,37
ZCP4_0519	Holliday junction resolvase YqgF	1,14	1,12	1,06	1,17	1,15	1,03	1,07
ZCP4_0520	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, C subunit	1,10	1,11	1,01	-1,10	-1,37	-2,23	-2,63
ZCP4_0521	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	-1,02	-1,10	-1,03	1,03	1,01	-1,17	-1,36
ZCP4_0522	aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	1,01	-1,08	-1,04	1,05	1,00	-1,28	-1,72
ZCP4_0523	transcriptional regulator, LysR family	1,18	1,21	1,10	-1,01	-1,12	-1,60	-1,46
ZCP4_0524	outer membrane protein of efflux system ZMO0780:ZMO0788	1,16	1,08	1,01	1,13	1,03	1,09	-1,12
ZCP4_0525	membrane fusion protein of efflux system ZMO0780:ZMO0778	1,05	1,05	1,06	1,06	1,16	1,30	1,19
ZCP4_0526	inner membrane transporter of efflux system ZMO0780:ZMO0778	1,12	1,17	1,13	1,04	1,37	1,64	1,95
ZCP4_0527	beta-lactamase domain protein	-1,00	1,10	1,24	1,35	1,70	2,34	2,82
ZCP4_0528	methyltransferase type 12	1,01	-1,12	-1,10	1,02	-1,49	-2,73	-3,20
ZCP4_0530	transcriptional regulator, LysR family	-1,30	-1,38	-1,31	-1,27	-1,14	-1,42	-1,27
ZCP4_0531	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-1,11	-1,31	-1,22	1,02	-1,17	-1,11	-1,14

5. Παράρτημα

	cyclophilin type							
ZCP4_0532	magnesium transporter	1,20	1,14	1,04	1,11	1,08	1,17	1,29
ZCP4_0533	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA	1,11	1,06	1,00	1,02	-1,14	-2,41	-2,64
ZCP4_0534	hypothetical protein	-1,77	-1,80	-1,27	-1,52	-1,16	-1,09	-1,15
ZCP4_0535	Outer membrane-related protein	1,04	1,06	1,00	-1,07	-1,43	-1,68	-1,81
ZCP4_0536	PII uridylyl-transferase	1,07	1,06	1,02	1,03	1,36	1,85	1,72
ZCP4_0537	threonyl-tRNA synthetase	-1,04	-1,10	1,00	1,10	1,13	-1,53	-1,84
ZCP4_0538	alpha/beta hydrolase fold protein	1,02	-1,02	1,04	1,09	1,40	1,63	1,40
ZCP4_0539	Tetratricopeptide domain protein	-1,04	-1,00	-1,02	1,10	1,41	2,26	2,34
ZCP4_0540	lactoylglutathione lyase	-1,14	-1,10	1,13	1,12	1,22	1,17	1,00
ZCP4_0541	hydroxyacylglutathione hydrolase	-1,10	-1,13	1,02	1,08	1,34	1,46	1,40
ZCP4_0542	isochorismatase hydrolase	-1,17	-1,22	-1,03	1,00	1,12	1,13	-1,20
ZCP4_0543	TPR repeat-containing protein	-1,12	-1,10	-1,04	-1,03	1,08	1,07	-1,24
ZCP4_0544	TPR repeat-containing protein	1,02	1,03	-1,01	1,00	-1,60	-3,99	-9,87
ZCP4_0545	Sterol-binding domain protein	-1,18	-1,12	-1,03	1,10	1,86	2,14	1,86
ZCP4_0546	glutaredoxin 3	-1,38	-1,28	1,03	1,16	2,19	1,81	1,47
ZCP4_0547	hypothetical protein	-1,12	-1,08	-1,08	-1,06	1,10	-1,02	1,08
ZCP4_0548	Mov34/MPN/PAD-1 family protein	1,00	-1,08	1,04	1,05	1,13	-1,70	-1,54
ZCP4_0549	pseudouridine synthase, RluA family	-1,12	-1,10	-1,03	1,21	2,04	8,66	7,05
ZCP4_0550	RNA polymerase factor sigma-32	-1,24	-1,17	-1,01	1,04	2,76	9,26	8,72
ZCP4_0551	cysteine synthase	-1,18	-1,19	-1,03	1,13	2,46	5,36	5,17
ZCP4_0552	hypothetical protein	-1,05	-1,09	1,01	1,08	-1,30	-1,59	-1,68
ZCP4_0553	hypothetical protein	-1,02	-1,08	1,04	1,21	1,16	-1,42	-1,52
ZCP4_0555	hypothetical protein	1,23	1,23	1,04	1,20	1,40	1,53	1,71
ZCP4_0556	hypothetical protein	1,29	1,24	-1,02	-1,03	-1,34	-1,48	-1,28
ZCP4_0557	peptide chain release factor 3	1,11	1,09	1,07	1,06	1,09	-1,35	-1,40
ZCP4_0558	CsbD family protein	-1,59	-1,62	1,18	1,29	6,32	8,69	7,79
ZCP4_0559	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	-1,28	-1,21	-1,02	-1,18	-1,56	-1,81	-1,90
ZCP4_0560	bifunctional sulfur carrier protein/thiazole synthase protein	-1,11	-1,11	-1,00	1,03	1,07	-1,68	-2,19
ZCP4_0561	3-dehydroquinate dehydratase	-1,01	1,06	-1,08	-1,16	-1,38	-2,23	-3,26
ZCP4_0562	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein	1,16	1,14	-1,02	1,07	-1,02	-1,62	-2,26
ZCP4_0563	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase	1,02	-1,04	-1,12	-1,11	-1,50	-2,82	-3,79
ZCP4_0564	3'(2'),5'-bispophosphate nucleotidase	1,05	1,00	1,02	1,05	1,18	1,33	1,12
ZCP4_0566	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	1,20	1,16	1,06	-1,01	-1,21	-2,34	-2,96
ZCP4_0567	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	1,13	1,12	-1,02	1,00	-1,20	-1,81	-1,48
ZCP4_0568	50S ribosomal protein L7/L12	1,00	1,00	1,00	-1,10	-2,27	-4,59	-8,35
ZCP4_0569	50S ribosomal protein L10	1,11	-1,02	-1,02	-1,05	-1,59	-3,15	-6,11
ZCP4_0570	50S ribosomal protein L1	1,10	1,03	-1,01	1,02	-1,76	-5,19	-7,90
ZCP4_0571	50S ribosomal protein L11	1,11	1,02	1,04	1,06	-1,85	-7,04	-9,44
ZCP4_0572	NusG antitermination factor	1,04	-1,00	-1,05	-1,04	-1,80	-5,39	-6,93
ZCP4_0573	preprotein translocase subunit SecE (NCBI)	1,14	1,11	-1,04	-1,05	-1,14	-1,67	-1,86
ZCP4_0575	Endothelin-converting enzyme 1	-1,20	-1,21	1,01	-1,01	1,29	1,79	1,63
ZCP4_0576	SsrA-binding protein	-1,24	-1,28	1,11	1,02	1,25	1,16	1,09

5. Παράρτημα

ZCP4_0577	dihydrodipicolinate synthase	-1,24	-1,23	-1,01	-1,01	1,25	2,22	2,67
ZCP4_0578	Lytic transglycosylase catalytic	-1,13	-1,14	-1,21	-1,04	1,25	4,09	4,83
ZCP4_0579	transcription elongation factor GreB	-1,06	1,05	1,03	-1,07	-1,24	1,56	1,96
ZCP4_0580	hypothetical protein	1,14	1,12	1,04	1,09	1,05	-1,23	-1,39
ZCP4_0581	aspartyl-tRNA synthetase	-1,05	-1,04	1,06	1,07	-1,19	-2,79	-3,35
ZCP4_0582	ribonuclease D	-1,02	-1,19	-1,22	-1,09	-1,51	-1,84	-2,05
ZCP4_0583	Ppx/GppA phosphatase	-1,07	-1,07	-1,03	-1,03	-1,31	-1,18	-1,05
ZCP4_0584	polyphosphate kinase	-1,29	-1,22	1,06	1,09	1,79	3,83	4,89
ZCP4_0585	DNA replication initiation ATPase	1,28	1,25	-1,12	1,11	1,10	-1,16	-1,13
ZCP4_0586	hypothetical protein	1,20	1,19	1,02	-1,06	-1,06	-1,39	-1,75
ZCP4_0587	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	-1,15	-1,21	-1,10	1,07	-1,00	-1,02	1,03
ZCP4_0588	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	-1,15	-1,17	-1,09	-1,01	1,02	-1,10	-1,26
ZCP4_0589	dihydrodipicolinate reductase	-1,11	-1,14	1,09	1,11	1,27	1,51	1,36
ZCP4_0590	endonuclease III	-1,09	-1,17	-1,11	-1,11	-1,37	-1,05	-1,43
ZCP4_0591	regulatory protein RecX	-1,01	1,01	1,11	-1,05	-1,01	-1,09	-1,58
ZCP4_0592	AMP-dependent synthetase and ligase	1,07	1,03	1,01	1,06	-1,24	-2,04	-2,53
ZCP4_0593	peptidase S9 prolyl oligopeptidase active site domain protein	1,12	1,12	-1,03	1,03	1,13	1,23	1,17
ZCP4_0595	hypothetical protein	1,03	1,00	-1,18	1,03	-1,62	-2,87	-3,06
ZCP4_0596	small multidrug resistance protein	-1,27	-1,08	-1,07	-1,17	-1,75	-1,71	-1,66
ZCP4_0598	hypothetical protein	1,09	1,13	-1,06	-1,27	-1,61	-1,85	-2,04
ZCP4_0600	hypothetical protein	-1,23	-1,20	-1,04	-1,03	1,65	5,13	6,05
ZCP4_0601	OsmC family protein	-1,58	-1,35	-1,04	1,13	4,01	9,10	10,13
ZCP4_0602	DNA gyrase subunit A	1,09	1,13	1,03	-1,00	-1,03	-1,43	-1,50
ZCP4_0603	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase Gid	1,05	1,10	1,02	-1,03	-1,27	-2,63	-3,67
ZCP4_0604	oxidoreductase domain protein	1,07	1,08	1,05	1,13	1,27	-2,71	-5,77
ZCP4_0605	Auxin Efflux Carrier	-1,17	-1,15	-1,13	-1,12	-1,18	1,15	-1,10
ZCP4_0606	acetolactate synthase	-1,02	-1,05	-1,12	-1,08	-1,96	-12,07	-27,26
ZCP4_0607	signal transduction protein	1,59	1,57	1,19	1,14	1,12	1,20	1,18
ZCP4_0608	CRISPR-associated protein, Csy4 family	1,02	1,10	-1,03	-1,10	1,01	1,86	2,06
ZCP4_0609	CRISPR-associated protein, Csy3 family	-1,10	-1,05	1,03	-1,03	-1,05	1,51	1,65
ZCP4_0610	CRISPR-associated protein, Csy2 family	-1,04	1,06	1,06	-1,14	1,21	2,67	3,36
ZCP4_0611	CRISPR-associated protein, Csy1 family	-1,02	-1,00	1,05	-1,01	1,28	1,77	1,94
ZCP4_0612	CRISPR-associated helicase Cas3 family	1,07	1,09	1,17	1,17	1,41	2,20	2,67
ZCP4_0613	CRISPR-associated protein Cas1	-1,01	1,05	1,02	-1,14	1,11	1,19	1,04
ZCP4_0614	nitroreductase	-1,10	-1,12	-1,06	-1,24	-1,33	-1,58	-1,62
ZCP4_0615	3-isopropylmalate dehydrogenase	-1,02	-1,05	-1,04	1,07	-1,51	-3,70	-4,28
ZCP4_0616	Cystathionine gamma-synthase	-1,04	-1,10	-1,01	1,09	1,05	-1,60	-2,06
ZCP4_0617	transcriptional regulator, LysR family	1,08	1,04	-1,03	1,01	-1,08	-1,16	-1,21
ZCP4_0618	hypothetical protein	-2,11	-1,55	1,11	1,13	2,69	6,35	6,57
ZCP4_0619	DNA repair protein RecO	1,29	1,29	1,16	1,10	1,20	1,87	2,35
ZCP4_0620	excinuclease ABC subunit C	1,14	1,16	1,13	1,10	1,38	2,19	2,41
ZCP4_0621	H ⁺ transporting two-sector ATPase B/B' subunit	1,02	1,02	-1,02	-1,02	1,06	-1,69	-2,37
ZCP4_0622	ATPase	1,02	1,05	1,03	1,05	1,30	-1,00	-1,35
ZCP4_0623	H ⁺ transporting two-sector ATPase C	-1,09	-1,01	1,03	1,07	1,17	1,69	1,56

5. Παράρτημα

	subunit							
ZCP4_0624	F0F1 ATP synthase subunit A	-1,02	1,02	1,02	1,06	1,48	1,29	1,26
ZCP4_0625	hypothetical protein	1,03	1,05	1,03	1,05	1,25	-1,71	-2,25
ZCP4_0626	hypothetical protein	-1,06	-1,11	1,16	1,19	1,74	3,55	3,72
ZCP4_0627	hypothetical protein	-1,23	-1,09	1,04	1,01	1,47	4,15	5,25
ZCP4_0628	hypothetical protein	1,05	1,09	-1,01	-1,09	-1,13	1,27	1,33
ZCP4_0629	DNA repair protein RadC	1,22	1,23	1,00	-1,07	-1,01	1,58	1,64
ZCP4_0630	adenylosuccinate lyase	-1,03	-1,04	-1,02	1,12	1,02	-2,12	-3,27
ZCP4_0631	chaperone protein DnaJ	-1,03	-1,00	-1,03	-1,03	1,02	1,90	1,96
ZCP4_0632	molecular chaperone DnaK	-1,14	-1,07	1,05	1,09	1,87	4,48	4,73
ZCP4_0633	HAD-superfamily subfamily IB hydrolase, TIGR01490	1,27	1,29	1,06	1,04	1,11	1,23	1,28
ZCP4_0634	hypothetical protein	1,01	-1,04	-1,00	-1,05	1,14	-1,27	-1,31
ZCP4_0635	arginine/ornithine succinyltransferase subunit	-1,00	1,01	1,20	1,21	1,25	-1,05	1,05
ZCP4_0636	phosphoribosyltransferase	1,12	1,12	1,06	1,02	-1,21	-2,59	-3,02
ZCP4_0637	adenosine/AMP deaminase	1,35	1,40	1,03	1,00	-1,18	-1,05	1,09
ZCP4_0638	polysaccharide deacetylase	-1,01	1,03	1,01	-1,06	-1,12	-1,19	-1,21
ZCP4_0639	hypothetical protein	-1,02	-1,05	-1,01	1,02	1,33	2,28	3,06
ZCP4_0640	flagellar protein FliS	1,26	1,30	1,13	-1,01	-1,03	-1,58	-1,51
ZCP4_0641	flagellar hook-associated 2 domain protein	-1,00	1,03	1,04	-1,01	1,43	1,96	2,14
ZCP4_0642	flagellar biosynthesis protein FlhB	1,04	1,09	1,06	-1,08	1,10	1,72	2,48
ZCP4_0643	flagellar biosynthetic protein FliR	-1,04	-1,01	-1,05	-1,22	-1,13	1,39	2,25
ZCP4_0644	export protein FliQ family 3	-1,05	-1,41	1,06	1,26	-1,03	2,19	2,21
ZCP4_0645	flagellar biosynthesis protein FliP	1,09	1,10	1,07	1,00	1,06	1,64	2,48
ZCP4_0646	hypothetical protein	1,25	1,47	1,09	-1,01	-1,03	-1,44	-1,10
ZCP4_0647	flagellar motor switch protein FliN	-1,04	1,01	1,02	-1,11	-1,03	-1,14	1,12
ZCP4_0648	surface presentation of antigens (SPOA) protein	1,16	1,19	1,11	-1,06	-1,06	-1,22	-1,09
ZCP4_0649	flagellar basal body-associated protein FliL	1,12	1,16	1,08	1,03	1,06	-1,00	-1,11
ZCP4_0650	hypothetical protein	1,03	1,12	1,02	-1,07	1,05	1,51	1,45
ZCP4_0651	hypothetical protein	1,16	1,20	1,05	-1,03	1,21	1,29	1,45
ZCP4_0652	flagellum-specific ATP synthase FliI	1,46	1,42	1,04	1,07	-1,07	-1,35	-1,16
ZCP4_0653	hypothetical protein	1,07	-1,02	1,03	-1,20	-1,03	1,21	1,13
ZCP4_0654	flagellar motor switch protein FliG	-1,01	-1,10	1,12	1,37	1,31	1,37	1,42
ZCP4_0655	flagellar M-ring protein FliF	-1,11	-1,18	-1,04	1,02	1,12	1,35	1,26
ZCP4_0657	sigma54 specific transcriptional regulator, Fis family	1,23	1,21	1,05	1,15	1,18	-1,43	1,01
ZCP4_0658	flagellin/flagellar hook associated protein	-1,58	-1,59	-1,34	1,08	1,46	3,65	4,31
ZCP4_0659	hypothetical protein	1,03	1,00	1,06	1,00	1,09	1,42	1,52
ZCP4_0660	hypothetical protein	-1,09	1,02	1,07	1,08	-1,05	-1,15	-1,01
ZCP4_0661	RNA polymerase, sigma 28 subunit, FliA/WhiG	1,20	1,18	1,22	1,07	1,18	-1,17	-1,39
ZCP4_0662	Cobyrinic acid ac-diamide synthase	1,17	1,17	1,15	1,08	1,25	1,22	1,10
ZCP4_0663	flagellar biosynthesis protein FlhA	1,01	1,01	-1,02	-1,04	1,26	2,31	3,07
ZCP4_0664	hypothetical protein	1,31	1,28	-1,05	1,09	1,09	-1,38	-1,90
ZCP4_0665	Anti-sigma-28 factor FlgM family protein	1,16	1,19	1,11	1,22	1,62	1,25	1,09
ZCP4_0666	hypothetical protein	1,12	1,23	1,12	1,10	1,69	1,49	1,70

5. Παράρτημα

ZCP4_0667	flagellar motor protein	-1,06	1,03	-1,07	-1,42	-1,23	-3,07	-3,56
ZCP4_0668	flagellar motor component	1,17	1,04	-1,06	1,12	-1,03	-1,24	-1,31
ZCP4_0669	flagellar basal-body rod protein FlgB	1,14	1,23	1,19	1,43	-1,07	-1,14	-1,83
ZCP4_0670	flagellar basal-body rod protein FlgC	-1,05	1,05	1,23	1,13	1,38	1,10	1,23
ZCP4_0671	flagellar hook capping protein	-1,66	-1,47	-1,04	-1,00	1,14	1,04	-1,16
ZCP4_0672	flagellar hook-basal body protein	-1,39	-1,27	-1,00	1,05	1,38	1,49	1,28
ZCP4_0673	flagellar basal-body rod protein FlgF	-1,20	-1,24	-1,07	1,09	1,17	1,05	-1,17
ZCP4_0674	flagellar basal-body rod protein FlgG	-1,27	-1,15	1,04	1,02	1,29	1,75	1,49
ZCP4_0675	flagellar L-ring protein	-1,34	-1,40	-1,15	-1,11	1,20	2,34	2,52
ZCP4_0676	flagellar basal body P-ring protein	-1,27	-1,21	-1,15	-1,09	1,20	2,79	3,27
ZCP4_0677	hypothetical protein	-1,13	-1,14	-1,05	-1,01	1,11	1,53	1,64
ZCP4_0678	flagellar hook-associated protein FlgK	-1,10	-1,03	1,06	1,06	1,22	1,31	1,23
ZCP4_0679	flagellin domain protein	-1,23	-1,13	1,10	1,07	1,35	1,61	1,46
ZCP4_0680	flagellar motor protein MotA	-1,02	1,04	-1,00	-1,12	1,03	1,20	1,05
ZCP4_0681	OmpA/MotB domain protein	1,10	1,12	1,04	-1,01	1,04	1,22	-1,02
ZCP4_0683	histidine kinase	1,21	1,26	1,06	-1,18	-1,10	-1,12	1,06
ZCP4_0684	acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha	1,21	1,12	-1,10	-1,05	-1,28	-1,71	-1,87
ZCP4_0685	integrase family protein	1,10	1,13	-1,04	-1,05	1,01	1,28	1,37
ZCP4_0686	hypothetical protein	1,16	1,17	1,06	-1,08	1,06	1,11	1,16
ZCP4_0688	Shikimate kinase	1,31	1,30	-1,03	-1,10	-1,85	-6,32	-8,10
ZCP4_0689	3-dehydroquinate synthase	1,17	1,10	1,02	1,02	-1,27	-2,37	-2,43
ZCP4_0690	hypothetical protein	-1,24	-1,24	1,02	-1,08	1,21	1,97	1,73
ZCP4_0691	NifU-like involved in Fe-S cluster formation	-1,20	-1,14	1,13	-1,04	1,11	1,31	1,30
ZCP4_0692	Colicin V production protein	1,05	1,17	1,12	1,00	1,09	1,21	1,17
ZCP4_0693	DNA repair protein RadA	1,11	1,06	-1,08	-1,24	-1,65	-1,57	-1,76
ZCP4_0694	hypothetical protein	-1,02	1,01	-1,10	-1,42	-1,51	1,51	1,96
ZCP4_0695	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	-1,02	1,04	1,01	-1,06	-1,15	-1,46	-1,51
ZCP4_0696	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	1,04	-1,01	-1,06	1,01	-1,08	-1,86	-2,21
ZCP4_0697	tryptophan synthase subunit beta	-1,06	-1,09	-1,00	1,01	-1,22	-2,11	-2,52
ZCP4_0698	tryptophan synthase subunit alpha	-1,01	-1,07	-1,01	1,06	-1,14	-1,65	-2,19
ZCP4_0699	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, beta subunit	-1,08	-1,12	-1,07	-1,01	-1,29	-1,76	-2,37
ZCP4_0700	FoIc bifunctional protein	1,01	-1,02	-1,09	-1,09	-1,47	-2,86	-4,28
ZCP4_0701	major facilitator superfamily MFS 1	1,05	1,10	1,01	1,00	1,04	1,41	1,70
ZCP4_0702	sodium:dicarboxylate symporter	-1,23	-1,18	-1,19	-1,14	-1,86	-4,27	-4,93
ZCP4_0703	pseudouridine synthase	1,32	1,30	-1,05	-1,03	-1,64	-3,81	-5,30
ZCP4_0704	methyltransferase	1,17	1,15	-1,03	1,23	-1,12	-4,32	-4,13
ZCP4_0705	UvrD/REP helicase	1,19	1,19	-1,03	-1,06	-1,20	-1,44	-1,47
ZCP4_0706	glutaredoxin 2	1,14	1,17	1,10	1,10	1,29	-1,02	-1,04
ZCP4_0707	ABC transporter, conserved site	-1,18	-1,11	1,08	1,11	1,35	1,43	1,63
ZCP4_0708	binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	-1,04	-1,00	1,09	1,09	1,36	1,62	2,14
ZCP4_0710	ribosomal L11 methyltransferase	1,03	1,07	1,12	1,18	1,21	-1,25	-1,40
ZCP4_0711	succinate dehydrogenase, cytochrome b subunit	1,03	1,13	1,08	-1,04	1,05	1,01	-1,18
ZCP4_0712	hypothetical protein	-1,10	1,00	1,08	1,17	1,49	1,50	1,51

5. Παράρτημα

ZCP4_0713	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	-1,00	-1,02	-1,01	1,05	1,06	-1,30	-1,45
ZCP4_0714	major facilitator superfamily MFS 1	1,09	1,12	1,06	-1,07	-1,25	-2,06	-2,24
ZCP4_0715	ATP-dependent helicase HrpB	1,14	1,10	-1,04	-1,08	-1,54	-2,16	-1,96
ZCP4_0716	Polyprenyl synthetase	1,15	1,14	-1,03	-1,11	-1,30	-2,31	-3,54
ZCP4_0717	chorismate mutase	1,01	-1,03	1,01	-1,04	-1,77	-4,17	-5,72
ZCP4_0718	PLP-dependent enzyme, histidinol-phosphate	-2,23	-2,51	-1,49	-1,23	-3,30	-3,00	-2,14
ZCP4_0719	hypothetical protein	-1,14	-1,18	-1,08	-1,03	-1,14	-1,31	-1,43
ZCP4_0720	glucose sorbosone dehydrogenase	1,03	1,06	1,04	1,00	1,05	1,01	-1,04
ZCP4_0721	hypothetical protein	1,36	1,32	1,05	-1,12	-1,71	-2,42	-1,93
ZCP4_0722	transcription elongation factor NusA	1,21	1,16	-1,01	-1,08	-1,45	-1,55	-1,43
ZCP4_0723	hypothetical protein	1,23	1,26	1,04	-1,02	-1,05	-1,28	-1,21
ZCP4_0724	translation initiation factor IF-2	1,05	1,00	-1,08	-1,05	-1,40	-1,82	-2,16
ZCP4_0725	ribosome-binding factor A	1,10	1,14	1,10	-1,04	-1,23	-1,53	-1,29
ZCP4_0726	thymidine kinase	1,13	1,16	-1,00	-1,00	-1,04	-1,08	1,01
ZCP4_0727	tRNA pseudouridine synthase B	1,22	-1,00	1,11	1,07	-1,30	-3,58	-3,86
ZCP4_0728	ribosomal protein S15	1,02	-1,04	1,05	-1,04	-1,63	-8,76	-12,74
ZCP4_0729	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	1,22	1,21	1,01	-1,08	-1,63	-4,34	-5,64
ZCP4_0730	signal transduction histidine kinase	1,15	1,21	1,11	1,05	1,10	1,12	1,19
ZCP4_0732	Chloride channel core	-1,04	-1,03	-1,03	-1,02	-1,05	-1,14	-1,08
ZCP4_0734	sulphate transporter	-1,02	1,05	1,13	1,06	1,15	-1,17	-1,11
ZCP4_0735	indole-3-glycerol-phosphate synthase	-1,08	-1,10	1,06	1,17	-1,10	-1,87	-1,66
ZCP4_0736	isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent	1,01	-1,04	-1,11	-1,06	-2,12	-3,97	-5,67
ZCP4_0737	aconitate hydratase	-1,02	-1,00	-1,06	-1,08	-1,72	-2,82	-2,97
ZCP4_0739	50S ribosomal protein L17	1,12	1,10	1,20	1,08	-1,18	-4,14	-7,70
ZCP4_0740	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	1,09	1,12	1,10	1,07	-1,20	-4,87	-9,41
ZCP4_0741	30S ribosomal protein S11	1,15	1,21	1,20	1,14	-1,10	-5,09	-9,44
ZCP4_0742	30S ribosomal protein S13	1,15	1,17	1,18	1,20	-1,07	-4,67	-7,25
ZCP4_0743	Adenylate kinase	1,02	1,11	1,02	-1,10	-1,59	-3,46	-3,76
ZCP4_0744	preprotein translocase subunit SecY	1,14	1,26	1,05	-1,10	-1,22	-1,94	-2,04
ZCP4_0745	50S ribosomal protein L15	1,01	1,03	-1,02	-1,18	-1,90	-5,20	-7,81
ZCP4_0746	50S ribosomal protein L30	-1,04	-1,07	-1,08	-1,06	-1,06	-2,34	-2,87
ZCP4_0747	30S ribosomal protein S5	1,01	1,00	1,00	-1,07	-1,30	-2,85	-4,40
ZCP4_0748	50S ribosomal protein L18	1,01	-1,06	1,03	-1,02	-1,14	-2,27	-3,81
ZCP4_0749	50S ribosomal protein L6	-1,04	-1,07	-1,07	-1,05	-1,52	-3,79	-5,79
ZCP4_0750	30S ribosomal protein S8	-1,02	-1,04	-1,04	-1,11	-1,26	-2,93	-4,58
ZCP4_0751	30S ribosomal protein S14	-1,05	-1,09	1,00	-1,09	-1,23	-3,81	-5,74
ZCP4_0752	50S ribosomal protein L5	-1,08	-1,04	-1,12	-1,16	-1,40	-2,56	-4,10
ZCP4_0753	50S ribosomal protein L24	1,01	-1,02	-1,02	-1,07	-1,64	-4,70	-8,14
ZCP4_0754	ribosomal protein L14	-1,03	1,01	1,01	-1,06	-1,14	-1,94	-2,83
ZCP4_0755	ribosomal protein S17	-1,06	-1,04	-1,00	-1,18	-1,70	-3,84	-6,38
ZCP4_0756	50S ribosomal protein L29	-1,21	-1,08	-1,07	-1,20	-1,35	-3,01	-4,95
ZCP4_0757	50S ribosomal protein L16	-1,10	1,03	1,08	-1,03	1,11	-1,30	-1,94
ZCP4_0758	30S ribosomal protein S3	-1,04	-1,00	-1,02	-1,12	-1,12	-2,26	-3,27
ZCP4_0759	50S ribosomal protein L22	-1,01	1,03	1,01	-1,06	-1,07	-2,43	-3,62

5. Παράρτημα

ZCP4_0760	ribosomal protein S19	-1,06	1,02	1,06	-1,05	-1,16	-2,48	-3,69
ZCP4_0761	50S ribosomal protein L2	-1,09	-1,01	-1,01	-1,14	-1,36	-3,11	-4,65
ZCP4_0762	50S ribosomal protein L23	-1,07	1,01	1,02	-1,08	-1,83	-5,76	-10,42
ZCP4_0763	50S ribosomal protein L4	-1,09	-1,04	-1,03	-1,23	-1,78	-4,66	-7,54
ZCP4_0764	50S ribosomal protein L3	1,02	1,03	1,02	-1,13	-1,57	-4,93	-7,43
ZCP4_0765	30S ribosomal protein S10	1,17	1,22	1,09	-1,07	-1,44	-7,21	-13,25
ZCP4_0766	elongation factor Tu	-1,10	-1,13	1,07	-1,08	-1,32	-3,83	-6,36
ZCP4_0767	elongation factor G	-1,03	1,06	1,03	-1,13	-1,25	-5,26	-8,18
ZCP4_0768	30S ribosomal protein S7	1,08	1,08	1,08	1,00	-1,15	-4,95	-8,10
ZCP4_0769	ribosomal protein S12	1,05	1,07	1,08	1,02	-1,17	-5,64	-8,98
ZCP4_0770	phosphoesterase PA-phosphatase related protein	1,08	1,07	-1,11	-1,23	-1,86	-1,53	-1,46
ZCP4_0771	dihydrolipoamide dehydrogenase	-1,07	-1,04	-1,09	-1,21	-1,75	-1,54	-1,42
ZCP4_0772	thioesterase superfamily protein	-1,09	1,00	-1,09	-1,16	-1,13	1,76	2,24
ZCP4_0773	pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase	-1,03	1,02	-1,09	-1,25	-1,38	-1,08	1,05
ZCP4_0774	hypothetical protein	1,08	1,05	-1,01	-1,08	-1,25	-1,38	-1,36
ZCP4_0775	GCN5-related N-acetyltransferase	-1,26	-1,28	-1,05	-1,04	-1,40	-1,45	-1,69
ZCP4_0776	GAF domain-containing protein	-1,09	-1,14	-1,10	-1,24	-1,44	-1,58	-1,55
ZCP4_0777	aminoacyl-tRNA hydrolase	1,33	1,26	1,04	-1,12	-1,28	-2,87	-3,78
ZCP4_0778	RNA pseudouridine synthase	1,21	1,28	-1,06	-1,18	-1,34	-3,58	-4,62
ZCP4_0779	glycosyl transferase family 2	1,16	1,25	1,06	1,00	-1,24	-2,80	-3,05
ZCP4_0780	cell wall component synthesis or export	1,20	1,20	1,05	1,03	-1,17	-1,62	-1,45
ZCP4_0781	GtrA family protein	1,23	1,25	1,12	1,13	-1,01	-1,45	1,12
ZCP4_0782	hypothetical protein	1,14	1,20	-1,04	-1,13	-1,33	-1,37	-1,25
ZCP4_0783	penicillin-binding protein, 1A family	1,26	1,21	-1,01	1,00	-1,14	-1,37	-1,24
ZCP4_0784	bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase	1,07	1,07	1,09	-1,00	-1,16	-2,03	-2,69
ZCP4_0785	phosphoglycolate phosphatase	1,04	1,04	1,08	1,05	-1,19	-1,94	-2,43
ZCP4_0786	outer membrane biogenesis protein	-1,20	-1,19	-1,06	-1,13	-1,16	1,57	2,30
ZCP4_0787	outer membrane biogenesis protein	-1,02	1,02	-1,05	-1,24	-1,37	1,38	2,34
ZCP4_0788	drug resistance transporter, Bcr/CflA subfamily	1,09	1,11	1,03	-1,03	-1,35	1,03	1,59
ZCP4_0789	type I glutamate--ammonia ligase	-1,08	-1,08	-1,07	1,00	-1,64	-3,58	-5,36
ZCP4_0790	nitrogen regulatory protein P-II	-1,32	-1,30	-1,35	-1,29	-3,80	-8,58	-10,20
ZCP4_0791	peptidase M24	-1,11	-1,09	-1,02	-1,01	-1,01	1,16	1,12
ZCP4_0792	Oligopeptidase B	-1,24	-1,19	-1,03	1,02	1,29	2,70	3,87
ZCP4_0795	hypothetical protein	1,10	1,13	-1,04	1,04	1,05	-1,40	-1,52
ZCP4_0796	HpcH/HpaI aldolase	-1,13	-1,16	-1,10	-1,04	1,43	1,99	1,67
ZCP4_0797	hypothetical protein	-1,08	-1,06	1,02	1,12	1,85	2,11	1,91
ZCP4_0798	acyl-CoA dehydrogenase domain protein	-1,24	-1,17	-1,01	1,05	1,45	1,36	1,18
ZCP4_0799	MgtC/SapB transporter	-1,31	-1,28	1,03	-1,30	1,05	2,08	1,86
ZCP4_0800	Homoserine dehydrogenase	1,00	1,01	1,05	-1,05	-1,32	-1,79	-2,13
ZCP4_0801	fructose-1 6-bisphosphatase class II	1,09	1,09	1,09	1,05	1,13	1,13	1,01
ZCP4_0802	hypothetical protein	1,35	1,30	1,05	-1,29	-1,10	-1,05	-1,60
ZCP4_0803	histidine kinase for ZMO0478	1,16	1,23	1,01	-1,05	-1,05	-1,56	-1,23
ZCP4_0804	Peptidoglycan-binding LysM	1,35	1,31	1,03	-1,03	1,17	1,14	1,46

5. Παράρτημα

ZCP4_0805	two-component response regulator affecting the cell wall	-1,02	-1,05	1,04	-1,07	1,24	3,58	4,01
ZCP4_0806	hypothetical protein	1,25	1,35	1,39	1,10	1,26	1,88	1,92
ZCP4_0807	riboflavin biosynthesis protein RibD	-1,05	-1,02	-1,02	-1,02	1,08	1,46	1,78
ZCP4_0808	riboflavin synthase subunit alpha	-1,16	-1,11	1,08	1,06	1,46	2,23	2,66
ZCP4_0809	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	-1,12	-1,09	1,00	1,06	1,43	2,13	2,27
ZCP4_0810	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	-1,09	-1,16	1,02	1,15	1,41	2,15	2,14
ZCP4_0811	rpsU-divergently transcribed protein	-1,27	-1,15	-1,03	-1,08	1,22	1,38	1,16
ZCP4_0812	transcriptional regulator, LysR family	1,09	-1,02	-1,07	-1,01	-1,26	-1,96	-1,84
ZCP4_0813	hypothetical protein	-1,16	-1,13	-1,00	-1,11	-1,27	-1,46	-1,35
ZCP4_0814	anthranilate synthase component I	1,00	1,00	-1,02	-1,06	-1,37	-1,77	-2,26
ZCP4_0815	PpiC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1,10	1,11	1,02	-1,07	-1,33	-2,05	-2,49
ZCP4_0816	Triose-phosphate isomerase	-1,03	1,02	1,10	1,04	1,20	1,08	-1,02
ZCP4_0817	preprotein translocase, SecG subunit	1,17	1,21	1,03	1,07	-1,16	-2,47	-3,01
ZCP4_0818	CTP synthetase	1,05	1,02	-1,04	-1,02	-1,42	-5,37	-8,50
ZCP4_0819	prolyl-tRNA synthetase	1,02	-1,03	-1,02	1,04	-1,14	-1,70	-2,05
ZCP4_0820	lipoprotein releasing system, transmembrane protein, LolC/E family	1,12	1,06	-1,04	-1,02	-1,06	-1,04	-1,08
ZCP4_0821	ABC transporter related protein	1,18	1,20	1,01	-1,10	-1,25	1,01	-1,23
ZCP4_0822	transcriptional regulator, AsnC family	1,20	1,35	1,09	1,14	1,07	-1,21	-1,58
ZCP4_0824	Formate--tetrahydrofolate ligase	-1,18	-1,28	-1,36	-1,19	-3,15	-9,37	-12,17
ZCP4_0825	GTP-binding protein EngA	1,12	1,15	1,03	-1,00	-1,29	-1,73	-1,93
ZCP4_0826	Pyrolo-quinoline quinone	1,05	1,09	1,02	-1,07	-1,12	-1,47	-1,71
ZCP4_0827	hypothetical protein	1,14	1,18	1,02	-1,07	-1,00	-1,36	-1,48
ZCP4_0829	cell wall hydrolase SleB	1,18	1,23	-1,03	-1,29	-2,54	-7,35	-15,94
ZCP4_0830	lipid synthesis related and affects the cell envelope	1,20	-1,09	-1,01	1,23	-1,01	-1,33	1,09
ZCP4_0831	lipid O-acetyltransferase affecting the cell envelope	1,05	1,04	-1,05	-1,04	-1,23	-1,71	-1,81
ZCP4_0832	lipolytic enzyme affecting the cell envelope	-1,04	-1,06	-1,10	-1,13	-1,33	-1,44	-1,51
ZCP4_0833	Lipolytic protein affecting the cell envelope	-1,00	1,05	1,01	-1,04	-1,10	-1,76	-2,05
ZCP4_0834	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	1,03	1,04	-1,04	-1,01	1,05	-1,14	1,34
ZCP4_0835	HAD-superfamily hydrolase, subfamily 1A, variant 3	1,10	1,09	-1,01	1,02	1,01	-1,12	1,05
ZCP4_0836	ATP12 ATPase	-1,00	-1,00	1,07	1,13	1,34	1,03	-1,02
ZCP4_0837	hypothetical protein	1,15	1,19	1,08	1,15	1,53	1,56	1,82
ZCP4_0838	pseudouridine synthase, RluA family	1,09	1,13	1,02	1,05	1,06	-1,40	-1,65
ZCP4_0840	hypothetical protein	1,17	1,04	1,43	-1,12	1,59	2,20	2,13
ZCP4_0841	hypothetical protein	-1,02	-1,10	1,05	-1,01	1,21	1,68	1,76
ZCP4_0842	17 kDa surface antigen	-1,27	-1,40	-1,44	-1,03	1,14	3,05	3,83
ZCP4_0843	guanylate kinase	1,25	1,14	1,01	1,01	-1,59	-4,21	-5,86
ZCP4_0844	Arginase/agmatinase/formiminoglutamase	1,02	1,11	1,12	1,04	-1,34	-1,70	-1,97
ZCP4_0845	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate N-succinyltransferase	-1,02	-1,02	1,00	-1,01	-1,10	-1,29	-1,23
ZCP4_0846	pyrimidine 5'-nucleotidase	-1,05	-1,07	1,04	-1,01	1,04	1,29	1,44
ZCP4_0847	iron-sulfur cluster assembly accessory protein	-1,15	-1,14	-1,08	-1,01	1,14	2,90	3,40
ZCP4_0848	FeS assembly SUF system protein	-1,22	-1,40	-1,10	-1,02	1,18	2,23	2,87
ZCP4_0849	cysteine desulfurase, SufS subfamily	-1,16	-1,23	-1,05	-1,07	-1,03	1,31	1,37

5. Παράρτημα

ZCP4_0850	SufBD protein	-1,30	-1,31	-1,07	-1,10	-1,09	1,24	1,17
ZCP4_0851	ABC transporter ATP-binding protein cysteine desulfurase activator complex subunit SufB	-1,26	-1,26	-1,04	-1,04	-1,03	1,21	1,15
ZCP4_0852	transcriptional regulator, BadM/Rrf2 family	-1,37	-1,35	-1,06	-1,06	1,01	1,21	1,25
ZCP4_0853	histidinol-phosphate aminotransferase	-1,34	-1,40	-1,08	-1,06	1,09	1,33	1,61
ZCP4_0854	Arogenate dehydrogenase	1,05	1,03	1,01	1,02	-1,25	-1,47	-1,53
ZCP4_0855	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	1,27	1,21	1,04	1,03	-1,19	-1,47	-1,48
ZCP4_0856	hypothetical protein	-1,06	-1,08	-1,05	-1,16	-1,08	-1,34	-1,44
ZCP4_0857	hypothetical protein	1,15	1,13	1,14	1,01	1,10	2,03	2,18
ZCP4_0858	hypothetical protein	-1,00	-1,02	1,08	-1,02	1,25	1,79	2,10
ZCP4_0859	cell division ATP-binding protein FtsE	1,20	1,13	1,10	-1,07	1,08	1,24	1,40
ZCP4_0860	MJ0042 family finger-like protein	1,00	1,04	1,06	1,04	-1,18	-1,50	-1,53
ZCP4_0861	hypothetical protein	1,02	-1,04	1,06	-1,02	-1,24	-1,31	-1,26
ZCP4_0862	multiple antibiotic resistance (MarC)-related protein	1,51	1,46	1,18	1,07	1,21	-1,32	-1,20
ZCP4_0863	DNA topoisomerase IV subunit B	1,19	1,14	1,07	1,07	-1,07	-1,27	-1,11
ZCP4_0864	Hsp33 protein	-1,01	1,05	1,09	1,08	1,03	-2,53	-3,65
ZCP4_0865	ornithine carbamoyltransferase	1,11	1,06	-1,01	1,01	1,07	-1,41	-2,58
ZCP4_0866	acetylornithine transaminase protein	1,00	-1,04	-1,05	1,08	-1,01	-1,75	-2,47
ZCP4_0867	GcrA cell cycle regulator	1,07	1,05	1,02	1,13	1,19	1,26	1,34
ZCP4_0868	ABC-2 type transporter	-1,01	-1,04	-1,03	-1,01	-1,07	-1,02	1,05
ZCP4_0869	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	-1,34	-1,25	1,11	1,35	4,94	15,85	18,15
ZCP4_0871	Ppx/GppA phosphatase	1,01	-1,08	-1,16	1,10	1,34	1,92	2,12
ZCP4_0872	ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FtsJ	1,03	-1,11	-1,19	1,06	-1,08	-1,01	-1,18
ZCP4_0873	diguanylate cyclase/phosphodiesterase	1,20	1,19	1,06	-1,07	1,23	1,74	2,38
ZCP4_0874	hypothetical protein	1,01	1,05	-1,09	1,02	1,16	2,00	2,35
ZCP4_0875	hypothetical protein	-1,02	1,12	1,25	1,34	1,46	2,60	2,30
ZCP4_0876	hypothetical protein	-1,19	-1,18	1,12	-1,02	1,66	2,72	2,85
ZCP4_0877	hypothetical protein	-1,18	1,09	1,05	-1,72	1,51	3,41	4,03
ZCP4_0878	hypothetical protein	-1,23	-1,03	1,11	1,15	1,49	2,44	2,17
ZCP4_0879	hypothetical protein	1,12	-1,01	1,05	1,18	-1,03	-1,03	1,14
ZCP4_0880	hypothetical protein	1,03	1,02	1,09	1,46	1,29	1,69	1,48
ZCP4_0881	hypothetical protein	1,02	1,38	-1,20	1,38	1,79	3,40	4,56
ZCP4_0882	hypothetical protein	1,42	1,73	-1,12	1,13	1,79	2,60	4,61
ZCP4_0883	hypothetical protein	-1,08	-1,05	-1,07	-1,03	1,49	2,81	3,27
ZCP4_0884	constituent protein	-1,05	-1,07	1,02	1,08	1,95	4,06	4,66
ZCP4_0885	hypothetical protein	-1,36	-1,15	-1,17	1,06	-1,14	2,27	3,39
ZCP4_0886	putative phage major head protein	1,30	1,40	1,20	1,30	2,17	3,99	4,15
ZCP4_0889	hypothetical protein	1,02	1,21	1,19	1,55	1,76	3,93	2,89
ZCP4_0890	hypothetical protein	-1,02	-1,07	1,15	1,73	1,69	2,59	1,97
ZCP4_0891	hypothetical protein	-1,00	1,05	1,05	1,08	1,52	2,41	2,85
ZCP4_0892	phage terminase, large subunit, PBSX family	1,15	1,31	1,16	1,35	1,96	3,66	4,18
ZCP4_0893	hypothetical protein	1,34	1,32	1,14	1,01	1,24	1,98	1,67
ZCP4_0894	HhH-GPD family protein	1,17	1,16	1,18	1,23	-1,11	-1,06	1,05
ZCP4_0895	ATP-dependent protease La	-1,07	-1,08	1,03	1,06	1,43	3,79	4,24

5. Παράρτημα

ZCP4_0897	Levansucrase	-1,06	1,04	1,04	-1,03	1,50	4,31	4,14
ZCP4_0898	Levansucrase	-1,08	1,07	1,04	1,21	1,46	3,93	4,53
ZCP4_0900	hypothetical protein	-1,75	-2,04	-1,56	-1,71	-1,26	-1,88	-3,25
ZCP4_0901	transcriptional regulator, AsnC family	1,10	1,15	1,05	-1,43	-1,23	-1,13	-1,20
ZCP4_0902	aspartate racemase	-1,14	-1,06	1,14	1,02	1,15	-1,01	-2,22
ZCP4_0903	glucokinase	-1,01	1,03	1,01	-1,04	1,31	1,67	1,54
ZCP4_0904	phosphogluconate dehydratase	-1,04	1,10	1,04	-1,01	1,12	1,27	1,25
ZCP4_0905	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	-1,11	1,00	-1,00	-1,03	1,10	-1,03	-1,19
ZCP4_0906	sugar transporter	1,01	1,10	1,05	1,06	1,07	1,09	1,19
ZCP4_0907	DNA ligase, NAD-dependent	-1,00	1,01	1,05	1,07	-1,05	1,67	2,04
ZCP4_0908	queuine tRNA-ribosyltransferase	-1,01	1,07	1,04	-1,07	-1,24	-1,23	1,03
ZCP4_0909	excinuclease ABC subunit B	-1,31	-1,34	1,01	1,03	1,96	8,69	10,48
ZCP4_0910	hypothetical protein	-1,20	-1,26	-1,26	-1,29	-2,61	-4,35	-4,60
ZCP4_0911	rod shape-determining protein RodA	1,09	1,17	1,04	-1,05	-1,20	1,33	1,96
ZCP4_0912	penicillin-binding protein 2	1,02	-1,04	1,03	-1,03	-1,01	2,00	3,08
ZCP4_0913	hypothetical protein	1,18	1,05	1,01	1,03	-1,04	-1,01	1,27
ZCP4_0914	rod shape-determining protein MreC	1,27	1,21	-1,11	-1,12	-1,34	-1,95	-2,38
ZCP4_0915	rod shape-determining protein MreB	1,04	-1,01	-1,08	-1,12	-1,51	-2,49	-2,59
ZCP4_0916	DNA mismatch repair protein	1,11	1,00	-1,05	1,11	1,09	1,17	1,12
ZCP4_0917	4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase	-1,24	-1,32	1,02	1,02	1,30	3,30	4,92
ZCP4_0918	hypothetical protein	-1,05	-1,03	1,07	1,04	1,24	2,68	2,83
ZCP4_0919	putative DNA helicase	1,24	1,23	1,08	1,02	-1,10	-1,43	-1,29
ZCP4_0920	Putative ParB-like nuclease	1,05	1,06	1,08	-1,01	1,14	1,46	1,63
ZCP4_0921	hypothetical protein	1,24	1,31	1,06	1,03	-1,17	1,06	1,23
ZCP4_0922	GTP-binding protein HflX	1,12	1,20	1,12	1,02	1,13	1,95	2,73
ZCP4_0923	RNA-binding protein Hfq	-1,11	-1,03	1,06	1,01	1,26	2,54	4,79
ZCP4_0924	ammonium transporter	-1,44	-1,44	-1,12	-1,02	-1,59	-1,73	-1,61
ZCP4_0925	Endonuclease/exonuclease/phosphatase	1,03	1,05	1,04	1,07	1,25	1,33	1,44
ZCP4_0926	microcin-processing peptidase 2	1,11	1,05	-1,05	-1,01	1,02	1,16	1,21
ZCP4_0927	aminotransferase class IV	1,08	1,12	1,03	-1,14	-1,04	1,33	1,67
ZCP4_0928	aminotransferase class I and II	-1,13	-1,18	-1,09	1,13	-1,02	-2,06	-2,60
ZCP4_0929	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,04	-1,09	-1,00	1,03	1,28	1,43	1,33
ZCP4_0930	Phosphomannomutase	-1,27	-1,26	1,03	1,03	1,38	2,68	3,35
ZCP4_0931	heat shock protein DnaJ domain protein	1,04	1,01	-1,00	1,02	-1,18	-1,14	-1,00
ZCP4_0932	ATPase MipZ	-1,12	-1,02	1,13	1,09	1,01	-1,15	-1,00
ZCP4_0933	thiamine-phosphate pyrophosphorylase	-1,02	-1,02	1,05	1,05	1,02	-1,00	1,02
ZCP4_0934	Peptidase related to the outer membrane	1,28	1,32	-1,00	-1,20	-1,89	-3,01	-3,58
ZCP4_0935	Inositol-phosphate phosphatase	1,15	1,11	-1,02	1,04	-1,35	-3,26	-4,76
ZCP4_0936	elongation factor P	1,08	1,06	1,05	1,02	-1,28	-3,58	-4,64
ZCP4_0937	cystathionine beta-lyase	-1,03	-1,02	1,04	-1,01	1,03	1,43	1,78
ZCP4_0938	7-cyano-7-deazaguanine reductase	-1,13	-1,11	-1,02	1,04	-1,23	1,23	1,50
ZCP4_0939	hypothetical protein	1,24	1,17	1,00	1,19	-1,21	-1,62	-1,52
ZCP4_0940	lipoprotein signal peptidase	1,14	1,11	-1,02	-1,05	-1,07	-1,11	1,05
ZCP4_0941	isoleucine--tRNA ligase	1,03	1,03	-1,03	-1,04	-1,46	-2,54	-2,94

5. Παράρτημα

ZCP4_0942	riboflavin biosynthesis protein RibF	1,12	1,20	1,07	-1,04	1,12	1,08	1,11
ZCP4_0943	dihydrofolate reductase region	1,13	1,07	1,15	-1,18	-1,56	-2,30	-2,32
ZCP4_0945	WGR domain protein	-1,43	-1,22	1,01	-1,12	-2,15	1,08	-1,36
ZCP4_0946	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,54	-1,30	1,02	-1,06	1,89	5,42	6,08
ZCP4_0947	hypothetical protein	-1,33	-1,28	-1,06	-1,45	1,22	1,39	1,91
ZCP4_0948	phospholipase D/Transphosphatidylase	-1,00	-1,07	1,04	1,01	1,26	2,08	2,15
ZCP4_0949	hypothetical protein	-1,07	-1,10	1,09	1,01	1,85	2,44	2,45
ZCP4_0950	amidohydrolase	-1,07	-1,07	1,09	1,10	2,21	3,40	3,50
ZCP4_0951	pyrroline-5-carboxylate reductase	-1,15	-1,14	-1,21	1,06	1,39	1,58	1,55
ZCP4_0952	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,97	-2,05	-1,14	1,11	3,03	9,05	10,60
ZCP4_0953	Capsule polysaccharide biosynthesis protein	1,21	1,17	-1,07	-1,12	1,12	2,44	2,57
ZCP4_0954	glycosyl transferase group 1	1,03	1,03	1,02	1,07	1,01	1,49	1,59
ZCP4_0955	Stress responsive alpha-beta barrel domain protein	-1,02	-1,03	1,06	1,00	-1,10	-1,21	-1,26
ZCP4_0956	ferrochelataase	1,25	1,25	1,01	1,07	-1,06	-1,26	-1,09
ZCP4_0958	PepSY-associated TM helix domain protein	-1,12	-1,11	-1,04	-1,06	-1,34	-1,31	-1,30
ZCP4_0959	exodeoxyribonuclease VII, large subunit	1,08	1,08	1,05	1,04	-1,04	-1,19	-1,26
ZCP4_0960	phosphoribosylamine/glycine ligase	-1,07	-1,11	-1,06	1,17	-1,17	-2,70	-3,64
ZCP4_0961	hypothetical protein	1,03	-1,08	-1,05	1,27	1,51	4,24	5,05
ZCP4_0962	hypothetical protein	1,38	1,30	-1,01	-1,16	-1,26	-1,43	-1,51
ZCP4_0963	CMP/dCMP deaminase zinc-binding protein	1,07	1,10	1,02	-1,11	-1,02	1,59	1,62
ZCP4_0964	ribosomal protein L28	1,27	1,07	1,14	1,23	-1,47	-3,19	-3,17
ZCP4_0965	sugar transporter	-1,10	-1,08	-1,01	1,01	1,57	4,89	8,07
ZCP4_0966	prolipoprotein diacylglycerol transferase	-1,02	-1,13	-1,01	1,02	-1,64	-3,30	-2,59
ZCP4_0967	hypothetical protein	-1,41	-1,36	1,22	1,16	3,27	18,42	27,39
ZCP4_0968	efflux transporter, RND family, MFP subunit	1,05	1,09	1,11	1,14	1,13	-1,08	-1,03
ZCP4_0969	hypothetical protein	-1,66	-1,55	-1,03	1,05	1,88	7,94	8,93
ZCP4_0970	outer membrane efflux protein with ZMO0282:ZMO0283	1,05	1,00	-1,03	1,01	-1,25	-1,23	-1,50
ZCP4_0971	RND multidrug efflux transport with ZMO0282:ZMO0285	1,05	1,08	1,08	-1,05	-1,00	1,19	1,28
ZCP4_0972	MFP subunit of efflux transporter, with ZMO0283:ZMO0285	1,02	1,04	1,12	1,12	1,06	-1,01	1,07
ZCP4_0973	repressor of efflux system ZMO0282:ZMO0285	-1,09	-1,04	1,04	1,04	1,01	-1,27	-1,36
ZCP4_0974	cold-shock DNA-binding domain protein	1,02	-1,09	-1,22	-1,06	-1,70	-1,47	-1,23
ZCP4_0975	3'-5' exonuclease	1,29	1,32	-1,06	-1,24	-2,14	-5,43	-6,77
ZCP4_0976	hypothetical protein	1,32	1,29	-1,11	-1,17	-1,49	-1,99	-1,98
ZCP4_0977	OstA family protein	1,29	1,21	-1,00	-1,05	-1,23	-1,33	-1,21
ZCP4_0978	ABC transporter related protein	1,14	1,15	1,05	-1,01	-1,04	1,41	1,56
ZCP4_0979	RNA polymerase factor sigma-54	-1,04	-1,05	-1,01	-1,08	1,02	1,83	1,80
ZCP4_0980	S-adenosylmethionine synthetase	-1,02	1,06	1,04	-1,04	-1,77	-4,68	-5,92
ZCP4_0981	apolipoprotein N-acyltransferase	1,23	1,18	-1,07	-1,03	-1,13	-1,10	1,14
ZCP4_0982	hypothetical protein	1,01	1,07	1,25	1,12	-1,23	-1,28	1,04
ZCP4_0983	hypothetical protein	-1,17	-1,19	-1,01	1,03	-1,09	-1,19	-1,07
ZCP4_0984	hypothetical protein	-1,14	1,04	-1,19	-1,25	-1,17	1,23	1,28
ZCP4_0985	hypothetical protein	1,05	1,02	1,06	-1,33	-1,18	1,39	1,92

5. Παράρτημα

ZCP4_0986	hypothetical protein	-1,09	1,15	1,03	-1,22	-1,33	-1,42	-1,02
ZCP4_0987	hypothetical protein	1,15	1,13	1,03	-1,22	-1,19	1,06	1,42
ZCP4_0989	hypothetical protein	1,10	1,18	1,05	-1,05	-1,24	-1,45	-1,40
ZCP4_0990	hypothetical protein	1,08	1,10	-1,00	-1,30	-1,20	-1,56	-1,07
ZCP4_0991	cytochrome c-type biogenesis protein CcmB	1,28	1,26	1,10	-1,14	1,02	1,55	2,65
ZCP4_0992	heme exporter protein CcmA	1,16	1,19	1,04	-1,24	-1,51	-1,80	-1,95
ZCP4_0993	histidine kinase	-1,00	-1,04	-1,03	-1,16	-1,07	-1,03	-1,00
ZCP4_0994	two component transcriptional regulator, winged helix family	-1,19	-1,18	-1,06	-1,11	1,00	1,14	1,26
ZCP4_0995	D-lactate dehydrogenase	-1,14	-1,07	-1,03	-1,13	-1,23	-1,43	-1,38
ZCP4_0996	type I secretion membrane fusion protein, HlyD family	-1,07	1,04	1,11	1,12	1,53	2,31	3,00
ZCP4_0997	type I secretion system ATPase	-1,12	-1,08	-1,03	1,06	1,21	2,03	2,70
ZCP4_0998	type I secretion outer membrane protein, TolC family	1,24	1,18	1,14	1,00	1,06	1,10	1,07
ZCP4_0999	major intrinsic protein	1,19	1,21	1,11	-1,01	1,01	1,08	1,22
ZCP4_1000	Endoribonuclease L-PSP	1,03	1,02	-1,03	-1,20	-1,60	-2,11	-2,24
ZCP4_1001	response regulator receiver protein	1,00	-1,00	1,05	-1,08	-1,41	-1,54	-1,87
ZCP4_1002	50S ribosomal protein L33	1,20	1,14	1,08	1,06	-1,50	-5,10	-8,24
ZCP4_1003	ATP-dependent protease ATP-binding subunit HslU	-1,28	-1,26	-1,00	1,10	1,68	3,33	4,15
ZCP4_1004	ATP-dependent protease peptidase subunit	-1,27	-1,38	1,01	1,08	1,53	2,77	3,47
ZCP4_1005	histone family protein DNA-binding protein	-1,11	1,01	1,01	1,00	-1,32	-3,18	-6,20
ZCP4_1006	hypothetical protein	1,00	1,11	-1,02	-1,05	-1,29	-1,81	-1,90
ZCP4_1007	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	1,10	1,17	-1,02	1,02	1,27	-1,26	-2,15
ZCP4_1008	F0F1 ATP synthase subunit beta	-1,08	-1,03	1,03	1,12	1,49	1,27	-1,20
ZCP4_1009	F0F1 ATP synthase subunit gamma	-1,09	-1,10	-1,03	-1,01	1,14	-1,14	-1,72
ZCP4_1010	F0F1 ATP synthase subunit alpha	-1,07	-1,04	1,03	1,04	1,23	-1,09	-1,38
ZCP4_1011	ATP synthase F1, delta subunit	-1,09	-1,10	-1,01	1,07	1,25	-1,27	-1,30
ZCP4_1012	chromosome partitioning ATPase	-1,01	1,00	1,09	-1,02	1,09	1,66	2,12
ZCP4_1013	protease Do	-1,11	-1,14	-1,12	-1,07	-1,14	1,24	1,79
ZCP4_1014	hypothetical protein	-1,15	-1,05	-1,13	-1,57	-1,52	1,07	1,16
ZCP4_1016	RNA methyltransferase, TrmH family, group 3	-1,20	-1,35	-1,24	1,07	-1,06	-1,04	1,07
ZCP4_1017	hypothetical protein	-1,38	-1,20	1,08	1,02	3,43	15,55	19,44
ZCP4_1018	ABC transporter related protein	1,36	1,27	-1,03	-1,05	-1,25	-1,08	-1,06
ZCP4_1019	transport system permease protein	1,19	1,01	-1,09	-1,27	-1,40	-1,11	1,34
ZCP4_1020	polysaccharide biosynthesis protein	1,16	1,09	-1,01	-1,05	-1,41	-1,71	-1,68
ZCP4_1021	DNA polymerase I	1,24	1,23	1,04	-1,02	-1,37	-2,20	-2,14
ZCP4_1022	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,08	1,13	1,05	1,01	1,19	1,19	1,25
ZCP4_1023	homoserine O-acetyltransferase	1,17	1,11	-1,10	-1,12	-1,09	2,28	2,82
ZCP4_1024	methionine biosynthesis protein MetW	1,12	-1,01	-1,00	1,13	1,35	5,02	6,88
ZCP4_1025	hypothetical protein	1,09	1,13	-1,08	-1,18	-1,22	1,11	1,21
ZCP4_1026	hypothetical protein	-1,03	-1,10	1,01	-1,24	-1,07	-2,08	-2,32
ZCP4_1028	transcriptional regulator, CarD family	1,32	1,36	1,24	1,06	1,12	-1,44	-1,29
ZCP4_1029	4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain protein	1,12	1,12	1,20	1,09	-1,68	-3,90	-5,47
ZCP4_1030	helicase domain protein	1,11	1,09	1,02	-1,02	1,26	2,34	2,72

5. Παράρτημα

ZCP4_1031	Peptidase M23	1,22	1,13	1,01	1,05	-1,27	-1,88	-2,33
ZCP4_1032	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	-1,88	-1,49	1,14	-1,05	2,43	10,00	13,73
ZCP4_1033	MATE efflux family protein	1,08	1,11	1,13	1,11	1,22	1,62	1,87
ZCP4_1034	outer membrane autotransporter barrel domain protein	1,14	1,15	1,01	-1,25	-1,02	1,33	1,36
ZCP4_1035	50S ribosomal protein L21	1,21	-1,06	-1,31	1,22	-1,65	-5,13	-6,67
ZCP4_1036	50S ribosomal protein L27	1,16	1,03	-1,33	-1,05	-1,65	-2,18	-2,15
ZCP4_1037	GCN5-related N-acetyltransferase	-1,08	-1,26	-1,12	1,08	1,52	1,78	1,93
ZCP4_1038	GTPase ObgE	1,07	-1,04	-1,11	-1,02	-1,10	-1,18	-1,21
ZCP4_1039	gamma-glutamyl kinase	-1,17	-1,19	-1,11	-1,05	-1,05	1,19	1,28
ZCP4_1040	NAD-dependent epimerase/dehydratase	1,02	-1,06	-1,10	-1,02	-1,30	-1,13	-1,18
ZCP4_1041	cation efflux protein	1,14	1,28	1,22	1,24	1,38	2,43	3,39
ZCP4_1042	transcriptional regulator, MerR family	-1,04	-1,20	1,18	1,33	2,12	8,47	9,49
ZCP4_1043	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	1,13	1,15	1,03	-1,08	-1,41	-2,36	-2,73
ZCP4_1044	glutamine amidotransferase of anthranilate synthase	1,02	1,03	1,02	-1,10	-1,29	-1,27	-1,17
ZCP4_1045	anthranilate phosphoribosyltransferase	1,00	-1,01	-1,01	-1,16	-1,24	-1,30	-1,58
ZCP4_1046	LexA repressor	1,46	1,85	2,09	3,49	3,88	4,11	4,01
ZCP4_1047	peptide chain release factor 2	1,20	1,14	1,04	1,09	-1,06	-1,82	-1,72
ZCP4_1048	penicillin-binding protein, 1A family	1,12	1,13	1,02	-1,08	1,04	1,70	2,29
ZCP4_1050	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	1,18	1,13	1,12	1,07	1,61	2,58	2,88
ZCP4_1052	hypothetical protein	1,01	1,04	-1,02	1,00	-1,03	-1,20	-1,04
ZCP4_1053	ribonuclease, Rne/Rng family	1,01	-1,08	-1,07	1,03	-1,52	-3,28	-3,61
ZCP4_1054	peptidase M48 Ste24p	-1,02	-1,05	1,10	1,13	1,71	3,39	3,62
ZCP4_1055	DSBA oxidoreductase	-1,00	1,01	1,10	1,10	1,39	2,27	2,31
ZCP4_1056	transcriptional regulator, RpiR family	1,74	1,85	1,33	1,17	1,34	-1,02	-1,21
ZCP4_1057	L-serine dehydratase 1	-1,23	-1,30	-1,24	-1,10	-2,07	-2,56	-2,39
ZCP4_1058	TonB-dependent siderophore receptor	1,06	1,11	1,27	1,27	2,14	2,42	3,02
ZCP4_1060	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	1,11	1,16	1,07	1,12	-1,08	-1,77	-1,78
ZCP4_1061	cysteinyI-tRNA synthetase	1,23	1,16	1,07	1,10	-1,03	-1,32	-1,14
ZCP4_1062	hypothetical protein	1,00	1,00	1,00	1,00	-1,54	-4,50	-5,84
ZCP4_1063	putative ABC transporter ATP-binding protein	1,11	1,07	1,11	1,13	-1,05	-2,33	-2,47
ZCP4_1064	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	1,11	1,18	1,23	1,13	1,05	-1,67	-1,61
ZCP4_1065	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	-1,12	-1,21	-1,08	1,14	1,67	2,80	2,13
ZCP4_1066	fructose-bisphosphate aldolase	-1,06	-1,07	1,09	1,06	1,78	4,90	7,58
ZCP4_1067	phosphoglycerate kinase	-1,10	-1,09	1,02	1,03	1,19	-1,48	-2,83
ZCP4_1068	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-1,03	-1,05	-1,03	1,00	-1,08	-1,71	-2,09
ZCP4_1069	transketolase	1,05	1,02	1,02	1,02	-1,13	-2,02	-1,94
ZCP4_1070	hypothetical protein	1,26	1,36	1,32	1,12	-1,02	-1,40	-1,90
ZCP4_1071	SnoaL	-1,64	-1,43	1,21	-1,11	2,29	6,68	9,08
ZCP4_1072	hypothetical protein	-1,20	-1,29	-1,01	1,01	1,48	2,72	3,52
ZCP4_1074	thiamine biosynthesis protein ThiC	1,02	-1,05	-1,14	-1,01	-1,06	-1,45	-1,42
ZCP4_1075	outer membrane receptor protein	-1,11	-1,07	1,17	1,25	1,30	1,66	2,52
ZCP4_1076	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	-1,42	-1,47	-1,01	1,11	1,41	1,83	2,25
ZCP4_1077	peptidoglycan-associated lipoprotein	-1,12	-1,19	-1,07	1,05	1,70	2,56	2,62

5. Παράρτημα

ZCP4_1078	protein TolB	-1,09	-1,12	-1,11	-1,04	-1,09	-1,17	-1,08
ZCP4_1079	hypothetical protein	-1,07	-1,08	-1,12	-1,19	-1,47	-2,43	-2,40
ZCP4_1080	protein TolR	-1,17	-1,21	-1,11	-1,07	-1,23	-1,41	-1,49
ZCP4_1081	MotA/TolQ/ExbB proton channel	-1,16	-1,15	-1,03	-1,06	-1,11	-1,11	1,02
ZCP4_1082	thioesterase superfamily protein	-1,21	-1,28	-1,05	-1,17	-1,10	-1,20	1,08
ZCP4_1083	Holliday junction DNA helicase RuvB	-1,13	-1,21	-1,02	1,04	1,31	1,41	1,50
ZCP4_1084	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding protein	-1,29	-1,43	-1,18	1,14	1,66	1,82	1,38
ZCP4_1085	hypothetical protein	-1,08	-1,10	-1,04	-1,08	-1,64	-3,74	-5,34
ZCP4_1086	Holliday junction DNA helicase RuvA	1,48	1,61	1,04	-1,30	-1,34	-4,05	-3,43
ZCP4_1087	Holliday junction resolvase	1,49	1,51	1,15	1,01	-1,34	-2,74	-2,94
ZCP4_1088	hypothetical protein	1,11	1,09	1,05	-1,04	-1,55	-4,75	-6,16
ZCP4_1089	hypothetical protein	1,12	1,08	1,00	-1,28	-2,88	-5,93	-7,61
ZCP4_1090	pyruvate kinase	-1,05	-1,04	1,00	1,00	1,01	-1,57	-2,03
ZCP4_1091	GCN5-related N-acetyltransferase	-1,13	-1,16	-1,34	-1,12	-1,62	-3,99	-7,67
ZCP4_1092	tRNA (guanine-N(7)-methyltransferase	1,00	-1,06	-1,09	-1,07	-1,86	-4,68	-5,19
ZCP4_1093	hypothetical protein	1,03	-1,04	-1,05	-1,00	-1,18	-1,49	-1,66
ZCP4_1094	peptidase M28	1,23	1,25	1,10	1,03	1,01	1,08	-1,04
ZCP4_1095	L-aspartate oxidase	-1,11	-1,12	-1,00	-1,06	-1,01	1,06	1,03
ZCP4_1096	ABC transporter related protein	-1,02	-1,05	-1,09	-1,14	-1,07	-1,16	-1,33
ZCP4_1097	alanine racemase domain protein	-1,07	-1,10	-1,08	-1,15	-1,22	-1,54	-2,00
ZCP4_1098	protein tyrosine phosphatase	-1,08	-1,21	-1,07	1,08	1,08	-1,07	-1,13
ZCP4_1099	aminoglycoside phosphotransferase	-1,08	-1,18	-1,23	-1,05	-1,16	-1,02	-1,23
ZCP4_1100	hypothetical protein	1,07	1,06	-1,05	-1,20	-1,21	-1,29	-1,04
ZCP4_1103	Sell domain protein repeat-containing protein	1,25	1,29	1,18	1,24	-1,02	-1,44	-1,29
ZCP4_1104	Sell domain protein repeat-containing protein	1,30	1,20	1,46	1,11	1,07	-1,14	-1,08
ZCP4_1105	Outer-membrane-associated acid tolerance proteins	-1,29	-1,37	-1,01	1,17	3,05	11,06	15,16
ZCP4_1106	hypothetical protein	1,46	1,55	1,04	-1,14	-1,67	-1,96	-1,69
ZCP4_1107	hypothetical protein	1,49	1,47	1,47	1,12	-1,82	-3,64	-3,40
ZCP4_1108	Outer membrane-associated acid tolerance protein	1,05	1,02	-1,16	1,13	-1,12	-1,52	-1,68
ZCP4_1109	metallophosphoesterase	-1,10	-1,07	1,08	-1,01	-1,11	1,21	1,66
ZCP4_1110	Acid phosphatase	-1,10	-1,05	-1,02	-1,13	-1,63	-1,15	1,23
ZCP4_1111	TonB-dependent receptor	1,25	1,17	1,26	1,07	-1,34	-1,68	-1,41
ZCP4_1112	S1/P1 nuclease	-1,01	-1,02	1,02	1,03	1,43	2,04	2,67
ZCP4_1114	ybaK/epsC protein	-1,03	-1,14	-1,11	1,05	-1,02	1,29	1,87
ZCP4_1115	ATPase-like protein	1,01	-1,05	-1,20	-1,06	-1,09	1,39	1,68
ZCP4_1116	hypothetical protein	-1,54	-1,26	1,04	1,13	4,16	8,07	6,37
ZCP4_1117	recombination factor protein RarA	1,30	1,12	1,04	1,02	1,13	1,18	1,20
ZCP4_1118	short chain dehydrogenase	1,01	1,01	1,13	1,11	1,98	2,22	1,56
ZCP4_1119	LysR family transcriptional regulator	-1,05	-1,08	1,20	1,07	1,31	1,64	1,66
ZCP4_1120	dihydroorotate dehydrogenase	1,10	1,10	1,19	1,16	1,29	1,07	1,09
ZCP4_1121	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaA	1,03	1,01	1,17	1,04	1,95	7,30	10,38
ZCP4_1122	hydroxylamine reductase	-1,06	-1,03	1,04	1,20	3,31	11,59	36,51
ZCP4_1123	transcriptional regulator responding to oxidative stress	1,06	1,05	1,08	1,16	3,21	19,14	37,90

5. Παράρτημα

ZCP4_1124	aminotransferase class IV	-1,02	-1,02	1,03	-1,03	1,06	1,16	1,07
ZCP4_1125	glutamine amidotransferase of anthranilate synthase	-1,43	-1,38	-1,13	-1,06	1,04	1,13	1,13
ZCP4_1126	para-aminobenzoate synthase, subunit I	-1,37	-1,38	-1,05	-1,02	1,14	1,13	1,14
ZCP4_1127	putative substrate of glutamine cyclotransferase	-1,02	-1,04	-1,10	-1,12	1,07	1,85	2,56
ZCP4_1128	ABC transporter related protein	1,17	1,12	-1,04	1,05	-1,09	-1,60	-1,52
ZCP4_1129	hypothetical protein	1,03	1,06	1,09	1,01	1,05	1,08	1,50
ZCP4_1130	hypothetical protein	-1,11	-1,03	-1,27	-2,11	-1,21	-1,27	-1,18
ZCP4_1131	small multidrug resistance protein	-1,06	-1,28	-1,06	-1,13	1,01	-1,00	-1,05
ZCP4_1132	NDP-sugar transferase related to glycolipid synthesis	1,12	-1,01	-1,02	1,12	1,14	-1,15	-1,17
ZCP4_1133	isopropylmalate isomerase small subunit	-1,08	-1,08	-1,08	-1,11	-1,37	-1,32	-1,17
ZCP4_1134	isopropylmalate isomerase large subunit	-1,07	-1,15	-1,12	-1,03	-1,54	-1,67	-1,36
ZCP4_1135	beta-lactamase	-1,07	-1,08	-1,00	1,03	-1,03	-1,08	-1,21
ZCP4_1136	NAD-dependent epimerase/dehydratase	-1,21	-1,27	1,00	1,19	1,82	1,60	1,43
ZCP4_1137	transcriptional activator of ZMO0101	-1,14	-1,16	-1,23	1,03	-1,85	-2,58	-3,03
ZCP4_1138	major facilitator superfamily MFS_1	1,10	1,07	-1,04	-1,12	-1,23	-2,41	-2,65
ZCP4_1139	CDP-diacylglycerol/glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	1,04	-1,01	1,04	1,15	1,76	2,87	3,71
ZCP4_1140	hypothetical protein	-1,81	-2,51	-1,63	-1,16	-1,52	-1,11	1,11
ZCP4_1141	biotin synthase	1,09	-1,00	-1,06	1,10	1,06	-1,57	-1,54
ZCP4_1142	hypothetical protein	1,09	1,08	-1,04	-1,00	1,03	-1,00	1,07
ZCP4_1143	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,40	-1,38	1,03	1,21	2,12	2,86	2,60
ZCP4_1145	hypothetical protein	1,02	1,00	1,02	-1,01	1,02	1,55	1,49
ZCP4_1146	(p)ppGpp synthetase I, SpoT/RelA	1,00	1,02	1,04	-1,09	1,06	1,49	1,45
ZCP4_1147	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	1,01	1,10	-1,00	-1,03	1,03	1,23	1,51
ZCP4_1148	CheX protein	1,09	1,13	-1,09	-1,06	-1,23	-1,17	1,01
ZCP4_1149	CheA signal transduction histidine kinase	-1,02	-1,03	-1,09	-1,05	-1,08	1,25	1,12
ZCP4_1150	MCP methyltransferase, CheR-type	1,18	1,17	-1,01	-1,07	-1,43	-1,46	-2,08
ZCP4_1151	chemotaxis-specific methylesterase	1,08	1,11	-1,01	-1,09	-1,23	-1,60	-2,00
ZCP4_1152	CheD	1,04	1,00	-1,08	-1,14	-1,34	-1,51	-1,71
ZCP4_1153	response regulator receiver protein	-1,08	-1,03	1,08	1,05	1,20	1,15	1,34
ZCP4_1154	CheW protein	1,03	1,01	1,03	1,09	1,63	2,52	2,85
ZCP4_1155	(dimethylallyl)adenosine tRNA methylthiotransferase	1,05	1,02	-1,01	1,01	-1,05	-1,19	-1,33
ZCP4_1156	PhoH family protein	1,01	-1,07	-1,13	1,05	1,17	1,55	1,66
ZCP4_1157	hypothetical protein	1,02	1,01	-1,04	1,07	-1,03	1,12	-1,08
ZCP4_1158	CBS domain containing protein	-1,06	-1,15	-1,24	-1,14	-1,30	-1,01	1,12
ZCP4_1159	NHL repeat-containing protein	-1,09	-1,13	-1,11	-1,06	1,27	3,46	4,36
ZCP4_1160	glutaredoxin 2	-1,41	-1,39	1,05	1,06	1,61	1,91	1,92
ZCP4_1161	major tail tube protein	-1,30	-1,19	-1,18	-1,13	-1,07	1,16	-1,04
ZCP4_1162	Sell domain protein repeat-containing protein	-1,02	-1,02	1,11	1,00	1,68	2,07	1,76
ZCP4_1163	Carbohydrate-selective porin OprB	1,02	1,09	1,03	-1,30	-1,49	-1,33	1,01
ZCP4_1164	aldo/keto reductase	-1,08	-1,13	-1,02	1,04	1,23	1,93	1,94
ZCP4_1165	histidine acid phosphatase	-1,02	-1,08	-1,03	1,06	1,00	1,29	1,24
ZCP4_1166	hypothetical protein	-1,08	-1,06	-1,07	-1,21	-1,28	-1,77	-1,65
ZCP4_1167	Glycerate kinase	-1,04	-1,05	-1,07	-1,21	-1,31	-1,14	-1,30

5. Παράρτημα

ZCP4_1168	phage protein	-1,30	-1,37	1,02	-1,09	1,12	2,13	2,33
ZCP4_1169	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	-1,14	-1,20	-1,00	1,04	1,45	2,49	3,12
ZCP4_1171	transcriptional regulator, MarR family	1,14	1,13	1,09	-1,16	1,17	1,11	-1,03
ZCP4_1172	alpha/beta hydrolase fold protein	-1,18	-1,35	-1,18	1,02	1,06	-1,04	1,14
ZCP4_1173	major facilitator superfamily MFS_1	1,15	-1,06	-1,09	1,24	1,23	1,61	2,16
ZCP4_1174	transcriptional regulator, LysR family	1,28	1,21	1,04	-1,19	-1,12	-1,68	-1,96
ZCP4_1175	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	-1,33	-1,12	-1,35	-1,18	-1,29	-1,07	-1,24
ZCP4_1176	Sell domain protein repeat-containing protein	-1,13	-1,10	1,03	1,05	1,04	1,12	-1,09
ZCP4_1178	Maf family protein	-1,11	-1,20	-1,10	1,04	1,37	2,20	1,98
ZCP4_1179	shikimate 5-dehydrogenase	-1,06	-1,25	-1,32	1,05	-1,04	1,02	-1,40
ZCP4_1180	dephospho-CoA kinase	-1,02	-1,19	-1,21	-1,01	1,19	1,25	-1,03
ZCP4_1181	DNA polymerase III, epsilon subunit	1,33	1,31	-1,03	-1,03	1,18	1,61	1,62
ZCP4_1182	sigma 54 modulation protein/ribosomal protein S30EA	-1,55	-1,38	-1,02	1,04	4,48	11,48	11,11
ZCP4_1183	putative PTS IIA-like nitrogen-regulatory protein PtsN	-1,50	-1,42	-1,06	1,04	2,71	6,96	6,43
ZCP4_1184	hypothetical protein	-1,20	-1,18	-1,18	-1,06	1,62	4,33	3,62
ZCP4_1185	Ankyrin	-1,17	-1,33	-1,10	1,05	1,07	-1,06	-1,25
ZCP4_1186	hypothetical protein	1,13	1,11	1,03	-1,03	-1,18	-1,01	1,30
ZCP4_1187	TonB-dependent receptor	-1,10	-1,11	-1,13	-1,34	-1,53	-1,52	-1,57
ZCP4_1189	Sell domain protein repeat-containing protein	1,04	1,03	1,03	-1,30	-1,22	1,06	1,17
ZCP4_1190	restriction endonuclease	1,03	1,06	1,03	1,10	1,08	-1,50	-1,30
ZCP4_1191	inosine monophosphate cyclohydrolase	-1,03	-1,06	1,05	1,09	-1,14	-2,80	-4,31
ZCP4_1192	Sell domain protein repeat-containing protein	1,12	1,11	-1,04	-1,36	-1,48	-3,23	-3,93
ZCP4_1193	hypothetical protein	1,09	1,06	1,05	1,10	1,73	2,71	3,86
ZCP4_1194	transcriptional regulator, AsnC family	1,02	1,05	1,07	1,02	1,30	1,44	1,18
ZCP4_1195	hypothetical protein	-1,30	-1,18	-1,01	1,22	2,72	5,33	5,64
ZCP4_1196	hypothetical protein	-1,41	-1,32	-1,05	1,19	2,60	6,80	6,48
ZCP4_1197	hypothetical protein	-1,36	-1,05	-1,01	1,26	2,51	6,58	7,84
ZCP4_1198	Heparinase II/III family protein	1,15	1,08	-1,14	-1,11	-1,75	-2,12	-1,91
ZCP4_1199	Ribulose-phosphate 3-epimerase	1,13	1,05	-1,08	-1,03	-1,40	-1,59	-1,73
ZCP4_1200	Fmu (Sun) domain protein	1,12	1,12	1,01	1,06	1,34	3,54	4,44
ZCP4_1201	GrpE protein	-1,20	-1,27	-1,11	1,06	1,48	3,76	3,83
ZCP4_1202	HrcA family transcriptional regulator	-1,11	-1,22	-1,06	1,04	1,94	9,52	11,90
ZCP4_1203	ribonuclease PH	-1,03	-1,15	-1,13	1,05	-1,04	-1,43	-1,26
ZCP4_1204	putative deoxyribonucleotide triphosphate pyrophosphatase	-1,19	-1,30	-1,35	-1,11	-1,48	-1,97	-2,84
ZCP4_1205	coproporphyrinogen III oxidase	-1,07	-1,16	-1,20	-1,09	-1,48	-2,28	-1,86
ZCP4_1206	hypothetical protein	-1,23	-1,31	-1,16	-1,54	-1,87	-1,81	-1,47
ZCP4_1207	hypothetical protein	-1,39	-1,16	-1,03	-1,38	1,09	1,72	1,98
ZCP4_1208	sulfite reductase subunit alpha	-1,11	-1,06	-1,57	-1,10	-1,05	1,05	1,20
ZCP4_1209	sulfite reductase subunit beta	-1,34	-1,30	-1,78	-1,26	-1,22	1,01	1,10
ZCP4_1210	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	-1,31	-1,23	-1,73	-1,31	-1,26	1,28	1,27
ZCP4_1211	uroporphyrin-III C-methyltransferase	1,32	1,38	-1,73	-1,06	-1,76	-2,13	-2,25
ZCP4_1212	sulfate adenylyltransferase subunit 2	-1,06	1,03	-2,11	-1,22	-1,93	-1,78	-1,87

5. Παράρτημα

ZCP4_1213	sulfate adenylyltransferase	-1,30	-1,19	-2,41	-1,32	-2,07	-1,88	-1,68
ZCP4_1214	adenylylsulfate kinase	-1,32	-1,27	-2,50	-1,42	-1,99	-2,32	-1,86
ZCP4_1215	aminotransferase class I and II	1,18	1,19	-1,13	1,06	1,11	1,31	2,18
ZCP4_1216	TonB-dependent receptor plug	1,20	1,50	-1,24	-1,06	-1,10	1,65	4,69
ZCP4_1217	uroporphyrinogen decarboxylase	1,04	-1,03	1,00	-1,31	-1,28	-1,36	1,29
ZCP4_1218	Protoporphyrinogen IX oxidase, novel form	1,34	1,32	1,04	-1,03	1,00	-1,22	-1,06
ZCP4_1219	transcription termination factor Rho	1,26	1,15	-1,02	1,08	-1,43	-5,41	-7,41
ZCP4_1220	Alcohol dehydrogenase GroES domain protein	-1,36	-1,29	-1,06	1,02	1,55	3,99	4,14
ZCP4_1221	dienelactone hydrolase-like enzyme	-1,23	-1,27	-1,03	1,08	2,26	7,85	9,32
ZCP4_1222	methylated-DNA/protein-cysteine methyltransferase	1,00	-1,06	1,02	-1,04	1,16	1,43	1,45
ZCP4_1223	tRNA modification GTPase TrmE	1,01	-1,10	-1,14	1,10	1,11	-1,03	-1,06
ZCP4_1224	TonB-dependent receptor plug	1,15	1,15	1,06	1,08	1,10	1,94	2,92
ZCP4_1226	aldo/keto reductase	-1,14	-1,10	1,04	-1,07	1,06	1,47	1,53
ZCP4_1227	SMP-30/Gluconolactonase/LRE domain protein	-1,45	-1,29	1,16	-1,02	1,41	2,76	2,98
ZCP4_1228	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme GidA	1,11	1,04	-1,06	-1,08	-1,40	-1,73	-2,13
ZCP4_1229	methyltransferase GidB	1,04	-1,11	-1,14	-1,05	-1,70	-2,08	-2,37
ZCP4_1230	Cobyrinic acid ac-diamide synthase	1,14	-1,03	-1,10	-1,08	1,05	1,80	2,04
ZCP4_1231	parB-like partition protein	1,02	-1,12	-1,20	-1,13	-1,21	1,30	1,05
ZCP4_1232	major facilitator superfamily MFS_1	1,16	1,02	-1,08	1,01	2,03	7,85	12,43
ZCP4_1233	hypothetical protein	-1,02	-1,03	-1,02	1,02	-1,20	-2,64	-3,21
ZCP4_1234	ornithine cyclodeaminase	1,29	1,19	1,08	1,00	-1,09	-1,08	1,11
ZCP4_1235	chromosome replication initiation inhibitor protein	1,05	-1,03	1,05	-1,23	-1,40	-1,20	-1,60
ZCP4_1236	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	-1,12	1,05	1,13	-1,04	1,18	1,65	2,01
ZCP4_1237	pantoate/beta-alanine ligase	-1,26	-1,22	1,05	-1,01	1,35	1,75	1,95
ZCP4_1238	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	-1,06	-1,06	1,12	1,09	1,83	2,75	3,38
ZCP4_1239	hypothetical protein	-1,21	-1,18	-1,15	-1,15	-1,30	-1,24	-1,08
ZCP4_1240	Beta-lactamase	-1,05	-1,00	-1,03	-1,19	-1,14	1,43	1,90
ZCP4_1241	hypothetical protein	-1,04	-1,03	-1,03	-1,36	-1,63	-1,30	-1,31
ZCP4_1242	ComEC/Rec2-related protein	1,23	1,32	-1,04	-1,15	-1,00	1,29	1,88
ZCP4_1243	glutamate--tRNA ligase 2	-1,16	-1,13	1,00	-1,07	-1,31	-1,54	-1,49
ZCP4_1244	citrate (Si)-synthase	-1,01	1,03	-1,00	-1,05	-1,29	-2,15	-2,35
ZCP4_1245	histidine kinase	1,23	1,20	1,09	-1,02	-1,03	1,23	1,56
ZCP4_1246	hypothetical protein	1,25	1,24	1,04	1,03	-1,20	-1,00	1,34
ZCP4_1247	hypothetical protein	-1,11	-1,17	1,09	-1,19	-1,00	1,46	1,58
ZCP4_1248	hypothetical protein	1,10	1,14	1,00	-1,04	1,09	2,32	2,71
ZCP4_1249	hypothetical protein	-1,03	-1,07	-1,15	1,00	1,29	2,55	2,80
ZCP4_1250	glycosyl transferase group 1	1,25	1,17	-1,03	-1,06	-1,00	1,34	1,34
ZCP4_1251	DNA repair protein RecN	1,09	1,10	1,03	-1,01	1,13	1,10	-1,05
ZCP4_1252	malate dehydrogenase	-1,15	-1,09	1,06	1,06	1,05	-1,30	-1,47
ZCP4_1253	molecular chaperone GroEL	-1,13	-1,23	-1,04	1,23	1,65	1,73	1,23
ZCP4_1254	co-chaperonin GroES	-1,16	-1,30	-1,06	1,23	1,92	1,61	1,36
ZCP4_1255	signal peptide peptidase SppA	-1,10	-1,03	1,05	1,02	1,30	1,60	1,67

5. Παράρτημα

ZCP4_1256	peptidase U32	1,05	1,01	1,03	-1,18	-1,24	1,08	1,15
ZCP4_1257	peptidase U32	1,03	-1,01	1,01	-1,18	-1,23	1,12	1,05
ZCP4_1258	capsular polysaccharide biosynthesis protein RkpI (phosphoglycerol transferase?)	1,16	1,12	-1,04	-1,11	-1,19	-1,25	1,01
ZCP4_1259	Capsule polysaccharide biosynthesis protein	1,14	1,02	-1,13	-1,25	-1,78	-1,71	-1,51
ZCP4_1260	primosome assembly protein PriA	-1,11	-1,15	-1,03	1,02	1,36	3,50	4,08
ZCP4_1261	hypothetical protein	-1,30	-1,37	1,01	1,11	2,70	10,11	16,50
ZCP4_1262	thiol-disulfide isomerase	-1,25	-1,18	1,05	-1,08	1,23	1,93	1,69
ZCP4_1263	adenosylmethionine--8-amino-7-oxononanoate transaminase	-1,30	-1,23	1,07	1,03	1,57	3,20	3,73
ZCP4_1264	8-amino-7-oxononanoate synthase	1,02	1,05	1,01	1,04	1,22	1,70	1,97
ZCP4_1265	pimeloyl-[acp] methyl ester esterase	-1,23	1,01	1,09	-1,04	1,49	5,39	6,78
ZCP4_1266	dethiobiotin synthase	1,09	1,16	1,10	-1,11	1,05	3,23	4,38
ZCP4_1267	site-specific tyrosine recombinase XerC	1,38	1,42	1,10	-1,11	-1,17	1,17	1,31
ZCP4_1268	glutathione synthetase	-1,06	-1,03	1,04	-1,06	1,08	1,48	1,51
ZCP4_1269	GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD	-1,05	1,00	-1,00	-1,03	-1,22	-1,67	-1,51
ZCP4_1270	peptidyl-tRNA hydrolase	1,12	1,02	1,00	-1,04	-1,48	-3,70	-3,21
ZCP4_1271	ribosomal 5S rRNA E-loop binding protein Ctc/L25/TL5	-1,09	-1,13	-1,17	-1,18	-2,55	-7,10	-9,26
ZCP4_1272	hypothetical protein	-1,26	-1,23	1,01	-1,06	1,31	4,46	5,26
ZCP4_1273	SmpA/OmlA domain protein	1,18	1,23	1,06	-1,06	-1,12	-1,66	-1,47
ZCP4_1274	DNA mismatch repair protein MutS	1,25	1,26	1,07	-1,08	-1,23	-1,03	1,23
ZCP4_1275	translation initiation factor IF-3	1,25	1,29	1,08	-1,13	-2,21	-4,33	-3,83
ZCP4_1277	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)(+))	1,17	1,15	-1,05	-1,04	-1,21	-1,50	-1,34
ZCP4_1278	putative DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease	1,19	1,21	-1,01	-1,12	-1,32	-2,19	-2,18
ZCP4_1279	porphobilinogen deaminase	1,03	1,04	1,03	-1,07	-1,03	1,43	1,78
ZCP4_1280	uroporphyrinogen III synthase HEM4	1,10	1,19	1,05	1,06	1,03	-1,07	1,07
ZCP4_1281	hypothetical protein	1,14	1,20	1,09	1,01	-1,09	-1,25	-1,19
ZCP4_1283	putative glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsX	1,33	1,35	1,02	1,00	-1,54	-4,60	-6,52
ZCP4_1284	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III	1,28	1,35	-1,01	-1,21	-1,91	-5,51	-6,61
ZCP4_1286	preprotein translocase, YajC subunit	-1,02	-1,02	-1,07	-1,09	-1,38	-1,98	-1,99
ZCP4_1287	preprotein translocase subunit SecD	1,08	1,11	1,01	-1,07	-1,27	-1,98	-2,18
ZCP4_1288	protein-export membrane protein SecF	1,07	1,09	-1,00	-1,15	-1,32	-2,26	-2,25
ZCP4_1289	PfkB domain protein	1,08	1,09	1,14	1,09	-1,07	-2,58	-2,85
ZCP4_1290	involved in peptidoglycan recycling or outer membrane attachment	-1,01	-1,00	1,10	-1,02	-1,20	-2,06	-2,08
ZCP4_1291	threonine synthase	-1,06	-1,08	-1,03	-1,02	-1,12	-2,75	-3,36
ZCP4_1292	Mitochondrial processing peptidase-like protein	1,16	1,18	1,02	-1,02	-1,22	-2,25	-3,11
ZCP4_1293	SAM-dependent methyltransferase-like protein	1,17	1,22	1,07	-1,12	-1,14	-2,66	-3,38
ZCP4_1295	isochorismatase hydrolase	-1,16	-1,16	1,08	1,04	-1,46	-2,55	-2,35
ZCP4_1296	membrane protein AbrB duplication	1,07	1,11	1,05	1,00	-1,09	-2,00	-1,46
ZCP4_1297	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	-1,43	-1,41	-1,03	-1,00	1,36	1,70	1,87
ZCP4_1298	hypothetical protein	1,06	-1,03	-1,03	-1,08	1,04	-1,04	-1,00
ZCP4_1299	glyoxylate/hydroxypyruvate reductase A	1,07	1,01	1,00	-1,18	1,01	1,01	1,31
ZCP4_1300	membrane protein AbrB duplication	1,22	1,09	-1,03	1,05	-1,29	-1,33	-1,26

5. Παράρτημα

ZCP4_1302	hypothetical protein	1,19	1,07	-1,16	-1,09	-1,12	-1,23	-1,53
ZCP4_1303	delta-aminolevulinic acid dehydratase	-1,02	-1,18	-1,27	1,03	-1,17	-1,20	-1,30
ZCP4_1304	valyl-tRNA synthetase	-1,04	-1,11	-1,09	-1,12	-1,55	-2,51	-3,22
ZCP4_1305	glutamine cyclotransferase	1,02	1,03	-1,08	-1,18	-1,21	-1,10	-1,03
ZCP4_1306	hypothetical protein	1,15	1,17	-1,01	-1,22	-1,12	1,52	1,66
ZCP4_1307	FeS cluster repair with bolA	-1,07	-1,05	-1,00	1,01	1,34	1,90	2,24
ZCP4_1308	ATP-binding protein	-1,11	-1,06	-1,02	1,11	2,00	2,73	3,69
ZCP4_1309	glutaredoxin-like protein	-1,10	-1,05	1,10	1,12	1,64	2,12	2,34
ZCP4_1310	hypothetical protein	1,13	1,19	1,05	-1,04	1,22	3,24	4,72
ZCP4_1311	quinolinate synthetase	1,02	1,03	1,01	-1,03	-1,01	1,41	1,77
ZCP4_1312	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	1,00	1,03	-1,04	-1,07	-1,07	1,62	2,19
ZCP4_1313	Ribonuclease I-like protein	1,08	1,09	1,02	-1,01	-1,02	1,41	1,72
ZCP4_1314	biotin/acetyl-CoA-carboxylase ligase	1,21	1,21	1,06	-1,02	1,02	1,18	1,39
ZCP4_1315	pantothenate kinase	1,17	1,21	1,09	-1,01	-1,20	-1,63	-1,30
ZCP4_1316	beta-lactamase domain protein	1,17	1,20	1,01	-1,03	-1,91	-3,99	-3,73
ZCP4_1323	hypothetical protein	1,51	1,59	1,10	-1,09	1,24	1,20	1,55
ZCP4_1324	hypothetical protein	1,24	1,37	1,09	-1,01	1,06	-1,28	-1,08
ZCP4_1325	RES domain-containing protein	1,17	1,22	1,03	-1,08	1,02	1,17	1,51
ZCP4_1326	glutamine amidotransferase	-1,19	-1,08	-1,14	-1,00	1,36	1,68	1,88
ZCP4_1327	transcriptional regulator, GntR family with aminotransferase domain	1,04	1,04	1,03	-1,14	1,28	1,32	1,03
ZCP4_1328	dihydrodipicolinate synthase family protein	-1,32	-1,26	1,02	1,10	1,76	2,38	2,43
ZCP4_1329	flavodoxin FldA	-1,12	-1,07	1,04	1,00	1,94	3,12	3,30
ZCP4_1330	hypothetical protein	1,01	1,08	1,00	-1,03	1,55	2,13	2,21
ZCP4_1332	periplasmic binding protein	-1,54	-1,77	-1,38	-1,42	-2,24	-1,32	-1,01
ZCP4_1333	transport system permease protein	-1,24	-1,13	-1,21	-1,37	-1,83	-1,15	1,46
ZCP4_1334	ABC transporter related protein	-1,11	-1,03	1,04	1,02	1,31	2,28	3,32
ZCP4_1335	PhnA protein	1,02	1,06	-1,04	-1,19	-2,69	-10,83	-14,43
ZCP4_1336	oxidoreductase domain protein	-1,19	-1,13	1,09	1,10	1,85	3,43	3,45
ZCP4_1337	ApbE family lipoprotein	1,03	-1,06	-1,03	1,00	1,15	1,69	2,02
ZCP4_1338	Functions with Rnf and may reduce SoxR	1,10	1,05	-1,00	-1,08	1,59	3,54	4,08
ZCP4_1339	isochorismatase hydrolase	1,03	-1,03	1,15	-1,08	1,27	2,58	2,90
ZCP4_1340	TOBE domain protein	-1,79	-2,35	-1,35	-1,23	-4,19	-6,71	-5,10
ZCP4_1341	modD protein	1,76	1,43	1,76	1,53	1,69	2,68	3,05
ZCP4_1343	homocitrate synthase	1,11	1,06	1,07	1,02	-1,10	1,63	2,05
ZCP4_1344	cysteine desulfurase NifS	-1,33	-1,17	1,04	-1,35	-1,04	2,01	3,12
ZCP4_1350	nitrogen fixation protein NifX	-1,87	-1,46	-1,20	-1,09	-1,40	1,30	1,51
ZCP4_1351	nitrogenase molybdenum-cofactor biosynthesis protein NifN	-1,24	-1,02	1,19	1,04	1,21	2,02	2,14
ZCP4_1352	nitrogenase molybdenum-cofactor biosynthesis protein NifE	1,30	1,22	1,26	1,07	1,41	1,16	1,15
ZCP4_1353	nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	-1,00	-1,34	-1,00	-1,13	1,10	-1,14	1,66
ZCP4_1354	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	1,06	1,24	1,06	1,03	1,15	1,45	1,04
ZCP4_1356	TonB-dependent siderophore receptor	1,12	1,21	1,12	-1,08	-1,29	1,38	2,20
ZCP4_1357	hypothetical protein	1,05	1,07	1,05	-1,35	-1,30	-1,48	-1,10
ZCP4_1359	NifZ family protein	1,12	1,10	1,04	1,19	-1,14	-1,43	-1,14

5. Παράρτημα

ZCP4_1360	4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain protein	1,02	-1,09	1,13	1,02	-1,68	-4,53	-5,65
ZCP4_1361	nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB	-1,18	-1,17	1,04	1,10	1,10	1,17	-1,13
ZCP4_1362	transcriptional regulator, NifA, Fis Family	-2,37	-2,92	-1,40	-1,01	-3,73	-3,24	-2,41
ZCP4_1363	TonB-dependent siderophore receptor	-1,63	-1,75	-1,34	-1,09	-2,85	-2,55	-2,61
ZCP4_1364	electron transport complex, RnfABCDGE type, A subunit	1,00	1,01	1,04	-1,03	-1,31	-1,36	1,21
ZCP4_1365	electron transport complex, RnfABCDGE type, B subunit	-1,07	-1,03	-1,03	-1,11	-1,53	-2,33	-1,76
ZCP4_1366	electron transport complex, RnfABCDGE type, C subunit	-1,02	-1,05	-1,00	-1,07	-1,46	-2,42	-2,04
ZCP4_1367	electron transport complex, RnfABCDGE type, D subunit	1,05	1,02	1,06	-1,05	-1,39	-1,85	-1,46
ZCP4_1368	electron transport complex, RnfABCDGE type, G subunit	1,13	1,08	1,13	1,13	-1,27	-2,12	-2,22
ZCP4_1369	electron transport complex RsxE subunit	-1,01	1,01	1,07	1,05	-1,33	-1,64	-1,51
ZCP4_1370	electron transport complex, RnfABCDGE type, H subunit	1,03	-1,26	1,02	-1,03	-1,45	-3,72	-3,64
ZCP4_1371	TonB-dependent receptor	-1,21	-1,08	-1,25	-1,83	-1,23	-1,51	-1,65
ZCP4_1372	Maltose O-acetyltransferase	-1,27	-1,41	1,01	-1,15	-1,26	-1,13	-1,08
ZCP4_1373	Haloacid dehalogenase domain protein hydrolase	-1,07	-1,07	1,06	1,06	1,06	-1,19	-1,30
ZCP4_1374	amino acid permease-associated region	1,51	1,38	1,13	1,30	-1,06	-1,30	-1,07
ZCP4_1375	integration host factor, beta subunit	-1,14	-1,19	1,06	-1,17	1,20	2,03	2,58
ZCP4_1376	phenazine biosynthesis protein PhzF family	-1,08	-1,10	-1,09	-1,12	-1,15	-1,25	-1,18
ZCP4_1377	30S ribosomal protein S1	1,24	1,27	1,08	-1,01	-1,63	-5,98	-9,32
ZCP4_1378	cytidylate kinase	-1,01	1,01	-1,01	-1,01	-1,40	-3,80	-4,23
ZCP4_1379	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	1,10	1,05	-1,03	1,01	-1,42	-3,83	-3,86
ZCP4_1380	hypothetical protein	-1,02	-1,02	1,06	1,08	-1,25	-3,89	-4,49
ZCP4_1382	transcriptional regulator, LysR family	-1,20	-1,81	-1,30	-1,13	-1,73	-1,70	-2,68
ZCP4_1383	dihydroxy-acid dehydratase	-1,23	-1,48	-1,41	-1,14	-2,70	-9,95	-14,21
ZCP4_1384	hypothetical protein	1,26	1,20	1,06	-1,18	-1,05	1,11	1,33
ZCP4_1385	ABC transporter	1,19	1,16	1,06	1,03	1,07	1,67	2,24
ZCP4_1386	hypothetical protein	-1,60	-1,53	1,10	-1,03	1,93	6,28	6,54
ZCP4_1387	hypothetical protein	1,29	1,28	1,79	2,14	1,81	1,25	1,46
ZCP4_1388	hypothetical protein	1,06	1,08	1,09	1,00	1,08	1,50	1,49
ZCP4_1389	mechanosensitive ion channel protein MscS	-1,14	-1,10	-1,04	-1,19	1,03	1,41	1,81
ZCP4_1390	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	-1,03	-1,04	1,05	1,09	1,74	2,03	1,90
ZCP4_1391	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	-1,03	-1,02	1,02	1,00	1,18	1,70	1,52
ZCP4_1392	hypothetical protein	-1,05	1,01	1,03	1,06	1,39	1,25	1,44
ZCP4_1393	hypothetical protein	-1,16	-1,09	1,03	1,08	-1,20	-1,45	-1,76
ZCP4_1394	aminopeptidase N	-1,36	-1,35	-1,07	-1,03	1,46	3,21	2,96
ZCP4_1395	hypothetical protein	1,01	1,04	1,15	1,08	1,45	2,05	2,27
ZCP4_1397	aldo/keto reductase	-1,38	-1,37	-1,06	1,21	1,73	2,42	2,17
ZCP4_1398	NAD(P)H quinone oxidoreductase, PIG3 family	-1,09	-1,04	1,20	1,15	1,63	1,94	1,65
ZCP4_1399	iron-containing alcohol dehydrogenase	-1,04	-1,03	1,10	1,17	1,69	2,60	2,68
ZCP4_1400	argininosuccinate lyase	1,01	1,03	-1,00	-1,07	-1,46	-1,56	-1,59
ZCP4_1401	hypothetical protein	1,12	-1,10	-1,05	-1,11	-1,74	-1,98	-2,37
ZCP4_1402	diaminopimelate decarboxylase	-1,02	-1,02	-1,01	-1,12	-1,63	-2,15	-2,40

5. Παράρτημα

ZCP4_1403	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-1,26	-1,26	-1,08	-1,13	1,06	1,88	2,11
ZCP4_1404	Mg2 transporter protein CorA family protein	-1,09	-1,07	-1,01	-1,11	-1,05	1,58	1,80
ZCP4_1405	ErkK/YbiS/YcfS/YnhG family protein	1,30	1,32	1,11	-1,01	-1,04	1,05	1,08
ZCP4_1406	hypothetical protein	-1,22	-1,30	-1,09	-1,02	-1,51	-2,52	-2,85
ZCP4_1407	hypothetical protein	1,39	1,33	-1,17	1,14	-1,32	-1,05	-1,25
ZCP4_1408	Uroporphyrin-III C/tetrapyrrole (Corrin/Protoporphyrin) methyltransferase	1,00	-1,09	-1,14	-1,00	-1,21	1,17	1,24
ZCP4_1409	Extracellular ligand-binding receptor outer membrane assembly lipoprotein YfiO	1,06	1,08	1,12	1,16	1,07	-1,70	-1,98
ZCP4_1410	carbohydrate kinase, thermoresistant glucokinase family	1,21	1,00	-1,21	-1,03	-1,54	-1,62	-1,50
ZCP4_1411	gluconate transporter	-1,06	-1,05	1,05	1,03	1,26	1,20	1,07
ZCP4_1412	Thymidylate synthase	1,19	1,18	1,19	1,12	1,29	1,30	1,31
ZCP4_1413	Aldehyde Dehydrogenase	-1,07	-1,04	1,08	-1,03	1,06	-1,20	-1,23
ZCP4_1414	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	-1,52	-1,28	1,16	1,35	5,95	13,45	13,78
ZCP4_1415	hypothetical protein	1,00	1,04	1,09	1,04	1,13	-1,13	-1,34
ZCP4_1416	hypothetical protein	1,30	1,33	1,12	-1,08	-2,07	-4,11	-6,18
ZCP4_1417	hypothetical protein	1,16	1,18	1,20	1,00	-1,04	-1,56	-1,89
ZCP4_1418	hypothetical protein	-1,81	-1,61	1,14	-1,02	2,06	1,81	1,67
ZCP4_1419	VacJ family lipoprotein	1,17	1,01	-1,17	-1,02	-1,61	-3,61	-4,80
ZCP4_1420	transcriptional regulator, ArsR family	1,08	1,11	1,10	1,02	-1,23	-2,58	-4,20
ZCP4_1421	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	1,02	-1,08	-1,02	1,02	-1,36	-2,44	-2,66
ZCP4_1422	homocysteine S-methyltransferase	1,06	1,03	-1,02	1,04	-1,12	-1,92	-2,00
ZCP4_1423	methionine synthase	1,07	1,05	1,09	1,10	-1,01	-1,56	-1,88
ZCP4_1424	biotin transporter BioY	1,23	1,15	1,04	1,05	-1,01	-1,37	-1,33
ZCP4_1425	GTP-binding protein LepA	1,16	1,28	1,14	1,00	-1,12	-2,10	-2,31
ZCP4_1426	hypothetical protein	1,03	-1,05	1,06	-1,01	1,16	-1,37	-1,45
ZCP4_1427	putatively essential histidine kinase for ZMO1739	1,09	1,13	1,06	-1,05	1,12	1,27	1,32
ZCP4_1428	putatively essential response regulator	-1,07	-1,06	1,09	-1,01	1,52	2,31	2,78
ZCP4_1429	glycosyl transferase group 1	-1,07	-1,06	-1,03	-1,02	1,26	1,82	1,75
ZCP4_1430	UDP glycosyltransferase-like enzyme in cell wall synthesis	-1,00	1,03	1,16	-1,04	1,18	1,32	1,03
ZCP4_1431	transcriptional regulator	1,18	1,19	1,03	-1,04	-1,13	-1,70	-2,03
ZCP4_1432	alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen	1,00	1,35	1,17	1,00	1,35	1,00	1,00
ZCP4_1433	Serine O-acetyltransferase	-1,06	1,02	-1,01	-1,03	1,15	1,70	1,94
ZCP4_1434	hypothetical protein	1,02	-1,03	-1,02	1,11	-1,06	1,27	1,30
ZCP4_1435	hypothetical protein	1,14	1,18	1,06	-1,14	-1,23	1,15	1,06
ZCP4_1436	aminotransferase	-1,06	-1,16	-1,14	1,02	1,32	1,99	2,04
ZCP4_1437	ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS	-1,19	-1,26	1,08	1,09	-1,11	-1,16	-1,01
ZCP4_1438	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	1,11	1,07	-1,02	1,02	1,05	1,14	1,23
ZCP4_1439	hypothetical protein	1,11	1,07	-1,06	1,10	1,13	1,59	2,00
ZCP4_1440	Laccase involved in oxidative stress resistance	1,22	1,18	1,14	1,24	1,28	1,69	2,46
ZCP4_1441	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase/class III alcohol dehydrogenase	1,10	1,07	1,06	-1,05	1,04	1,06	1,18
ZCP4_1442	extradiol dioxygenase	-1,21	-1,12	1,13	1,25	4,27	9,18	9,23
ZCP4_1443	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	1,00	1,03	1,06	1,00	1,32	1,90	2,49

5. Παράρτημα

ZCP4_1444	ROK family protein	1,02	1,05	1,18	1,00	-1,08	-1,44	-1,59
ZCP4_1445	part of an outer membrane integrity system	-1,22	-1,19	-1,02	-1,02	-1,16	-1,54	-1,56
ZCP4_1446	tonB-like protein involved in outer membrane integrity	-1,01	1,06	1,07	1,02	1,01	-1,02	-1,05
ZCP4_1447	MotA/TolQ/ExbB proton channel	-1,01	1,05	1,10	1,03	1,18	2,28	2,64
ZCP4_1448	Biopolymer transport protein ExbD/TolR	1,05	1,10	1,16	1,07	1,53	1,97	1,81
ZCP4_1449	biopolymer transport protein ExbD/TolR (NCBI)	1,08	1,16	1,08	-1,03	1,13	1,14	-1,01
ZCP4_1450	30S ribosomal protein S21	1,14	1,09	-1,03	-1,16	-1,96	-4,82	-6,02
ZCP4_1451	peptidylprolyl isomerase FKBP-type	1,51	1,51	1,08	1,05	-1,30	-3,82	-5,12
ZCP4_1452	hypothetical protein	-1,06	-1,09	-1,03	-1,01	1,34	2,45	2,99
ZCP4_1453	signal peptidase I	1,00	1,02	1,02	1,01	1,05	1,16	1,14
ZCP4_1454	holo-acyl-carrier-protein synthase	1,05	1,14	1,01	-1,01	1,13	1,20	1,06
ZCP4_1455	pyridoxine 5'-phosphate synthase	-1,08	-1,11	-1,04	1,10	1,51	1,65	1,17
ZCP4_1456	orotate phosphoribosyltransferase	-1,11	-1,08	1,01	-1,00	1,01	-1,13	-1,32
ZCP4_1457	Thioredoxin domain protein	-1,68	-1,46	1,23	1,14	3,86	15,52	19,62
ZCP4_1458	peptidase S16 lon domain protein	1,02	-1,01	1,03	1,00	1,88	8,61	12,78
ZCP4_1459	Ubiquinone biosynthesis hydroxylase, UbiH/UbiF/VisC/COQ6 family	-1,09	-1,19	-1,07	-1,01	1,07	1,55	1,65
ZCP4_1460	cell divisionFtsK/SpoIIIE	1,07	1,14	1,00	-1,09	-1,10	-1,02	1,13
ZCP4_1461	outer membrane lipoprotein carrier protein LolA	-1,12	-1,08	-1,00	-1,07	1,03	-1,24	-1,33
ZCP4_1462	hypothetical protein	1,02	1,00	1,18	1,06	1,67	2,50	2,63
ZCP4_1463	exodeoxyribonuclease III Xth	1,08	1,12	1,09	-1,05	-1,15	-1,04	1,00
ZCP4_1464	GTP cyclohydrolase II	-1,05	1,00	1,04	1,03	1,06	2,56	3,33
ZCP4_1465	transcriptional regulator, HxlR family	-1,34	-1,29	1,01	1,02	1,81	4,66	5,02
ZCP4_1466	zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	-1,26	-1,17	1,11	1,41	3,70	5,87	7,46
ZCP4_1467	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein	1,59	1,87	1,32	1,19	1,47	1,58	1,72
ZCP4_1468	TonB-dependent receptor	1,18	1,27	1,12	-1,03	-1,32	-1,85	-1,89
ZCP4_1469	chorismate synthase	1,02	-1,03	1,04	-1,00	1,05	-1,29	-1,63
ZCP4_1470	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,08	-1,06	1,06	1,01	1,17	1,13	1,07
ZCP4_1471	ribonuclease BN	1,07	1,06	1,19	1,03	1,36	4,01	4,80
ZCP4_1472	chaperone DnaJ domain protein	-1,22	-1,30	-1,04	1,05	1,80	4,89	5,62
ZCP4_1473	dihydroorotase multifunctional complex type	-1,07	-1,05	-1,03	-1,07	1,34	1,69	1,55
ZCP4_1474	folate-binding protein YgfZ	-1,05	-1,02	1,06	-1,04	1,23	1,78	1,83
ZCP4_1475	adenylosuccinate synthetase	-1,00	-1,06	-1,08	-1,01	-1,36	-2,18	-2,56
ZCP4_1476	ATP phosphoribosyltransferase	1,10	-1,01	-1,10	-1,05	-1,39	-2,37	-2,58
ZCP4_1477	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-1,07	-1,12	1,06	1,12	1,29	-1,01	-1,57
ZCP4_1478	phosphoserine aminotransferase	1,14	1,01	-1,03	1,09	1,11	1,13	-1,08
ZCP4_1479	L-asparaginase	1,04	1,06	-1,01	-1,06	-1,17	-1,13	-1,09
ZCP4_1480	aspartate aminotransferase	-1,23	-1,22	-1,13	-1,08	1,13	1,74	1,54
ZCP4_1481	YidE/YbjL duplication	-1,15	-1,04	1,00	-1,09	1,54	3,04	2,86
ZCP4_1482	Extensin family protein	1,16	1,14	-1,02	-1,11	-1,03	1,76	2,03
ZCP4_1483	hypothetical protein	-1,13	-1,17	1,09	1,03	1,79	4,89	6,88
ZCP4_1484	prephenate dehydratase	1,01	-1,12	-1,13	-1,08	-1,22	1,24	1,65
ZCP4_1485	A/G-specific adenine glycosylase	1,07	1,00	1,04	1,10	1,05	1,58	1,73
ZCP4_1486	hypothetical protein	1,17	1,25	1,06	-1,09	-1,21	-1,29	-1,57

5. Παράρτημα

ZCP4_1487	protein-disulfide isomerase-like protein	-1,31	-1,22	1,05	1,07	1,79	3,29	3,52
ZCP4_1488	aldo/keto reductase	-1,12	-1,09	-1,02	-1,02	1,17	1,43	1,40
ZCP4_1489	hypothetical protein	1,04	1,13	-1,02	-1,02	1,14	1,57	1,75
ZCP4_1490	hypothetical protein	-1,03	-1,11	1,00	-1,07	1,08	1,65	1,86
ZCP4_1491	hypothetical protein	1,20	1,07	-1,04	-1,12	-1,30	-2,15	-2,04
ZCP4_1492	Ubiquinone biosynthesis protein COQ7	1,13	1,15	1,07	-1,04	1,00	-1,12	-1,07
ZCP4_1493	hypothetical protein	1,08	1,11	1,08	1,05	1,16	1,20	1,35
ZCP4_1494	carboxyl-terminal protease	1,10	1,06	-1,01	-1,06	-1,20	-1,64	-1,65
ZCP4_1495	Peptidase M23	1,36	1,34	1,14	-1,12	-1,09	-1,98	-2,16
ZCP4_1496	hypothetical protein	1,93	1,60	-1,09	1,05	-1,17	-2,06	-2,33
ZCP4_1497	iojap-like protein	1,14	-1,04	-1,20	-1,05	-1,18	-1,23	-1,21
ZCP4_1498	nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase	1,10	-1,06	-1,07	1,06	1,25	2,38	2,53
ZCP4_1499	gamma-glutamyl-phosphate reductase	-1,11	-1,17	-1,14	1,06	1,18	1,24	1,04
ZCP4_1500	hypothetical protein	1,08	-1,07	-1,11	1,10	1,01	-1,02	-1,14
ZCP4_1501	ATP-dependent metalloprotease FtsH	-1,08	-1,14	-1,01	1,04	1,97	10,13	14,89
ZCP4_1502	tRNA(Ile)-lysidine synthetase	1,03	-1,04	-1,15	-1,04	-1,03	1,30	1,26
ZCP4_1503	hypothetical protein	-1,14	-1,19	-1,10	-1,04	1,16	1,17	1,07
ZCP4_1504	transcriptional regulator, XRE family	-1,11	1,01	-1,06	-1,19	-1,04	1,65	1,72
ZCP4_1505	antioxidant, AhpC/TSA family protein	-1,13	-1,13	1,09	1,08	1,77	4,44	5,38
ZCP4_1506	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	-1,64	-1,40	1,06	1,08	2,14	5,02	5,98
ZCP4_1507	aspartate kinase	1,04	1,07	1,05	-1,03	-1,28	-2,72	-3,34
ZCP4_1508	2-nitropropane dioxygenase NPD	1,05	1,11	-1,04	-1,15	-1,53	-2,67	-3,74
ZCP4_1509	PTSINtr with GAF domain, PtsP	1,08	1,06	-1,10	-1,16	-1,56	-2,18	-2,93
ZCP4_1510	beta-lactamase	1,29	1,28	-1,13	-1,13	-1,10	-1,12	-1,67
ZCP4_1511	Gluconolactonase	1,02	1,05	1,07	-1,12	-1,41	-3,48	-5,30
ZCP4_1512	uracil-DNA glycosylase	1,18	1,09	-1,10	-1,09	-1,34	-1,88	-2,30
ZCP4_1513	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridine pyrophosphokinase	1,15	-1,00	-1,09	1,08	-1,46	-1,84	-2,23
ZCP4_1515	transcription-repair coupling factor	-1,00	-1,05	-1,01	1,02	1,12	1,39	1,34
ZCP4_1516	DEAD/DEAH box helicase domain protein	-1,03	-1,07	-1,04	-1,01	1,13	1,81	1,83
ZCP4_1517	tyrosyl-tRNA synthetase	-1,02	-1,01	1,12	1,17	1,13	-1,54	-1,50
ZCP4_1518	anhydro-N-acetylmuramic acid kinase	1,22	1,24	1,08	1,11	1,15	1,19	1,10
ZCP4_1519	hypothetical protein	-1,20	-1,40	-1,32	-1,15	-1,61	-1,12	-1,07
ZCP4_1520	tryptophanyl-tRNA synthetase	-1,28	-1,23	1,02	-1,05	-1,19	-1,21	-1,39
ZCP4_1521	integral membrane protein MviN	-1,35	-1,43	-1,11	-1,08	1,20	2,02	2,20
ZCP4_1522	protein-export protein SecB	-1,31	-1,30	-1,01	1,03	1,40	2,52	2,81
ZCP4_1523	import inner membrane translocase subunit Tim44	-1,07	-1,04	1,03	-1,10	1,16	1,91	1,65
ZCP4_1524	hypothetical protein	1,01	1,04	1,14	1,08	1,12	1,35	-1,01
ZCP4_1525	MltA domain protein	1,11	1,07	1,05	-1,09	-1,17	-1,26	-1,33
ZCP4_1527	hypothetical protein	1,28	1,34	-1,01	-1,31	-3,32	-9,85	-8,53
ZCP4_1528	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	1,17	1,06	-1,09	-1,17	-1,41	-1,19	-1,18
ZCP4_1529	TonB-dependent receptor component of system for siderophore uptake and catechol efflux	1,08	1,13	1,17	1,18	-1,01	-1,11	-1,33
ZCP4_1530	component of system for siderophore uptake and catechol efflux	-1,05	1,05	1,06	-1,03	1,15	1,26	1,19

5. Παράρτημα

ZCP4_1531	component of system for siderophore uptake and catechol efflux	-1,03	1,10	1,16	1,06	1,26	1,57	1,64
ZCP4_1533	ribosome biogenesis GTP-binding protein YsxC	1,21	1,09	-1,01	-1,03	-1,76	-5,42	-7,51
ZCP4_1534	putative inner membrane protein translocase component YidC	1,16	1,13	-1,01	-1,00	-1,56	-4,41	-5,54
ZCP4_1536	ribonuclease P protein component	1,16	1,04	-1,06	1,00	-1,43	-2,80	-2,99
ZCP4_1537	Mg chelatase, subunit ChII	-1,05	-1,21	-1,35	-1,23	-1,34	1,18	1,69
ZCP4_1538	RNA polymerase sigma factor RpoD	1,01	1,05	1,09	1,04	1,02	2,06	2,29
ZCP4_1539	DNA primase	1,07	1,06	1,00	1,00	-1,38	1,03	1,22
ZCP4_1541	GatB/YqeY domain-containing protein	1,05	-1,01	-1,05	-1,05	-2,22	-7,47	-9,14
ZCP4_1542	carbamoyl phosphate synthase small subunit	-1,07	-1,22	-1,26	1,04	-1,16	2,70	3,67
ZCP4_1543	carbamoyl phosphate synthase large subunit	1,01	-1,01	-1,05	-1,01	-1,19	1,88	2,16
ZCP4_1544	transcription elongation factor GreA	1,06	-1,02	-1,04	-1,07	-1,14	-1,33	-1,43
ZCP4_1545	Rhomboid family protein	1,17	1,18	1,05	1,05	1,29	2,51	2,64
ZCP4_1546	toluene tolerance family protein	1,12	1,18	1,07	1,03	1,46	2,48	2,03
ZCP4_1547	hypothetical protein	-1,11	-1,06	1,04	1,07	2,21	5,95	5,25
ZCP4_1548	hypothetical protein	-1,20	-1,09	1,05	1,05	2,50	6,35	6,68
ZCP4_1549	hypothetical protein	-1,28	-1,20	1,08	1,04	2,54	3,43	2,99
ZCP4_1550	enolase	-1,22	-1,32	-1,22	1,00	-1,31	-2,91	-3,82
ZCP4_1551	Septum formation initiator	1,07	1,11	-1,16	-1,22	-1,81	-2,36	-2,63
ZCP4_1552	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component, alpha subunit	-1,03	-1,01	-1,06	-1,14	-1,29	-1,76	-1,54
ZCP4_1553	pyruvate dehydrogenase subunit beta	-1,09	-1,06	1,00	-1,09	-1,06	-1,36	-1,57
ZCP4_1554	Phosphodiesterase I	1,20	1,24	1,14	1,05	1,05	1,54	1,43
ZCP4_1555	hypothetical protein	-1,03	-1,05	-1,06	-1,06	-1,18	1,13	1,40
ZCP4_1556	hypothetical protein	-1,08	-1,12	1,04	-1,00	1,25	1,42	1,47
ZCP4_1557	ribonuclease H	1,41	1,42	1,04	-1,07	-1,46	-1,35	-1,65
ZCP4_1558	homoserine kinase	1,01	1,06	1,05	-1,02	-1,13	-1,04	-1,13
ZCP4_1559	hopanoid biosynthesis associated RND transporter like protein HpnN	-1,08	-1,06	-1,02	-1,04	1,00	1,80	1,99
ZCP4_1560	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	1,15	1,08	-1,07	-1,05	-1,39	-3,09	-3,41
ZCP4_1561	iron-containing alcohol dehydrogenase	-1,05	1,03	1,12	1,21	1,62	1,69	2,16
ZCP4_1562	peptidase M61 domain protein	-1,07	-1,13	1,03	1,15	1,29	1,78	1,80
ZCP4_1563	alanine racemase	1,28	1,28	-1,01	-1,09	-1,15	1,05	1,06
ZCP4_1564	permease component of efflux system for aromatic compounds	1,24	1,16	-1,16	-1,03	-1,10	1,13	1,27
ZCP4_1565	ATPase component of system for efflux of aromatic compounds	1,17	1,13	-1,06	-1,06	-1,18	-1,35	-1,51
ZCP4_1566	tRNA-binding protein	1,25	1,36	1,18	1,28	-1,17	-1,57	-1,62
ZCP4_1567	hypothetical protein	1,05	-1,03	1,11	1,03	-1,07	-1,10	-1,20
ZCP4_1568	excinuclease ABC subunit A	-1,22	-1,18	1,14	1,46	2,88	9,65	14,36
ZCP4_1569	hypothetical protein	-1,37	-1,27	-1,13	1,10	1,67	4,59	5,77
ZCP4_1570	bacterioferritin	-1,35	-1,35	-1,24	-1,07	1,41	4,50	4,88
ZCP4_1571	recombination protein F	1,01	1,00	-1,10	1,12	1,08	-1,10	-1,08
ZCP4_1572	DNA gyrase subunit B	1,24	1,24	1,01	-1,04	-1,12	-1,12	-1,07
ZCP4_1573	Uracil-DNA glycosylase superfamily	1,12	-1,03	1,12	1,15	-1,04	-1,26	-1,45
ZCP4_1574	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	-1,24	-1,27	-1,55	1,00	-1,00	3,32	4,79
ZCP4_1581	hydrolases of the alpha/beta superfamily; K06889	-1,40	-1,42	1,04	-1,03	1,17	1,62	2,03

5. Παράρτημα

ZCP4_1582	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,33	-1,41	-1,08	-1,01	1,34	2,27	1,85
ZCP4_1583	major facilitator superfamily MFS 1	-1,20	-1,18	1,12	1,16	2,46	6,39	10,37
ZCP4_1584	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,29	-1,10	1,19	1,12	2,06	2,06	1,59
ZCP4_1585	transcriptional regulator, LysR family	-1,16	-1,10	-1,04	1,04	1,27	1,69	1,94
ZCP4_1586	peroxidase regulated by ZMO0116	-1,20	-1,21	-1,05	1,03	1,02	-1,01	-1,11
ZCP4_1587	hypothetical protein	-1,03	-1,05	1,02	-1,09	-1,93	-3,30	-4,42
ZCP4_1588	cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II	-1,04	-1,05	1,03	-1,06	-1,17	-1,43	-1,84
ZCP4_1589	cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit I	-1,04	-1,05	1,03	-1,09	-1,24	-1,58	-1,66
ZCP4_1590	formate acetyltransferase	1,02	1,01	1,00	-1,05	1,20	2,85	2,77
ZCP4_1591	pyruvate formate-lyase l-activating enzyme	-1,02	-1,06	-1,09	-1,14	1,00	1,77	1,51
ZCP4_1592	TonB-dependent receptor	1,18	1,20	1,11	1,09	1,08	1,05	-1,07
ZCP4_1593	aminoglycoside phosphotransferase	1,19	1,19	1,14	1,07	-1,20	-2,55	-2,44
ZCP4_1594	hypothetical protein	1,25	1,18	1,23	1,09	2,05	5,19	6,21
ZCP4_1595	nicotinamide mononucleotide transporter PnuC	1,13	1,14	-1,29	-1,36	-1,33	-1,56	-1,46
ZCP4_1597	hypothetical protein	1,22	1,25	1,03	-1,03	-1,21	-1,36	-1,65
ZCP4_1598	NUDIX hydrolase	1,10	1,12	1,03	-1,00	-1,26	-1,97	-2,07
ZCP4_1599	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,12	1,14	-1,02	-1,06	-1,16	-1,53	-1,73
ZCP4_1600	amidophosphoribosyltransferase	1,12	1,06	-1,02	1,00	-1,10	-1,21	1,27
ZCP4_1601	glutamate/cysteine ligase	1,12	1,18	1,01	-1,05	1,64	2,97	3,84
ZCP4_1602	16S ribosomal RNA methyltransferase RsmE	1,10	1,02	-1,23	1,04	-1,57	-3,15	-3,33
ZCP4_1603	thiamine-monophosphate kinase	1,13	1,08	-1,08	-1,09	-1,28	1,09	1,16
ZCP4_1604	NusB antitermination factor	1,05	1,07	-1,13	-1,01	-1,38	-1,56	-1,49
ZCP4_1605	Histidinol dehydrogenase	1,12	1,05	-1,06	1,09	-1,03	1,10	1,31
ZCP4_1606	ATP phosphoribosyltransferase	1,36	1,21	-1,12	-1,03	-1,49	-1,78	-1,39
ZCP4_1607	BolA family protein	-1,13	-1,14	1,20	1,01	1,62	4,46	5,39
ZCP4_1608	squalene-hopene cyclase	-1,03	-1,05	1,02	1,08	-1,37	-2,93	-3,13
ZCP4_1609	transcriptional regulator, TetR family	1,12	-1,00	1,09	1,11	-1,58	-4,69	-5,54
ZCP4_1610	heat shock protein DnaJ domain protein	1,07	-1,05	1,10	1,17	1,26	2,23	2,44
ZCP4_1611	cobalt chelatase, pCobS small subunit	-1,23	-1,20	1,05	1,09	1,28	1,82	2,11
ZCP4_1612	cobalt chelatase, pCobT subunit	-1,01	-1,03	-1,04	1,10	1,22	1,63	1,65
ZCP4_1613	single-strand binding protein	1,28	1,36	1,03	-1,16	-1,56	-3,24	-3,35
ZCP4_1614	ferrous iron transport protein B	1,22	1,20	-1,09	-1,06	-1,70	-2,22	-2,02
ZCP4_1615	FeoA family protein	1,27	1,33	1,02	1,01	-1,49	-2,47	-2,42
ZCP4_1616	DNA polymerase III, alpha subunit	1,15	1,07	1,01	1,16	-1,00	-1,42	-2,15
ZCP4_1618	hypothetical protein	-1,75	-1,44	-1,00	1,01	3,90	19,72	22,83
ZCP4_1619	phosphoribosylformylglycinamide synthase I	1,16	1,10	1,04	1,05	1,00	-1,27	-1,28
ZCP4_1620	phosphoribosylformylglycinamide synthase, purS	1,07	1,09	1,03	-1,12	-1,34	-1,93	-2,15
ZCP4_1621	Capsular polysaccharide synthesis protein	-1,10	-1,07	-1,01	-1,07	1,08	1,60	2,06
ZCP4_1622	membrane fusion component of efflux system ZMO1529:ZMO1525	-1,05	1,03	-1,01	-1,04	-1,11	-1,22	-1,18
ZCP4_1623	inner membrane component of efflux system ZMO1529:ZMO1525	1,02	1,00	-1,09	-1,10	-1,27	1,00	1,19
ZCP4_1624	inner membrane component of efflux system ZMO1529:ZMO1525	1,02	1,00	-1,14	-1,19	-1,49	-1,07	1,03
ZCP4_1625	efflux transporter outer membrane factor lipoprotein	-1,06	-1,09	-1,09	-1,24	-1,76	-1,17	1,11

5. Παράρτημα

ZCP4_1626	hypothetical protein	1,02	1,04	1,09	1,07	1,10	1,14	1,34
ZCP4_1627	TonB-dependent receptor	1,13	1,20	1,47	1,29	-1,26	-1,65	-1,40
ZCP4_1628	hypothetical protein	-1,27	-1,23	-1,03	-1,05	-1,65	-3,67	-5,07
ZCP4_1629	hypothetical protein	1,40	1,41	1,07	-1,13	-1,49	-2,87	-3,71
ZCP4_1630	ribose-phosphate pyrophosphokinase	1,13	1,15	1,00	1,00	-1,79	-8,42	-11,50
ZCP4_1631	fructose 1,6-bisphosphatase	1,23	1,15	1,01	-1,18	-1,71	-4,78	-7,20
ZCP4_1633	50S ribosomal protein L20	1,06	1,07	-1,02	-1,14	-2,33	-8,21	-10,81
ZCP4_1634	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	1,11	1,10	1,01	1,00	-1,36	-2,80	-3,33
ZCP4_1635	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	1,05	1,02	-1,00	-1,03	-1,39	-2,55	-3,02
ZCP4_1636	ABC transporter related protein	-1,10	-1,15	-1,02	-1,09	-1,36	1,03	1,28
ZCP4_1637	hypothetical protein	1,19	1,16	1,02	1,10	-1,67	-9,61	-15,86
ZCP4_1638	protein-(glutamine-N5) methyltransferase, release factor-specific	1,28	1,25	1,08	1,02	-1,30	-2,08	-2,59
ZCP4_1639	peptide chain release factor 1	1,07	1,03	1,10	1,09	-1,35	-2,70	-2,80
ZCP4_1640	histidyl-tRNA synthetase	1,00	-1,01	1,07	1,07	-1,42	-2,50	-2,65
ZCP4_1641	Inorganic diphosphatase	1,16	1,12	1,10	1,03	-1,99	-7,34	-11,25
ZCP4_1642	hypothetical protein	1,03	-1,07	1,07	1,04	1,45	3,28	5,20
ZCP4_1643	hypothetical protein	1,14	1,12	-1,10	-1,24	-1,12	1,54	1,77
ZCP4_1644	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	1,12	1,14	-1,07	-1,16	-1,54	-2,43	-2,44
ZCP4_1645	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	1,10	1,09	-1,06	1,01	-1,25	-1,86	-1,87
ZCP4_1646	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	-1,02	-1,02	-1,09	1,02	-1,21	-2,85	-2,98
ZCP4_1647	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	-1,08	-1,05	-1,20	-1,12	-1,25	-2,61	-3,02
ZCP4_1648	phosphoribosyl-ATP diphosphatase	-1,12	-1,08	-1,07	-1,09	-1,10	-1,67	-2,29
ZCP4_1649	histidine triad (HIT) protein	-1,23	-1,26	-1,12	-1,28	-1,37	-2,34	-3,13
ZCP4_1650	amino acid permease-associated region	-1,18	-1,21	-1,06	-1,08	-1,46	-2,09	-1,79
ZCP4_1651	Phosphoenolpyruvate carboxylase	1,06	1,10	1,06	1,09	-1,07	-1,84	-2,28
ZCP4_1652	ATP/cobalamin adenosyltransferase	1,15	1,20	1,14	1,04	1,49	1,74	1,92
ZCP4_1653	acetylglutamate kinase	1,03	-1,00	-1,02	1,00	-1,40	-1,82	-1,72
ZCP4_1654	hypothetical protein	1,03	-1,01	1,01	-1,08	-1,11	1,09	1,30
ZCP4_1655	hypothetical protein	1,00	1,01	-1,01	-1,02	-1,33	-1,66	-1,83
ZCP4_1656	hypothetical protein	1,03	1,01	1,03	1,00	-1,37	-1,86	-1,85
ZCP4_1657	3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	1,00	-1,00	1,13	1,07	1,00	1,07	1,22
ZCP4_1658	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	-1,13	-1,16	-1,04	1,04	1,18	1,15	1,22
ZCP4_1659	diguanylate phosphodiesterase	1,09	1,34	1,19	1,12	1,20	1,14	1,13
ZCP4_1661	deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase	-1,35	-1,33	1,15	1,15	2,19	5,68	6,21
ZCP4_1662	UvrD/REP helicase	1,02	1,06	1,12	1,01	1,08	1,89	2,75
ZCP4_1663	outer membrane autotransporter barrel domain protein	1,32	1,39	1,07	1,00	1,36	1,46	1,59
ZCP4_1664	succinate--CoA ligase subunit beta	-1,20	-1,26	-1,05	1,06	1,20	1,27	1,25
ZCP4_1665	Electron transfer flavoprotein alpha/beta-subunit	-1,16	-1,13	1,07	1,17	1,58	1,42	1,21
ZCP4_1666	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	-1,21	-1,17	1,01	1,15	1,58	1,77	1,58
ZCP4_1667	6-phosphogluconolactonase	-1,27	-1,23	-1,02	1,05	1,67	2,74	2,58
ZCP4_1669	TonB-dependent receptor plug	1,27	1,38	-1,56	1,15	-2,11	-1,90	1,48

5. Παράρτημα

ZCP4_1670	hypothetical protein	1,11	1,06	1,11	-1,00	1,25	-1,11	-1,23
ZCP4_1671	GTP-binding protein TypA	1,21	1,25	1,15	1,18	-1,33	-4,95	-7,38
ZCP4_1672	Transglycosylase domain protein	1,35	1,59	1,22	1,24	-1,22	-5,61	-7,37
ZCP4_1673	alpha/beta hydrolase fold protein	-1,20	-1,16	1,01	1,35	1,89	3,34	4,40
ZCP4_1674	hypothetical protein	1,04	1,07	-1,04	-1,04	-1,62	-3,10	-2,65
ZCP4_1675	hypothetical protein	-1,19	-1,38	-1,07	-1,63	-1,85	-2,82	-1,35
ZCP4_1676	hypothetical protein	1,27	1,25	1,08	-1,17	-1,33	-1,07	1,20
ZCP4_1677	major facilitator superfamily MFS_1	1,32	1,35	1,19	-1,03	-1,06	1,24	1,31
ZCP4_1678	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	-1,05	-1,06	-1,11	-1,02	-1,31	-2,52	-2,17
ZCP4_1679	Resolvase domain protein	1,06	1,07	1,01	1,02	1,08	-1,02	-1,19
ZCP4_1680	major facilitator superfamily MFS_1	1,08	-1,02	1,01	1,05	-1,28	-3,25	-3,55
ZCP4_1681	purine nucleoside permease	1,08	1,12	1,10	1,06	-1,22	-3,40	-5,13
ZCP4_1682	Deoxyribodipyrimidine photo-lyase	1,13	1,14	1,06	1,05	1,13	-1,14	-1,28
ZCP4_1683	Mannitol dehydrogenase domain protein	-1,13	-1,06	1,09	1,21	3,13	7,68	7,52
ZCP4_1684	hypothetical protein	1,01	1,02	-1,22	-1,19	-1,54	-2,39	-4,58
ZCP4_1686	GumN family protein	-1,17	-1,19	-1,09	-1,12	-1,21	-1,02	-1,23
ZCP4_1687	glycyl-tRNA synthetase subunit alpha	1,08	1,05	-1,01	1,04	-1,30	-3,16	-3,75
ZCP4_1688	glycyl-tRNA synthetase, beta subunit	1,12	1,09	1,04	1,06	-1,36	-3,06	-5,11
ZCP4_1689	polysaccharide biosynthesis protein	1,13	1,21	1,22	1,05	1,21	-1,14	-1,26
ZCP4_1690	hypothetical protein	1,18	1,15	1,05	-1,09	-1,14	-1,07	-1,14
ZCP4_1691	FAD dependent oxidoreductase	-1,06	-1,18	-1,13	1,16	-1,13	-1,78	-2,29
ZCP4_1692	hypothetical protein	1,27	1,23	1,03	-1,08	-1,48	1,31	1,57
ZCP4_1693	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase	1,03	1,07	1,08	1,02	1,06	1,72	1,98
ZCP4_1694	transcriptional regulator, AsnC family	-1,10	-1,07	-1,03	-1,28	-1,53	-1,39	-2,00
ZCP4_1695	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	-1,01	-1,06	1,09	1,19	2,41	3,33	3,06
ZCP4_1696	hypothetical protein	1,26	1,24	1,11	1,04	-1,09	-1,82	-1,92
ZCP4_1697	leucyl-tRNA synthetase	1,02	-1,02	1,01	-1,04	-1,32	-2,73	-3,90
ZCP4_1698	hypothetical protein	1,19	1,17	1,02	1,06	-1,32	-1,88	-2,65
ZCP4_1699	DNA polymerase III, delta subunit	1,15	1,26	-1,05	-1,21	-1,67	-3,39	-3,82
ZCP4_1700	component of efflux system ZMO1432:ZMO1429	1,18	1,20	1,00	-1,06	-1,40	-3,69	-5,08
ZCP4_1701	component of efflux system ZMO1432:ZMO1429	1,04	1,03	1,01	-1,07	-1,25	-3,19	-3,46
ZCP4_1702	component of efflux system ZMO1432:ZMO1429	1,09	1,16	-1,01	-1,06	-1,39	-1,65	-1,46
ZCP4_1703	outer membrane component of efflux system ZMO1432:ZMO1429	1,05	1,03	-1,02	-1,06	-1,64	-4,58	-6,93
ZCP4_1704	diacylglycerol kinase catalytic region	1,07	1,15	1,04	-1,02	-1,12	-1,64	-1,23
ZCP4_1706	thiamine phosphate synthase	-1,02	-1,07	-1,19	-1,10	-2,68	-3,98	-4,54
ZCP4_1707	ATP-dependent chaperone ClpB	-1,37	-1,29	1,04	1,15	3,24	11,47	13,45
ZCP4_1708	peptidase M16 domain protein	-1,00	-1,04	-1,04	-1,03	-1,49	-1,70	-1,83
ZCP4_1709	peptidase M16 domain protein	-1,04	-1,08	1,02	1,11	1,24	1,18	1,02
ZCP4_1710	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	-1,04	-1,12	-1,08	1,07	-1,42	-2,91	-2,94
ZCP4_1711	5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide mutase	-1,05	-1,22	-1,19	-1,00	-1,37	-2,43	-2,32
ZCP4_1712	4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase	-1,09	-1,16	-1,05	1,03	1,34	2,46	2,89
ZCP4_1714	DEAD/DEAH box helicase domain protein	1,62	1,52	1,01	1,01	-1,76	-5,40	-8,96
ZCP4_1715	Scaffold protein Nfu/NifU	-1,24	-1,23	1,04	-1,14	1,29	5,04	6,21

5. Παράρτημα

ZCP4_1716	peptidase M22 glycoprotease	-1,06	-1,05	1,01	-1,06	1,43	4,16	4,89
ZCP4_1717	ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	1,06	1,10	1,06	-1,23	-1,03	1,98	1,64
ZCP4_1718	transcriptional regulator, MucR family	-1,01	1,01	1,04	-1,01	-1,09	-2,27	-2,85
ZCP4_1719	ferric uptake regulator, Fur family	1,25	1,25	1,06	1,05	1,13	-1,01	-1,05
ZCP4_1720	bacterioferritin	-1,48	-1,26	-1,02	-1,03	1,19	2,16	2,30
ZCP4_1721	BFD domain protein (2Fe-2S)-binding domain protein	-1,10	-1,07	1,06	1,02	1,20	3,06	3,19
ZCP4_1722	inositol monophosphatase	-1,00	1,01	1,13	1,09	1,29	1,42	1,28
ZCP4_1723	peptidase S9B dipeptidylpeptidase IV domain protein	-1,03	-1,05	1,01	1,00	-1,01	-1,32	-1,56
ZCP4_1724	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	-1,02	-1,05	-1,02	1,06	1,00	-1,63	-1,78
ZCP4_1725	alpha/beta hydrolase fold protein	-1,01	-1,07	-1,11	-1,11	-1,23	-1,12	-1,23
ZCP4_1726	two-component response regulator	1,01	-1,02	-1,08	-1,02	1,10	1,74	2,11
ZCP4_1727	RNA polymerase, sigma-24 subunit, ECF subfamily	1,43	1,29	-1,13	-1,11	1,07	1,38	1,45
ZCP4_1728	Peptidase M23	1,12	1,11	-1,04	-1,05	-1,88	-3,36	-4,26
ZCP4_1729	iron-sulfur cluster assembly accessory protein	-1,02	1,01	-1,03	-1,13	-1,09	3,11	3,27
ZCP4_1730	exodeoxyribonuclease III Xth	-1,01	-1,03	-1,11	-1,14	1,03	2,47	2,81
ZCP4_1731	hypothetical protein	-1,04	-1,02	1,05	1,10	-1,15	-3,29	-4,86
ZCP4_1732	fatty acid hydroxylase	-1,21	-1,12	1,07	1,16	1,40	1,33	1,15
ZCP4_1733	hypothetical protein	1,14	1,07	1,43	1,54	2,18	2,18	2,34
ZCP4_1734	hypothetical protein	1,16	1,17	1,12	1,06	1,16	1,08	1,03
ZCP4_1735	N-formylglutamate amidohydrolase	1,19	1,18	1,01	1,07	1,24	-1,01	-1,17
ZCP4_1736	permease YjgP/YjgQ family protein	1,00	1,06	1,01	-1,06	-1,15	1,19	1,42
ZCP4_1737	permease YjgP/YjgQ family protein	1,03	1,05	1,04	1,00	-1,07	1,16	1,40
ZCP4_1738	hypothetical protein	-1,22	-1,07	1,02	-1,14	1,47	-1,38	-2,20
ZCP4_1739	sphingosine kinase	1,00	1,06	1,03	-1,03	1,09	-1,24	-1,79
ZCP4_1740	hypothetical protein	1,12	1,04	-1,00	-1,11	1,05	1,40	1,62
ZCP4_1741	cytochrome c biogenesis protein transmembrane region	1,08	1,06	-1,23	-1,08	-1,60	-1,39	-1,14
ZCP4_1742	gamma-glutamyltransferase	-1,24	-1,30	-1,21	1,06	1,16	-1,17	-1,68
ZCP4_1743	two component transcriptional regulator, winged helix family	-1,04	-1,02	1,09	1,11	1,60	4,61	5,49
ZCP4_1744	hypothetical protein	-1,06	-1,08	1,00	1,15	2,28	11,91	13,88
ZCP4_1745	toxic anion resistance family protein	-1,08	-1,08	1,01	1,08	1,88	5,32	5,70
ZCP4_1746	GTP-binding protein Era	1,23	1,25	1,01	1,03	1,06	1,07	1,09
ZCP4_1747	aminotransferase class-III	-1,28	-1,31	-1,49	1,02	-1,29	-1,05	-1,03
ZCP4_1748	aminoglycoside phosphotransferase	-1,28	-1,07	-1,21	-1,24	-1,23	-1,53	-1,37
ZCP4_1749	transcriptional regulator, AraC family	-1,32	-1,46	-1,34	-1,21	-2,22	-4,01	-4,54
ZCP4_1750	ethanolamine transproter	-1,59	-1,75	-1,56	-1,12	-3,03	-2,65	-3,79
ZCP4_1751	hypothetical protein	-1,13	-1,25	-1,28	-1,10	-1,22	-2,08	-2,46
ZCP4_1753	Ribonuclease III	-1,15	-1,25	-1,09	-1,02	1,29	2,48	2,47
ZCP4_1754	hypothetical protein	-1,48	-1,16	1,07	1,45	5,00	11,51	11,66
ZCP4_1755	short chain dehydrogenase	-1,78	-1,36	-1,07	-1,04	2,46	5,79	5,81
ZCP4_1757	N-carbamoylputrescine amidase	1,06	-1,04	1,04	1,11	-1,11	-1,47	-1,64
ZCP4_1758	Agmatine deiminase	-1,04	-1,10	1,01	1,04	-1,26	-1,89	-2,16
ZCP4_1759	30S ribosomal protein S4	1,14	1,04	-1,12	-1,05	-2,20	-8,13	-11,59
ZCP4_1760	diguanylate cyclase with beta propeller sensor	1,09	1,11	-1,01	-1,10	-1,32	-1,52	-1,71

5. Παράρτημα

ZCP4_1761	coproporphyrinogen III oxidase	-1,00	-1,00	1,00	1,06	1,03	-1,19	-1,41
ZCP4_1764	hypothetical protein	-1,05	-1,10	-1,06	-1,18	-1,28	-2,05	-2,13
ZCP4_1765	thiamine pyrophosphate protein TPP binding domain protein	-1,03	-1,03	-1,03	1,00	-1,24	-2,73	-2,88
ZCP4_1766	30S ribosomal protein S20	1,27	1,29	-1,02	-1,18	-1,41	-3,71	-4,37
ZCP4_1826	fructose-bisphosphate aldolase	-1,72	-1,38	-2,39	-1,36	-1,35	-1,06	1,05
ZCP4_1833	succinate semialdehyde dehydrogenase	-1,31	-1,15	-1,17	-1,04	-1,11	-1,01	1,12
ZCP4_1924	glycosyl transferase	1,38	1,39	1,12	-1,06	1,12	1,67	2,16
ZCP4_RS00900	hypothetical protein	1,79	2,39	3,93	12,51	19,53	29,05	27,25
ZCP4_RS01055	Fis family transcriptional regulator	1,03	1,18	-1,08	-1,10	-1,09	-1,33	-1,59
ZCP4_RS02420	hypothetical protein	1,30	1,43	1,03	-1,25	-1,41	-1,74	-1,91
ZCP4_RS02450	hypothetical protein	-1,02	1,23	-1,14	-1,14	1,60	1,42	1,60
ZCP4_RS04065	hypothetical protein	-1,94	-2,05	1,08	-1,13	1,26	1,95	2,03
ZCP4_RS04120	ferredoxin	1,26	1,15	1,01	1,02	-1,21	-4,62	-6,96
ZCP4_RS04935	hypothetical protein	1,05	1,18	-1,16	-1,45	-1,46	-1,31	1,16
ZCP4_RS05670	hypothetical protein	1,59	1,82	2,14	2,35	2,78	5,32	7,07
ZCP4_RS06435	hypothetical protein	-1,17	1,06	1,23	1,13	-1,03	-1,64	-1,21
ZCP4_RS07620	Smr protein/MutS2	1,15	1,31	1,06	-1,02	-1,35	-1,66	-1,99
ZCP4_RS08200	hypothetical protein	-1,05	-1,10	-1,06	-1,14	-1,09	1,05	1,14
ZCP4_RS08335	hypothetical protein	1,29	1,29	-1,08	-1,57	-2,58	-2,22	-2,72
ZCP4_RS08520	DNA repair protein RadC	1,09	1,12	-1,10	-1,18	-1,23	1,21	1,44
ZCP4_RS08815	hypothetical protein	-1,07	-1,08	-1,16	-1,22	-1,44	-2,16	-2,19
ZCP4_RS08845	DUF264 domain-containing protein	-1,02	-1,10	1,12	-1,11	1,12	1,52	1,71
ZCP4_RS08850	phage portal protein	1,38	1,31	1,19	-1,31	-1,01	-1,05	-1,36
ZCP4_RS08855	hypothetical protein	-1,38	-1,32	-1,11	-1,28	-1,51	-1,42	-1,61
ZCP4_RS08860	hypothetical protein	-1,07	-1,07	-1,01	-1,19	-1,22	1,12	1,15
ZCP4_RS08865	hypothetical protein	1,26	1,22	-1,00	1,01	-1,14	-1,14	1,01
ZCP4_RS08875	hypothetical protein	1,11	1,08	-1,05	-1,09	-1,13	-1,07	-1,03
ZCP4_RS08880	hypothetical protein	1,11	-1,01	-1,17	-1,34	-2,16	-1,48	-1,39
ZCP4_RS08890	hypothetical protein	-1,14	1,29	-1,08	-1,15	-3,07	-2,70	-3,54
ZCP4_RS08900	hypothetical protein	1,25	1,30	-1,01	-1,05	-1,39	-1,06	1,13
ZCP4_RS08905	DUF891 domain-containing protein	-1,01	1,02	-1,01	-1,07	-1,23	-1,13	-1,80
ZCP4_RS08915	hypothetical protein	1,06	1,07	1,05	1,04	-1,47	-1,64	-2,04
ZCP4_RS08920	hypothetical protein	1,18	1,20	1,03	-1,07	-1,33	-1,10	1,23
ZCP4_RS08925	hypothetical protein	1,23	1,32	1,19	1,88	3,84	5,13	5,49
ZCP4_RS08930	DUF955 domain-containing protein	1,12	1,13	1,08	1,32	1,74	1,68	2,08
ZCP4_RS08940	addiction module antitoxin RelB	-1,16	-1,13	-1,00	-1,10	-1,38	-1,09	-1,04
ZCP4_RS08945	addiction module toxin, RelE/StbE family	1,07	1,24	1,01	1,31	1,35	2,26	2,52
ZCP4_RS08950	hypothetical protein	1,13	1,21	-1,00	1,08	1,21	1,61	1,68
ZCP4_RS08955	hypothetical protein	-1,60	-1,55	1,15	1,04	1,23	1,34	1,17
ZCP4_RS08960	hypothetical protein	-1,31	-1,43	1,14	1,07	1,48	2,69	3,32
ZCP4_RS08970	hypothetical protein	-1,05	-1,06	1,25	1,07	-1,05	1,72	1,57
ZCP4_RS08975	hypothetical protein	-1,14	-1,12	1,24	-1,05	1,32	4,37	4,17
ZCP4_RS08980	late control D family protein	1,13	1,18	1,19	1,01	-1,22	-1,19	-1,03

5. Παράρτημα

ZCP4_RS08995	phage tail tape measure protein	1,20	1,25	1,04	1,09	-1,16	1,13	1,44
ZCP4_RS09000	tail E family protein	-1,17	-1,20	1,09	-1,00	1,20	2,03	3,02
ZCP4_RS09005	hypothetical protein	-1,11	-1,05	1,05	1,08	1,43	2,75	3,78
ZCP4_RS09010	tail sheath protein	-1,02	-1,07	1,17	1,38	1,62	2,76	3,95
ZCP4_RS09015	phage baseplate assembly protein V	1,80	1,70	1,83	2,01	3,47	9,77	8,78
ZCP4_RS09035	baseplate assembly protein J	1,54	1,59	1,56	1,46	1,69	3,14	4,43
ZCP4_RS09045	hypothetical protein	-1,38	-1,31	1,24	1,01	1,22	2,44	2,63
ZCP4_RS09050	hypothetical protein	1,11	-1,33	1,04	1,47	1,24	2,31	4,91
ZCP4_RS09055	hypothetical protein	1,38	1,72	1,86	1,74	2,15	3,92	3,52
ZCP4_RS09060	N-acetylmuramyl-L-alanine amidase	1,12	1,02	-1,07	-1,05	-1,30	1,28	2,51
ZCP4_RS09065	hypothetical protein	-1,70	-1,11	-1,37	-1,17	-1,38	1,89	2,87
ZCP4_RS09075	head completion protein	-1,16	-1,07	-1,23	-1,14	-1,33	1,35	1,76
ZCP4_RS09085	phage capsid protein	1,38	1,25	1,20	1,16	1,23	1,54	1,12
ZCP4_RS09090	NADPH dehydrogenase	1,11	1,19	1,12	1,10	1,34	2,87	3,97
ZCP4_RS09095	aspartate racemase	1,04	1,24	-1,46	-1,16	-1,14	1,24	1,63
ZCP4_RS09100	D-cysteine desulfhydrase	-1,20	1,07	-2,42	-1,13	-1,20	-1,25	1,17
ZCP4_RS09105	iron-containing alcohol dehydrogenase	1,02	1,22	-2,23	-1,20	-1,48	1,02	1,23
ZCP4_RS09110	PfkB domain protein	-1,25	-1,06	-2,17	-1,33	-1,34	-1,01	1,45
ZCP4_RS09120	galactose mutarotase	-1,69	-1,34	-1,95	-1,33	-1,06	1,14	1,29
ZCP4_RS09125	fucose isomerase	-1,57	-1,27	-1,67	-1,15	1,16	1,56	1,72
ZCP4_RS09130	oxidoreductase	-1,30	-1,14	-1,20	-1,07	1,12	1,07	-1,02
ZCP4_RS09135	MFS transporter	1,46	1,50	-2,89	-1,38	-2,31	-1,81	1,03
ZCP4_RS09140	ligand-gated channel	-1,29	-1,02	-3,60	-1,48	-2,72	-2,45	-1,13
ZCP4_RS09145	MFS transporter	-1,43	-1,12	-1,88	-1,19	-1,00	3,00	4,43
ZCP4_RS09155	GCN5-related N-acetyltransferase	1,07	1,22	1,12	1,10	1,34	2,15	2,44
ZCP4_RS09160	CopG family transcriptional regulator	1,14	1,33	1,05	-1,01	-1,14	1,14	-1,06
ZCP4_RS09165	hypothetical protein	-1,15	-1,06	1,00	-1,02	-1,13	-1,06	1,06
ZCP4_RS09170	CopG family transcriptional regulator	1,15	1,25	1,19	1,09	-1,34	-2,95	-9,18
ZCP4_RS09175	hypothetical protein	-1,13	-1,09	-1,05	-1,12	1,02	1,11	-1,33
ZCP4_RS09180	hypothetical protein	1,02	1,10	-1,02	-1,18	-1,16	-1,09	-1,18
ZCP4_RS09185	hypothetical protein	1,21	1,44	1,33	1,96	1,33	1,89	2,63
ZCP4_RS09190	hypothetical protein	-1,58	-1,52	-1,85	-1,48	-1,26	1,06	-1,18
ZCP4_RS09195	hypothetical protein	-1,31	-1,36	-1,03	-1,32	-1,27	-1,24	1,00
ZCP4_RS09200	transcriptional regulator, HxlR family	1,10	1,02	-1,23	1,06	-1,88	-2,17	-3,58
ZCP4_RS09205	NADP oxidoreductase coenzyme F420-dependent	-1,23	-1,24	-1,05	-1,02	1,66	3,37	4,37
ZCP4_RS09210	glutathione S-transferase	-1,24	-1,10	1,13	1,14	2,16	3,46	3,86
ZCP4_RS09215	RND transporter	1,02	1,16	1,09	1,11	2,02	3,91	5,08
ZCP4_RS09220	TetR family transcriptional regulator	-1,18	-1,06	-1,06	-1,01	-1,04	-1,46	-1,39
ZCP4_RS09225	efflux transporter RND family, MFP subunit	1,02	1,10	1,06	1,21	1,52	1,20	1,25
ZCP4_RS09230	acriflavin resistance protein	-1,04	-1,06	-1,03	1,08	1,52	3,23	3,92
ZCP4_RS09235	TonB-dependent receptor	1,04	1,13	-1,05	-1,11	1,04	2,29	2,75
ZCP4_RS09240	AraC family transcriptional regulator	-1,01	1,08	1,05	-1,10	-1,28	-1,17	-1,53

5. Παράρτημα

ZCP4_RS09245	hypothetical protein	-1,07	1,01	1,06	1,02	-1,21	-1,74	-1,82
ZCP4_RS09250	protein parA	-1,09	-1,06	1,04	-1,09	-1,27	-1,43	-1,55
ZCP4_RS09255	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,12	-1,15	-1,05	-1,11	-1,29	-1,73	-2,18
ZCP4_RS09260	TonB-dependent receptor	-1,10	-1,01	1,18	1,17	1,35	-1,04	-1,30
ZCP4_RS09265	addiction module toxin, RelE/StbE family	1,16	1,29	1,18	1,09	1,14	1,62	1,71
ZCP4_RS09270	translation repressor RelB	-1,01	1,12	1,16	1,02	-1,07	-1,05	1,02
ZCP4_RS09275	hypothetical protein	1,10	1,11	1,16	1,19	1,30	1,47	1,70
ZCP4_RS09280	hypothetical protein	1,13	1,15	1,01	-1,10	-1,42	-2,16	-2,02
ZCP4_RS09290	hypothetical protein	-1,01	1,08	1,01	-1,26	-1,39	-1,24	-1,52
ZCP4_RS09295	hypothetical protein	1,28	1,03	1,27	1,56	2,11	1,81	2,24
ZCP4_RS09300	hypothetical protein	-1,17	1,02	-1,08	1,33	1,63	1,90	1,63
ZCP4_RS09305	hypothetical protein	-1,17	-1,16	-1,14	-1,32	-1,01	1,36	1,21
ZCP4_RS09315	hypothetical protein	-1,23	-1,37	1,07	1,06	1,71	2,95	2,60
ZCP4_RS09325	hypothetical protein	-1,13	-1,14	-1,02	1,06	-1,14	-1,83	-1,70
ZCP4_RS09330	hypothetical protein	1,09	1,10	-1,14	1,03	-1,00	-1,08	-1,01
ZCP4_RS09335	hypothetical protein	1,15	1,18	1,03	1,03	1,06	1,25	-1,01
ZCP4_RS09350	secretory lipase	1,00	1,07	1,03	-1,03	1,12	1,31	1,60
ZCP4_RS09355	hypothetical protein	-1,16	-1,08	1,00	-1,08	1,01	2,06	2,55
ZCP4_RS09360	lipoprotein	1,03	1,09	1,14	1,14	1,36	2,48	2,83
ZCP4_RS09365	ABC transporter related protein	-1,15	-1,16	1,00	-1,03	1,30	2,26	2,59
ZCP4_RS09370	ABC transporter related protein	1,01	1,03	1,09	1,13	1,47	2,40	2,80
ZCP4_RS09375	hypothetical protein	-1,31	-1,36	1,02	1,11	1,58	3,36	3,12
ZCP4_RS09380	hypothetical protein	1,17	1,22	1,10	-1,08	-1,35	-1,22	-1,35
ZCP4_RS09385	hypothetical protein	-1,12	-1,17	-1,05	-1,18	-1,11	-1,01	-1,22
ZCP4_RS09400	hypothetical protein	1,09	1,17	1,07	-1,13	1,04	1,62	1,64
ZCP4_RS09405	Appr-1-p processing domain protein	-1,09	-1,03	1,07	1,16	1,67	2,29	2,45
ZCP4_RS09410	hypothetical protein	1,06	1,19	1,32	-1,02	1,31	1,39	1,38
ZCP4_RS09415	transposase	1,07	-1,01	1,07	1,12	1,41	4,53	5,85
ZCP4_RS09425	DNA adenine methylase	1,13	1,11	1,01	-1,05	1,08	1,46	1,62
ZCP4_RS09430	hypothetical protein	1,06	1,15	-1,04	-1,15	-1,13	1,21	1,50
ZCP4_RS09435	hypothetical protein	1,01	1,02	1,02	-1,10	-1,02	1,52	1,79
ZCP4_RS09440	hypothetical protein	-1,12	1,08	1,09	1,09	1,44	2,83	3,54
ZCP4_RS09445	TonB-dependent receptor	1,14	1,15	1,09	1,01	1,38	2,30	3,03
ZCP4_RS09450	hypothetical protein	1,18	1,02	-1,01	1,02	-1,27	-3,09	-2,51
ZCP4_RS09455	hypothetical protein	-1,07	-1,06	1,03	1,05	-1,13	-2,20	-1,69
ZCP4_RS09460	addiction module toxin, RelE/StbE family	1,06	1,06	1,06	1,04	-1,07	-1,53	-1,33
ZCP4_RS09465	addiction module antitoxin RelB	-1,04	1,01	-1,08	-1,15	-1,78	-2,46	-2,05
ZCP4_RS09470	hypothetical protein	1,05	1,14	-1,07	-1,75	-1,12	-1,00	1,05
ZCP4_RS09475	hypothetical protein	-1,17	-1,11	1,00	-1,17	-1,07	1,14	1,26
ZCP4_RS09480	hypothetical protein	1,31	1,14	-1,19	-1,01	1,29	1,98	1,99
ZCP4_RS09485	type I restriction-modification system subunit M	-1,06	-1,10	-1,09	1,13	1,60	2,22	2,41
ZCP4_RS09490	restriction modification system DNA specificity	-1,09	-1,07	1,02	-1,00	1,38	2,16	2,22

5. Παράρτημα

ZCP4_RS09495	anticodon nuclease PrrC	-1,08	-1,01	-1,03	-1,06	1,20	2,22	2,27
ZCP4_RS09500	type I site-specific deoxyribonuclease HsdR	-1,08	-1,10	-1,07	-1,04	1,15	2,04	1,94
ZCP4_RS09505	hypothetical protein	-1,18	-1,13	1,08	-1,24	-1,50	-1,91	-1,86
ZCP4_RS09510	death-on-curing family protein	-1,02	1,13	1,10	1,21	1,68	2,98	3,79
ZCP4_RS09515	hypothetical protein	-1,43	-1,08	1,11	1,26	-1,99	-4,30	-5,20
ZCP4_RS09520	chromosome partitioning protein ParA	-1,26	-1,14	1,05	-1,05	-1,40	-1,54	-1,49
ZCP4_RS09525	autotransporter-associated beta strand repeat protein	-1,04	1,04	1,01	-1,12	1,12	1,18	1,24
ZCP4_RS09530	hypothetical protein	-1,07	-1,05	1,18	1,10	1,80	4,29	4,91
ZCP4_RS09545	UDP-N-acetyl glucosamine 2-epimerase	1,12	1,21	-1,06	-1,14	1,09	1,01	1,23
ZCP4_RS09555	bacteriophage N4 receptor, outer membrane	1,11	1,14	-1,01	-1,15	-1,07	-1,02	1,28
ZCP4_RS09560	DUF4434 domain-containing protein	-1,27	-1,24	-1,10	-1,20	1,15	2,36	2,70
ZCP4_RS09565	RepA replicase	1,04	1,12	-1,03	1,05	1,00	1,25	-1,02
ZCP4_RS09570	hypothetical protein	1,05	1,09	1,11	1,11	1,21	1,83	1,51
ZCP4_RS09575	hypothetical protein	-1,14	-1,25	1,19	1,36	-1,10	-1,34	-1,35
ZCP4_RS09580	hypothetical protein	1,13	1,17	1,02	-1,13	-1,25	1,17	1,05
ZCP4_RS09595	hypothetical protein	1,18	1,12	1,20	1,23	1,45	1,80	1,66
ZCP4_RS09600	hypothetical protein	1,31	1,58	1,52	1,16	1,17	1,10	-1,35
ZCP4_RS09610	DUF497 domain-containing protein	-1,20	-1,13	1,05	-1,23	-1,02	1,53	1,79
ZCP4_RS09615	transcriptional regulator	-1,15	-1,12	1,14	-1,08	1,09	1,46	1,15
ZCP4_RS09620	transcriptional regulator	1,05	1,02	1,04	-1,04	1,24	2,20	2,28
ZCP4_RS09640	RNase P RNA	1,00	-1,35	-1,15	1,00	-1,35	1,00	1,00
ZCP4_RS09645	phage capsid scaffolding protein	1,59	1,49	1,85	2,28	1,99	1,55	1,24
ZCP4_RS09650	hypothetical protein	-1,51	-1,20	1,29	1,08	1,63	2,44	2,85
ZCP4_RS09655	P2 GpU family protein	-1,19	-1,02	-1,14	1,01	-1,28	-1,50	-1,16
ZCP4_RS09660	hypothetical protein	-1,31	-1,19	-1,08	-1,10	-1,22	1,08	1,16
ZCP4_RS09665	hypothetical protein	1,17	1,39	1,31	1,10	1,03	1,53	1,49
ZCP4_RS09670	hypothetical protein	-1,56	-1,39	-1,02	-1,37	-1,29	1,71	1,75
ZCP4_RS09675	hypothetical protein	1,74	1,40	1,06	1,27	1,01	1,04	-1,19
ZCP4_RS09680	hypothetical protein	1,15	1,16	1,15	1,19	1,47	1,87	1,65
ZCP4_RS09685	hypothetical protein	1,73	2,24	1,25	1,11	1,47	2,90	2,39

Με κλιμακώσεις του κόκκινου χρώματος στα κελιά συμβολίζονται οι διαφορετικοί λόγοι υπερέκφρασης (πορτοκαλί: 1,45-1,49, σκούρο πορτοκαλί: 1,50-1,99, κόκκινο: 2,00-4,99, σκούρο κόκκινο: 5,00 και άνω). Με κλιμακώσεις του πράσινου χρώματος στα κελιά συμβολίζονται οι διαφορετικοί λόγοι υπερέκφρασης (ανοιχτό πράσινο: -1,45 - -1,49, πράσινο: -1,50 - -1,99, σκούρο πράσινο: -2,00 - -4,99, σκούρο πράσινο: -5,00 και κάτω).

Πίνακας 5.8. Επιδιορθωτικά γονίδια του *E. coli* ανά κατηγορία επιδιόρθωσης και τα ομόλογά τους στο *Z. mobilis* CP4

Γονίδιο στο <i>E. coli</i>	Χαρακτηρισμός προϊόντος γονιδίου στο <i>E. coli</i>	Locus tag στο CP4	Χαρακτηρισμός προϊόντος γονιδίου στο CP4
Άμεση επιδιόρθωση			
<i>ada</i>	fused DNA-binding transcriptional dual regulator/O6-methylguanine-DNA methyltransferase		
<i>alkB</i>	oxidative demethylase of N1-methyladenine or N3-		

5. Παράρτημα

	methylcytosine DNA lesions		
<i>phr</i>	deoxyribodipyrimidine photolyase, FAD-binding	ZCP4_1682	Deoxyribodipyrimidine photolyase, FAD-binding
<i>ogt</i>	O-6-alkylguanine-DNA:cysteine-protein methyltransferase		
Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης			
<i>alkA</i>	3-methyl-adenine DNA glycosylase II		
<i>fpg (mutM)</i>	formamidopyrimidine/5-formyluracil/5-hydroxymethyluracil DNA glycosylase	ZCP4_0147	Formamidopyrimidine/5-formyluracil/5-hydroxymethyluracil DNA glycosylase
<i>mug</i>	G/U mismatch-specific DNA glycosylase	ZCP4_1573	G/U mismatch -specific DNA glycosylase
<i>mutY</i>	adenine glycosylase	ZCP4_1485	Adenine DNA glycosylase
<i>nei</i>	endonuclease VIII and 5-formyluracil/5-hydroxymethyluracil DNA glycosylase		
<i>nfi</i>	endonuclease V		
<i>nfo</i>	endonuclease IV with intrinsic 3'-5' exonuclease activity		
<i>nth</i>	DNA glycosylase and apyrimidinic (AP) lyase (endonuclease III)	ZCP4_0590	DNA glycosylase AP lyase
<i>tag</i>	3-methyl-adenine DNA glycosylase I, constitutive		
<i>ung</i>	uracil-DNA-glycosylase	ZCP4_0149/ZCP4_1512	Uracil-DNA glycosylase
<i>udg</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	ZCP4_0489	UDP-glucose 6-dehydrogenase
<i>xthA</i>	exodeoxyribonuclease III	ZCP4_1463/ZCP4_1730	Exodeoxyribonuclease III/Exodeoxyribonuclease III-AP endonuclease
Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου			
<i>mfd</i>	transcription-repair coupling factor	ZCP4_1515	Transcription-repair coupling factor
<i>uvrA</i>	ATPase and DNA damage recognition protein of nucleotide excision repair excinuclease UvrABC	ZCP4_1568	Excinuclease ABC subunit A
<i>uvrB</i>	exision nuclease of nucleotide excision repair, DNA damage recognition componen	ZCP4_0909	Excinuclease ABC subunit B
<i>uvrC</i>	excinuclease UvrABC, endonuclease subunit	ZCP4_0620	Excinuclease ABC endonuclease subunit
<i>uvrD</i>	DNA-dependent ATPase I and helicase II	ZCP4_0705/ ZCP4_1662	DNA-dependent ATPase I and helicase II/ DNA-dependent ATPase I and helicase II
Επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων			
<i>dam</i>	DNA adenine methyltransferase		
<i>mutH</i>	methyl-directed mismatch repair protein		
<i>mutL</i>	methyl-directed mismatch repair protein	ZCP4_0916	Methyl-directed mismatch repair protein
<i>mutS</i>	methyl-directed mismatch repair protein	ZCP4_1274	Methyl-directed mismatch repair protein
<i>vsr</i>	DNA mismatch endonuclease of very short patch repair		
<i>xseA</i>	exonuclease VII, large subunit		
<i>xseB</i>	exonuclease VII small subunit		
Επιδιόρθωση μέσω ανασυνδυασμού			
<i>radA (sms)</i>	DNA repair protein	ZCP4_0693	DNA repair protein RadA
<i>recA</i>	DNA recombination and repair protein; ssDNA-dependent ATPase; ATP-dependent homologous DNA strand exchanger; recombinase A; LexA autocleavage cofactor	ZCP4_0166	Recombinase A
<i>recB</i>	exonuclease V (RecBCD complex), beta subunit		
<i>recC</i>	exonuclease V (RecBCD complex), gamma chain		
<i>recD</i>	exonuclease V (RecBCD complex), alpha chain		

5. Παράρτημα

<i>recE</i>	exonuclease VIII		
<i>recF</i>	gap repair protein	ZCP4_1571	Recombination protein F
<i>recG</i>	ATP-dependent DNA helicase	ZCP4_1516	ATP-dependent DNA helicase
<i>recJ</i>	ssDNA exonuclease, 5' --> 3'-specific	ZCP4_0105	ssDNA exonuclease RecJ
<i>recN</i>	recombination and repair protein	ZCP4_1251	DNA replication and repair protein RecN
<i>recO</i>	gap repair protein	ZCP4_0619	DNA repair protein RecO
<i>recQ</i>	ATP-dependent DNA helicase		
<i>recR</i>	gap repair protein	ZCP4_0494	Recombination protein RecR
<i>recT</i>	recombination and repair protein RecT		
<i>recX</i>	regulatory protein for RecA		
<i>rus</i>	endonuclease RUS		
<i>ruvA</i>	component of RuvABC resolvasome, regulatory subunit	ZCP4_1086	Holliday junction DNA helicase RuvA
<i>ruvB</i>	ATP-dependent DNA helicase, component of RuvABC resolvasome	ZCP4_1083	Holliday junction DNA helicase RuvB
<i>ruvC</i>	component of RuvABC resolvasome, endonuclease	ZCP4_1087	Crossover junction endodeoxyribonuclease RuvC
<i>sbcB (exol)</i>	exodeoxyribonuclease I		
<i>sbcC</i>	exonuclease, dsDNA, ATP-dependent		
<i>sbcD</i>	exonuclease, dsDNA, ATP-dependent		
<i>ssb</i>	single-stranded DNA-binding protein	ZCP4_1613	Single-stranded DNA-binding protein
SOS επιδιόρθωση			
<i>lexA</i>	SOS regulon transcription repressor	ZCP4_1046	Transcription repressor of SOS regulon LexA
<i>umuC</i>	SOS mutagenesis		
<i>umuD</i>	SOS mutagenesis		
Επιδιόρθωση-Αντιγραφή			
<i>polA</i>	5' to 3' DNA polymerase and 3' to 5'/5' to 3' exonuclease	ZCP4_1021	5' to 3' DNA polymerase and 3' to 5'/5' to 3' exonuclease
<i>polB</i>	DNA polymerase II		
<i>polC/dnaE</i>	DNA polymerase III	ZCP4_1616	DNA polymerase III alpha subunit
Άλλα			
<i>mutT</i>	Repairs 8-oxy-dGTP, GTP		
<i>radC</i>	DNA repair protein RadC	ZCP4_0629	DNA repair protein RadC

Τα κενά κελιά υποδηλώνουν ότι δεν βρέθηκε ομόλογο γονίδιο στο CP4

Πίνακας 5.9 Τα SOS-ρυθμιζόμενα υπερεκφραζόμενα γονίδια του CP4 και οι χειριστές τους

Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)							SOS χειριστές	d
		0.05	0.1	0.2	1	5	10	15		
ZCP4_0005	FtsH-interacting integral membrane protein	-1,21	-1,20	1,03	1,02	2,50	11,67	19,43	GTTACAATCTTATTC	-192
									GTTGAATATAATTTTC	-159
									CAACAATATCTCAAT	-31
ZCP4_0014	putative metalloprotease	-1,33	-1,27	1,13	-1,01	1,78	3,90	5,37	GTTCTGCAAGCGTTT	-107
									GAACACTATGTCAAT	-164
ZCP4_0015	arabinose efflux permease family protein	-1,38	-1,40	-1,04	-1,01	2,31	8,43	12,45	AAACATCTTCCCAAT	-76
									TTTTTCCCACTTTTC	-101
ZCP4_0016	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	1,04	-1,18	1,07	1,08	1,20	1,65	2,12		

5. Παράρτημα

ZCP4_0019	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV	-1,29	-1,24	-1,06	1,22	3,37	11,60	12,31	TAATCCAGACTGAAG	-258
									GAAGCGTTTATCAAA	-175
ZCP4_0020	hypothetical protein	-1,32	-1,32	1,03	-1,02	1,89	2,33	2,08	TTTTATTGATTGTTG	-245
									ATTGTTGGCCGGTTT	-237
									GTTGGCCGGTTTTTA	-234
									GTTTTTGTGGTTTT	-226
									CTTTTGTGTTGTTT	-33
									TTTTGACCGGAGTTT	-21
									TTTGACCGGAGTTTC	-20
ZCP4_0029	two component transcriptional regulator, winged	1,44	1,40	1,07	1,09	-1,03	1,54	2,23	GAAGCGAAATAAAT	-107
									TTTCGCAATGATTTA	-34
ZCP4_0028	histidine kinase related to acid and other stresses	1,11	1,02	-1,03	1,05	1,04	1,42	1,69		
ZCP4_0039	periplasmic chaperone for outer membrane	1,11	1,13	1,06	1,03	1,17	1,90	1,75	GAAGTCTTGTTGGAAG	-8
									AAATTTATAGTGAAA	-70
ZCP4_0038	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	1,11	1,11	1,05	1,09	1,28	2,17	2,26		
ZCP4_0037	dimethyladenosine transferase	1,15	1,08	-1,01	-1,07	-1,05	1,32	1,19		
ZCP4_0041	leucyl aminopeptidase	-1,13	-1,23	-1,02	1,03	1,47	2,28	2,11	GTTTTTGCCTGTTTC	-174
									ATTCCTTGATATTC	-87
									TTTGAATGAGAGTTT	-21
ZCP4_0042	DNA polymerase III subunit chi	1,22	1,19	1,07	-1,04	1,34	2,86	2,65		
ZCP4_0046	hypothetical protein	1,11	1,11	1,01	1,02	1,13	2,13	2,23	AAAAAGCGAATAAAC	-96
									TTTCGCGTGAATTTT	-74
									TTTACTATTTTCATTC	-36
									TTTCATTCTGCCTTG	-29
ZCP4_0047	pyrroline-5-carboxylate reductase	-1,06	-1,09	1,03	1,07	1,21	1,96	1,90		
ZCP4_0050	hypothetical protein	-1,08	-1,12	1,05	1,06	1,39	2,06	2,43	CAAACACTGACATAAC	-46
									GAATTTCCGGTTAAT	-28
									CTTTCTCTATTTTC	-188

5. Παράρτημα

									ATTAATAATCCTTC	-151
ZCP4_0055	hypothetical protein	-1,73	-1,37	-1,27	-1,31	1,71	3,69	4,79	GAACAGATGTAAAG	-70
									TTTTGAAAAATTC	-93
									TTTTTAAGGGAGTTT	-20
ZCP4_0056	sugar phosphate permease	1,06	-1,04	1,03	1,02	1,22	1,83	2,69	GAAGATAGGGACAAA	-104
									TTTAAACGGGGCTTC	-76
ZCP4_0057	Membrane bound FAD containing D-sorbitol	-1,44	-1,44	-1,19	1,05	1,46	5,51	6,01	AAACAAGCCTCAAAA	-169
									GAAATATTTGAAAT	-103
									TAAAATATAATAAAC	-73
ZCP4_0058	glucose-methanol-choline oxidoreductase	-1,60	-1,60	-1,12	-1,07	1,19	4,81	4,26		
ZCP4_0059	cytochrome c, mono- and diheme variants family	-1,43	-1,55	-1,19	-1,12	1,13	4,92	4,43		
ZCP4_0060	transcriptional regulator. LacI family	-1,14	-1,21	-1,03	1,13	1,36	2,28	2,55	GTTTCTTAAAAGTTT	-78
									TTTCTATTGATTTTC	-209
									GAATGATATTAATAA	-248
									AAAACAGGGTTGAAT	-236
									TAAATGTTTGTTAAC	-166
									TAACACATATAAAAT	-147
									TAAAATGAAAATAAC	-138
									AAAGTGATCGGAAG	-26
									TTTCTTAAAAGTTTT	-77
									GTTTTGCTCTTTTTT	-67
									ATTTATTGTGACTTC	-7
ZCP4_0067	succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase	1,13	1,16	1,26	1,32	1,98	2,54	2,36	GAAAAAATGAGGAAG	-27
									ATTCGAGCGTTCTTT	-65
ZCP4_0068	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	-1,12	-1,13	-1,03	-1,02	1,66	4,12	6,52	TAAAGTTTCCTAAC	-19
									TAACGCATGGAAAG	-8
ZCP4_0087	Protein of unknown function (DUF3617)	1,78	2,18	1,59	1,29	1,26	-1,27	-1,73	GTTGATCGGCTTTTC	-179
									GTTTTTACGAGGCTC	-154
									AAACAATCACCTAAA	-64
ZCP4_0093	D-isomer specific 2-	-1,42	-1,23	1,16	1,18	4,19	31,37	30,32	GTTCTATAAAAAGTTA	-103

5. Παράρτημα

	hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding protein									
									GAAATCATCACCAAA	-256
									GAATCCTCTTAAAAA	-182
									ATTCTTCGCTCTTTG	-289
									CTTCTCGGGCATTIT	-206
									CTTCAAAAAACTTTT	-29
ZCP4_0094	Zn-dependent alcohol dehydrogenase	-1,20	-1,10	1,05	1,17	4,24	6,93	5,62	GTTTCATATGTTTTTG	-7
									ATTCTATGACTTTTT	-191
ZCP4_0095	transcriptional regulator	-1,09	-1,15	1,03	1,09	1,39	3,47	3,81	CTTGTCATATGTTT	-10
									AAACAACCTCCAAG	6
									TTTCATACAGAATT	-168
									ATTTAAAGGCTGTT	-81
									TTTTATGGGGCATT	-68
ZCP4_0119	hypothetical protein	-1,23	-1,25	1,02	1,03	1,26	2,69	2,18	GAACCGTATCCGACC	-34
									AAATGGGACAGGAAC	-273
									AAAGAGATCCGAAA	-285
									CAATCATAGAATAAC	-19
									ATTTTATAATGATT	-103
ZCP4_0118	signal transduction histidine kinase	-1,39	-1,40	1,07	1,04	1,83	4,66	5,75		
ZCP4_0122	glucose-6-phosphate isomerase	1,03	1,02	1,07	1,02	1,38	2,62	3,10	TTTCAGTCTTGTTA	-109
									GAATCGCAAATAAAG	6
									GTTTCTACTTAATTA	-128
									TTTAGGAGAGCGTTG	-18
ZCP4_0130	hypothetical protein	-1,53	-1,26	1,17	1,17	1,65	2,82	2,88	AAAGGCATTAAGAAC	-141
									GAATCTGATACAAAA	1
									GAAAGGCTATAAAAA	-209
									AAATAAGGAAGGAAA	-170
									AAAAAAGGGTGAAAA	-17
									AAAAAAGGGTGAAAC	-16
ZCP4_0135	5-aminolevulinic acid synthase	-1,03	1,01	1,04	1,07	1,23	1,55	1,52	GTTTTTTTCGTTTTT	-117
									TTTTTTTCGTTTTTT	-115
									TTTAAGACAGGGTTA	-88
ZCP4_0138	acyl-phosphate glycerol-3-phosphate	1,07	1,03	1,03	1,06	1,01	1,51	1,86	GAAGCATATTTGAAT	-32
									TTTGACCTTGCTTTC	-79

5. Παράρτημα

									TTTCATTCCGCTTTA	-60
ZCP4_0139	DNA protecting protein DprA	-1,03	-1,05	-1,15	-1,04	-1,43	-2,65	-2,17		
ZCP4_0140	DNA topoisomerase I. bacterial	-1,00	-1,11	-1,12	1,02	-1,07	1,60	1,83	GTTTATCATTTTTTC	-93
									TAAATTGCGCGGAAT	-29
									TTTTTTGTTGCTTTC	-148
									TTTCAAAGGGATTTT	-82
ZCP4_0147	Formamidopyrimidine/5-formyluracil/5-hydroxymethyluracil DNA glycosylase	-1,52	-1,50	1,09	-1,18	1,29	4,45	5,47	TTTCTGGATATATTC	-39
									TTTCTGGATATATTC	-39
									CAATTTAAACGGAAG	-22
									GTTATTTGATCCTG	-146
									TTTTGGTCAATGTTA	-100
ZCP4_0149	Uracil-DNA glycosylase	-1,08	-1,05	1,07	-1,10	1,06	2,19	3,62	TTTCTATTATTCTTC	-119
									GAAGAATAATAGAAA	-134
									AAAGTCTTCTGGAAT	10
									TAAAAGGAAAGGAAG	-145
									GAAAGGAAGAATAAT	-139
									CTTCAAAGGGTTT	-110
ZCP4_0148	Lytic transglycosylase catalytic	-1,14	-1,13	1,01	-1,12	-1,20	1,05	1,30		
ZCP4_0152	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol	1,06	1,09	1,12	1,08	1,18	1,88	2,48	TTTCTAATCCGTTA	-63
									AAAAACATTTAAAC	-268
									AAAGTTGTTAGAAA	-91
									TTTTTAAAAAATTC	-237
									TTTTTATAGTGTTA	-222
									ATTCATTATCGATT	-121
									GTTATAGCCCTATT	-52
									ATTTAAGAATGTTA	-41
									GTTACGTCAATTATA	-30
ZCP4_0164	putative N-acetylglucosamine kinase	1,07	1,02	1,13	1,12	1,24	1,51	1,84	CAACAGATTTTGAAA	-101
									AAAATTTCTGGCAAC	-88
									ATTTTGAAAAATTC	-95
									ATTTTTGGGGTTG	7
ZCP4_0163	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	-1,04	-1,05	-1,07	-1,04	-1,07	1,17	1,17		

5. Παράρτημα

	ase									
ZCP4_0165	putative hydrolase. CocE/NonD family	-1,04	-1,02	1,11	1,21	1,46	1,66	1,76	GTTCTTGTCACCTTA	-98
									TTTATGAATCTGTTT	-83
									GTTTTCTTTTCTTT	-55
									TTTCTTTTCTTTT	-53
									GTTATGTCTCGATTA	-4
ZCP4_0166	protein RecA	1,09	1,14	1,18	1,75	3,22	9,32	10,23	GTTCACCTTATGTTT	-104
									TTTGAGAATAAATTC	-215
									CTTGCTATTCTGTTT	-130
ZCP4_0167	putative amidophosphoribosyltransferase ComF	1,26	1,38	1,30	2,03	2,44	2,94	2,63		
ZCP4_RS00900	hypothetical protein	1,79	2,39	3,93	12,51	19,53	29,05	27,25	GAACATTTGAAGAAC	-51
ZCP4_0173	Aspartate racemase	-1,19	-1,06	1,23	1,83	3,73	7,72	7,30		
ZCP4_0206	signal transduction histidine kinase involved in	1,03	1,04	1,01	-1,13	1,19	2,18	2,30	AAACCTTGCTTAAA	-266
									CTTTGCTTAAAGTTG	-262
									TTTCTTGAAATTTTG	-94
									TTTGTAGTATCGTTG	-24
ZCP4_0207	two component, sigma54 specific, transcriptional regulator, Fis family	1,01	-1,05	1,01	1,01	1,07	1,70	1,75		
ZCP4_0217	NADH dehydrogenase. FAD-containing subunit	-1,25	-1,31	-1,08	1,06	1,74	1,95	1,97	GTTCTTCGTTAGTTA	-217
									GAAACAGATTTGAAT	-110
									TAATTTATGTGAAAC	-120
									TAAATGTCGAAGAAT	-3
									ATTTGAATGTTCTTC	-103
ZCP4_0218	intracellular septation protein A	1,12	1,16	1,03	1,03	1,13	1,44	1,81	TAACTAACGAAGAAC	-184
ZCP4_0266	superoxide dismutase	-1,39	-1,43	-1,23	1,07	1,70	3,26	3,18	TTTCACCATAGGTTT	-47
									CAAAAAAGATTAAAC	-228
									TAAACTTTAAAGAAA	-218
									AAACTTTAAAGAAAT	-217
									TAAAATTGCATTAAC	-149
									CAACTGAAATATAAT	-134
									GTTGCTGCGTTCTTT	-59
ZCP4_0276	phosphate ABC	-1,10	-1,04	1,12	1,11	1,62	2,35	2,26	AAATTTATAAAAAAC	-107

5. Παράρτημα

	transporter substrate-binding									
									TTTCTGTCATTTTGG	-89
ZCP4_0275	phosphate ABC transporter, inner membrane subunit PstC	1,09	1,08	1,08	1,03	1,11	1,26	1,54		
ZCP4_0274	phosphate ABC transporter, inner membrane subunit PstA	1,17	1,23	1,14	1,13	1,21	1,39	1,58		
ZCP4_0273	phosphate ABC transporter, ATPase subunit	-1,06	-1,12	1,06	1,04	-1,11	-1,17	-1,17		
ZCP4_0312	hypothetical protein	-1,32	-1,20	-1,04	-1,13	1,18	2,62	2,96	AAATTAAGGAGAAT	-17
									GTTATGATTGTTTTA	-31
ZCP4_0318	amino acid/peptide transporter (peptide:H)	1,02	1,05	1,24	1,01	1,21	2,22	2,72	GAAGCAGGGTTGAAA	-73
									GAAAAAAGGCAGAAA	-62
									GAATAAAAGACAAAA	-176
									GAAGGGATTCCAAAA	-147
ZCP4_0321	methionine-S-sulfoxide reductase	-1,49	-1,34	1,10	-1,01	2,04	6,25	6,28	GTTTTGCTTAACCTC	-277
									GAAACTTTTTTAAAT	-33
									TTTTTTTATGTGTTT	-288
									TTTAGGCGTTTGTTG	-246
ZCP4_0324	hypothetical protein	-1,37	-1,27	1,00	1,12	2,00	1,85	1,61	GAATATATCTGTAAC	-35
ZCP4_0326	molecular chaperone (small heat shock protein)	-1,02	-1,04	1,40	1,57	4,18	9,43	10,80	AAAGGATTAGAGAAT	-16
									TTTCTGATCCCATTT	-270
									TTTTTATCATCATTC	-202
									TTTCTAAAAATCTTG	-138
ZCP4_0327	putative small protein containing a coiled-coil	-1,02	1,06	-1,26	-1,15	1,08	1,65	1,72	GAACAATGACGCAAT	2
ZCP4_0338	ABC-type Fe ³⁺ -hydroxamate transport system.	1,16	1,08	1,14	1,28	1,96	3,51	3,98	CAATCTTGTGGAAC	-6
									TTTTGCACCTTGTTT	-94
									GAAACCCTATGCAAAA	-58
									AAACCCTATGCAAAA	-57

5. Παράρτημα

									ATTCAGTGGCTTTTT	-147
ZCP4_0339	putative oxidoreductase. aryl-alcohol	-1,34	-1,26	-1,05	1,10	1,77	5,39	5,63	GAGTTTCTGATGAAC	-10
ZCP4_0356	monofunctional biosynthetic peptidoglycan	-1,38	-1,43	-1,04	1,10	1,17	1,59	1,50	AAACTCTGCTATAAA	-77
									TTTTTCGCTTTTTTC	9
ZCP4_0362	putative rRNA methylase SpoU family	1,03	1,01	-1,02	1,08	1,24	1,71	1,53	TTTCGAGGAAGCTTC	-178
									CAATTCTTATCCAAC	-150
									TTTTTGAATCAATTC	-159
									TTTCAGCGTGTITTT	-105
ZCP4_0363	coproporphyrinogen III oxidase	1,05	1,13	1,01	1,14	1,61	2,53	2,17		
ZCP4_0364	GCN5-related N-acetyltransferase	-1,17	-1,12	-1,01	1,04	1,05	1,34	1,03		
ZCP4_0365	endopeptidase Clp ATP-binding regulatory subunit	1,08	1,03	1,03	1,07	1,71	4,64	4,73	AAACGATTTTGGAAT	-51
									AAACTGGCGCTAAAA	-63
									GAAAGCGGCTAAAAAG	-32
									ATTGATAAAGTCTTC	-200
ZCP4_0366	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	-1,06	-1,02	1,10	1,07	2,31	6,45	7,03	GAATTAGTAAGCAAG	-62
									TAACCTTCGCCAAAT	-35
ZCP4_0372	beta-fructofuranosidase	-1,36	-1,24	1,02	1,01	1,97	5,13	5,38	AAATTTCTTTTGAAA	-132
									CAAAAAATATAGAAA	-106
ZCP4_0374	nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	-1,41	-1,47	1,05	-1,17	1,48	6,31	8,00	GAAACGGGCTTGAAA	-86
									AAACGGGCTTGAAA	-85
									TTTCTAAAAATTTTT	-63
ZCP4_0375	transcriptional regulator	-1,17	-1,21	1,06	1,05	1,23	1,91	2,08	TTTCTCAATCAATTC	-65
									GAAGCTATTATAAAA	-116
									TAAAAAATTCAGAAT	-106
									TTTCCCATATTTTA	-40
									TTTTATTTATTTTTTC	-30
ZCP4_0376	guanine deaminase	-1,12	-1,17	1,04	1,06	1,44	2,83	3,74		
ZCP4_0378	aspartate/tyrosine/aromatic aminotransf	-1,03	1,04	1,38	1,39	2,49	2,50	1,92	TAAATTGCGTTTAAC	-49

5. Παράρτημα

	erase									
									CTTTATCCTTGTTTC	-70
									GTTTAACCTCTTTT	-41
ZCP4_0379	DMT(drug/metabolite transporter) superfamily	1,33	1,40	1,39	1,27	2,45	4,86	6,59	TAATATTATGTGAAT	-66
									ATTATAGTGCGGTTA	-53
ZCP4_0380	glutathione S-transferase	-1,45	-1,30	1,03	1,05	1,65	3,01	3,11	GAAAAACAAATGAAA	-10
									CAAGGTGACAAAAAC	-98
ZCP4_0381	hypothetical protein	-1,21	1,03	1,39	2,60	1,45	1,99	2,10	GAACATAACAAGAAC	-31
									TAATACAACCTCAAC	-104
									CAACTCCAACAAAAA	-99
									TAACAAGAACAAAAA	-27
									ATTCAATAAATATTG	-130
ZCP4_0382	putative secretion activating protein	-1,06	-1,05	1,16	2,39	1,77	2,95	2,59	TAAATGATCGGAAT	-58
									ATTTTCAGGAAATTC	-73
									CTTCTCGACTGTTA	-39
ZCP4_0389	cold-shock DNA-binding protein family	1,10	1,14	1,13	-1,02	-1,03	1,57	1,93	GAATGCCGAATAAAC	-2
									TTTCTTCTTCTTTC	-47
									AAAAATTAAGAGAAA	-187
									AAAGGCTTTTAGAAA	-123
									CTTCGGGCAGCTTTT	-166
ZCP4_0395	diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing	1,26	1,22	1,06	-1,17	1,10	2,63	2,94	TTTCACTGTCTGTTA	-101
									AAATAGTTTTTGAAA	-32
									GTTATCTGTATTTTT	-90
									GTTGTACATTTCTTG	2
ZCP4_0405	ABC-type polysaccharide/polyol phosphate	-1,18	-1,15	1,03	-1,07	1,23	1,69	1,63	GAATAAATTATTA	-43
									TAAAGCTATTCGAAA	-32
ZCP4_0406	glycosyl transferase group 1	1,03	1,07	1,07	-1,02	1,12	1,33	1,50		
ZCP4_0407	lipopolysaccharide biosynthesis protein	1,08	1,13	1,06	1,01	-1,16	-1,37	-1,16		
ZCP4_0413	outer membrane receptor protein	1,10	1,09	1,18	1,13	6,42	22,73	25,43	GTTTCATCGTATATTC	-79
									ATTCATGGACATTTTC	-69
									AAATCTTATTGAAT	-183

5. Παράρτημα

									ATTTTTTAAACTTC	-140
									ATTTTGTAAACATTTTC	-103
ZCP4_0462	Alg9-like mannosyltra nsferase family protein	1,02	1,05	1,16	1,01	1,18	1,58	2,35	TAAACATAAAGGAAT	-259
									GTTATCAATTTCTTT	-134
ZCP4_0464	Kef-type potassium/p roton antiporter. CPA2	-1,04	-1,03	-1,01	-1,02	1,30	1,68	1,97	CAAAAGCGAATAAC	-267
									GAATAACCGGATAAG	-259
									ATTTTATAGAGGTTA	-243
									ATTTATCCGATTTTC	-173
									ATCTTCTCTTTTA	9
									TTTGATAAAGGTTT	-27
ZCP4_0494	Recombinati on protein RecR	1,19	1,18	-1,06	-1,08	1,08	1,93	2,51	TTTGATAAAGGTTT	-27
ZCP4_0493	peptide deformylase	1,22	1,28	1,14	1,07	1,03	1,79	2,16		
ZCP4_0500	cell wall- associated hydrolase.	-1,09	-1,05	1,02	1,06	1,45	1,79	1,82	GAAGGATGAGGGAA G	-16
ZCP4_0501	N-acetyl- gamma- glutamyl- phosphate reductase		-1,20	-1,05	1,12	1,12	-1,09	-1,11		
ZCP4_0507	dehydrogen ase of unknown specificity.	-1,07	-1,12	1,05	1,31	1,73	1,67	1,07	GTTCCATTCAAATTT	-159
									AAACGACGGGGTAAT	-194
									AAATTACCTCTGAAA	-112
									ATTCAAATTTCTTTT	-154
									ATTGAGACGACATTC	-138
									ATTCCACAAATTTT	-127
ZCP4_0509	outer membrane receptor protein	-1,31	-1,33	-1,01	1,19	3,30	7,40	9,21	GAAAAAAGGTCAAA	8
									GAAATCAGAAAAAAA	1
ZCP4_0510	Prolyl oligopeptida se	1,06	1,08	1,19	1,29	2,19	4,07	4,52		
ZCP4_0526	cation/multi drug efflux pump	1,12	1,17	1,13	1,04	1,37	1,64	1,95	GTTATTTTTGCTTC	-77
									TAAAACAATTACAAC	-97
									GAAAAGCAAATCAAA	-49
									AAAAGCAAATCAAAC	-48
									TTTTTGCTTCTGTTT	-72
									CTTCTGTTTGATTTT	-66
ZCP4_0525	membrane fusion protein of	1,05	1,05	1,06	1,06	1,16	1,30	1,19		

5. Παράρτημα

	efflux system									
ZCP4_0524	outer membrane protein of efflux system	1,16	1,08	1,01	1,13	1,03	1,09	-1,12		
ZCP4_0546	Glutaredoxin . GrxC family	-1,38	-1,28	1,03	1,16	2,19	1,81	1,47	ATTAGTCGGTTTTTC	-72
									ATTGGGAGAGTATTC	-15
ZCP4_0545	Sterol-binding domain protein	-1,18	-1,12	-1,03	1,10	1,86	2,14	1,86		
ZCP4_0549	ribosomal large subunit pseudouridine synthase	-1,12	-1,10	-1,03	1,21	2,04	8,66	7,05	CAATGCCGACAGAAC	-3
ZCP4_0551	cysteine synthase	-1,18	-1,19	-1,03	1,13	2,46	5,36	5,17	ATTGTCAGACCGTTC	-103
									GAAAAATGGCAAAAA	-6
ZCP4_0555	hypothetical protein	1,23	1,23	1,04	1,20	1,40	1,53	1,71	GAAAGGCTTTTTAAG	-15
									GTTGGAGCTGATTTT	-92
									GTTTTCCCTATTTT	-77
ZCP4_0575	endothelin-converting enzyme	-1,20	-1,21	1,01	-1,01	1,29	1,79	1,63	TAACAAAAAAGAAG	-177
									GAAAAAAGACAAAAG	-48
									ATTCTATCACTCTTA	-190
									CTTCTGGTAATTTTA	-137
									CTTCTTTTATTTTA	-98
ZCP4_0584	polyphosphate kinase 1	-1,29	-1,22	1,06	1,09	1,79	3,83	4,89	GTTCTTTCCGCTTA	-34
									CTTTTTTGTGCTTA	-185
ZCP4_0600	YfdX protein	-1,23	-1,20	-1,04	-1,03	1,65	5,13	6,05	GAAAATTAAGTAAA	-73
									TTTCTCTCTATTTT	-271
									AAAAATCTTGGAAAT	-289
									TAATATTTAAAGAAA	-84
									CTTGGAAATTTTTTC	-282
ZCP4_0601	peroxiredoxin. Ohr subfamily	-1,58	-1,35	-1,04	1,13	4,01	9,10	10,13	TAAAAATGATGGAAA	-136
									AAACAACGATCAAAA	-96
									AAAATAACGGGGAAT	-85
									TAACGGGGAATAAAA	-81
									AAAACCTCTTTGAAT	-70
									ATTATTCATTATTTT	-171
									ATTATTTCCACATTC	-164
ZCP4_0602	DNA gyrase subunit A	1,09	1,13	1,03	-1,00	-1,03	-1,43	-1,50		
ZCP4_0603	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase Gid	1,05	1,10	1,02	-1,03	-1,27	-2,63	-3,67		
ZCP4_0607	EF hand	1,59	1,57	1,19	1,14	1,12	1,20	1,18	ATTTTATTTATGTTA	-195
									ATTTATGAATTATTC	-125

5. Παράρτημα

ZCP4_0620	Excinuclease ABC subunit C UvrC	1,14	1,16	1,13	1,10	1,38	2,19	2,41	TTTCAAAGATCGTTC	4
ZCP4_0619	DNA repair protein RecO	1,29	1,29	1,16	1,10	1,20	1,87	2,35		
ZCP4_0618	hypothetical protein	-2,11	-1,55	1,11	1,13	2,69	6,35	6,57		
ZCP4_0629	DNA repair protein RadC	1,22	1,23	1,00	-1,07	-1,01	1,58	1,64	GAAAAAGCCGCTATC	-76
									GAATGCTTTAGAAAA	-86
									GAATGGATAGAAAAAG	-3
ZCP4_0631	chaperone protein DnaJ	-1,03	-1,00	-1,03	-1,03	1,02	1,90	1,96	GAAGATCAGCCTAAA	-102
									CTTGTGTCTGAGTTA	-3
ZCP4_0632	chaperone protein DnaK	-1,14	-1,07	1,05	1,09	1,87	4,48	4,73	CAAATAATAAGAAG	-143
									ATTCGATTATTTTTA	-221
ZCP4_0641	flagellar capping protein	-1,00	1,03	1,04	-1,01	1,43	1,96	2,14	GAAAAAACAAAGAAC	-98
ZCP4_0658	flagellin/flagellar hook associated protein	-1,58	-1,59	-1,34	1,08	1,46	3,65	4,31	TTTATAGTAAAGTTG	-276
									GTTGCCCTCTTTTT	-265
									ATTAGCCATCTGTTA	-242
									GTTACGATAAATTTT	-158
ZCP4_0663	flagellar biosynthesis protein FlhA	1,01	1,01	-1,02	-1,04	1,26	2,31	3,07	GTTGTTTTTTTGTTT	-149
									AAAAATTCCTACTAAC	-211
ZCP4_0662	Cobyrinic acid acdiamide synthase	1,17	1,17	1,15	1,08	1,25	1,22	1,10		
ZCP4_0661	RNA polymerase, sigma 28 subunit, FliA/WhiG	1,20	1,18	1,22	1,07	1,18	-1,17	-1,39		
ZCP4_0708	ABC-type anion transport system. duplicated	-1,04	-1,00	1,09	1,09	1,36	1,62	2,14	GAAAGCCGATTGAAA	-288
									TTTTATTGCATATTC	-219
									ATTTGTCGTAAATTC	-134
ZCP4_0707	ABC transporter, conserved site	-1,18	-1,11	1,08	1,11	1,35	1,43	1,63	ATTAAGCTATTTTTC	-70
ZCP4_0788	drug resistance transporter Bcr/CfIA subfamily	1,09	1,11	1,03	-1,03	-1,35	1,03	1,59	GGACAATTAAGAAC	-54
ZCP4_0806	hypothetical protein	1,25	1,35	1,39	1,10	1,26	1,88	1,92	GTTCTCAATTATTTG	-32
									CAAATACAACCTAAC	-103
ZCP4_0807	riboflavin biosynthesis protein RibD	-1,05	-1,02	-1,02	-1,02	1,08	1,46	1,78		

5. Παράρτημα

ZCP4_0840	hypothetical protein	1,17	1,04	1,43	-1,12	1,59	2,20	2,13	TAATTCGCCATAAC	-70
									TTTCGGTAATCATTG	13
ZCP4_0842	putative outer membrane lipoprotein	-1,27	-1,40	-1,44	-1,03	1,14	3,05	3,83	AAACAGGCTAACAAC	-62
ZCP4_0869	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	-1,34	-1,25	1,11	1,35	4,94	15,85	18,15	AAACATATGGCGAAA	-278
ZCP4_0871	Ppx/GppA phosphatase	1,01	-1,08	-1,16	1,10	1,34	1,92	2,12	TAACAAATCGGTAAT	-51
									TTTTTAAACTCTTC	-157
									TTTTTGTCCCATTC	-139
ZCP4_0872	ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FtsJ	1,03	-1,11	-1,19	1,06	-1,08	-1,01	-1,18		
ZCP4_0873	diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing	1,20	1,19	1,06	-1,07	1,23	1,74	2,38	CAAGGCTAAGTTAAC	-229
									GAATTTTATAGACAAA	-209
									TAAATTTATTGAAA	-177
ZCP4_0895	ATP-dependent proteinase	-1,07	-1,08	1,03	1,06	1,43	3,79	4,24	GAACCCAGAAAGATC	-68
ZCP4_0897	Levansucrase/Invertase	-1,06	1,04	1,04	-1,03	1,50	4,31	4,14	TTTTGAGTTTATTTTC	-100
									GTTTATTTCAACTTA	-94
ZCP4_0898	Levansucrase/Invertase	-1,08	1,07	1,04	1,21	1,46	3,93	4,53	AAACTTCCGAAGAAA	-150
									TTTCGGCTTTATTTTC	-37
									AAACTTTTTTAAAAA	-186
									TAAAAACTCCGAAG	-153
									TTTAAATCTCTTTTC	-277
									GTTTTTGGGATTTTA	-287
									GTTTGAGTATTTTTA	-212
									TTTCATCATTTATTA	-26
ZCP4_0903	glucokinase	-1,01	1,03	1,01	-1,04	1,31	1,67	1,54	GAATTATTATGGAAA	-8
ZCP4_0909	Excinuclease ABC subunit B UvrB	-1,31	-1,34	1,01	1,03	1,96	8,69	10,48	TTTCTACGCTTGTTT	-44
									TTTCTACGCTTGTTT	-44
ZCP4_0923	RNA-binding protein Hfq	-1,11	-1,03	1,06	1,01	1,26	2,54	4,79	TTTCTTTACAATTC	-220
									GAAAAGGTCAACAAT	6
									GTTTTCTTTTCTTT	-228
									ATTCTATGATAATTG	-209
									ATTGAATAATATTTTC	-198
									TTTCATTGTCCTTTG	-187
									GTTTCTGTGGCATT	-135
									TTTCTGTGGCATTG	-134

5. Παράρτημα

									CTTGAGAGACTCTTC	-95
									GTTTTGTAATGATT	-45
ZCP4_0922	GTP-binding protein HflX	1,12	1,20	1,12	1,02	1,13	1,95	2,73		
ZCP4_0921	hypothetical protein	1,24	1,31	1,06	1,03	-1,17	1,06	1,23		
ZCP4_0930	phosphomannomutase	-1,27	-1,26	1,03	1,03	1,38	2,68	3,35	TTTCTTGCTGCGTTA	-55
									AAAAAAACCAAGAAA	-127
									TTTCGGGCAGCTTTT	-72
ZCP4_0946	dehydrogenase of unknown specificity	-1,54	-1,30	1,02	-1,06	1,89	5,42	6,08	TAACCTTCAAAGAAC	-31
									GAACAAGGGATGAAG	-183
									TTTCAAAATTTGTTA	-112
									GAAACAAAAATAAAT	-57
									GTTAGAGTTGATTA	-101
									GTTGTATTATTTTTT	-95
									TTTGTTCTAACCTTC	-38
ZCP4_0947	hypothetical protein	-1,33	-1,28	-1,06	-1,45	1,22	1,39	1,91	CTTCATCCCTTGTC	-173
ZCP4_0950	amidohydrolyase	-1,07	-1,07	1,09	1,10	2,21	3,40	3,50	GAATGAATTTGGAAG	-2
									GAATTTGGAAGAAAA	2
ZCP4_0949	hypothetical protein	-1,07	-1,10	1,09	1,01	1,85	2,44	2,45		
ZCP4_0952	dehydrogenase of unknown specificity.	-1,97	-2,05	-1,14	1,11	3,03	9,05	10,60	TTTCTGGCGGCTTTC	-83
									AAATTTTTTCAGAAA	-33
									GTTTCTGGCGGCTTT	-84
									TTTCTGAAAATTTTT	-40
ZCP4_0961	hypothetical protein	1,03	-1,08	-1,05	1,27	1,51	4,24	5,05	AAATTAATGGAAA	-160
									AAAACGGCATAGAAG	-134
									TAAGCCCGATAAAC	-63
									AAAGATGACGCCAAC	-5
ZCP4_0963	tRNA-adenosine deaminase	1,07	1,10	1,02	-1,11	-1,02	1,59	1,62	TTTTTCTTGCTGTG	-77
									GTTATTTCCACCTTT	9
ZCP4_0965	MFS transporter. sugar porter family	-1,10	-1,08	-1,01	1,01	1,57	4,89	8,07	TAACAATTCAGAAAT	4
									CAATGGAATGGAAG	-248
									GAAGGGACGCTAAAA	-34
									TTTCTGTCTTTTA	-216
									GTTTAAACATTATTT	-151
									GTTTACTTTTATTTA	-134
									ATTCTGAATATTTTT	-120
									GTTTATAAAATATTT	-105
ZCP4_0969	hypothetical protein	-1,66	-1,55	-1,03	1,05	1,88	7,94	8,93	GAAATAAAATGAAC	-179

5. Παράρτημα

									GAACAAAATTTTAAT	-169
									TTTTCTTTATGTTA	-37
ZCP4_1004	HslV component of HslUV peptidase	-1,27	-1,38	1,01	1,08	1,53	2,77	3,47	GTTTTCTAAAAGTTT	-36
									TTTCCCATGTTTTTA	-255
ZCP4_1003	ATP-dependent protease ATP-binding subunit HslU	-1,28	-1,26	-1,00	1,10	1,68	3,33	4,15		
ZCP4_1012	ATPase involved in chromosome partitioning	-1,01	1,00	1,09	-1,02	1,09	1,66	2,12	GTTTGTGATATTTTC	-85
									TTTCATTTACAGGTTG	-19
									CAATTATTATAGAAA	-278
									CAAGATTTTCTGAAT	-68
									ATTCGCCTGAATTTA	-104
									TTTCGGCAAGATTTT	-74
									ATTCCCTTTTGTTTT	-31
									TTTTGTTTTCATTTTC	-25
ZCP4_1013	periplasmic serine protease. Do/DeqQ family	-1,11	-1,14	-1,12	-1,07	-1,14	1,24	1,79	ATTCAAAAAGGTTTC	-220
ZCP4_1030	superfamily II RNA helicase	1,11	1,09	1,02	-1,02	1,26	2,34	2,72	TAATTTGCGATGAAC	-137
									AAAAAACAGAGGAAA	-179
ZCP4_1032	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	-1,88	-1,49	1,14	-1,05	2,43	10,00	13,73	GTTATGCCTTCTTTC	-97
									AAAAACGGGTTGAAA	-80
									AAACGGGTTGAAAAA	-78
									AAAAAGCAGAATAAC	-67
									GAATAACAACAAAAT	-59
ZCP4_1037	acetyltransferase. ribosomal protein	-1,08	-1,26	-1,12	1,08	1,52	1,78	1,93	CTTAAACCGATGTTTC	-10
									TTTTTTGATCGGTTA	-98
ZCP4_1046	SOS-response transcriptional repressor LexA	1,46	1,85	2,09	3,49	3,88	4,11	4,01	GTTCTATATCTGTTC	-97
									GTTTCCTACAGTTC	-108
									GTTAGATGGATGTTT	-120
									TAAAAGATGAGGAAA	-58
									AAAAGATGAGGAAAC	-57
									GTTAGCGGGCCTTTG	-32
ZCP4_1054	putative Zn-dependent	-1,02	-1,05	1,10	1,13	1,71	3,39	3,62	TAAAAAAATACTAAC	-253

5. Παράρτημα

	protease									
									TAATTCATATTAAC	-234
									AAACCGAAATATAAA	-223
									AAATATTTATCAAAC	-105
ZCP4_1055	DSBA oxidoreductase	-1,00	1,01	1,10	1,10	1,39	2,27	2,31		
ZCP4_1056	transcriptional regulator. RpiR family	1,74	1,85	1,33	1,17	1,34	-1,02	-1,21	AAAATTAATAAGAAC	-160
									GAATTTCTAAGAAA	-69
									CAAAATAGGGGAAT	-80
									TTTTTAAAGCCTTC	-126
ZCP4_1058	TonB-dependent siderophore receptor	1,06	1,11	1,27	1,27	2,14	2,42	3,02	GAAAACCTTGAAT	-222
									TTTTGTCTCTGTTT	-294
									TTTCTGACATTCITT	-242
ZCP4_1065	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate	-1,12	-1,21	-1,08	1,14	1,67	2,80	2,13	CAAAAACCTTAAAC	-55
									GTTTTATGCCCTTT	-35
ZCP4_1066	fructose-bisphosphate aldolase	-1,06	-1,07	1,09	1,06	1,78	4,90	7,58	GAAAACTTAAAAT	-233
									TAAGAAGAAGCTAAC	-210
									CTTATAGTATCTTTC	-173
ZCP4_1075	outer membrane receptor protein	-1,11	-1,07	1,17	1,25	1,30	1,66	2,52	GAAAAGGATAGCAAC	-194
									TTTTTCATGTTGTTG	13
ZCP4_1076	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	-1,42	-1,47	-1,01	1,11	1,41	1,83	2,25		
ZCP4_1077	peptidoglycan-associated lipoprotein	-1,12	-1,19	-1,07	1,05	1,70	2,56	2,62	TAAAAGTAAATTAAC	5
									ATTCGGTGATTATTA	-75
									ATTATTGCTTTTTTC	-52
ZCP4_1083	Holliday junction DNA helicase RuvB	-1,13	-1,21	-1,02	1,04	1,31	1,41	1,50	GATCGCCTTATGAAG	-132
ZCP4_1088	DNA-binding regulatory protein, YebC/PmpR family	1,11	1,09	1,05	-1,04	-1,55	-4,75	-6,16	CTTCTGGTATGTTT	-256
									ii)GTTACGGTTTTCTTC	-271
ZCP4_1087	Holliday junction resolvase RuvC	1,49	1,51	1,15	1,01	-1,34	-2,74	-2,94		
ZCP4_1086	Holliday junction	1,48	1,61	1,04	-1,30	-1,34	-4,05	-3,43		

5. Παράρτημα

	DNA helicase RuvA									
ZCP4_1105	TPR repeat-containing protein	-1,29	-1,37	-1,01	1,17	3,05	11,06	15,16	GTTATGAGAAAATTC	-3
ZCP4_1116	hypothetical protein	-1,54	-1,26	1,04	1,13	4,16	8,07	6,37	TAAAAGCCGGTGAAA	-191
									CAAAAAGGCCTGAAT	-93
ZCP4_1118	dehydrogenase of unknown specificity.	1,01	1,01	1,13	1,11	1,98	2,22	1,56	TAAAGGCAGCAAAC	-50
									AAACGCCGAGAAAAT	-39
ZCP4_1121	sodium/proton antiporter. NhaA family	1,03	1,01	1,17	1,04	1,95	7,30	10,38	TTTAGCTATACGTTT	-32
									ATTCGTCGATTTTTT	12
ZCP4_1123	transcriptional regulator. BadM/Rrf2 family	1,06	1,05	1,08	1,16	3,21	19,14	37,90	AAAGTGATGAAGAAG	-115
									AAACTTTGTGGTAAA	-46
									TTTTTTGTATTTTTT	-148
ZCP4_1127	hypothetical protein	-1,02	-1,04	-1,10	-1,12	1,07	1,85	2,56	ATTCATTCCTTATTC	-49
									AAAGATAGATAGAAA	-112
									GAAGAATGCTTAAAA	-14
ZCP4_1139	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate	1,04	-1,01	1,04	1,15	1,76	2,87	3,71	GTTGTTTTCAAGTTG	-206
									GTTTTCAAGTTGTTA	-203
ZCP4_1143	dehydrogenase of unknown specificity.	-1,40	-1,38	1,03	1,21	2,12	2,86	2,60	TAATCAAAGGCAAC	-74
									GAAGATGGTAAAAAT	-5
									ATTGCTTTCTCTTC	-46
ZCP4_1147	methyl-accepting chemotaxis protein	1,01	1,10	-1,00	-1,03	1,03	1,23	1,51	GTTGAATTGGTTTTT	1
ZCP4_1154	chemotaxis signal transduction protein	1,03	1,01	1,03	1,09	1,63	2,52	2,85	GAAAAAATTTTTAAC	-51
									AAAGTTTTTCGGAAA	-62
									TTTCGGAAAAAATTT	-56
									TTTTAACCATTTTTT	-43
ZCP4_1162	TPR repeat-containing protein	-1,02	-1,02	1,11	1,00	1,68	2,07	1,76	GTTCTCGATAATTTG	-135
									AAATAGGGGTGTAAC	-16
									GTTGATATATTTTTA	-271
									GTTATGTGTTTTTTG	-186
									CTTTATTCCGGTTT	-37
									TTTTATTCCGGTTTC	-36

5. Παράρτημα

ZCP4_1183	PTS IIA-like nitrogen-regulatory protein PtsN	-1,50	-1,42	-1,06	1,04	2,71	6,96	6,43	GAATATTGCTAGAAT	-105
									AAAACATGAATGAAC	-6
									TAAAGGCGAAAAAAC	-16
									TTTGACTTTATTTTC	-90
ZCP4_1184	hypothetical protein	-1,20	-1,18	-1,18	-1,06	1,62	4,33	3,62		
ZCP4_1202	heat-inducible transcription repressor HrcA	-1,11	-1,22	-1,06	1,04	1,94	9,52	11,90	AAAAATGGCATGAAA	-76
									AAATGGCATGAAAAC	-74
ZCP4_1201	GrpE protein	-1,20	-1,27	-1,11	1,06	1,48	3,76	3,83		
ZCP4_1200	Fmu (Sun) domain protein	1,12	1,12	1,01	1,06	1,34	3,54	4,44		
ZCP4_1207	putative metal-dependent hydrolase	-1,39	-1,16	-1,03	-1,38	1,09	1,72	1,98	GAAATGGGCGTGAAA	-42
									TTTTTTTGAGTGTTA	-26
ZCP4_1216	outer membrane receptor protein	1,20	1,50	-1,24	-1,06	-1,10	1,65	4,69	TAAATATAATATAAC	-151
									GTTTTTTTATTTTTA	-233
									TTTATTGTAAAGTTG	-189
									GTTGATCTCTTTTTT	-178
ZCP4_1215	aminotransferase class I and II	1,18	1,19	-1,13	1,06	1,11	1,31	2,18		
ZCP4_1224	outer membrane cobalamin receptor protein	1,15	1,15	1,06	1,08	1,10	1,94	2,92	TAACAGCCTTTAAAT	-98
									GTTTCCTTATATTTA	-285
									CTTCTTGTTCCTTA	-291
ZCP4_1227	Gluconolactonase	-1,45	-1,29	1,16	-1,02	1,41	2,76	2,98	GAACAGAGAGAGAAA	-260
									AAAATATTCATGAAT	-98
ZCP4_1226	aldo/keto reductase	-1,14	-1,10	1,04	-1,07	1,06	1,47	1,53		
ZCP4_1232	arabinose efflux permease family protein	1,16	1,02	-1,08	1,01	2,03	7,85	12,43	TAAGGCTTACTGAAA	-122
									TTTGGGCTGTCTTTC	-204
ZCP4_1237	pantothenate synthetase	-1,26	-1,22	1,05	-1,01	1,35	1,75	1,95	GAACTGATTCTAAA	-126
									TTTTGAAGTATTTTC	-130
									CTTCAAATTTTTTGG	-82
ZCP4_1238	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	-1,06	-1,06	1,12	1,09	1,83	2,75	3,38		

5. Παράρτημα

	e									
ZCP4_1248	hypothetical protein	1,10	1,14	1,00	-1,04	1,09	2,32	2,71	CAATATTTTGGAAA	-91
									ATTCGCCAATATTTT	-97
									ATTCGCTTAATTTA	-36
ZCP4_1254	Co-chaperonin GroES	-1,16	-1,30	-1,06	1,23	1,92	1,61	1,36	CAAAAATGAGCGAAG	-172
									GAAGATTTTATAAA	-161
									AAAAGATGAAACAAC	-148
									TAAAAATTTTGAAG	-124
									ATTCCCCTAGTTTT	-36
ZCP4_1255	signal peptide protein peptidase A	-1,10	-1,03	1,05	1,02	1,30	1,60	1,67	AAATAAATCATGAAA	-33
									CAAAGGAGCCAAAAC	-17
ZCP4_1260	replication restart DNA helicase PriA	-1,11	-1,15	-1,03	1,02	1,36	3,50	4,08	CAAATCTACGTGAAA	-9
									AAATCTACGTGAAAC	-8
ZCP4_1261	hypothetical protein	-1,30	-1,37	1,01	1,11	2,70	10,11	16,50	ATTCTAAGCCATTC	-117
ZCP4_1262	thioredoxin domain protein	-1,25	-1,18	1,05	-1,08	1,23	1,93	1,69	CTTTTGGCTTCTTC	-98
									GTTTTAATATTTTT	-66
									ATTCCCGTGTCTTG	11
ZCP4_1272	putative metal-binding protein. possibly	-1,26	-1,23	1,01	-1,06	1,31	4,46	5,26	AAAGCCTAATCGAAC	-48
									GAACTATATTACAAA	-115
									GAACAAATGGAAAAA	-60
									GTTAAAGCTTTTTTT	-80
									TTTCATTCTTTTTT	-28
ZCP4_1306	Protein of unknown function (DUF2497)	1,15	1,17	-1,01	-1,22	-1,12	1,52	1,66	CAAAAAAACAGAAA	-40
									AAAAAAAACAGAAAC	-39
									CTTGCCAAGAATTC	-174
ZCP4_1307	hypothetical protein	-1,07	-1,05	-1,00	1,01	1,34	1,90	2,24	ATTCTGTCTGGCTTC	-81
									GAATACACCATAAAA	-196
									GTTTCAACTGGATTA	-174
									GTTTTTATATGATTA	-104
									CTTCCTACATTCTTG	-35
ZCP4_1308	ATP-binding protein	-1,11	-1,06	-1,02	1,11	2,00	2,73	3,69		
ZCP4_1309	glutaredoxin-like protein	-1,10	-1,05	1,10	1,12	1,64	2,12	2,34		
ZCP4_1310	hypothetical protein	1,13	1,19	1,05	-1,04	1,22	3,24	4,72		
ZCP4_1311	quinolinate synthetase	1,02	1,03	1,01	-1,03	-1,01	1,41	1,77		

5. Παράρτημα

ZCP4_1312	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	1,00	1,03	-1,04	-1,07	-1,07	1,62	2,19		
ZCP4_1323	hypothetical protein	1,51	1,59	1,10	-1,09	1,24	1,20	1,55	GAAGAGGGTGGCAAT	-242
									CAAGGATGCAAGAAT	-190
									GAATTTTTTAATAAA	-76
									TTTAATAAAAAATTC	-71
ZCP4_1324	hypothetical protein	1,24	1,37	1,09	-1,01	1,06	-1,28	-1,08		
ZCP4_1325	RES domain-containing protein	1,17	1,22	1,03	-1,08	1,02	1,17	1,51		
ZCP4_1326	GMP synthase family protein	-1,19	-1,08	-1,14	-1,00	1,36	1,68	1,88	ATTGCTTCACGCTTC	-36
									CTTCACGCTCTTTT	-32
									AAATGTGACCGGAAA	-35
									TTTCGGAAGTATTTT	-80
ZCP4_1336	putative dehydrogenase	-1,19	-1,13	1,09	1,10	1,85	3,43	3,45	GAAGTATTTTTGAAA	-75
ZCP4_1337	membrane-associated lipoprotein involved in	1,03	-1,06	-1,03	1,00	1,15	1,69	2,02	GAATAAAAAATAAAC	-203
									GAAAAATCTTGCAAT	-122
									TTTACTATTCTGTTT	-260
									TTTTCTCAATCGTTG	-107
									GTTTTTCTTTTTTC	-249
ZCP4_1338	Functions with Rnf and may reduce SoxR	1,10	1,05	-1,00	-1,08	1,59	3,54	4,08		
ZCP4_1339	nicotinamide-like amidase	1,03	-1,03	1,15	-1,08	1,27	2,58	2,90	GTTTTAAAATAATTC	-88
ZCP4_1341	putative molybdenum utilization protein ModD	1,76	1,43	1,76	1,53	1,69	2,68	3,05	AAAACAGAAGAGAAA	-18
									AAACAGAAGAGAAAAG	-17
ZCP4_1356	TonB-dependent siderophore receptor	1,12	1,21	1,12	-1,08	-1,29	1,38	2,20	GAATGAATGAGAAAC	-7
ZCP4_1385	ABC transporter. permease/A TP-binding protein	1,19	1,16	1,06	1,03	1,07	1,67	2,24	GAAGCAAGCGACAAA	2
									GAATCAGGGATAAAA	-17
									ATTTTCAGGCTTTTC	-88
ZCP4_1386	hypothetical protein	-1,60	-1,53	1,10	-1,03	1,93	6,28	6,54	AAAAATGAATGAAC	-86
									TTTAAATGCGTTTTTC	-62
									TTTCCTAGAATTTTG	8
ZCP4_1387	hypothetical	1,29	1,28	1,79	2,14	1,81	1,25	1,46	GAACATAAGGGGAAC	-55

5. Παράρτημα

	protein									
									GAAAGTATTGAGAAC	-66
									AAACAGTAAAAAAG	-41
									AAAGTAAAATTAAC	-30
									TTTCATCCAAAATTA	-226
									TTTGAACCTATTTTC	-196
									TTTCCCAAAAATTTT	-185
ZCP4_1388	hypothetical protein	1,06	1,08	1,09	1,00	1,08	1,50	1,49	CAACGCCAATGGAAG	10
ZCP4_1390	hypothetical protein	-1,03	-1,04	1,05	1,09	1,74	2,03	1,90	GAAAAGCGATTGAAT	-144
									AAAAGATTATAAAC	10
									TAAATTGCTAGGAAA	-155
ZCP4_1394	aminopeptidase N	-1,36	-1,35	-1,07	-1,03	1,46	3,21	2,96	GTAAAGATAGGTTC	-187
									GAAGTCCCGATTAAA	8
									TAACACGATCATAAA	-233
									TTTAACATGAAGTTT	-148
									GTTAATAAACATTA	-137
ZCP4_1395	hypothetical protein	1,01	1,04	1,15	1,08	1,45	2,05	2,27	GAACCTATCTTTAAC	-283
									GAATATTATAATAAC	-40
									GAATGAATAGAGAAA	-3
									GTTGGGAAAAGGTTA	-115
ZCP4_1397	aldo/keto reductase. diketogulonate reductase	-1,38	-1,37	-1,06	1,21	1,73	2,42	2,17	CTTATGGCTGCTTTC	-220
									TTTGATAGACTGTTT	-45
ZCP4_1398	putative NAD(P)H quinone oxidoreductase. PIG3	-1,09	-1,04	1,20	1,15	1,63	1,94	1,65	GAACTGTCTTTAAAG	-45
									TAACAAAAACAAT	-121
									AAAATGGCAGGCAAC	-3
ZCP4_1414	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	-1,52	-1,28	1,16	1,35	5,95	13,45	13,78	AAAAGGTAATTTAAC	-179
									GAAGTAATAAGAAAG	-28
									TTTTTAAAAATTTTC	-292
									CTTCGAGCTCGTTG	-259
									ATTGCAACTAATTTTC	-159
ZCP4_1418	Chagasin family peptidase inhibitor I42	-1,81	-1,61	1,14	-1,02	2,06	1,81	1,67	GAACAAAGCTGTAAA	-130
									GAAATATCTATAAAT	-247
									AAAAATTTATGGAAA	-212
									GAAGGAATATAAAT	-17
									CTTCACTAAAAATTT	-219

5. Παράρτημα

ZCP4_1429	glycosyltransferase	-1,07	-1,06	-1,03	-1,02	1,26	1,82	1,75	CTTTTCAGGCTGTC	-229
									GAAATAGGCCAAAAA	-153
									AAATAGGCCAAAAAC	-152
									TTTTCTGTCTTATTC	-171
ZCP4_1433	serine O-acetyltransferase	-1,06	1,02	-1,01	-1,03	1,15	1,70	1,94	GAAGCCTGTGCGAAC	-43
									TTTCTAAAACCGTTC	-190
									GTTTATGTTCAATTC	-5
									CAAATTTTTATGAAA	-97
									GTTTCTCGCTTTTAA	-246
ZCP4_1434	hypothetical protein	1,02	-1,03	-1,02	1,11	-1,06	1,27	1,30		
ZCP4_1436	aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase	-1,06	-1,16	-1,14	1,02	1,32	1,99	2,04	AAAATATCTTGAAAA	-169
									ATTTTCAAGCAGTTT	-135
									TTTCAAGCAGTTTTT	-133
ZCP4_1443	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	1,00	1,03	1,06	1,00	1,32	1,90	2,49	CTTCCAACATCTTTC	-39
									TTTGGTGCAGGGTTA	-175
ZCP4_1447	outer membrane transport energization protein	-1,01	1,05	1,10	1,03	1,18	2,28	2,64	TTTCTAAAGAATTC	-74
									GAATTTATTCAAAG	-150
									CAATATATTAAGAAA	-100
ZCP4_1448	outer membrane transport energization protein	1,05	1,10	1,16	1,07	1,53	1,97	1,81	TAACGTCTTTAAAA	-67
									TTTAAAAGACCGTTA	-59
ZCP4_1449	biopolymer transport protein ExbD/TolR (NCBI)	1,08	1,16	1,08	-1,03	1,13	1,14	-1,01		
ZCP4_1451	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1,51	1,51	1,08	1,05	-1,30	-3,82	-5,12	GTTTAGGATTTGTTT	-74
ZCP4_1457	thioredoxin domain-containing protein	-1,68	-1,46	1,23	1,14	3,86	15,52	19,62	GAAACGGGCAAGAAA	-29
									TAAATATCAAAGAAA	-40
									AAATATCAAAGAAAC	-39
									AAACGGGCAAGAAAA	-28
									GTTGGCAATTCTTTT	-67
ZCP4_1458	peptidase	1,02	-1,01	1,03	1,00	1,88	8,61	12,78		

5. Παράρτημα

	S16 lon domain protein									
ZCP4_1459	2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1.4-benzoquinol	-1,09	-1,19	-1,07	-1,01	1,07	1,55	1,65	GAATAGATCAGGAAG	-35
									AAAATCGGTTTGAAT	-46
ZCP4_1462	hypothetical protein	1,02	1,00	1,18	1,06	1,67	2,50	2,63	AAACCACGACCGAAA	10
									AAAAATATCTTGAAA	-274
									CAAGTTTTAATAAAC	-222
									AAAAAATAAACGAAA	-113
									TAAACGAAAATGAAA	-107
									AAACGAAAATGAAAT	-106
									AAAATAATGGGAAA	-18
									GAAAAATATGAAAAT	-7
ZCP4_1465	transcriptional regulator. HxlR family	-1,34	-1,29	1,01	1,02	1,81	4,66	5,02	GAACGCACATAAAAG	-54
									AAAAAGAACAAGAAC	-65
ZCP4_1467	hypothetical protein	1,59	1,87	1,32	1,19	1,47	1,58	1,72	ATTGAAGCCCTTTTC	-85
									TTTTCTCATATATTC	-75
									ATTCTTTAGTCTTTT	-64
ZCP4_1471	hypothetical protein	1,07	1,06	1,19	1,03	1,36	4,01	4,80	GTTCCCTCGCTGTTG	-102
									CAATTATGACAGAAG	7
									TAACGCTATTGAAAT	-81
									TAACCTTGTTAAT	-33
									TTTCGCTATCCCTTT	-123
									CTTTGGTGCTAGTTC	-112
ZCP4_1470	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,08	-1,06	1,06	1,01	1,17	1,13	1,07		
ZCP4_1469	chorismate synthase	1,02	-1,03	1,04	-1,00	1,05	-1,29	-1,63		
ZCP4_1472	DnaJ-class molecular chaperone with C-terminal	-1,22	-1,30	-1,04	1,05	1,80	4,89	5,62	GTTCCAATCATTTTA	-187
									TTTTAAATTTTGTTTC	-198
									GAAGTGATTTTAAA	-206
ZCP4_1481	aspartate-alanine antiporter	-1,15	-1,04	1,00	-1,09	1,54	3,04	2,86	AAATATAAAATTTAAC	-174
									TAACTCATTATTAATA	-163
									TAACCAATATTAAG	-24
									GTTTTCTTATCTTTA	-114
ZCP4_1480	aspartate aminotransferase	-1,23	-1,22	-1,13	-1,08	1,13	1,74	1,54		
ZCP4_1482	hypothetical protein	1,16	1,14	-1,02	-1,11	-1,03	1,76	2,03	AAAACAGCTCTGAAA	-111

5. Παράρτημα

									AAACAGCTCTGAAAG	-110
									TTTCCTGATAATTTG	-34
									ATTGCGGTTAATTC	-24
ZCP4_1483	hypothetical protein	-1,13	-1,17	1,09	1,03	1,79	4,89	6,88		
ZCP4_1484	prephenate dehydratase	1,01	-1,12	-1,13	-1,08	-1,22	1,24	1,65		
ZCP4_1485	A/G-specific adenine glycosylase MutY	1,07	1,00	1,04	1,10	1,05	1,58	1,73	ATTGCGGTTAATTC	-24
									TTTCCTGATAATTTG	-34
									AAACAGCTCTGAAAG	-110
ZCP4_1487	protein-disulfide isomerase	-1,31	-1,22	1,05	1,07	1,79	3,29	3,52	GAACTATTTTAAAAG	-96
									AAAAAACGGTTGAAC	-107
									GAAAAAATTGAAAAT	1
									GAATAGCCTAAAAAT	-192
									AAAATAGACTTGAAA	-71
									ATTTTGATAGCCTTC	-235
									ATCCAGTTCTATTT	-177
									ATTGAAAATAGGTTT	7
ZCP4_1489	hypothetical protein	1,04	1,13	-1,02	-1,02	1,14	1,57	1,75	CAATCTTGAGAAAAC	-64
									GAAAAAGCATGAAAAG	-8
									GTTGTCCCTCTTTTT	-105
									TTTCTTAAAAGATTG	-92
									ATTCGATCCCTTTA	-28
ZCP4_1490	hypothetical protein	-1,03	-1,11	1,00	-1,07	1,08	1,65	1,86	TAATCCGATGAAAAC	5
									CAACCGGTGGATAAT	-6
ZCP4_1501	membrane protease FtsH catalytic subunit	-1,08	-1,14	-1,01	1,04	1,97	10,13	14,89	TTTGGGTCATTGTTA	-133
									CTTCAGTCTTTATTA	-72
									GTTGTATGATCCTTT	-48
ZCP4_1504	Helix-turn-helix domain protein	-1,11	1,01	-1,06	-1,19	-1,04	1,65	1,72	GTTCAAATATATTT	-118
									GTTCAATTAATATTA	-95
									TTTAATTTTTGGTTC	-106
									TAATGAAGGGCGAAG	-2
									ATTACTTTTCATTTT	-84
ZCP4_1516	ATP-dependent DNA helicase RecG	-1,03	-1,07	-1,04	-1,01	1,13	1,81	1,83	GTTGAACTCTGCTTT	-37
									AAAATCGAAACGAAA	-54
									GTTGAACTCTGCTTT	-37
									CTTAATCCGCTGTTT	14
ZCP4_1522	protein	-1,31	-1,30	-1,01	1,03	1,40	2,52	2,81	TTTCATTACCCCTTG	-123

5. Παράρτημα

	translocase subunit secB									
									TTTGCGCCATCATT	-47
									ATTCAAGATCACTTT	-36
ZCP4_1521	integral membrane protein MviN	-1,35	-1,43	-1,11	-1,08	1,20	2,02	2,20		
ZCP4_1520	tryptophanyl-tRNA synthetase	-1,28	-1,23	1,02	-1,05	-1,19	-1,21	-1,39		
ZCP4_1523	hypothetical protein	-1,07	-1,04	1,03	-1,10	1,16	1,91	1,65	GAAAACCCCTCAAAT	-214
									CTTCTTTGTGTCTTT	-162
									TTTGTCCTTTTTTC	-158
									ATTCTGCTGTATTTT	-31
ZCP4_1524	hypothetical protein	1,01	1,04	1,14	1,08	1,12	1,35	-1,01		
ZCP4_1525	MltA domain protein	1,11	1,07	1,05	-1,09	-1,17	-1,26	-1,33		
ZCP4_1542	carbamoyl-phosphate synthase small subunit	-1,07	-1,22	-1,26	1,04	-1,16	2,70	3,67	AAAAAAAAGGAGAAC	-21
									GAATGGTCGGGCAAT	-140
ZCP4_1543	carbamoyl phosphate synthase large subunit	1,01	-1,01	-1,05	-1,01	-1,19	1,88	2,16		
ZCP4_1546	ABC-type transport system involved in resistance	1,12	1,18	1,07	1,03	1,46	2,48	2,03	GTTCAATAAAGGTTC	-254
									TAACATTAGCCGAAT	-88
									TAACATTAGAGAAG	-143
									GAAGGTGTTTTAAC	-99
									GTTGCGCCTTTTTC	9
									GAATTATGAAAAAAG	-5
ZCP4_1549	hypothetical protein	-1,28	-1,20	1,08	1,04	2,54	3,43	2,99	CTTCTCATGCGATT	-69
ZCP4_1548	hypothetical protein	-1,20	-1,09	1,05	1,05	2,50	6,35	6,68		
ZCP4_1561	alcohol dehydrogenase. class IV	-1,05	1,03	1,12	1,21	1,62	1,69	2,16	AAACGGGATTA AAC	-99
									AAACGTCTCGAAAAC	-110
									AACTTTGAGAAAAC	-121
									GAAAACGTCTCGAAA	-112
									GTTGTTTTCGGGTTG	-51
									GTTTTCGGGTTGTTG	-48
									AAACAGACTATAAAT	-248
									TAAATGTGCTGGAAT	-238
									GAAAATGCGTAAAAT	-161
									AAAAACTTTGAGAAA	-123
									GAAAACGGGATTA AA	-101

5. Παράρτημα

									AAACGCAAAAACAAT	-88
									CAAAAACAATAGAAA	-83
									ATTTACTCGTTTTTC	-141
									CTTCTCAACTTTTT	4
ZCP4_1562	glycyl aminopeptidase	-1,07	-1,13	1,03	1,15	1,29	1,78	1,80	AAACAATGATTCAAC	-32
									GTTCTTGCTATTTT	6
									TTTTATGAAGCGTTC	-5
									AAACGCTGCATCAAA	-263
									AAAAAATAAAAGAAA	-161
									AAAGAAATTTTGAAA	-153
ZCP4_1568	Excinuclease ABC subunit A UvrA	-1,22	-1,18	1,14	1,46	2,88	9,65	14,36	GAACGGTAGCAGAAT	-166
									GAACAAAGGGGGAAT	-94
									ATTGCCGCCGAATTC	-148
									ATTCAAAGTCCCTTG	-137
									CTTGCTTGCCGTTT	-126
ZCP4_1574	hypothetical protein	-1,24	-1,27	-1,55	1,00	-1,00	3,32	4,79	TAACACTTTTTTAAC	-204
									AAACTTCTTATAAC	-230
									AAACTAAAAGCAAAC	-152
									AAACTGAACCCAAAC	-133
									AAACCCCAAAAAAC	-187
									GAACCCAAACTAAA	-128
									AAAAGTAGCCCAAC	-177
									CAACACAAACCTAAA	-166
									AAATGAGGAAAAAAC	-100
									AAACCTTCTTCCAAG	-89
									AAAGGAAAATAGAAT	-13
									TTTTTGTAACCTTC	-237
									GTTTTATAACTTTT	-210
ZCP4_1583	arabinose efflux permease family protein	-1,20	-1,18	1,12	1,16	2,46	6,39	10,37	ATTTTTGCTTATTTTC	-207
									TTTAGCATCTAGTTT	-158
ZCP4_1582	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,33	-1,41	-1,08	-1,01	1,34	2,27	1,85		
ZCP4_1581	hydrolases of the alpha/beta superfamily	-1,40	-1,42	1,04	-1,03	1,17	1,62	2,03		
ZCP4_1584	short-chain alcohol dehydrogenase	-1,29	-1,10	1,19	1,12	2,06	2,06	1,59	GAACCGGAAATGAGC	-103
ZCP4_1590	formate acetyltransferase 1	1,02	1,01	1,00	-1,05	1,20	2,85	2,77	AAAAGCCATATGAAA	-211
									ATTTTAGGGCTGTTG	-232

5. Παράρτημα

									ATTCTATTATCTTT	-166
									TTTTTCAAATGATTC	-154
									TTTTTGTTAGAGTTA	-136
ZCP4_1591	pyruvate formate-lyase 1-activating enzyme	-1,02	-1,06	-1,09	-1,14	1,00	1,77	1,51		
ZCP4_1594	hypothetical protein	1,25	1,18	1,23	1,09	2,05	5,19	6,21	GAAGATGATTTTAAA	-123
									TTTTGAGCCTTTTTC	-172
									GTTAGCCCTTCTTTA	2
ZCP4_1607	transcriptional regulator. BolA protein family	-1,13	-1,14	1,20	1,01	1,62	4,46	5,39	ATTCTGGCATCCTTC	-110
									GTTAAAATCCCGTTA	-124
									TAAAAGGATAATAAC	-300
									GAATAGCCGTTAAAA	-132
									AAATTAGTCTGGAAA	-81
									CAAAGCCGAGGGAAA	-19
									ATTCAGGCCATTTTT	-164
									TTTCCAAGAATTTTA	-152
ZCP4_1618	hypothetical protein	-1,75	-1,44	-1,00	1,01	3,90	19,72	22,83	TTTTTTAGCTGTTC	-132
									AAATAAAGCACCAAC	-172
									AAAATCTTGTCGAAT	-33
									ATTAGGCATGTGTTT	-222
									ATTCGACTGTGTTT	-55
ZCP4_1621	KpsF/GutQ family protein	-1,10	-1,07	-1,01	-1,07	1,08	1,60	2,06	TAACAAAAAGTCAAC	-93
									CAAAATTTTTCGAAA	-170
									TAAGTGTAAAAAAT	-131
									GAAAATAACAAAAAG	-98
									ATTTATGCAAAGTTA	-214
									TTTTTCGAAAATTTTC	-165
									ATTTCAAGGGTGTTT	-155
									TTTCAAGGGTGTTT	-154
									GTTTTATTATTTTAA	-144
ZCP4_1642	hypothetical protein	1,03	-1,07	1,07	1,04	1,45	3,28	5,20	GAATTTTATAAAAA	-139
									TTTTTATAAAAAATTC	-136
									CTTTTAGAGTTTTTC	-99
									TTTTCTCGTTCCTTC	-89
									ATTGTAATTCATTC	-30
									ATTGTCGAGACGTTG	12
ZCP4_1652	ATP:cob(I)al amin adenosyltransferase	1,15	1,20	1,14	1,04	1,49	1,74	1,92	GAAAAAATAAAAAAT	-175
									ATTATTTAATGGTTA	-205

5. Παράρτημα

									ATTATTCTTCTTTC	-114
									ATTAATAATTAGTTTC	-52
ZCP4_1661	deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase.	-1,35	-1,33	1,15	1,15	2,19	5,68	6,21	AAATCTCTTTGGAAT	-22
									AAATGAAATGGGAAA	-2
ZCP4_1662	UvrD/REP helicase	1,02	1,06	1,12	1,01	1,08	1,89	2,75	GTTTCTGGGCTGATC	6
ZCP4_1667	6-phosphoglucosyltransferase	-1,27	-1,23	-1,02	1,05	1,67	2,74	2,58	GTTCTAATAAAGTTC	-164
									AAAATAGTTTGAAAC	-119
									AAACCTGCTCAAAAG	-67
									GTTGTCCGGATTTTT	-266
ZCP4_1673	putative hydrolase or acyltransferase of	-1,20	-1,16	1,01	1,35	1,89	3,34	4,40	AAACCTATAATGAAT	-239
ZCP4_1695	putative threonine efflux protein	-1,01	-1,06	1,09	1,19	2,41	3,33	3,06	GAAATTTTTCAAAAT	-71
									TTTCCCTGAAATTT	-79
									TTTTTCAAAATATTC	-67
									ATTCGGATGGTCTTT	-56
									TTTTTCAAGGCGTTT	-43
									TTTTCAAGGCGTTTC	-42
ZCP4_1721	bacterioferritin-associated ferredoxin	-1,10	-1,07	1,06	1,02	1,20	3,06	3,19	GAAGTTATATCTAAG	-59
									TTTTAATTTTTGTTA	-107
									GTTTGAGAGTGATTA	-8
ZCP4_1726	DNA-directed RNA polymerase specialized sigma	1,01	-1,02	-1,08	-1,02	1,10	1,74	2,11	GTTTTTGTAGGTTA	-131
									GTTACCAATTTTTG	-41
ZCP4_1727	RNA polymerase, sigma-24 subunit, ECF subfamily	1,43	1,29	-1,13	-1,11	1,07	1,38	1,45		
ZCP4_1729	Iron-sulfur cluster assembly accessory protein	-1,02	1,01	-1,03	-1,13	-1,09	3,11	3,27	GAAATGACAAACAAC	-4
ZCP4_1730	exodeoxyribonuclease III Xth	-1,01	-1,03	-1,11	-1,14	1,03	2,47	2,81		
ZCP4_1743	response regulator with CheY-like receiver	-1,04	-1,02	1,09	1,11	1,60	4,61	5,49	AAAAATTCATGGAAT	-139
									CTTCTTTCTTTTTC	-119

5. Παράρτημα

ZCP4_1744	hypothetical protein	-1,06	-1,08	1,00	1,15	2,28	11,91	13,88		
ZCP4_1745	uncharacterized protein involved in tellurite	-1,08	-1,08	1,01	1,08	1,88	5,32	5,70	GTAAATTTCTTTTC	-79
ZCP4_1753	RNase III	-1,15	-1,25	-1,09	-1,02	1,29	2,48	2,47	TTTTATAACTTTTC	-76
									CTTTCAAGCTGTTG	-67
ZCP4_1754	hypothetical protein	-1,48	-1,16	1,07	1,45	5,00	11,51	11,66	AAATAGATATAAAC	-199
									TAAATCAGGATAAC	-53
									GTTTGGTCTTTTTTA	-125
ZCP4_1755	short-chain dehydrogenase of unknown substrate	-1,78	-1,36	-1,07	-1,04	2,46	5,79	5,81	AAAACAAAATTTAAC	-151
									ATTTAACCGCTCTTC	-143
									CTTCATTTTTCTTTG	-132
									TTTTGTTTAGTTTTTC	-91
ZCP4_RS08925	hypothetical protein	1,23	1,32	1,19	1,88	3,84	5,13	5,49	CAAAGAAAAAGAAC	-120
									TTTCGTACTGTTG	-54
									TTTCACCCGTTCTTT	-112
ZCP4_RS08930	DUF955 domain-containing protein	1,12	1,13	1,08	1,32	1,74	1,68	2,08		
ZCP4_RS08970	hypothetical protein	-1,05	-1,06	1,25	1,07	-1,05	1,72	1,57	TTTATGCTTCGTTA	-85
									TTTCGTTATAATTTT	-92
ZCP4_RS08975	hypothetical protein	-1,14	-1,12	1,24	-1,05	1,32	4,37	4,17	GAACTATATAAAAAT	4
									GTCAGCATTACTTA	-112
									GTTTTTATCTTTTTTA	-71
									TTTCGCTGCAATTTT	-147
ZCP4_RS09000	tail E family protein	-1,17	-1,20	1,09	-1,00	1,20	2,03	3,02	ATTCCAAACAATTTT	-198
ZCP4_RS09010	tail sheath protein	-1,02	-1,07	1,17	1,38	1,62	2,76	3,95	GTTTTTGCGTGATT	-48
ZCP4_RS09005	hypothetical protein	-1,11	-1,05	1,05	1,08	1,43	2,75	3,78		
ZCP4_RS09015	phage baseplate assembly protein V	1,80	1,70	1,83	2,01	3,47	9,77	8,78	GAACAAAACATGAAC	-179
									TTTCGATTTAAATTG	-25
									TTTTTACATTTTTTC	-141
									TTTGTTCTCAATTC	-187
									GTTATTTGAAATTG	-195
ZCP4_RS09090	NADPH dehydrogenase	1,11	1,19	1,12	1,10	1,34	2,87	3,97	TTTTGGGTATAGTTT	-226
									TTTCGGTTGAGATT	-298
ZCP4_RS09185	hypothetical protein	1,21	1,44	1,33	1,96	1,33	1,89	2,63	GTTAGTGCTAGATT	-80
									CTTCCCAAGTATTTG	-163
									TTTTATCTGGAGTTT	-199

5. Παράρτημα

ZCP4_RS09205	NADP oxidoreductase coenzyme F420-dependent	-1,23	-1,24	-1,05	-1,02	1,66	3,37	4,37	CTTTACGATGTTTC	-47
ZCP4_RS09235	TonB-dependent receptor	1,04	1,13	-1,05	-1,11	1,04	2,29	2,75	CTTTGTTTCTCATTTC	-2
									GTTTCTCATTCAATT	-6
									TTTCTCATTCAATTA	-7
									TTTCAACGTCAATTT	-237
ZCP4_RS09275	hypothetical protein	1,10	1,11	1,16	1,19	1,30	1,47	1,70	ATTTTCACTTGTTTC	10
									GTTGAAATATTTTTTC	2
ZCP4_RS09295	hypothetical protein	1,28	1,03	1,27	1,56	2,11	1,81	2,24	TTTTGACACAACCTTC	-15
									CTTTGAAATAATTTTC	-60
									TTTCTCACCATTTTA	-176
ZCP4_RS09300	hypothetical protein	-1,17	1,02	-1,08	1,33	1,63	1,90	1,63	GAAAGAGGGCTTAAC	-174
									TTTTTTCAGCATTTTC	-118
									GTTTTTTCAGCATTT	-119
ZCP4_RS09375	hypothetical protein	-1,31	-1,36	1,02	1,11	1,58	3,36	3,12	ATTAGCCTTTTATTC	-262
ZCP4_RS09400	hypothetical protein	1,09	1,17	1,07	-1,13	1,04	1,62	1,64	GAAACAAAGAAAAAC	-98
									TTTAATGGTTGTTT	-117
									TTTTTAAAACAGTTT	-87
ZCP4_RS09415	Transposase	1,07	-1,01	1,07	1,12	1,41	4,53	5,85	GTTTTGAGGTCGTTTC	-227
									TTTCAGGGATGGTTA	-177
									TTTAATTAGCTGTTT	-238
									GTTATCGCGGGATTA	-166
									TTTTCTAGGTTTTTC	-103
									TTTTAGGGTCTGTTA	-45
									CTCCGTCCTCTTTT	4
ZCP4_RS09435	hypothetical protein	1,01	1,02	1,02	-1,10	-1,02	1,52	1,79	GAACAGAGAAAAAAG	-204
									TTTCAGCAATGGTTA	-252
									TTTAGTCAATTTTTTC	-297
ZCP4_RS09430	hypothetical protein	1,06	1,15	-1,04	-1,15	-1,13	1,21	1,50		
ZCP4_RS09425	DNA adenine methylase	1,13	1,11	1,01	-1,05	1,08	1,46	1,62		
ZCP4_RS09440	hypothetical protein	-1,12	1,08	1,09	1,09	1,44	2,83	3,54	ATTTATTTATTTTTTC	-193
									ATTTATAAATTGTTA	-167
									GTTATATATTTATTA	-156
									GTTAGGATGTTTTTT	-140
									GTTAATGTATTTTTTA	-84
ZCP4_RS09445	TonB-dependent receptor	1,14	1,15	1,09	1,01	1,38	2,30	3,03	TTTCCCTAATTTTTG	-232
									ATTCAGATTAATTTT	-220
									TTTTGAATAATATTC	-74

5. Παράρτημα

									CTTCTCATTATTTTG	-64
ZCP4_RS09480	hypothetical protein	1,31	1,14	-1,19	-1,01	1,29	1,98	1,99	CTTCCCAGATTGTTT	-225
									TTCCCTTGATTT	-252
									ATTTTTTGCTGTTT	-164
									TTTTTTGCTGTTTC	-163
									GTTTCTAACCCCTTG	-149
ZCP4_RS09485	type I restriction-modification system. M	-1,06	-1,10	-1,09	1,13	1,60	2,22	2,41	GAAGCCAGTCCGAAG	-30
									GAAATTGCTCGGAAT	-274
									TTTCTATGGAAATTT	-238
									TTTTCTGTGATTC	-142
									TTTTTATCCTTCTTC	-19
ZCP4_RS09490	restriction modification system DNA specificity	-1,09	-1,07	1,02	-1,00	1,38	2,16	2,22		
ZCP4_RS09495	anticodon nuclease PrrC	-1,08	-1,01	-1,03	-1,06	1,20	2,22	2,27		
ZCP4_RS09500	type I site-specific deoxyribonuclease HsdR	-1,08	-1,10	-1,07	-1,04	1,15	2,04	1,94		
ZCP4_RS09530	uncharacterized protein with a C-terminal OMP	-1,07	-1,05	1,18	1,10	1,80	4,29	4,91	CAATACGGCAGGAAC	-119
									GTTGTTCTGCATTG	-219
ZCP4_RS09570	hypothetical protein	1,05	1,09	1,11	1,11	1,21	1,83	1,51	GTTTTTCAGCCTTT	-118
									TTTTTCAGCCTTTC	-117
ZCP4_RS09595	hypothetical protein	1,18	1,12	1,20	1,23	1,45	1,80	1,66	ATTCTATCTTGTTA	-62
									CTTAAGAGAAGATTC	-249
									CTTCTTTTTTCATTA	-30
ZCP4_RS09600	hypothetical protein	1,31	1,58	1,52	1,16	1,17	1,10	-1,35		
ZCP4_RS09645	phage capsid scaffolding protein	1,59	1,49	1,85	2,28	1,99	1,55	1,24	GTTTACTGGTTTTTG	7
									ATTTTTTACTCGTTG	-13
									TTTGCTCTGCAGTTT	-42
ZCP4_RS09085	phage capsid protein	1,38	1,25	1,20	1,16	1,23	1,54	1,12		
ZCP4_RS09650	hypothetical protein	-1,51	-1,20	1,29	1,08	1,63	2,44	2,85	ATTAGATATCTATTC	5
									TTTCATTGCAATTTT	-92
ZCP4_RS09685	hypothetical protein	1,73	2,24	1,25	1,11	1,47	2,90	2,39	GTTGAACAAGTGTTTC	-10
									GAACAAGTGTTCAAA	-7
									CAACGTCTCCGAAA	-290
									CTCCGAAAGGCTTA	-284
									TTTATACGTCCATTC	-49

5. Παράρτημα

Οι χρωματικές ενδείξεις των λόγων έκφρασης είναι ίδιες με του Πίνακα 5.7. Γονίδια (*locus tag* και προϊόν γονιδίου) που στοιχίζονται τέρμα δεξιά εντός του κελιού τους είναι γονίδια που ανήκουν σε συνεργίσια με το προηγούμενο γονίδιο και ρθμίζονται από τους ίδιους χειριστές. *d*: η απόσταση του πρώτου νουκλεοτιδίου του εκάστοτε χειριστή από το κωδικόνιο μεταφραστικής έναρξης του εκάστοτε (το - υποδηλώνει ότι ο χειριστής είναι ανοδικά του γονιδίου, το + υποδηλώνει καθοδικά).

Πίνακας 5.10. Τα SOS-ρυθμιζόμενα υποεκφραζόμενα γονίδια του CP4 και οι χειριστές τους

Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)							SOS χειριστές	d
		0.05	0.1	0.2	1	5	10	15		
ZCP4_0044	hemolysin A	1,14	1,17	1,12	1,17	1,01	-1,65	-2,35	AAACGCCTCCTGAAC	-286
ZCP4_0824	Formate-- tetrahydrofolate ligase	-1,18	-1,28	-1,36	-1,19	-3,15	-9,37	-12,17	GTTCCAACCTGTTT	-253
ZCP4_0491	hypothetical protein	1,15	-1,11	-1,40	-1,07	-1,52	-1,63	-2,18	GAACCCAGTCCCAAC	-247
ZCP4_0175	30S ribosomal protein S2	1,14	1,07	1,03	1,09	-1,44	-2,78	-2,31	GTTCTTCAAATGTTC	-218
ZCP4_1728	Peptidase M23	1,12	1,11	-1,04	-1,05	-1,88	-3,36	-4,26	GAAATGATTGAAC	-108
ZCP4_0134	sugar-phosphate isomerase, RpiB/LacA/LacB family	-1,10	-1,09	1,02	-1,04	-1,16	-2,72	-3,39	GAAATGCTTAAGAAC	-107
ZCP4_0133	serine hydroxymethyltr ansferase	-1,13	-1,19	-1,02	-1,05	-1,31	-2,92	-4,12		
ZCP4_0132	transcriptional regulator NrdR	1,24	1,15	-1,08	-1,04	-1,64	-3,51	-5,51		
ZCP4_0131	RNA methyltransfera se, TrmH family, group 1	1,34	1,31	1,05	-1,03	-1,71	-4,83	-5,98		
ZCP4_0106	GTP cyclohydrolase I	1,07	1,09	1,14	1,09	-1,40	-3,52	-4,33	GAAGAGATAAAGAAC	-104
ZCP4_1097	alanine racemase domain protein	-1,07	-1,10	-1,08	-1,15	-1,22	-1,54	-2,00	TAACTATTTGAGAAC	-98
ZCP4_1096	ABC transporter related protein	-1,02	-1,05	-1,09	-1,14	-1,07	-1,16	-1,33		
ZCP4_1650	amino acid permease- associated region	-1,18	-1,21	-1,06	-1,08	-1,46	-2,09	-1,79	TAACTATTTGAGAAC	-98
									GTTTTGCTTGTGTTC	-90
ZCP4_0061	acyl carrier protein	1,10	1,12	1,10	1,03	-1,23	-3,62	-6,69	GTTCCAGATTTTTTC	-79
ZCP4_1211	uroporphyrin-III C- methyltransfera se	1,32	1,38	-1,73	-1,06	-1,76	-2,13	-2,25	GAACAGGAATAGAGC	-70
ZCP4_1212	sulfate adenyltransfer ase subunit 2	-1,06	1,03	-2,11	-1,22	-1,93	-1,78	-1,87		
ZCP4_1213	sulfate adenyltransfer ase	-1,30	-1,19	-2,41	-1,32	-2,07	-1,88	-1,68		
ZCP4_1214	adenylsulfate kinase	-1,32	-1,27	-2,50	-1,42	-1,99	-2,32	-1,86		
ZCP4_1551	Septum formation initiator	1,07	1,11	-1,16	-1,22	-1,81	-2,36	-2,63	GTCCTGATTCGTTC	-56
ZCP4_0604	oxidoreductase domain protein	1,07	1,08	1,05	1,13	1,27	-2,71	-5,77	GAACCATGACGGATC	-55
ZCP4_0344	hopanoid biosynthesis	1,42	1,38	1,06	1,08	-1,02	-2,73	-3,05	GAAAGGCATAAGAAC	-38

5. Παράρτημα

	associated glycosyl transferase protein HpnI									
ZCP4_0343	hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnJ	1,07	1,01	1,02	1,09	-1,07	-1,40	-1,31	GAACGGTTCATGATC	-26
ZCP4_0342	hopanoid biosynthesis associated protein HpnK	1,21	1,19	1,02	1,09	1,07	-1,13	-1,01		
ZCP4_0043	hydro-lyase, Fe-S type, tartrate/fumarate subfamily, alpha subunit	1,07	-1,01	1,05	1,08	-1,13	-2,26	-2,18	GTTCAGGAGGCGTTT	-22
ZCP4_1615	FeoA family protein	1,27	1,33	1,02	1,01	-1,49	-2,47	-2,42	GAACAGGATAATAAC	-16
ZCP4_0002	ABC transporter related protein	1,15	1,16	1,13	1,08	-1,12	-1,68	-1,51	GAATAAGGGTTGAAT	-83
ZCP4_0003	OmpA/MotB domain protein	1,07	-1,09	-1,14	-1,02	-1,06	-1,38	-1,55	GTGCTTGCACCGCTC	-74
ZCP4_0011	aminopeptidase N	-1,10	-1,06	1,04	1,05	1,12	-1,31	-2,13	GATCCGCTTCCTTTC	-50
ZCP4_0012	aldo/keto reductase	-1,12	-1,05	1,08	-1,04	1,07	-1,36	-2,37	GTTTATCCTCGGATC	-254
ZCP4_0033	conserved predicted protein with nucleoside triphosphate hydrolase domain	1,09	1,11	-1,02	-1,06	-1,50	-2,15	-2,22	CAACGATCTTGTAAAC	-54
ZCP4_0034	Nucleotide kinase-like enzyme affecting the cell wall	1,12	1,13	-1,07	-1,25	-1,88	-3,07	-4,24	GTGCACTGCGCTTTC	-271
									GATCTTGTAAACGGAC	-50
ZCP4_0052	N-acetylmuramic acid-6-phosphate etherase	1,25	1,16	1,07	1,06	-1,44	-3,69	-3,80	TTTCTTTTCTGATA	7
ZCP4_0051	organic radical activating-like protein	1,15	1,03	-1,00	1,05	-1,67	-5,69	-5,22	GGCCTGTTTATGAAA	-28
									GAAGCCGTGACCAGC	-133
									GTTATTTTCAAATTA	-62
ZCP4_0062	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase 2	1,19	1,20	1,09	1,07	-1,00	-1,65	-2,15	GTTTATCCTCCGATC	-167
ZCP4_0063	aminodeoxychorismate lyase	1,27	1,35	1,02	-1,20	-1,33	-1,40	-2,10		
ZCP4_0069	8-amino-7-oxononanoate synthase	-1,06	-1,03	1,05	1,04	1,01	-1,94	-2,49	GAATAAGAATTGAAA	-19
									GAAAAGAATAAGAAT	-24
ZCP4_0072	GMP synthetase	1,33	1,32	1,03	1,04	-1,06	-1,52	-1,53	GCTCTATGTCCGTTT	-5
									GGACAGGAAGTGTTT	-68
ZCP4_0081	CcmE/CycJ protein	1,09	1,08	-1,07	-1,18	-1,60	-1,61	-2,42	TTTCATCAGACGTTT	-63
ZCP4_0082	cytochrome c assembly protein	-1,05	-1,10	-1,16	-1,33	-1,92	-1,78	-1,77	GCTCGGCTTAGTTTC	-52

5. Παράρτημα

ZCP4_0083	Redoxin domain protein	-1,15	-1,09	-1,20	-1,26	-1,71	-1,60	-1,57		
ZCP4_0084	cytochrome C biogenesis protein	-1,09	-1,11	-1,15	-1,19	-1,98	-1,96	-2,25		
ZCP4_0085	cytochrome c biogenesis factor-like protein	1,25	1,07	-1,22	-1,01	-1,48	-1,72	-1,86		
ZCP4_0089	50S ribosomal protein L36P	1,43	1,37	-1,05	-1,11	-2,75	10,00	-11,30	TTTCAAGGATATTTTC	-114
ZCP4_0092	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	-1,10	-1,08	1,01	1,02	1,09	-1,39	-2,13	GAAGAGATATTGAAA	-27
									GAAAAGGAGTGGAAAT	-16
									CAACACATAACGAAG	-38
ZCP4_0103	GDP-mannose 4,6-dehydratase	-1,15	-1,07	1,12	1,15	1,03	-1,41	-1,53	AAACTGGTGATGAAT	-218
ZCP4_0102	nucleoside-diphosphate sugar epimerase	1,01	-1,02	1,14	1,11	1,10	-1,24	-1,41	TTTCATATTAGGTTG	-70
ZCP4_0107	Mandelate racemase/mucronate lactonizing protein	1,01	1,01	-1,02	1,13	-1,14	-1,84	-1,96	TGACCAAAGATGAAC	-35
ZCP4_0110	30S ribosomal protein S6	1,23	1,22	1,18	1,16	-1,12	-7,43	-11,81	GATCATTAAAAGATC	-110
ZCP4_0109	30S ribosomal protein S18	1,05	1,17	1,09	1,04	-1,17	-5,41	-8,91	GTCGCGATTATGTTTC	-249
ZCP4_0108	50S ribosomal protein L9	1,13	1,31	1,12	-1,07	-1,59	-8,07	-14,12		
ZCP4_0114	twin arginine translocase protein A	1,12	1,05	1,02	1,02	-1,29	-1,87	-2,30	GTTTAGGGAGATTTTC	-19
ZCP4_0120	DEAD/DEAH box helicase domain protein	1,25	1,17	1,01	1,08	-1,03	-1,48	-1,72	GTTGGATATCCGTTG	-75
ZCP4_0125	potassium transporter Kup	1,11	1,09	1,01	1,01	-1,21	-2,33	-2,71	GATTGTTGCAAGAAC	-125
									GAACAGCAGAGGGTC	-114
									TTTTGCTTTCGGTTTC	-89
ZCP4_0162	Beta-N-acetylhexosaminidase	-1,15	-1,20	-1,04	-1,05	-1,10	-1,27	-1,50	GAAGGGCTTTCGACC	-60
ZCP4_0183	outer membrane protein assembly complex, YaeT protein	1,17	1,19	1,06	-1,00	-1,28	-1,94	-1,78	GAAGACAGCCGGAAA	-51
ZCP4_0184	outer membrane chaperone Skp (OmpH)	1,02	-1,05	-1,03	1,04	-1,15	-2,64	-2,95		
ZCP4_0185	beta-hydroxyacyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase FabZ	1,03	-1,02	-1,01	1,06	-1,18	-2,66	-3,45		
ZCP4_0187	VanZ family protein	1,37	1,43	1,17	-1,01	-1,31	-2,84	-2,48	TTTCGAGGTGGCTTC	-53
									CTTCTTGACCTCTTC	-5

5. Παράρτημα

ZCP4_0195	Cytochrome-c peroxidase	1,03	1,01	1,02	1,01	-1,07	-1,46	-1,72	GTTTCATCCGATCATC	-57
ZCP4_0211	Glutathione S-transferase domain protein	1,33	1,26	-1,03	-1,03	-1,65	-1,95	-1,85	GTTCCCTAATGTGG	-9
									ATTTATCTATAGTTC	-20
ZCP4_0212	Glutamate synthase (ferredoxin)	1,04	-1,01	-1,06	-1,14	-2,74	-11,59	-20,85	GAGATATAAATGAAC	-56
ZCP4_0216	phage SPO1 DNA polymerase-related protein	-1,05	-1,11	-1,15	-1,02	-1,02	-1,71	-2,10	GAAAAATGTCAGAAG	-5
ZCP4_0226	Nucleotidyl transferase	-1,08	-1,27	-1,22	1,04	-1,67	-4,38	-5,36	GCTCATCTTCATTC	-38
ZCP4_0227	double-strand break repair protein AddB	1,04	-1,08	-1,18	1,01	-1,41	-2,05	-2,41		
ZCP4_0228	double-strand break repair helicase AddA	1,04	1,02	1,01	-1,03	-1,25	-1,01	1,00		
ZCP4_0246	hypothetical protein	1,15	1,05	-1,32	-1,45	-1,79	-2,24	-3,53	GTTCCCGTGGTGTC	-247
ZCP4_0251	signal recognition particle protein	1,16	1,03	-1,11	-1,11	-2,11	-3,78	-4,93	GGTCAGCGAATTTTC	-117
ZCP4_0250	30S ribosomal protein S16	1,07	-1,06	-1,03	1,04	-1,72	-4,31	-7,98		
ZCP4_0249	16S rRNA processing protein RimM	1,18	1,06	-1,03	1,01	-1,62	-3,33	-4,75		
ZCP4_0248	tRNA (guanine-N(1)-methyltransferase	1,34	1,12	-1,05	-1,09	-2,19	-7,94	-8,79		
ZCP4_0247	50S ribosomal protein L19	1,04	-1,07	-1,16	-1,17	-2,85	-10,19	-13,74		
ZCP4_0267	dihydroneopterin aldolase	1,12	1,06	-1,07	-1,16	-2,25	-5,35	-6,28	GAAAAGCCAAAAAAC	-211
									TAACAATACAACAAC	-55
ZCP4_0272	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	1,01	-1,01	1,00	1,07	1,11	-2,07	-2,38	GTTATAAAAGCGCTC	-95
									TTTCGGCACAGGATC	-46
ZCP4_0286	argininosuccinate synthase	1,03	-1,00	1,06	1,03	-1,54	-5,01	-8,28	ATTCGGAGAGTTTC	-15
ZCP4_0298	Orn/DAP/Arg decarboxylase 2	1,19	1,12	-1,01	1,09	-1,20	-2,80	-2,76	TTTCGCCTCGATTC	-191
									CTTCTATATGGCTTC	-276
ZCP4_0304	translation initiation factor IF-1	1,32	1,44	1,03	1,06	-1,62	-4,16	-5,28	AAACTTTGGCAGAAT	-51
ZCP4_0305	maf protein	1,40	1,38	1,11	1,08	-1,48	-5,54	-11,71		
ZCP4_0306	hypothetical protein	1,41	1,43	1,01	-1,06	-1,83	-6,14	-15,35		
ZCP4_0319	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	-1,09	-1,03	1,19	-1,02	-1,48	-2,32	-3,39	GAAACTGGTGCAGAAA	-219
									TTTCAAAGCCAGTGC	-200
									GAAGGCTGATCGGAC	-127

5. Παράρτημα

ZCP4_0368	trigger factor	1,10	1,09	1,05	1,19	-1,48	-5,13	-8,27	GTCGTTACGAGATG	-12
ZCP4_0367	glycosyltransferase involved in cell wall biogenesis	1,31	1,29	1,05	1,00	-1,26	-2,90	-4,05	GTTCCAGAGGTTTTCC	-98
ZCP4_0370	Aldose 1-epimerase	1,07	1,02	-1,15	-1,29	-1,80	-2,31	-2,76	AAACCGCCCATGAGC	-10
ZCP4_0404	periplasmic protein for capsular polysaccharide export	1,16	1,13	1,02	-1,00	-1,36	-2,00	-1,95	GAACAGCGTTTTAAA	-81
									GCTTTATTTTTGTTTC	-40
ZCP4_0420	NERD domain protein	1,10	-1,02	1,02	-1,01	-1,24	-1,48	-1,73	GTTCCAGTAGCGTATC	1
ZCP4_0421	beta-lactamase	-1,26	-1,23	-1,02	-1,07	1,17	1,61	1,36	GATTATCCGAGGTTTC	-18
ZCP4_0424	Aldose 1-epimerase	-1,01	-1,01	1,18	1,22	1,24	-2,05	-3,73	ATTTGACTTGCGTTG	-245
									GTCAAAGTTGACTTC	-231
									CTTCAAAAAGTTTA	-220
									TATCTTATTTAATTC	-86
									TTACTGATTCAGTTT	-41
									TAACTATTCAACAAA	-68
									CAACAAATAAATAAG	-60
									AAACCTCTCTCAAAG	-306
									GAAAAAATAATAAAT	-268
									GAATTAATTTGACT	-252
ZCP4_0426	hypothetical protein	-1,07	-1,02	-1,01	-1,06	-1,58	-3,32	-3,19	GATCCGGACAGGATC	-183
ZCP4_0428	50S ribosomal protein L13	1,00	-1,05	1,02	1,10	-1,29	-7,51	-14,49	GAACAAAAAATCATC	-166
ZCP4_0429	30S ribosomal protein S9	1,09	1,08	-1,04	1,04	-1,31	-6,96	-14,61		
ZCP4_0438	hopanoid-associated phosphorylase	-1,02	-1,06	-1,06	-1,04	-1,33	-2,08	-2,47	AAAAATATGCTGAAC	-6
ZCP4_0454	hypothetical protein	1,16	1,09	1,06	1,19	-1,19	-5,83	-10,65	CAACTTGAATAGAAA	-172
ZCP4_0467	arginyl-tRNA synthetase	-1,01	-1,03	1,01	1,00	-1,43	-1,98	-1,97	GAGCCTTTTGGCAAC	-93
ZCP4_0470	Sporulation domain protein	-1,02	1,01	1,00	1,01	-1,39	-2,45	-3,13	GTTCTATTGCGTGA	-157
ZCP4_0469	Chloride channel core	1,07	1,04	-1,10	-1,22	-1,54	-1,67	-1,64	TTTATGCTTGCGTTC	-43
ZCP4_0490	queuosine biosynthesis protein QueD	-1,17	-1,11	1,07	-1,04	-1,28	-1,53	-1,50	GAAAAATATGAGAAT	-7
									GAATCAACTTCTAAC	-31
									GAAATCTAGCAGAGC	-222
ZCP4_0498	ribosomal protein S12 methylthiotransferase	1,09	1,01	-1,08	-1,07	-1,71	-5,53	-7,87	TAACGCCTCATAAAC	-202
ZCP4_0520	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, C subunit	1,10	1,11	1,01	-1,10	-1,37	-2,23	-2,63	GAACGCCCTTACAAG	-119
ZCP4_0521	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	-1,02	-1,10	-1,03	1,03	1,01	-1,17	-1,36	GATCCTGTTCTGCTC	-51

5. Παράρτημα

ZCP4_0522	aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	1,01	-1,08	-1,04	1,05	1,00	-1,28	-1,72		
ZCP4_0523	transcriptional regulator, LysR family	1,18	1,21	1,10	-1,01	-1,12	-1,60	-1,46	GTTGTGCAGTCTTTC	-97
ZCP4_0544	TPR repeat-containing protein	1,02	1,03	-1,01	1,00	-1,60	-3,99	-9,87	ATTCTCCGATCTTTC	-34
ZCP4_0548	Mov34/MPN/PAD-1 family protein	1,00	-1,08	1,04	1,05	1,13	-1,70	-1,54	GTTCTTTATGGCTTT	-7
									GTTCCGATGATTTGC	-28
									TTTGCCATGGTGTTTC	-18
ZCP4_0553	hypothetical protein	-1,02	-1,08	1,04	1,21	1,16	-1,42	-1,52	GATAACGCCCTGTTC	-116
ZCP4_0567	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	1,13	1,12	-1,02	1,00	-1,20	-1,81	-1,48	GTGCATAAGGCATTC	-84
ZCP4_0566	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	1,20	1,16	1,06	-1,01	-1,21	-2,34	-2,96	GAAAACATCAGGAAA	-158
									TTTCGGGACAGGATC	-198
									GCTCTCGACAATTC	-282
ZCP4_0569	50S ribosomal protein L10	1,11	-1,02	-1,02	-1,05	-1,59	-3,15	-6,11	GTTCCGGATAGGCTT	-219
ZCP4_0568	50S ribosomal protein L7/L12	1,00	1,00	1,00	-1,10	-2,27	-4,59	-8,35	GAACCAGTGCCGTCC	-196
									ATTTAAAGTTTGTTTC	-230
									ATTTAAAGACCTGTTC	-247
ZCP4_0598	hypothetical protein	1,09	1,13	-1,06	-1,27	-1,61	-1,85	-2,04	GTTCGATCTCTTCTC	-84
									GAAAACAAAAACGAAT	-35
ZCP4_0602	DNA gyrase subunit A	1,09	1,13	1,03	-1,00	-1,03	-1,43	-1,50	TTTCTTCATTTTTTC	-58
ZCP4_0603	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase Gid	1,05	1,10	1,02	-1,03	-1,27	-2,63	-3,67	TTTCGGTGCCTATTC	-29
ZCP4_0614	nitroreductase	-1,10	-1,12	-1,06	-1,24	-1,33	-1,58	-1,62	GAATACGGATAGAAT	-14
									GAAGATAATAGCAAC	-104
ZCP4_0625	hypothetical protein	1,03	1,05	1,03	1,05	1,25	-1,71	-2,25	TTTCATTCTCTGTGC	-142
ZCP4_0630	adenylosuccinate lyase	-1,03	-1,04	-1,02	1,12	1,02	-2,12	-3,27	GTCCTAATTATGATC	-10
									GATCCCCCGTTATTC	1
ZCP4_0693	DNA repair protein RadA	1,11	1,06	-1,08	-1,24	-1,65	-1,57	-1,76	ATTTGCATTATGTTC	-27
ZCP4_0692	Colicin V production protein	1,05	1,17	1,12	1,00	1,09	1,21	1,17		
ZCP4_0702	sodium:dicarboxylate symporter	-1,23	-1,18	-1,19	-1,14	-1,86	-4,27	-4,93	GTAAATTATTGCTC	-111
ZCP4_0703	pseudouridine synthase	1,32	1,30	-1,05	-1,03	-1,64	-3,81	-5,30	CAACCAGATAAGGAC	-18
ZCP4_0704	methyltransferase	1,17	1,15	-1,03	1,23	-1,12	-4,32	-4,13		
ZCP4_0714	major facilitator superfamily MFS_1	1,09	1,12	1,06	-1,07	-1,25	-2,06	-2,24	GAACCGTTACCAAA	-44
ZCP4_0716	Polyprenyl	1,15	1,14	-1,03	-1,11	-1,30	-2,31	-3,54	AAACAAGTTGAGCAA	-63

5. Παράρτημα

	synthetase									
ZCP4_0715	ATP-dependent helicase HrpB	1,14	1,10	-1,04	-1,08	-1,54	-2,16	-1,96	GCAAACAAGTTGAGC	-65
									CTTCACAGTGTAGTC	-23
									ATTCTTCATGCTTC	-34
									GTTGAGCAAGTGCA	-57
ZCP4_0717	chorismate mutase	1,01	-1,03	1,01	-1,04	-1,77	-4,17	-5,72	CAACTGTTTGCAAC	-63
ZCP4_0721	hypothetical protein	1,36	1,32	1,05	-1,12	-1,71	-2,42	-1,93	GAACGGAACAAGCAA	-20
ZCP4_0722	transcription elongation factor NusA	1,21	1,16	-1,01	-1,08	-1,45	-1,55	-1,43	GCTCGGAAACGTCC	-58
									GATCGTCGTA AAAAC	-247
									AAACAGATATTGAAA	-107
ZCP4_0729	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	1,22	1,21	1,01	-1,08	-1,63	-4,34	-5,64	TTTCGCATCCGGTTA	-83
ZCP4_0735	indole-3-glycerol-phosphate synthase	-1,08	-1,10	1,06	1,17	-1,10	-1,87	-1,66	ATTCTTACAGAGATC	8
ZCP4_0737	aconitate hydratase	-1,02	-1,00	-1,06	-1,08	-1,72	-2,82	-2,97	GCAAAGAGAGTGAAC	-36
ZCP4_0736	isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent	1,01	-1,04	-1,11	-1,06	-2,12	-3,97	-5,67	GAATGATATGAGAAT	-54
ZCP4_0742	30S ribosomal protein S13	1,15	1,17	1,18	1,20	-1,07	-4,67	-7,25	GTTGTTCCACGCTTC	-264
									GTTTTGTATCAGTTG	-170
									GCTCTTTTGCAGTTG	-119
ZCP4_0744	preprotein translocase subunit SecY	1,14	1,26	1,05	-1,10	-1,22	-1,94	-2,04	GTTCTTGAGTTTTTA	-141
ZCP4_0743	Adenylate kinase	1,02	1,11	1,02	-1,10	-1,59	-3,46	-3,76	ATTTTTTCGGGGTTC	-24
ZCP4_0745	50S ribosomal protein L15	1,01	1,03	-1,02	-1,18	-1,90	-5,20	-7,81	AAATTGGCAAAGAAC	-126
ZCP4_0754	ribosomal protein L14	-1,03	1,01	1,01	-1,06	-1,14	-1,94	-2,83	TTTCCCGGCTAGTCC	-40
ZCP4_0753	50S ribosomal protein L24	1,01	-1,02	-1,02	-1,07	-1,64	-4,70	-8,14		
ZCP4_0764	50S ribosomal protein L3	1,02	1,03	1,02	-1,13	-1,57	-4,93	-7,43	GCTCCTTCGTCATTC	-80
ZCP4_0763	50S ribosomal protein L4	-1,09	-1,04	-1,03	-1,23	-1,78	-4,66	-7,54		
ZCP4_0762	50S ribosomal protein L23	-1,07	1,01	1,02	-1,08	-1,83	-5,76	-10,42		
ZCP4_0761	50S ribosomal protein L2	-1,09	-1,01	-1,01	-1,14	-1,36	-3,11	-4,65		
ZCP4_0760	ribosomal protein S19	-1,06	1,02	1,06	-1,05	-1,16	-2,48	-3,69		
ZCP4_0759	50S ribosomal protein L22	-1,01	1,03	1,01	-1,06	-1,07	-2,43	-3,62		
ZCP4_0758	30S ribosomal protein S3	-1,04	-1,00	-1,02	-1,12	-1,12	-2,26	-3,27		
ZCP4_0766	elongation factor Tu	-1,10	-1,13	1,07	-1,08	-1,32	-3,83	-6,36	TAACTAATGGCGAAA	-6
ZCP4_0765	30S ribosomal protein S10	1,17	1,22	1,09	-1,07	-1,44	-7,21	-13,25		
ZCP4_0769	ribosomal protein S12	1,05	1,07	1,08	1,02	-1,17	-5,64	-8,98	GCTCGGTGCTATTTT	-82
ZCP4_0767	elongation factor G	-1,03	1,06	1,03	-1,13	-1,25	-5,26	-8,18	GAACATTGCCATATA	-146

5. Παράρτημα

ZCP4_0768	30S ribosomal protein S7	1,08	1,08	1,08	1,00	-1,15	-4,95	-8,10	CTACATCTCCTGTTG	-194
									GTTAGCGGAAAGATG	-251
									GTTCCATTTGTA	-280
									GATCAATGTAAGGTT	-292
									GGTCAGGCGCATTTT	-53
									ATTTTTGCTCGGTGC	-88
ZCP4_0778	RNA pseudouridine synthase	1,21	1,28	-1,06	-1,18	-1,34	-3,58	-4,62	ATTGGGAATCAGTTC	-96
									TTGCAAACGTGTTT	10
ZCP4_0784	bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase	1,07	1,07	1,09	-1,00	-1,16	-2,03	-2,69	AGTCTGTCCTGTTC	-67
ZCP4_0789	type I glutamate-- ammonia ligase	-1,08	-1,08	-1,07	1,00	-1,64	-3,58	-5,36	GAACAGGCTTTAAG	-72
									ATTCGGCATCTGATC	7
ZCP4_0790	nitrogen regulatory protein P-II	-1,32	-1,30	-1,35	-1,29	-3,80	-8,58	-10,20	GAAGTTTGACGTAAC	-59
									GAAGCGCTTGTGAAA	-9
ZCP4_0795	hypothetical protein	1,10	1,13	-1,04	1,04	1,05	-1,40	-1,52	CTACAATTTAGAAC	-120
									GTTTTTCGATATTT	-30
									GATCGGGCTTTTTTC	-89
ZCP4_0822	transcriptional regulator, AsnC family	1,20	1,35	1,09	1,14	1,07	-1,21	-1,58	GAAAAAGCCCAGAAT	-200
									CTGCCCGTTTAGTTC	-151
									GTTTAGTTCTGGATC	-145
									AAACAAAAATGAAA	-38
									GTTCTGAAGATATC	-145
									AAAATAAACCGGAAC	-201
									GAAGTGCCGGAGAAA	-240
									GAACAAGCCGTCAAA	-190
ZCP4_0827	hypothetical protein	1,14	1,18	1,02	-1,07	-1,00	-1,36	-1,48	GTTCCAAGCAAATTT	-238
ZCP4_0826	Pyrrolo-quinoline quinone	1,05	1,09	1,02	-1,07	-1,12	-1,47	-1,71		
ZCP4_0825	GTP-binding protein EngA	1,12	1,15	1,03	-1,00	-1,29	-1,73	-1,93		
ZCP4_0829	cell wall hydrolase SleB	1,18	1,23	-1,03	-1,29	-2,54	-7,35	-15,94	GAACAAGCTGTCAT	-228
									GTCACCAAGAAGTTC	-145
ZCP4_0833	Lipolytic protein affecting the cell envelope	-1,00	1,05	1,01	-1,04	-1,10	-1,76	-2,05	ATTCATCGGCCTTTA	-130
ZCP4_0832	lipolytic enzyme affecting the cell envelope	-1,04	-1,06	-1,10	-1,13	-1,33	-1,44	-1,51	GGAGATTTTATGAAG	-9
ZCP4_0831	lipid O-acetyltransferase affecting the cell envelope	1,05	1,04	-1,05	-1,04	-1,23	-1,71	-1,81	AAACTATAACTTATC	-46
ZCP4_0830	lipid synthesis related and affects the cell	1,20	-1,09	-1,01	1,23	-1,01	-1,33	1,09	GATAAAAACTATAAC	-51

5. Παράρτημα

	envelope										
										AAAGAGTAAAAGAAG	-108
ZCP4_0843	guanylate kinase	1,25	1,14	1,01	1,01	-1,59	-4,21	-5,86		TTTCAAAAAGGGTGC	-129
										CTTCAGCTAATTTTC	3
ZCP4_0844	Arginase/agmatinase/formimino glutamase	1,02	1,11	1,12	1,04	-1,34	-1,70	-1,97		AAACGACGACAGAAA	-161
ZCP4_0915	rod shape-determining protein MreB	1,04	-1,01	-1,08	-1,12	-1,51	-2,49	-2,59		TTTCTGGCTTCTTTC	-47
ZCP4_0914	rod shape-determining protein MreC	1,27	1,21	-1,11	-1,12	-1,34	-1,95	-2,38			
ZCP4_0913	hypothetical protein	1,18	1,05	1,01	1,03	-1,04	-1,01	1,27			
ZCP4_0934	Peptidase related to the outer membrane elongation factor P	1,28	1,32	-1,00	-1,20	-1,89	-3,01	-3,58		TTTCCCATATTTTC	-128
ZCP4_0936	Inositol-phosphate phosphatase	1,08	1,06	1,05	1,02	-1,28	-3,58	-4,64		GTTTCCGGCTTGTTA	-132
ZCP4_0935	dihydrofolate reductase region	1,15	1,11	-1,02	1,04	-1,35	-3,26	-4,76		AAACAAGCCGGAAC	-109
ZCP4_0943	ribosomal protein L28	1,13	1,07	1,15	-1,18	-1,56	-2,30	-2,32		CTTGATCGGCGTTC	-72
										GAAATAGGCCAGAGC	-221
ZCP4_0964	prolipoprotein diacylglycerol transferase	1,27	1,07	1,14	1,23	-1,47	-3,19	-3,17		GTCCGTCTGTGCATC	-42
ZCP4_0966	3'-5' exonuclease	-1,02	-1,13	-1,01	1,02	-1,64	-3,30	-2,59		TAACAAAAACAGAAT	-190
ZCP4_0975	hypothetical protein	1,29	1,32	-1,06	-1,24	-2,14	-5,43	-6,77		GAATGATAGTCGAAA	-41
ZCP4_0976	OstA family protein	1,32	1,29	-1,11	-1,17	-1,49	-1,99	-1,98		GAAAATAGACCGAAT	-52
ZCP4_0977	S-adenosylmethionine synthetase	1,29	1,21	-1,00	-1,05	-1,23	-1,33	-1,21		AAACAGTCTAAAAAC	-28
ZCP4_0980	heme exporter protein CcmA	-1,02	1,06	1,04	-1,04	-1,77	-4,68	-5,92		TAACAGATAAGGAAA	-26
ZCP4_0992	Endoribonuclease L-PSP	1,16	1,19	1,04	-1,24	-1,51	-1,80	-1,95		GCTATTTGTTTGTTTC	-151
ZCP4_1000	hypothetical protein	1,03	1,02	-1,03	-1,20	-1,60	-2,11	-2,24		TTTATGTGTTTGTTTC	-5
ZCP4_1006	4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain protein	1,00	1,11	-1,02	-1,05	-1,29	-1,81	-1,90		GAACCACTAGAGATA	-99
										GTCCGACTAGACTTC	-142
ZCP4_1029	50S ribosomal protein L27	1,12	1,12	1,20	1,09	-1,68	-3,90	-5,47		TTTTTTGGTTGTTTC	-76
ZCP4_1036	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	1,16	1,03	-1,33	-1,05	-1,65	-2,18	-2,15		CAACAGTGCCAGAAT	-81
ZCP4_1043	L-serine dehydratase 1	1,13	1,15	1,03	-1,08	-1,41	-2,36	-2,73		GAAAAAACGGTGAAT	-17
										GTTAATAAAAAATTTTC	-178
										TTTGGGATGTTGTTTC	-121
ZCP4_1057	3-deoxy-7-phosphoheptulo	-1,23	-1,30	-1,24	-1,10	-2,07	-2,56	-2,39		GTTAGCAGTGTTTTC	2
ZCP4_1060		1,11	1,16	1,07	1,12	-1,08	-1,77	-1,78		GAACCGCCTTTGCGC	-33

5. Παράρτημα

	nate synthase									
ZCP4_1062	hypothetical protein	1,00	1,00	1,00	1,00	-1,54	-4,50	-5,84	GAGCCAATGGGGCAC	-61
									TAACAAAAGTGGAGC	-22
ZCP4_1070	hypothetical protein	1,26	1,36	1,32	1,12	-1,02	-1,40	-1,90	GTTTTATAGGGTTT	-49
ZCP4_1085	hypothetical protein	-1,08	-1,10	-1,04	-1,08	-1,64	-3,74	-5,34	TTTCTTCTCAAGATC	-3
									GTTACGGTTTTCTTC	-271
ZCP4_1090	pyruvate kinase	-1,05	-1,04	1,00	1,00	1,01	-1,57	-2,03	CTTCCCTTTTCTTC	-117
									GATCTCTTTGCGAAG	-137
									GAAGCTTGACTGAAG	-6
ZCP4_1091	GCN5-related N-acetyltransferase	-1,13	-1,16	-1,34	-1,12	-1,62	-3,99	-7,67	ATTCCCGCTGCGTAC	7
ZCP4_1092	tRNA (guanine-N(7)-methyltransferase	1,00	-1,06	-1,09	-1,07	-1,86	-4,68	-5,19	GCTCTATTCACGATC	9
ZCP4_1093	hypothetical protein	1,03	-1,04	-1,05	-1,00	-1,18	-1,49	-1,66	GTTCTTTCCCTTGTC	-96
									GCTCGATGTTCTTTC	-103
ZCP4_1108	Outer membrane-associated acid tolerance protein	1,05	1,02	-1,16	1,13	-1,12	-1,52	-1,68	GAAACGGCTTTGATC	-91
ZCP4_1138	major facilitator superfamily MFS_1	1,10	1,07	-1,04	-1,12	-1,23	-2,41	-2,65	CTTCTATCCGGCTTC	7
ZCP4_1187	TonB-dependent receptor	-1,10	-1,11	-1,13	-1,34	-1,53	-1,52	-1,57	GTTACACTATATTTTC	-92
ZCP4_1191	inosine monophosphate cyclohydrolase	-1,03	-1,06	1,05	1,09	-1,14	-2,80	-4,31	GTTTCATCTCGTGGTG	-223
									ATTCTGGGCGAGTTT	-107
									GAACCTGACCCGTAA	-66
ZCP4_1192	Sel1 domain protein repeat-containing protein	1,12	1,11	-1,04	-1,36	-1,48	-3,23	-3,93	GAAAAAGATATGAAG	-41
ZCP4_1219	transcription termination factor Rho	1,26	1,15	-1,02	1,08	-1,43	-5,41	-7,41	GTTTCCAACGGTGC	-120
ZCP4_1252	malate dehydrogenase	-1,15	-1,09	1,06	1,06	1,05	-1,30	-1,47	GAAGCTAAAATGAAA	-77
ZCP4_1259	Capsule polysaccharide biosynthesis protein	1,14	1,02	-1,13	-1,25	-1,78	-1,71	-1,51	AAATAGCCTATGAAC	-200
									AAACCATGTATGAAT	-6
ZCP4_1271	ribosomal 5S rRNA E-loop binding protein Ctc/L25/TL5	-1,09	-1,13	-1,17	-1,18	-2,55	-7,10	-9,26	GCTCGAGAGGAGGTC	-94
ZCP4_1270	peptidyl-tRNA hydrolase	1,12	1,02	1,00	-1,04	-1,48	-3,70	-3,21		
ZCP4_1269	GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD	-1,05	1,00	-1,00	-1,03	-1,22	-1,67	-1,51		
ZCP4_1273	SmpA/OmlA domain protein	1,18	1,23	1,06	-1,06	-1,12	-1,66	-1,47	TAACCTAATATGACC	-58
									TAACCGTTGGGAAA	-41

5. Παράρτημα

ZCP4_1286	preprotein translocase, YajC subunit	-1,02	-1,02	-1,07	-1,09	-1,38	-1,98	-1,99	TTTCTTTCCCTTTTC	-32
ZCP4_1287	preprotein translocase subunit SecD	1,08	1,11	1,01	-1,07	-1,27	-1,98	-2,18		
ZCP4_1288	protein-export membrane protein SecF	1,07	1,09	-1,00	-1,15	-1,32	-2,26	-2,25		
ZCP4_1289	PfkB domain protein	1,08	1,09	1,14	1,09	-1,07	-2,58	-2,85	GTTTGCTCGCTTTTC	-74
									TTTCTAACGCCGTTA	-63
ZCP4_1291	threonine synthase	-1,06	-1,08	-1,03	-1,02	-1,12	-2,75	-3,36	GAGAAATAAAAGAAC	-169
ZCP4_1292	Mitochondrial processing peptidase-like protein	1,16	1,18	1,02	-1,02	-1,22	-2,25	-3,11		
ZCP4_1293	SAM-dependent methyltransferase-like protein	1,17	1,22	1,07	-1,12	-1,14	-2,66	-3,38		
ZCP4_1335	PhnA protein	1,02	1,06	-1,04	-1,19	-2,69	-10,83	-14,43	AAACGGATGACGAAA	-40
ZCP4_1340	TOBE domain protein	-1,79	-2,35	-1,35	-1,23	-4,19	-6,71	-5,10	TTACGAATATAGAAC	-38
ZCP4_1362	transcriptional regulator, NifA, Fis Family	-2,37	-2,92	-1,40	-1,01	-3,73	-3,24	-2,41	TTTCCCCAAAATTC	-290
ZCP4_1371	TonB-dependent receptor	-1,21	-1,08	-1,25	-1,83	-1,23	-1,51	-1,65	CAACAAAGATGAAAC	-94
									TTTCCAAGTAAATTC	5
ZCP4_1377	30S ribosomal protein S1	1,24	1,27	1,08	-1,01	-1,63	-5,98	-9,32	CAAGGAATATAGAAC	-18
									GCAAGCTGTATGAAC	-114
									GAACTGCATGGCCAC	-7
ZCP4_1380	hypothetical protein	-1,02	-1,02	1,06	1,08	-1,25	-3,89	-4,49	GGACGGTTCATGATC	-10
									AAACTCTGGAAGGAC	-21
ZCP4_1400	argininosuccinate lyase	1,01	1,03	-1,00	-1,07	-1,46	-1,56	-1,59	AAATATCAAAAGAAC	-285
ZCP4_1401	hypothetical protein	1,12	-1,10	-1,05	-1,11	-1,74	-1,98	-2,37		
ZCP4_1402	diaminopimelate decarboxylase	-1,02	-1,02	-1,01	-1,12	-1,63	-2,15	-2,40		
ZCP4_1409	Extracellular ligand-binding receptor	1,06	1,08	1,12	1,16	1,07	-1,70	-1,98	ATTCGCTACCGGTTG	8
ZCP4_1417	hypothetical protein	1,16	1,18	1,20	1,00	-1,04	-1,56	-1,89	GAGCAACCCATGAAA	-267
									GTTTGCAATTACATTC	-32
ZCP4_1420	transcriptional regulator, ArsR family	1,08	1,11	1,10	1,02	-1,23	-2,58	-4,20	GAACAAAAGGAAATC	-116
ZCP4_1421	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	1,02	-1,08	-1,02	1,02	-1,36	-2,44	-2,66	TAACAAAATGATAAC	-41
ZCP4_1422	homocysteine S-methyltransferase	1,06	1,03	-1,02	1,04	-1,12	-1,92	-2,00	GAACGGCTATCTAGC	-48
ZCP4_1423	methionine synthase	1,07	1,05	1,09	1,10	-1,01	-1,56	-1,88	GAAAAGCGGCTGAAA	-29
ZCP4_1444	ROK family protein	1,02	1,05	1,18	1,00	-1,08	-1,44	-1,59	GAAAATATTTGAAA	-214
ZCP4_1445	part of an outer	-1,22	-1,19	-1,02	-1,02	-1,16	-1,54	-1,56	GAATAAAAATATAAC	-55

5. Παράρτημα

	membrane integrity system									
ZCP4_1450	30S ribosomal protein S21	1,14	1,09	-1,03	-1,16	-1,96	-4,82	-6,02	ATTCTTATGCAGATC	-7
ZCP4_1468	TonB-dependent receptor	1,18	1,27	1,12	-1,03	-1,32	-1,85	-1,89	AATATCTGCAGGAAC	-55
									TATAGCTACAGAAC	-162
									GTTCGCTGTTAGGCT	-193
									GAACCGGAAAAATCC	-44
									GTCATCCATCCATTC	-97
									TTTCGGTTATCTATC	-141
									GTTAGGCTTTTGCTT	-186
									TTTTGTTTCGCTGTTA	-197
									CTAGACATTTTGTTT	-204
									AAAGACTAAAAGAAT	-67
									GAATATCTGCAGGAA	-56
ZCP4_1476	ATP phosphoribosyltransferase	1,10	-1,01	-1,10	-1,05	-1,39	-2,37	-2,58	CAACATGATTAGAAA	-49
ZCP4_1475	adenylosuccinate synthetase	-1,00	-1,06	-1,08	-1,01	-1,36	-2,18	-2,56	GAATGTTGTCGCAAC	-60
									GAAACAGGGTGGAAAT	-71
ZCP4_1510	beta-lactamase	1,29	1,28	-1,13	-1,13	-1,10	-1,12	-1,67	GATAAGAGAAAAGAAC	-113
ZCP4_1511	Gluconolactonase	1,02	1,05	1,07	-1,12	-1,41	-3,48	-5,30	GTTTACCATATGGTC	-171
ZCP4_1517	tyrosyl-tRNA synthetase	-1,02	-1,01	1,12	1,17	1,13	-1,54	-1,50	TTTCGTTCTGATTTT	9
									GTTTTTACAGCGATT	-33
									TTACAGCGATTATTC	-29
									ATTCCGAATAGGCAC	-18
									GACACAATTCGTTC	2
ZCP4_1536	ribonuclease P protein component	1,16	1,04	-1,06	1,00	-1,43	-2,80	-2,99	ATTCATGAGCATTC	-133
ZCP4_1535	#N/A								GAATCTTGGCGCAAC	-112
ZCP4_1534	putative inner membrane protein translocase component YidC	1,16	1,13	-1,01	-1,00	-1,56	-4,41	-5,54		
ZCP4_1533	ribosome biogenesis GTP-binding protein YsxC	1,21	1,09	-1,01	-1,03	-1,76	-5,42	-7,51		
ZCP4_1552	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component, alpha subunit	-1,03	-1,01	-1,06	-1,14	-1,29	-1,76	-1,54	GTCAAAATTCGTTC	-217
ZCP4_1553	pyruvate dehydrogenase subunit beta	-1,09	-1,06	1,00	-1,09	-1,06	-1,36	-1,57	TTTCCTAGGCTGTTA	-289
ZCP4_1560	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	1,15	1,08	-1,07	-1,05	-1,39	-3,09	-3,41	TTTCGCCCCGATTTT	-241
									GAAAGTGTACAGAAA	-131
ZCP4_1589	cytochrome bd ubiquinol	-1,04	-1,05	1,03	-1,09	-1,24	-1,58	-1,66	AAACGATAATTAAC	-209

5. Παράρτημα

	oxidase subunit I									
ZCP4_1588	cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II	-1,04	-1,05	1,03	-1,06	-1,17	-1,43	-1,84		
ZCP4_1587	hypothetical protein	-1,03	-1,05	1,02	-1,09	-1,93	-3,30	-4,42		
ZCP4_1602	16S ribosomal RNA methyltransferase RsmE	1,10	1,02	-1,23	1,04	-1,57	-3,15	-3,33	GAAGCCGTTATGACC	-61
ZCP4_1609	transcriptional regulator, TetR family	1,12	-1,00	1,09	1,11	-1,58	-4,69	-5,54	TTTCTAGTTTAATTC	-46
ZCP4_1608	squalene-hopene cyclase	-1,03	-1,05	1,02	1,08	-1,37	-2,93	-3,13		
ZCP4_1613	single-strand binding protein	1,28	1,36	1,03	-1,16	-1,56	-3,24	-3,35	AAACCGAAAAAAC	-54
									AAACGGCTATGGAAA	-43
									GAAAGAACAACGAAT	-32
ZCP4_1620	phosphoribosylformylglycinamide synthase, purS	1,07	1,09	1,03	-1,12	-1,34	-1,93	-2,15	GAACGCTTCAAGCC	-46
ZCP4_1619	phosphoribosylformylglycinamide synthase I	1,16	1,10	1,04	1,05	1,00	-1,27	-1,28	TTTCAAGCCTGTAC	-40
									GTTACAATTAGATT	-30
									CTTCAAGCCTGTTA	-41
									GCTATGAACGCTTTC	-51
ZCP4_1629	hypothetical protein	1,40	1,41	1,07	-1,13	-1,49	-2,87	-3,71	GTTGATACCTGTTT	1
									GTTATTTTTGCGTTA	-54
									ATCCTATTAAGGTTTC	-131
ZCP4_1630	ribose-phosphate pyrophosphokinase	1,13	1,15	1,00	1,00	-1,79	-8,42	-11,50	GGACTATTGCAGAAT	-192
ZCP4_1631	fructose 1,6-bisphosphatase	1,23	1,15	1,01	-1,18	-1,71	-4,78	-7,20		
ZCP4_1634	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	1,11	1,10	1,01	1,00	-1,36	-2,80	-3,33	GTTCTGGAAAAATTT	-141
ZCP4_1635	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	1,05	1,02	-1,00	-1,03	-1,39	-2,55	-3,02	GAACAGCGCGTAAAA	-34
ZCP4_1636	ABC transporter related protein	-1,10	-1,15	-1,02	-1,09	-1,36	1,03	1,28	GAAAGGCATAGGAGC	-236
ZCP4_1637	hypothetical protein	1,19	1,16	1,02	1,10	-1,67	-9,61	-15,86	GTTCTTTTCGGGGC	-148
									TAACGGCTCCAGAAG	-117
ZCP4_1640	histidyl-tRNA synthetase	1,00	-1,01	1,07	1,07	-1,42	-2,50	-2,65	CAACTCTTGAAAAAC	-44
ZCP4_1639	peptide chain release factor 1	1,07	1,03	1,10	1,09	-1,35	-2,70	-2,80		
ZCP4_1638	protein-(glutamine-N5) methyltransferase, release factor-specific	1,28	1,25	1,08	1,02	-1,30	-2,08	-2,59		
ZCP4_1646	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylidene]	-1,02	-1,02	-1,09	1,02	-1,21	-2,85	-2,98	GAACGGATATTGGAG	-22

5. Παράρτημα

	neamino] imidazole-4-carboxamide isomerase									
ZCP4_1647	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	-1,08	-1,05	-1,20	-1,12	-1,25	-2,61	-3,02		
ZCP4_1648	phosphoribosyl-ATP diphosphatase	-1,12	-1,08	-1,07	-1,09	-1,10	-1,67	-2,29	GTTAAGGTGGGTTA	-93
ZCP4_1649	histidine triad (HIT) protein	-1,23	-1,26	-1,12	-1,28	-1,37	-2,34	-3,13	GAACGGATAATGACT	-10
									GGTCTTCCAAGATC	-123
ZCP4_1653	acetylglutamate kinase	1,03	-1,00	-1,02	1,00	-1,40	-1,82	-1,72	TTTCGGAGCCTGTGC	-16
ZCP4_1654	hypothetical protein	1,03	-1,01	1,01	-1,08	-1,11	1,09	1,30	GTTAACGTAAAATTC	-37
									GATCAGGCTTTTTTC	-64
									TTCCCTTGTGGATC	-75
ZCP4_1656	hypothetical protein	1,03	1,01	1,03	1,00	-1,37	-1,86	-1,85	GACCATGCCGAGTTC	-31
ZCP4_1672	Transglycosylase domain protein	1,35	1,59	1,22	1,24	-1,22	-5,61	-7,37	GAATAACAGGGGGAC	-24
ZCP4_1674	hypothetical protein	1,04	1,07	-1,04	-1,04	-1,62	-3,10	-2,65	GTTCTTGATATATAA	-32
									TTTTAGAGAGGGTTA	-15
									TTACAAGCTATTTTC	-73
									GATCGCTAAAAGATA	-109
									TATCAAAAAATATTC	-129
ZCP4_1678	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	-1,05	-1,06	-1,11	-1,02	-1,31	-2,52	-2,17	GTTTCGTCATTATTC	-162
									ATTCAGAAGATGTTG	-95
ZCP4_1684	hypothetical protein	1,01	1,02	-1,22	-1,19	-1,54	-2,39	-4,58	TAACAGGAATAGAAG	-18
ZCP4_1687	glycyl-tRNA synthetase subunit alpha	1,08	1,05	-1,01	1,04	-1,30	-3,16	-3,75	GAAAAGAGGAATAAC	-83
ZCP4_1688	glycyl-tRNA synthetase, beta subunit	1,12	1,09	1,04	1,06	-1,36	-3,06	-5,11	AAACAGATTTTAAAC	-158
									TAACATTTCGAGGAAA	-17
ZCP4_1691	FAD dependent oxidoreductase	-1,06	-1,18	-1,13	1,16	-1,13	-1,78	-2,29	GATCAGGCTGAGGTC	-51
ZCP4_1696	hypothetical protein	1,26	1,24	1,11	1,04	-1,09	-1,82	-1,92	AAACGCCATAGGAAA	-262
ZCP4_1697	leucyl-tRNA synthetase	1,02	-1,02	1,01	-1,04	-1,32	-2,73	-3,90	GAAAATTTTTGGAAA	-110
ZCP4_1698	hypothetical protein	1,19	1,17	1,02	1,06	-1,32	-1,88	-2,65	ATTCGATATAGGTTT	-141
ZCP4_1699	DNA polymerase III, delta subunit	1,15	1,26	-1,05	-1,21	-1,67	-3,39	-3,82		
ZCP4_1706	thiamine phosphate synthase	-1,02	-1,07	-1,19	-1,10	-2,68	-3,98	-4,54	GGATTTTTTCGGAAC	-21
									GATATAAATCTGTTC	-292
ZCP4_1711	5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide mutase	-1,05	-1,22	-1,19	-1,00	-1,37	-2,43	-2,32	GTTCCAATTGAGAGC	-26

5. Παράρτημα

ZCP4_1710	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	-1,04	-1,12	-1,08	1,07	-1,42	-2,91	-2,94	TTGCCTGCACGTTT	-37
ZCP4_1718	transcriptional regulator, MucR family	-1,01	1,01	1,04	-1,01	-1,09	-2,27	-2,85	GTTCTATGAGCGATG	-6
									AAACGTTGGGAGATC	-105
ZCP4_1742	gamma-glutamyltransferase	-1,24	-1,30	-1,21	1,06	1,16	-1,17	-1,68	GATCAAAAATGGTTT	-84
ZCP4_1749	transcriptional regulator, AraC family	-1,32	-1,46	-1,34	-1,21	-2,22	-4,01	-4,54	GAACCGCATGCCAAG	-30
ZCP4_1758	Agmatine deiminase	-1,04	-1,10	1,01	1,04	-1,26	-1,89	-2,16	TTTCTGTTTTGTTA	-72
ZCP4_1757	N-carbamoylputrescine amidase	1,06	-1,04	1,04	1,11	-1,11	-1,47	-1,64	GATCTGGGCAAGCTC	-222
									GATCCGCAATCTAAC	-198
									GAATCGGGTTGGAAT	-151
									GAAACATTTCCGAAT	-104
									GTCGAGGAAGAGTTC	-19
ZCP4_1759	30S ribosomal protein S4	1,14	1,04	-1,12	-1,05	-2,20	-8,13	-11,59	GTTCCGGATCCGTCT	-61
ZCP4_1760	diguanylate cyclase with beta propeller sensor	1,09	1,11	-1,01	-1,10	-1,32	-1,52	-1,71	GTTCAGCAATGCTT	-9
ZCP4_1766	30S ribosomal protein S20	1,27	1,29	-1,02	-1,18	-1,41	-3,71	-4,37	CTTTTTACGCGTTC	-235
ZCP4_RS08855	hypothetical protein	-1,38	-1,32	-1,11	-1,28	-1,51	-1,42	-1,61	GTTCCGAGAAAGTGC	-119
ZCP4_RS08880	hypothetical protein	1,11	-1,01	-1,17	-1,34	-2,16	-1,48	-1,39	GACTCTAAAAGAGC	-19
									CTAAAAGAGCGTTT	-15
									GATCACATTCGGAGA	-60
									CGACACTGTCATAAC	-76
									ATTCGGAGATAGCTG	-54
									GCTGATCGCGAGATC	-102
									GCACCGCAAAGGACA	-118
ZCP4_RS08890	hypothetical protein	-1,14	1,29	-1,08	-1,15	-3,07	-2,70	-3,54	TTTCAAACAGCTTC	-72
ZCP4_RS08905	DUF891 domain-containing protein	-1,01	1,02	-1,01	-1,07	-1,23	-1,13	-1,80	ATTACATATTGGTTA	-116
ZCP4_RS08915	hypothetical protein	1,06	1,07	1,05	1,04	-1,47	-1,64	-2,04	GAAAACAATCTGAAG	-55
									TTTCTTCAAATGTTG	-91
ZCP4_RS09255	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,12	-1,15	-1,05	-1,11	-1,29	-1,73	-2,18	ATACGAATGACGAAA	-7
									GAAGTAAGGAATAAT	-20
									TAAGAAGTAAGGAAT	-23
									AAATGATTTTCAAAC	-78
ZCP4_RS09280	hypothetical protein	1,13	1,15	1,01	-1,10	-1,42	-2,16	-2,02	ATTCTGTCTATGTTT	-289
ZCP4_RS09325	hypothetical	-1,13	-1,14	-1,02	1,06	-1,14	-1,83	-1,70	GAGCTGATCTGAAAC	-129

5. Παράρτημα

	protein									
ZCP4_RS09330	hypothetical protein	1,09	1,10	-1,14	1,03	-1,00	-1,08	-1,01	GATCAGGTCGAGTTG	-151
ZCP4_RS09335	hypothetical protein	1,15	1,18	1,03	1,03	1,06	1,25	-1,01	ATGCTGCGTACGTTT	-97
									GTTCCGGCCAAAGCTT	-86
ZCP4_RS09455	hypothetical protein	-1,07	-1,06	1,03	1,05	-1,13	-2,20	-1,69	GAACACATTCAGAAC	-96
ZCP4_RS09450	hypothetical protein	1,18	1,02	-1,01	1,02	-1,27	-3,09	-2,51		
ZCP4_RS09465	addiction module antitoxin RelB	-1,04	1,01	-1,08	-1,15	-1,78	-2,46	-2,05	TAAGTTGTACAGAAC	-237
ZCP4_RS09460	addiction module toxin, RelE/StbE family	1,06	1,06	1,06	1,04	-1,07	-1,53	-1,33	GATACTATCTTGAAC	-32
									GAACAAGATAGGAGT	-21
ZCP4_RS09520	chromosome partitioning protein ParA	-1,26	-1,14	1,05	-1,05	-1,40	-1,54	-1,49	GATGATTTCAAGTTA	-230
ZCP4_RS09515	hypothetical protein	-1,43	-1,08	1,11	1,26	-1,99	-4,30	-5,20	AATCACATATTGTTG	-245
									GGAGGCATCGGTAAC	-264
									TAAATGAACCGGAAT	-292
									ACAGAATAAATGAAC	-298
									TAATTACATATGAAA	-9
									CAACCTTTCTTCAA	-28
									ATACAACCTTTCTTC	-31
									AAAATATAATACAAC	-39
									GAACGGATGTTGTCA	-121
									CTTACTTTCAAGTTA	-97
									GTGATCCTTACTTTC	-103
									GACCTTACACCAAAT	-157
									GAACCTCAATGCTAG	-192
									GATCTATCATGGATG	-211
									CAAGTTAACGTGATC	-222
									TTTGAACGGATGTTG	-124
ZCP4_RS09105	iron-containing alcohol dehydrogenase	1,02	1,22	-2,23	-1,20	-1,48	1,02	1,23	GAATTTTTTAGGAAA	-23
ZCP4_RS09190	hypothetical protein	-1,58	-1,52	-1,85	-1,48	-1,26	1,06	-1,18	GTTCTGTTCCGTC	-86
ZCP4_RS09200	transcriptional regulator, HxlR family	1,10	1,02	-1,23	1,06	-1,88	-2,17	-3,58	AAACAATTATGAAAC	-8

Οι ενδείξεις είναι ίδιες με του Πίνακα 5.9.

5. Παράρτημα

Πίνακας 5.11. SOS-ρυθμιζόμενα υπερεκφραζόμενα γονίδια του CP4 που διαθέτουν SOS χειριστές εντός του πλαισίου ανάγνωσης του ανοδικού τους γονιδίου.

Locus tag	Προϊόν γονιδίου	Λόγοι έκφρασης στις συγκεντρώσεις του MMS (mM)							SOS χειριστές	d
		0.05	0.1	0.2	1	5	10	15		
ZCP4_0239	lytic murein transglycosylase	1,06	1,02	1,05	-1,01	1,15	1,41	1,61	GTTCCGGCATGGGTC	-270
									GAAAGACCGCATAAC	-78
									GAAATTGCTGCGAAA	-93
ZCP4_0288	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	-1,07	-1,12	-1,01	1,04	1,22	1,74	1,87	GTTCAACACCGGAGC	-222
									TTTCAGCCCCGTCC	-168
									TTTCCGAGATTGTCT	-195
									GAGATTGTCTTTAAC	-169
									GATTGCCCGTTTTTC	-206
ZCP4_0311	FAD/FMN-dependent dehydrogenase	-1,29	-1,31	1,03	1,03	1,40	2,07	2,20	GATCAGCTTCAATGC	-158
									ATTACCGAGATGATC	-179
									TTTCTCGCGCCAGTC	-219
									TTGCAGAGTCCTTTC	-230
ZCP4_0333	ABC-type dipeptide transport system. periplasmic	1,04	1,08	1,02	-1,24	-1,16	1,20	1,72	TTACCTTTACGGAAA	-128
									GATTTCAAATGAAG	-214
									GGAGAAAAGCGGCAAC	-209
ZCP4_0349	nucleoside permease	1,15	1,19	-1,01	1,00	1,04	1,51	1,75	GAAAAACAGGGATAAC	-86
									GAAAAAGCAAGGAAA	-97
									GAAGCCACAACGAAA	-177
ZCP4_0392	hypothetical protein	-1,07	-1,12	-1,01	1,03	1,15	2,45	4,42	GAAACCCCTGGGAAA	-153
									GAGGCTGTAGCGAAT	-138
									GAAAGAGGCTGTAGC	-142
									AAACCCCTGGGAAAAG	-152
									AAAGTCGAATGAAAC	-163
ZCP4_0396	catalase	-1,37	-1,21	-1,02	1,07	2,49	9,15	9,26	GTTCAACAATTAATC	-202
									GTTTTGCGGTCATTC	-269
									GAAGACAATCTGATG	-262
									AAACATTGCAGGATA	-297
									GTTTAAGACCGATCC	-245
ZCP4_0425	site-specific recombinase. DNA invertase Pin	-1,00	1,10	1,19	1,17	1,06	1,45	1,54	CAACCGAACTCAAAC	-272
									CAATTTCCCGACAAC	-283
									TCCGACAACCGAAC	-278
									TTTCCGCTTTGGAAC	-229
									GAATATCTTTTAAT	-205
ZCP4_0492	hypothetical protein	1,17	1,17	1,06	1,01	-1,07	1,58	1,63	ATTCTACTGAGTTT	-95
									GTTGAAGCGTGGTAT	-151
									GTTGGCAACTGTCT	-220
									ATTACGGGAAGATTC	-106
									ATTCATTGATCATT	-172

5. Παράρτημα

									ATTGAAGGTTTGTG	-231
ZCP4_0550	RNA polymerase. sigma 32 subunit. RpoH	-1,24	-1,17	-1,01	1,04	2,76	9,26	8,72	AATCGTTGGCTTTTC	-202
									ATGCAGCTTTTATTC	-98
									GAAACGGGGCGGACG	-290
									GGACGGAGCAAAAAG	-215
									CTTTATTGGGTGATC	-259
									GTTTATGGACGGAGC	-242
ZCP4_0579	transcription elongation factor GreB	-1,06	1,05	1,03	-1,07	-1,24	1,56	1,96	GACCTGACACCAAT	-147
									GATCGCCATAGCTTG	-258
									GATCCAGTCGATGAC	-272
									GTTACGGGTTTCATC	-193
									GTAGTTACGGGTTTC	-190
									GTTGGATGTAGTTAC	-183
ZCP4_0627	YnbE-like lipoprotein	-1,23	-1,09	1,04	1,01	1,47	4,15	5,25	GTTCAGTCTTAATC	-108
									GTTCTTAATCAGTCA	-103
									GTTCCATTCAATTTG	-264
									GAAGTTGAGACGAAA	-217
									GTACCTTCCATTTTC	-187
ZCP4_0639	putative permease	-1,02	-1,05	-1,01	1,02	1,33	2,28	3,06	GATCCGTTGTGGAAT	-213
ZCP4_0659	hypothetical protein	1,03	1,00	1,06	1,00	1,09	1,42	1,52	GTTATTACCGCCTTC	-79
									GATGACTTCGCTTC	-249
ZCP4_0797	hypothetical protein	-1,08	-1,06	1,02	1,12	1,85	2,11	1,91	GAAATTCGCGAAAC	-145
									TTTCTTTCCCGATA	-59
									AAACCCGACTCTATC	-134
									GATGTCGAACGGAAA	-156
ZCP4_0808	riboflavin synthase alpha chain	-1,16	-1,11	1,08	1,06	1,46	2,23	2,66	GATCGGCAGTTGTTT	-290
									CAAAGAGAGAAGAAC	-123
									GTTGACCGGATATTA	-254
									GAAGCGGGGCAAAG	-278
ZCP4_0837	hypothetical protein	1,15	1,19	1,08	1,15	1,53	1,56	1,82	GTTCTCCAGAAAC	-159
ZCP4_0878	hypothetical protein	-1,23	-1,03	1,11	1,15	1,49	2,44	2,17	GATCCAGAAAGGAAA	-206
									AATCTTCCGACGAAT	-221
ZCP4_0885	hypothetical protein	-1,36	-1,15	-1,17	1,06	-1,14	2,27	3,39	GATCCGATTCAGAAA	-261
ZCP4_0893	Homeodomain-like domain protein	1,34	1,32	1,14	1,01	1,24	1,98	1,67	GAAAATTATCTGATC	-269
									CTTGGTGATATATTC	-164
ZCP4_0912	peptidoglycan glycosyltransferase	1,02	-1,04	1,03	-1,03	-1,01	2,00	3,08	GTTCACTTGTTGATC	-162
									GATCGCTGGCGGTTA	-151
									GTTCTAGCTTGCTAG	-285
									TTTGTTCACTTGTTG	-165
ZCP4_0918	hypothetical protein	-1,05	-1,03	1,07	1,04	1,24	2,68	2,83	GAACTGGGATGGAAG	-281
									GATCGCGTAAGAAT	-176
									GAGCATCTTCATAAC	-215
									CTTACGCCGATCTTC	-165

5. Παράρτημα

ZCP4_0920	hypothetical protein	1,05	1,06	1,08	-1,01	1,14	1,46	1,63	GATCAGGAAATGAAA	-268
									AAAGTCGTTGGCAAC	-195
									GATCAATTACTCTTT	-244
									TTTCCAAAGTGGATG	-258
ZCP4_0948	cardiolipin synthetase 2	-1,00	-1,07	1,04	1,01	1,26	2,08	2,15	CAACATCGTGTATC	-142
ZCP4_0979	RNA polymerase. sigma 54 subunit. RpoN/SigL	-1,04	-1,05	-1,01	-1,08	1,02	1,83	1,80	GAAGACCTCTCCAAC	-213
									TATCGAAATCGGATC	-284
									TATCGGATATCGAAA	-277
									GAAATGCTTGATATC	-159
									TAACGTCAGGGAAAT	-169
ZCP4_1071	ketosteroid isomerase-like protein	-1,64	-1,43	1,21	-1,11	2,29	6,68	9,08	GAAATAAAAAGCTAC	-197
ZCP4_1122	hydroxylamine reductase	-1,06	-1,03	1,04	1,20	3,31	11,59	36,51	GTTCCAATGAGCATC	-209
									TTTGCCGGGATGTTT	-220
									GAAGCCGGTTGAAA	-81
ZCP4_1146	(p)ppGpp synthetase. RelA/SpoT family	1,00	1,02	1,04	-1,09	1,06	1,49	1,45	GAAGCGCCTTGAAG	-293
ZCP4_1156	phosphate starvation-inducible protein PhoH.	1,01	-1,07	-1,13	1,05	1,17	1,55	1,66	GAACGGAAAGGCAAG	-262
									GATCAAAAGCAGTTT	-136
									GATGCCGGCCCAAC	-151
									ATTCCTTGGCGGATG	-109
ZCP4_1160	Glutaredoxin. GrxB family	-1,41	-1,39	1,05	1,06	1,61	1,91	1,92	TTACCGAAATCGATC	-229
									GATTGTGCCCGGAAG	-151
									AAAGCTGTTTTGAAA	-281
									GTTATCAATGGGCTT	-218
									CTTTCCATATGGTTG	-235
ZCP4_1169	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase	-1,14	-1,20	-1,00	1,04	1,45	2,49	3,12	TGACGGATAAAGAAC	-241
									GATCCGATCCAGAAA	-209
									TTACCCAATTGGAAA	-160
									TGACAGAAGAAGAAT	-115
ZCP4_1182	ribosomal subunit interface protein	-1,55	-1,38	-1,02	1,04	4,48	11,48	11,11	TTTCTAATCCTGTCT	-142
									GAATTATTGCGTCAC	-155
									TATCGACAAAATTTT	-153
ZCP4_1297	NADH:flavin oxidoreductase	-1,43	-1,41	-1,03	-1,00	1,36	1,70	1,87	CAACTATTGCCGGAC	-234
ZCP4_1313	ribonuclease I	1,08	1,09	1,02	-1,01	-1,02	1,41	1,72	GTTCCGACCGAGTCA	-252
ZCP4_1329	flavodoxin. long chain	-1,12	-1,07	1,04	1,00	1,94	3,12	3,30	TTTCTATGAAGGATC	-219
ZCP4_1343	homocitrate synthase NifV	1,11	1,06	1,07	1,02	-1,10	1,63	2,05	CTTCGTTTTTCTTTC	-178
									TAACTTTTCTCGACC	-279
ZCP4_1391	hypothetical protein	-1,03	-1,02	1,02	1,00	1,18	1,70	1,52	GAATGCTCACTATAC	-121
ZCP4_1403	UDP-glucose pyrophosphorylase	-1,26	-1,26	-1,08	-1,13	1,06	1,88	2,11	GTTGCAGAAGTGATG	-227
									GTATAATTCTCGTCC	-246
ZCP4_1404	Mg2+/Co2+ transporter	-1,09	-1,07	-1,01	-1,11	-1,05	1,58	1,80	GTTTTGGCGGTATTC	-215
									GTTGCGTTAGCCTTG	-159

5. Παράρτημα

ZCP4_1439	hypothetical protein	1,11	1,07	-1,06	1,10	1,13	1,59	2,00	GTGCTGATATCGAAC	-105
ZCP4_1505	Peroxiredoxin	-1,13	-1,13	1,09	1,08	1,77	4,44	5,38	GAAGAAACGCAGAAG	-204
									ATTTAATGACTATTC	-113
ZCP4_1547	hypothetical protein	-1,11	-1,06	1,04	1,07	2,21	5,95	5,25	GTTTTATTGCCTTG	-180
									ATTATTGGCCTGATC	-210
ZCP4_1559	putative RND superfamily exporter	-1,08	-1,06	-1,02	-1,04	1,00	1,80	1,99	TAACGGCTGCATTAC	-154
									CAACGGAACCAAAG	-140
ZCP4_1569	hypothetical protein	-1,37	-1,27	-1,13	1,10	1,67	4,59	5,77	GATCTGTTTCGCAAA	-188
									GAAGAAGCCCATATC	-161
ZCP4_1585	transcriptional regulator. LysR family	-1,16	-1,10	-1,04	1,04	1,27	1,69	1,94	GAAGAAATGCTGGAA	-230
ZCP4_1740	hypothetical protein	1,12	1,04	-1,00	-1,11	1,05	1,40	1,62	GAATTGCTGGTGAAC	-169
									GTATCAAAGGCGTTC	-229

Οι ενδείξεις είναι ίδιες με του πίνακα 5.9.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6. Βιβλιογραφία

1. Abella M., Campoy S., Erill I., Rojo F. and Barbé J. (2007). Cohabitation of two different *lexA* regulons in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, 189(24): 8855-8862.
2. Aertsen A. and Michiels C.W. (2005). *Mrr* instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 58(5): 1381-1391.
3. Afendra A.S. and Drainas C. (1987). Expression and stability of a recombinant plasmid in *Zymomonas mobilis* and *Escherichia coli*. *Microbiology*. 133(1): 127-134.
4. Agrawal M., Mao Z., and Chen R.R. (2011). Adaptation yields a highly efficient xylose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain. *Biotechnol. Bioeng.*, 108(4): 777-785.
5. Akakura R. and Winans S.C. (2002) Mutations in the *occQ* operator that decrease OccR-induced DNA bending do not cause constitutive promoter activity. *J. Biol. Chem.*, 277(18): 15773-15780.
6. Aldred K.J., Kerns R.J. and Osheroff N. (2014) Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10): 1565.
7. Alekshun M.N. and Levy S.B. (1999). Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli marRAB* locus, by multiple chemicals in vitro. *J. Bacteriol.*, 181(15): 4669-4672.
8. Aleshkin G.I., Kadzhaev K.V. and Markov A.P. (1998) High and low UV-dose responses in SOS-induction of the precise excision of transposons Tn1, Tn5 and Tn10 in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 401:179-191.
9. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
10. Amundsen S.K., Sharp J.W. and Smith G.R. (2016). RecBCD Enzyme “Chi Recognition” Mutants Recognize Chi Recombination Hotspots in the Right DNA Context. *Genetics*, 204(1): 139-152
11. Ananthlakshmy V.K. and Gunasekaran P. (1999) Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis* . *J. Biosci. Bioeng.*, 87: 214-217.
12. Anders S., Pyl P.T. and Huber W. (2015) HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2): 166-169.
13. Anderson D.G. and Kowalczykowski S.C. (1997). The translocating RecBCD enzyme stimulates recombination by directing RecA protein onto ssDNA in a χ -regulated manner. *Cell*, 90(1): 77-86.

6. Βιβλιογραφία

14. Arthur H.M. and Eastlake P.B. (1983). Transcriptional control of the *uvrD* gene of *Escherichia coli*. *Gene*, 25(2): 309-316.
15. Arvanitis N., Pappas K.M., Kolios G., Afendra A.S., Typas M.A. and Drainas C. (2000) Characterization and replication properties of the *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 plasmids pZMO1 and pZMO2. *Plasmid*, 44:127-137.
16. Atshan S.S., Shamsudin M.N., Lung K.H., Sekawiz Z., Pei C.P. and Ghaznavi-Rad E. (2012) Improved method for the isolation of RNA from bacteria refractory to disruption, including *S. aureus* producing biofilm. *Gene*, 494(2):219-224
17. Au N., Kuester-Schoeck E., Mandava V., Bothwell L.E., Canny S.P., Chachu K., Colavito S.A., Fuleer S.N., Groban E.S., Hensley L.A., O'Brien T.C., Shah A., Tierney J.T., Tomm L.L., O'Gara T.M., Gorano V A.I., Grossman A.D. and Lovett C.M.(2005) Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J. Bacteriol.*, 187(22): 7655-7666.
18. Ault R.G. (1965) Spoilage bacteria in brewing-A review. *J. Inst. Brew. London* 71:376-391.
19. Bai F.W., Anderson W.A. and Moo-Young M. (2008) Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.*, 26:89-105.
20. Ban C. and Yang W. (1998) Structural basis for MutH activation in *E. coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. *EMBO J.*, 17(5):1526-1534.
21. Barbe J., Vericat J.A. and Guerrero R. (1982) Discriminated induction of SOS functions in *Escherichia coli* by alkylating agents *J. Gen. Microbiol.*, 129:2079-2089.
22. Barker B.T.P. and V.F. Hillier. (1912) Cider sickness. *J. Agric. Chem.*, 10:42-45.
23. Battesti A. and Bouveret E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.*, 62(4): 1048-1063.
24. Baumler D.J., Hung K.F., Bose J.L., Vykhodets B.M., Cheng C.M., Jeong K.C. and Kaspar C.W. (2006). Enhancement of acid tolerance in *Zymomonas mobilis* by a proton-buffering peptide. *Appl. Biochem. Biotech.*, 134(1): 15-26.
25. Belaïch J.P. and Senez J.C. (1965) Influence of aeration and pathothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.*, 89:1195-1200.
26. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J. and Sayers E.W. (2011) GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 39:D32-37.
27. Benson N.R., Wong R.M.Y. and McClelland M. (2000). Analysis of the SOS response in *Salmonella enterica* serovar typhimurium using RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *J. Bacteriol.*, 182(12): 3490-3497.

6. Βιβλιογραφία

28. Bertrand-Burggraf E., Hurstel S., Daune M. and Schnarr M. (1987) Promoter properties and negative regulation of the *uvrA* gene by the LexA repressor and its amino-terminal DNA binding domain. *J. Mol. Biol.*, 193:293-302.
29. Better M. and Helinski D.R. (1983) Isolation and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 155:311-316.
30. Bisognano C., Kelley W.L., Estoppey T., Francois P., Schrenzel J., Li D., Lew D.P., Hooper D.C. Cheung A.L. and Vaudaux, P. (2004). A RecA-LexA-dependent pathway mediates ciprofloxacin-induced fibronectin binding in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 279(10): 9064-9071.
31. Bochner B., Gomez V., Ziman M., Yang S. and Brown S.D. (2010) Phenotype microarray profiling of *Zymomonas mobilis* ZM4. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 161:116-123.
32. Böhner R. and Hagen U. (1977). Action of intercalating agents on the activity of DNA polymerase I. *BBA Nucleic Acids*, 479(3): 300-310.
33. Boiteux S., Huisman O. and Laval J. (1984) 3-Methyladenine residues in DNA induce the SOS function *sfiA* in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 3(11): 2569.
34. Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., Boyer H. W., Crosa J.H. and Falkow S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2(2): 95-113.
35. Boor K.J. (2006). Bacterial stress responses: what doesn't kill them can make them stronger. *PLoS Biol.*, 4(1): e23.
36. Bosch M.V.D., Lohman P.H. and Pastink A. (2002). DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol. Chem.*, 383(6): 873-892.
37. Boyce R.P. and Howard-Flanders, P. (1964). Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K-12. *P. Natl. Acad. Sci.*, 51(2): 293-300.
38. Brent R. and Ptashne M. (1981) Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:4204-4208.
39. Brestic-Goachet N., Gunasekaran P., Cami B., and Baratti J. (1987). Transfer and expression of broad host range plasmids in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.*, 9(1): 13-18.
40. Brestic-Goachet N., Gunasekaran P., Cami B. and Baratti J. (1989) Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 135: 893-902
41. Brestic-Goachet N., Gunasekaran P., Cami B. and Baratti J. (1990). Transfer and expression of a *Bacillus licheniformis* α -amylase gene in *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.*, 153(3): 219-225.

6. Βιβλιογραφία

42. Bringer S., Finn R.K. and Sahm H. (1984). Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.*, 139(4): 376-381.
43. Buchholz S.E., Dooley M.M. and Eveleigh D.E. (1989). Growth of *Zymomonas* on lactose: Gene cloning in combination with mutagenesis. *J. Ind. Microbiol.*, 4(1): 19-27.
44. Buchholz S.E. and Eveleigh D.E. (1986). Transfer of plasmids to an antibiotic-sensitive mutant of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(2): 366-370.
45. Burdett V., Baitinger C., Viswanathan M., Lovett S.T. and Modrich P. (2001) *In vivo* requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. *P Natl Acad Sci USA.*, 98(12):6765–6770.
46. Butala M., Žgur-Bertok D. and Busby S.J. (2009). The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol. Life Sci.*, 66(1): 82.
47. Byun M.K., Kaper J.B. and Ingram L.O. (1986). Construction of a new vector for the expression of foreign genes in *Zymomonas mobilis*. *J. Ind. Microbiol.*, 1(1): 9-15.
48. Bzymek M. and Lovett S T. (2001). Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms. *PNAS*, 98(15): 8319-8325.
49. Calero S., Fernandez de Henestrosa A.R. and Barbe J. (1994) Molecular cloning, sequence and regulation of expression of the *recA* gene of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Gen. Genet.*, 242:116-120.
50. Calero S., Garriga X. and Barbé J. (1993) Analysis of the DNA damage-mediated induction of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa* *lexA* genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 110(1): 65-70.
51. Cambray G., Sanchez-Alberola N., Campoy S., Guerin E., Da Re S., Gonzalez-Zorn B., Ploy M.C., Barbe J., Mazel D. and Erill I. (2011) Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mobile DNA* 2(1):6
52. Campoy S., Mazón G., de Henestrosa A.R.F., Llagostera M., Monteiro P.B. and Barbé J. (2002) A new regulatory DNA motif of the gamma subclass Proteobacteria: identification of the LexA protein binding site of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiology*, 148(11): 3583-3597.
53. Campoy S., Fontes M., Padmanabhan S., Cortés P., Llagostera M. and Barbé J. (2003) LexA-independent DNA damage-mediated induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.*, 49(3): 769-781.

6. Βιβλιογραφία

54. Cao Q.H., Shao H.H., Qiu H., Li T., Zhang Y.Z. and Tan X.M. (2017). Using the CRISPR/Cas9 system to eliminate native plasmids of *Zymomonas mobilis* ZM4. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81(3): 453-459.
55. Carey V.C. and Ingram L.O. (1983). Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: effects of ethanol and glucose. *J. Bacteriol.*, 154(3): 1291-1300
56. Campoy S., Salvador N., Cortés P., Erill I. and Barbé J. (2005) Expression of canonical SOS genes is not under LexA repression in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Bacteriol.*, 187(15): 5367-5375.
57. Carr J.G. and Passmore S.M. (1971). Discovery of the “cider sickness” bacterium *Zymomonas anaerobia* in apple pulp. *J. Inst. Brew. London* 77:462-466.
58. Cazetta M.L., Celligoi M.A.P.C., Buzato J.B., Scarmino I.S., da Silva R.S.F. (2005) Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Process Biochem.*, 40: 747-751.
59. Chakravartty V. and Cronan J.E. (2013). The wing of a winged helix-turn-helix transcription factor organizes the active site of BirA, a bifunctional repressor/ligase. *J. Biol. Chem.*, 288(50): 36029-36039.
60. Chen I.P. and Michel H. (1998). Cloning, sequencing, and characterization of the *recA* gene from *Rhodopseudomonas viridis* and construction of a *recA* strain. *J. Bacteriol.*, 180(12): 3227-3232.
61. Chen Z., Yang H. and Pavletich N.P. (2008) Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature*, 453:489-484.
62. Cheng K.C., Cahill D.S., Kasai H., Nishimura, S. and Loeb L.A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions. *J. Biol. Chem.*, 267(1): 166-172.
63. Cheo D.L., Bayles K.W. and Yasbin R.E. (1991) Cloning and characterization of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 173(5): 1696-1703.
64. Cho K., Fuqua C. and Winans S.C. (1997) Transcriptional regulation and location of *Agrobacterium tumefaciens* genes required for complete catabolism of octopine. *J. Bacteriol.*, 179:1-8
65. Cho S.H., Lei R., Henninger T.D. and Contreras L.M. (2014). Discovery of ethanol-responsive small RNAs in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microb.*, 80(14): 4189-4198.
66. Chou Y-C., Linger J., Yang S. and Zhang M. (2015) Genetic engineering and improvement of a *Zymomonas mobilis* for arabinose utilization and its performance on pretreated corn stover hydrolysate. *J. Biotechnol. Biomater.*, 5: 2.

6. Βιβλιογραφία

67. Chun, U.H. and Rogers, P.L. (1988):The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 29: 19-24.
68. Clark A.J. and Margulies A.D. (1965) Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K12. *P Natl. Acad. Sci*, 53(2): 451-459.
69. Clark A.J., Sandler S.J., Willis D.K., Chu C.C., Blonar M.A. and Lovett S.T. (1984, January). Genes of the RecE and RecF pathways of conjugational recombination in *Escherichia coli*. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 49, pp. 453-462). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
70. Cirz R.T., O'Neill B.M., Hammond J.A., Head, S. R. and Romesberg F.E. (2006). Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. *J. Bacteriol.*, 188(20): 7101-7110.
71. Combie J. (2006). Properties of levan and potential medical uses. In *ACS symposium series* (Vol. 934, pp. 263-269). Oxford University Press.
72. Conway T., Byun M.O.-K. and Ingram L.O. (1986) Expression Vector for *Zymomonas mobilis* *Appl. Environ. Microbiol.*, 235-241.
73. Conway T., Sewell G.W., Osman Y.A. and Ingram L.O. (1987a) Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.*, 169(6):2591-2597.
74. Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M. and Lunec J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10): 1195-1214.
75. Coton M., Laplace J.M., Auffray Y. and Coton E. (2006) Polyphasic study of *Zymomonas mobilis* strains revealing the existence of a novel subspecies *Z. mobilis* subsp. *francensis* subsp. nov., isolated from French cider. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56:121-125.
76. Cooper G.M. and Sunderland M.A. (2000) *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sinauer Associates; DNA Repair.
77. Courcelle J., Khodursky A., Peter B., Brown P.O. and Hanawalt P.C. (2001) Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, 158:41-64.
78. Cox M.M. (2003) The bacterial RecA protein as a motor protein. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57(1): 551-577.
79. Cox M.M. (2007). Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, 42(1): 41-63.

6. Βιβλιογραφία

80. Cox M.M., Goodman M.F., Kreuzer K.M. and Sherratt, D. J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*, 404(6773): 37.
81. Croes C., Vanderleyden J. and Michiels K. (1990). Construction of an *Azospirillum brasilense* Sp7 *recA* mutant. *Mol. Gen. Genet.* , 223(1): 152-155.
82. Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.-M. and Brenner S.E (2004) WebLogo: A Sequence Logo Generator *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 14:1188–1190
83. Crowley D.J. and Courcelle J. (2002) Answering the call: coping with DNA damage at the most inopportune time. *BioMed Res. Int.*, 2(2): 66-74.
84. Cuñé J., Cullen P., Mazon G., Campoy S., Adler B. and Barbe J. (2005) The *Leptospira interrogans* *lexA* gene is not autoregulated. *J. Bacteriol.*, 187(16): 5841-5845.
85. D'Ari R. (1985) The SOS system. *Biochimie*, 67(3): 343-347.
86. Da Re S., Garnier F., Guérin E., Campoy S., Denis F. and Ploy M.C. (2009) The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO reports*, 10(8): 929-933.
87. da Rocha R.P., Paquola A.C., Marques Mdo V., Menck C.F. and Galhardo R.S. (2008) Characterization of the SOS regulon of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 190:1209-1218.
88. Dalhus B., Laerdahl J.K., Backe P.H. and Bjørås M. (2009) DNA base repair—recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol Rev.*, 33(6):1044–1078
89. Davis E.O., Dullaghan E.M. and Rand L. (2002) Definition of the mycobacterial SOS box and use to identify LexA-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 184(12): 3287-3295.
90. Davis L., Rogers P., Pearce J. and Peiris P. (2006). Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. *Biomass Bioenergy*, 30(8-9): 809-814.
91. Dawes E.A., Ribbons D.W. and Large P.J. (1966) The route of ethanol formation in *Zymomonas mobilis*. *Biochem. J.*, 98:795-803.
92. Deanda K., Zhang M., Eddy C. and Picataggio S. (1996) Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:4465-4470.
93. Defais M., Fauquet P., Radman M. and Errera M. (1971). Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of λ in different genetic systems. *Virology*, 43(2):495-503.

6. Βιβλιογραφία

94. Demple B., Jacobsson A. and Olsson M. (1982) Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Physical properties of *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *J Biol Chem.*, 257(22):13776–13780.
95. Desikan R., Soheila A.H., Hancock J.T. and Neill S.J. (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.*, 127(1): 159-172.
96. Desiniotis A., Kouvelis V.N., Davenport K., Bruce D., Detter C., Tapia R., Han C., Goodwin L.A., Woyke T., Kyrpides N.C., Typas M.A. and Pappas K.M. (2012) Complete genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* centrotypic ATCC 29191. *J. Bacteriol.*, 194(21):5966-5967.
97. Desouky O., Ding N. and Zhou G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J. Radiat. Res. Appl Sci.*, 8(2): 247-254
98. DiCapua E., Cuillel M., Hewat E., Schnarr M., Timmins P.A. and Ruigrok R.W. (1992) Activation of RecA protein: the open helix model for LexA cleavage. *J. Mol. Biol.*, 226(3): 707-719.
99. DiCapua E., Schnarr M., Ruigrok R.W., Lindner P. and Timmins P.A. (1990) Complexes of RecA protein in solution: a study by small angle neutron scattering. *J. Mol. Biol.*, 214(2): 557-570.
100. Dong G., He M. and Feng H. (2016). Functional characterization of CRISPR-Cas system in the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Advances in Microbiology*, 6(03): 178.
101. Dong H.W., Bao J., Ryu D.D. and Zhong J.J. (2011). Design and construction of improved new vectors for *Zymomonas mobilis* recombinants. *Biotechnol. Bioeng.*, 108(7): 1616-1627.
102. Dong H.W., Fan L.Q., Luo Z., Zhong J.J., Ryu D.D. and Bao J. (2013). Improvement of ethanol productivity and energy efficiency by degradation of inhibitors using recombinant *Zymomonas mobilis* (pHW20a-fdh). *Biotechnol. Bioeng.*, 110(9): 2395-2404.
103. Dowden S.B., Glazebrook J.A. and Strike P. (1984). UV inducible UV protection and mutation functions on the I group plasmid TP110. *Mol. Gen. Genet.*, 193(2): 316-321.
104. Dumay V., Inui M. and Yukawa H. (1999) Molecular analysis of the *recA* gene and SOS box of the purple non-sulfur bacterium *Rhodospseudomonas palustris* no. 7. *Microbiology*, 145 (Pt 5):1275-1285.
105. Dunn K.L. and Rao C.V. (2015). High-throughput sequencing reveals adaptation-induced mutations in pentose-fermenting strains of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 112(11): 2228-2240.

6. Βιβλιογραφία

106. Ebina Y., Kishi F., Miki T., Kagamiyama H., Nakazawa T. and Nakazawa A. (1981). The nucleotide sequence surrounding the promoter region of colicin E1 gene. *Gene*, 15(2): 119-126.
107. Eisen J.A. and Hanawalt P.C. (1999) A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat. Res.*, 435:171-213.
108. van den Eizen P.J., Maat J., Walters H.H., Veltkamp E. and Nijkamp J.J. (1982). The nucleotide sequence of the bacteriocin promoters of plasmids Clo DF13 and Col E1: role of *lexA* repressor and cAMP in the regulation of promoter activity. *Nucleic Acids Res.*, 10(6): 1913-1928.
109. Elledge S.J. and Walker G.C. (1983). The *muc* genes of pKM101 are induced by DNA damage. *J. Bacteriol.*, 155(3): 1306-1315.
110. Erill I., Campoy S. and Barbe J. (2007) Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31:637-656.
111. Erill I., Campoy S., Kılıç S. and Barbé J. (2016). The Verrucomicrobia LexA-binding motif: Insights into the evolutionary dynamics of the SOS response. *Front. Mol. Biosci.*, 3, 33.
112. Erill I., Escribano M. Campoy S. and Barbé J. (2003) *In silico* analysis reveals substantial variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. *Bioinformatics*, 19(17): 2225-2236.
113. Erill I., Jara M., Salvador N., Escribano M., Campoy S. and Barbe J. (2004) Differences in LexA regulon structure among Proteobacteria through in vivo assisted comparative genomics. *Nucleic Acids Res.*, 32:6617-6626.
114. Erill I. and O'Neill M.C. (2009) A reexamination of information theory-based methods for DNA-binding site identification. *BMC Bioinformatics*, 10:57.
115. Estevez C., Muro C., Abate C.M., Callieri D.A. and Sineriz F. (1997) Improved technique for the isolation of stable mutants of *Zymomonas mobilis*. *Folia Microbiol.* 42: 562–564
116. Falnes P.Ø., Johansen R.F. and Seeberg E. (2002) AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*, 419(6903): 178-182.
117. Fang G., Hammar S. and Grumet R. (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*, 13(1): 52-54.
118. Farrand S.K., O'Morchoe S.P. and McCutchan J. (1989) Construction of an *Agrobacterium tumefaciens* C58 *recA* mutant. *J. Bacteriol.*, 171(10): 5314-5321.
119. Feldmann S.D., Sahm H. and Sprenger G.A. (1992). Pentose metabolism in *Zymomonas mobilis* wild-type and recombinant strains. *Appl. Microbiol. Biot.*, 38(3): 354-361.

6. Βιβλιογραφία

120. Fernandez de Henestrosa A.R. and Barbe J. (1994) Autoregulation and kinetics of induction of the *Rhizobium phaseoli recA* gene. *Mutat. Res.*, 308:99-107.
121. Fernandez de Henestrosa A.R., Calero S. and Barbé J. (1991) Expression of the *recA* gene of *Escherichia coli* in several species of gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.*, 226(3): 503-506.
122. Fernandez de Henestrosa A.R., Cuñé J., Erill I., Magnuson J.K. and Barbé J. (2002) A green nonsulfur bacterium, *Dehalococcoides ethenogenes*, with the LexA binding sequence found in gram-positive organisms. *J. Bacteriol.*, 184(21): 6073-6080.
123. Fernandez de Henestrosa A.R., del Rey A., Tarragó R. and Barbé J. (1997). Cloning and characterization of the *recA* gene of *Paracoccus denitrificans* and construction of a *recA*-deficient mutant. *FEMS Microbiol. Lett.*, 147(2): 209-213.
124. Fernández De Henestrosa A.R., Rivera E., Tapias A. and Barbe J. (1998) Identification of the *Rhodobacter sphaeroides* SOS box. *Mol. Microbiol.*, 28:991-1003.
125. Fernández de Henestrosa A.R., Ogi T., Aoyagi S., Chafin D., Hayes J.J., Ohmori H. and Woodgate R. (2000) Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 35(6): 1560-1572.
126. Figurski D.H. and Helinski D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *P. Natl. A. Sci.*, 76: 1648-1652.
127. Filloux A. (Ed.). (2012). *Bacterial regulatory networks*. Horizon Scientific Press.
128. Finch P.W.A., Chambers P. and Emmerson P.T. (1985). Identification of the *Escherichia coli recN* gene product as a major SOS protein. *J. Bacteriol.*, 164(2): 653-658.
129. Freese E. and Strack H.B. (1962). Induction of mutations in transforming DNA by hydroxylamine. *P. Natl. Acad. Sci.*, 48(10): 1796-1803.
130. Fogh R.H., Oettleben G., Rüterjans H., Schnarr M., Boelens R. and Kaptein R. (1994) Solution structure of the LexA repressor DNA binding domain determined by 1H NMR spectroscopy. *The EMBO J.*, 13(17): 3936.
131. Fogliano M. and Schendel P.F. (1981). Evidence for the inducibility of the *uvrB* operon. *Nature*, 289(5794): 196-198.
132. Freese E. (1959). The Specific Mutagenic Effect of Base Analogues on Phage T4. *J. Mol. Biol.* 1(2): 87-105.
133. Friedberg E.C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921): 436-440.

6. Βιβλιογραφία

134. Fromme J.C, Banerjee A. and Verdine G.L. (2004) DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr Opin Struc Biol.*, 14(1):43–49.
135. Fuchs R.P., Fujii S. and Wagner J. (2004) Properties and functions of *Escherichia coli*: Pol IV and Pol V. *Adv. Protein Chem.*, 69: 229-264.
136. Fukui K. (2010). DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J. Nucleic Acids*, 2010: 260512.
137. Galani, I., Drainas, C., and Typas, M.A. (1985) Growth requirements and the establishment of a chemically defined minimal medium in *Zymomonas mobilis*. *Biotech. Lett.*, 7: 673-678.
138. Galeros M., Pappas K.M., Beletsiotis E. and Typas M.A. (2001) ISZm1068: an IS5-like insertion element from *Zymomonas mobilis*. *Arch Microbiol.*, 175: 323-333
139. Galhardo R.S., Rocha R.P., Marques M.V. and Menck C.F. (2005) An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res.*, 33(8): 2603-2614.
140. Garriga X., Calero S. and Barbé J. (1992) Nucleotide sequence analysis and comparison of the *lexA* genes from *Salmonella typhimurium*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mol. Gen. Genet.*, 236(1): 125-134.
141. Gibbs M. and De Moss R.D. (1954) Anaerobic dissimilation of C14-labeled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. *J. Biol. Chem.*, 207:689-694.
142. Gillespie K. and Yasbin R.E. (1987). Chromosomal locations of three *Bacillus subtilis* *din* genes. *J. Bacteriol.*, 169(7): 3372-3374
143. Giese K.C., Michalowski C B. and Little J.W. (2008) RecA-dependent cleavage of LexA dimers. *J. Mol. Biol.*, 377(1): 148-161.
144. Gonçalves de Lima O., De Araujo J.M., Schumacher I.E. and Cavalcanti Da Silva E. (1970) Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo novo do Recife. I. Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (Lindner) (1928). *Rev. Inst. Antibiot. Univ. Recife* 10: 3-15.
145. Goodman A.E., Rogers P.L. and Skotnicki M.L. (1982) Minimal medium for the isolation of auxotrophic *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 496–498
146. Goodman A.E., Strzelecki A.T. and Rogers P.L. (1984). Formation of ethanol from lactose by *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.*, 1(3-4): 219-228.
147. Goss W.A., Deitz W.H. and Cook T.M. (1965) Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli* II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol.*, 89(4): 1068-1074.

6. Βιβλιογραφία

148. Gotoh H., Kasaraneni N., Devineni N., Dallo S.F. and Weitao T. (2010) SOS involvement in stress-inducible biofilm formation. *Biofouling*, 26(5): 603-611.
149. Gottesman S. (1984). Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annu. Rev. Genet.*, 18(1): 415-441.
150. Grady W.M. and Ulrich C.M. (2007). DNA alkylation and DNA methylation: cooperating mechanisms driving the formation of colorectal adenomas and adenocarcinomas?. *Gut*, 56(3): 318-320.
151. Grainger D.C. and Busby S.J. (2008). Global regulators of transcription in *Escherichia coli*: mechanisms of action and methods for study. *Adv. Appl. Microbiol.*, 65: 93-113.
152. Green M.H.L., Donch J. and Greenberg J. (1969). The effect of A *uvr* mutation on rescue of UV irradiated Lon strains of *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol.*, 10(6): 397-405.
153. Griffiths A.J., Wessler S.R., Lewontin R.C., Gelbart W.M., Suzuki D.T. and Miller J.H. (2005) *Introduction to Genetic Analysis*, 8th ed. New York: W.H. Freeman and Co.
154. Grzesiuk E. and Janion C. (1996) MMS-induced mutagenesis and DNA repair in *Escherichia coli dnaQ49*: Contribution of UmuD' to DNA repair. *Mutat. Res.-DNA Repair*, 362(2): 147-154.
155. Gudas L.J. and Mount D.W. (1977). Identification of the *recA (tif)* gene product of *Escherichia coli*. *P. Natl. Acad. Sci.*, 74(12): 5280-5284.
156. Gudas L.J. and Pardee A.B. (1975) Model for regulation of *Escherichia coli* DNA repair functions. *P. Nat Acad. Sci.*, 72(6): 2330-2334.
157. Guerin E., Cambray G., Sanchez-Alberola N., Campoy S., Erill I., Da Re S., Gonzalez-Zorn B., Barbe J., Ploy M-C., Mazel D. (2009) The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science* 324(5930): 1034.
158. Gunasekaran P., Karunakaran T., Cami B., Mukundan A.G., Preziosi L. and Baratti J. (1990) Cloning and sequencing of the *sacA* gene: characterization of a sucrose from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.*, 172(12): 6727-6735.
159. Hajjema B.J., Sinderen D., Winterling K., Kooistra J., Venema G. and Hamoen L.W. (1996) Regulated expression of the *dinR* and *recA* genes during competence development and SOS induction in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 22(1): 75-85.
160. Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166: 557-580.

6. Βιβλιογραφία

161. Hanawalt P.C. (2015). Historical perspective on the DNA damage response. *DNA Repair*, 36: 2-7.
162. Hamoen L.W. Haijema B. Bijlsma J.J. Venema G. and Lovett C.M. (2001) The *Bacillus subtilis* competence transcription factor, ComK, overrides LexA-imposed transcriptional inhibition without physically displacing LexA. *J. Biol. Chem.*, 276(46): 42901-42907.
163. Haseltine W.A. and Block R. (1973) Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *PNAS*, 70(5): 1564-1568.
164. Hauser J., Levine A.S., Ennis D.G., Chumakov K.M. and Woodgate R. (1992). The enhanced mutagenic potential of the MucAB proteins correlates with the highly efficient processing of the MucA protein. *J. Bacteriol.*, 174(21): 6844-6851.
165. He M.X., Feng H., Bai F., Li Y., Liu X. and Zhang Y.Z. (2009). Direct production of ethanol from raw sweet potato starch using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 3(11): 721-726.
166. He M.X., Wu B., Shui Z.X., Hu Q.C., Wang W.G., Tan F.R., Tang X.Y., Zhu Q.J., Pan K., Li Q. and Su X.H. (2012a). Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under furfural stress. *Appl. Microbiol. Biot.*, 95(1): 189-199.
167. He M.X., Wu B., Shui Z.X., Hu Q.C., Wang W.G., Tan F.R., Zhu Q.J., Pan K., Li Q. and Su X.H. (2012b). Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under ethanol stress. *Biotechnol. Biofuels*, 5(1): 75.
168. He M.X., Wu, B., Qin H., Ruan Z.Y., Tan F.R., Wang J.L., Shui Z.X, Dai L.C., Zhu Q.L., Pan K., Tang X.Y., Wang W.G. and Hu Q.C. (2014) *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. *Biotechnol. Biofuels*, 7: 101.
169. de Henestrosa A.R.F., Cuné J., Erill I., Magnuson J. K. and Barbé J. (2002). A green nonsulfur bacterium, *Dehalococcoides ethenogenes*, with the LexA binding sequence found in gram-positive organisms. *J. Bacteriol.*, 184(21): 6073-6080.
170. Hertman I. and Luria S.E. (1967) Transduction studies on the role of a rec⁺ gene in the ultraviolet induction of prophage lambda. *J. Mol. Biol.*, 23(2): 117-133.
171. Hiom K. (2009). DNA repair: common approaches to fixing double-strand breaks. *Curr. Biol.*, 19(13): R523-R525.
172. Ho C., Kulaeva O. I., Levine A. S. and Woodgate R. (1993). A rapid method for cloning mutagenic DNA repair genes: isolation of *umu*-complementing genes from multidrug resistance plasmids R391, R446b, and R471a. *J. Bacteriol.*, 175(17): 5411-5419
173. Hocquet D., Llanes C., Thouverez M., Kulasekara H.D., Bertrand X., Plésiat P., Mazel D. and Miller S.I. (2012) Evidence for induction of integron-based

6. Βιβλιογραφία

- antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog*, 8(6): e1002778.
- 174.Hoppner TC and Doelle M.W. (1983) Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *Appl. Microbiol. Biot.*, 17(3):152-157.
- 175.Horii T., Ogawa T., Nakatani T., Hase T., Matsubara H. and Ogawa H. (1981) Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell*, 27:515-522.
- 176.Huisman O. and D'Ari R. (1981). An inducible DNA replication–cell division coupling mechanism in *E. coli*. *Nature*, 290(5809): 797-799.
- 177.Huisman O., D'Ari R. and Gottesman S. (1984) Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *PNAS*, 81(14): 4490-4494.
- 178.Huisman O., Jacques M., D'ari R. and Caro L. (1983). Role of the *sfiA*-dependent cell division regulation system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 153(2): 1072-1074.
- 179.Ingram L.O. (1976). Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.*, 125(2): 670-678.
- 180.Inoue J., Honda M., Ikawa S., Shibata T. and Mikawa T. (2007). The process of displacing the single-stranded DNA-binding protein from single-stranded DNA by RecO and RecR proteins. *Nucleic Acids Res*, 36(1): 94-109.
- 181.Ischenko A.A. and Saparbaev M.K. (2002) Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. *Nature*, 415(6868):183–187.
- 182.Janion C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Sci.*, 4(6): 338.
- 183.Jara M., Núñez C., Campoy S., de Henestrosa A.R.F., Lovley D.R. and Barbé J. (2003) *Geobacter sulfurreducens* has two autoregulated *lexA* genes whose products do not bind the *recA* promoter: differing responses of *lexA* and *recA* to DNA damage. *J. Bacteriol.*, 185(8): 2493-2502.
- 184.Jeon Y.J., Svenson C. J., Joachimsthal, E.L. and Rogers P.L. (2002) Kinetic analysis of ethanol production by an acetate-resistant strain of recombinant *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.*, 24(10): 819-824.
- 185.Jeon Y.J., Svenson C.J. and Rogers P.L. (2005) Over-expression of xylulokinase in a xylose-metabolising recombinant strain of *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 244(1): 85-92.

6. Βιβλιογραφία

186. Jeon Y.J., Xun Z., Su P. and Rogers P. L. (2012). Genome-wide transcriptomic analysis of a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 93(6): 2513-2518.
187. Jia X., Wei N., Wang T., and Wang H. (2013) Use of an EZ-Tn5-based random mutagenesis system to create a *Zymomonas mobilis* with significant tolerance to heat stress and malnutrition. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 40: 811–822
188. Jin H., Retallack D.M., Stelman S.J., Hershberger C.D. and Ramseier T. (2007). Characterization of the SOS response of *Pseudomonas fluorescens* strain DC206 using whole-genome transcript analysis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 269(2): 256-264.
189. Joachimsthal E., Haggett K.D., Jang J.-H. and Rogers P.L. (1998) A mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 capable of ethanol production from glucose in the presence of high acetate concentrations. *Biotechnol. Lett.*, 20: 137-142.
190. Johnston J.L., Sloan J., Fyfe J.A., Davies J.K. and Rood J.I. (1997). The *recA* gene from *Clostridium perfringens* is induced by methyl methanesulphonate and contains an upstream Cheo box. *Microbiology*, 143(3): 885-890.
191. Kalnenieks U., Galinina N., Toma M.M., Pickford J.L., Rutkis R. and Poole R.K. (2006) Respiratory behaviour of a *Zymomonas mobilis adhB::kan(r)* mutant supports the hypothesis of two alcohol dehydrogenase isoenzymes catalysing opposite reactions. *FEBS Lett.*, 580:5084-5088.
192. Kanagasundaram V. and Scopes RK. (1992) Cloning, sequence analysis, and expression of the structural gene encoding glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol.*, 174(5):1439-47.
193. Kang S.A., Jang K.H., Seo J.W., Kim K.H., Kim Y.H., Rairakhwada D., Seo M.Y., Lee J.O., Ha S.D., Kim C.H. and Rhee S. K. (2009). Levan: applications and perspectives. *Microbial production of biopolymers and polymer precursors*. Caister Academic Press, Norwich, 145-161.
194. Kato T. and Shinoura Y. (1977). Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light. *Mol. Gen. Genet.*, 156(2): 121-131.
195. Keller K.L., Overbeck-Carrick T.L. and Beck, D. J. (2001). Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutat. Res./DNA Repair*, 486(1): 21-29.
196. Keller P.M., Böttger E.C. and Sander P. (2008). Tuberculosis vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Russia is a natural *recA* mutant. *BMC Microbiol.*, 8(1): 120.
197. Kelley W. L. (2006). Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. *Mol. Microbiol.*, 62(5): 1228-1238.

6. Βιβλιογραφία

- 198.Kenyon C.J. and Walker G.C. (1980). DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. *P. Natl. Acad. Sci.*, 77(5): 2819-2823.
- 199.Kerr A.L., Jeon Y.J., Svenson C.J., Rogers P.L. and Neilan B.A. (2011) DNA restriction-modification systems in the ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89:761-769.
- 200.Khan F., Singh S.P. and Mishra B.N. (2008). Conservation of the LexA repressor binding site in *Deinococcus radiodurans*. *J. Integrative Bioinformatics*: 5(1): 1-56.
- 201.Khil P.P. and Camerini-Otero R.D. (2002). Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 44(1): 89-105.
- 202.Klapwijk P.M., van Beelen P. and Schilperoort R.A. (1979) Isolation of a recombination deficient *Agrobacterium tumefaciens* mutant. *Mol. Gen. Genet.*, 173:171-175.
- 203.Kluyver A.J. and Hoppenbrouwers W.J. (1931). Einmerkwürdiges Gärungsbakterium: Lindner's *Thermobacterium mobile*. *Arch. Mikrobiol.*, 2:245-260.
- 204.Kim T., Chitteni-Pattu S., Cox B.L., Wood E.A., Sandler S.J. and Cox M.M. (2015). Directed evolution of RecA variants with enhanced capacity for conjugal recombination. *PLOS Genet.*, 11(6): e1005278.
- 205.Kitagawa Y., Akaboshi E., Shinagawa H., Horii T., Ogawa H. and Kato T. (1985). Structural analysis of the *umu* operon required for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. *P. Natl. Acad. Sci.*, 82(13): 4336-4340.
- 206.Knegtel R., Fogh R.H., Boelens R., Kaptein R., Otteleben G., Rüterjans H., Dumoulin P. and Schnarr M. (1995) A model for the LexA repressor DNA complex. *Proteins*, 21(3): 226-236.
- 207.Kogoma T. (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 61(2): 212-238.
- 208.Kouvelis V.N., Davenport K.W., Brettin T.S., Bruce D., Detter C., Han C.S., Nolan M., Tapia R., Damoulaki A., Kyrpides N.C., Typas M.A. and Pappas K.M. (2011) Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. *pomaceae* Lectotype Strain ATCC 29192. *J. Bacteriol.*, 193:5049-5050.
- 209.Kouvelis V.N., Saunders E., Brettin T.S., Bruce D., Detter C., Han C., Typas M.A. and Pappas K.M. (2009) Complete genome sequence of the ethanol producer *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163. *J Bacteriol*, 191:7140-7141.
- 210.Kouvelis V.N., Teshima H., Bruce D., Detter C., Tapia R., Han C., Tampakopoulou V.O., Goodwin L., Woyke T., Kyrpides N.C., Typas M.A. and

6. Βιβλιογραφία

- Pappas K.M. (2014) Finished genome of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* strain CP4, an applied ethanol producer. *Genome Announc.*, 2(1).
- 211.Kovach M.E., Phillips R.W., Elzer P.H., Roop 2nd R.M. and Peterson K.M. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques*, 16: 800-802.
- 212.Kowalczykowski S.C. (1991) Biochemical and biological function of *Escherichia coli* RecA protein: behavior of mutant RecA proteins. *Biochimie*, 73(2): 289-304.
- 213.Kowalczykowski S.C., Clow J., Soraani R. and Varghese, A. (1987). Effects of the *Escherichia coli* S SB Protein on the Binding of *Escherichia coli* RecA Protein to Single-stranded DNA. *J. Mol. Hid*, 193, 81-95.
- 214.Kowalczykowski S.C., Dixon D.A., Eggleston A.K., Lauder S.D. and Rehrauer W.M. (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 58(3):401-65.
- 215.Kremer T.A., LaSarre B., Posto A.L. and McKinlay J.B. (2015) N₂ gas is an effective fertilizer for bioethanol production by *Zymomonas mobilis*. *PNAS*, 112(7): 2222-2226.
- 216.Kuchinski K.S., Brimacombe C.A., Westbye A.B., Ding H. and Beatty J.T. (2016). The SOS response master regulator LexA regulates the gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus* and represses transcription of the signal transduction protein CckA. *J. Bacteriol.*, 198(7): 1137-1148.
- 217.Kunduru M.R. and Pometto A.L. 3rd (1996) Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *J. Ind. Microbiol.*, 16:249-256
- 218.Kurnit D.M. (1989) *Escherichia coli* *recA* deletion strains that are highly competent for transformation and for in vivo phage packaging. *Gene*, 82(2): 313-315.
- 219.Labazi M., del Rey A., Fernandez de Henestrosa A.R. and Barbe J. (1999) A consensus sequence for the Rhodospirillaceae SOS operators. *FEMS Microbiol. Lett.*, 171:37-42.
- 220.Lahue R.S. and Modrich P. (1989). DNA mismatch correction in a defined system. *Science*, 245(4914):160–164.
- 221.Lam C.K., O'Mullan P. and Eveleigh D.E (1993) Transformation of *Zymomonas mobilis* by electroporation *Appl. Microb. & Biotechn.* 39, Number 3: 305-308
- 222.Lamers M.H., Perrakis A., Enzlin J.H., Winterwerp H.H.K., De Wind N. and Sixma T.K. (2000) The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G-T mismatch. *Nature*, 407(6805):711–717.

6. Βιβλιογραφία

- 223.Landini P. and Volkert M.R. (2000) Regulatory responses of the adaptive response to alkylation damage: a simple regulon with complex regulatory features. *J. Bacteriol.*, 182: 6543-6549.
- 224.Längle-Rouault F., Maenhaut-Michel G. and Radman M. (1987) GATC sequences, DNA nicks and the MutH function in *Escherichia coli* mismatch repair. *EMBO J.*, 6(4):1121-1127.
- 225.Lee K.Y., Park J.M., Kim T.Y., Yun H. and Lee S.Y. (2010) The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies. *Microb. Cell. Fact.*, 9:94.
- 226.Lee J.H., Skotnicki M.L. and Rogers P.L. (1982) Kinetic studies on a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.*, 4:615-620
- 227.Lejeune A., Eveleigh D.E. and Colson C. (1988). Expression of an endoglucanase gene of *Pseudomonas fluorescens* var. cellulosa in *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 49(3): 363-366.
- 228.Leng N., Dawson J.A., Thomson J.A., Ruotti V., Rissman A.I., Smits B.M., Haag J.D., Gould M.N., Stewart R.M. and Kendzierski C. (2013) EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments. *Bioinformatics*, 29(8): 1035-1043.
- 229.Lewis L.K., Harlow G.R., Gregg-Jolly L.A. and Mount D.W. (1994) Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 241(4): 507-523.
230. Lewin B. (2004) Genes VIII. Upper Saddle River. *New Jersey: Pearson Prentice Hall*.
- 231.Li B. and Dewey C.N. (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 12(1): 323.
- 232.Li H. and Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14): 1754-1760.
- 233.Li S., Xu M. and Su Z. (2010). Computational analysis of LexA regulons in Cyanobacteria. *BMC genomics*, 11(1): 527.
- 234.Liang C.C. and Lee W.C. (1998). Characteristics and transformation of *Zymomonas mobilis* with plasmid pKT230 by electroporation. *Biopr. Engineer.* 19:81-85
- 235.Lie, T. J., Wood, G. E. and Leigh, J. A. (2005). Regulation of nif Expression in *Methanococcus maripaludis* roles of the euryarchaeal repressor NrpR, 2-oxoglutarate and two operators. *J. Biol. Chem.*, 280(7): 5236-5241.

6. Βιβλιογραφία

- 236.Lin L.L. and Little J.W. (1989) Autodigestion and RecA-dependent cleavage of Ind⁻ mutant LexA proteins. *J. Mol. Biol.*, 210(3): 439-452.
- 237.Lindahl T., Sedgwick B., Sekiguchi M. and Nakabeppu Y. (1988) Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu. Rev. Biochem.*, 57: 133-157.
- 238.Lindner P. (1928) Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde, Tafel 68, 3rd ed. Berlin.
- 239.Linger J.G., Adney W.S. and Darzins A. (2010). Heterologous expression and extracellular secretion of cellulolytic enzymes by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(19): 6360-6369.
- 240.Little J.W. (1983). Variations in the in vivo stability of LexA repressor during the SOS regulatory cycle. In *Cellular responses to DNA damage*.
- 241.Little J.W. (1984) Autodigestion of LexA and phage lambda repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:1375-1379.
- 242.Little J.W. (1991) Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie*, 73(4): 411-421.
- 243.Little J.W. and Gellert M. (1983).The SOS regulatory system: control of its state by the level of RecA protease. *J. Mol. Biol.*, 167(4): 791-808.
- 244.Little J.W., Kim B., Roland K.L., Smith M.H., Lin L.L. and Slilaty S.N. (1994) Cleavage of LexA repressor. *Methods Enzymol.*, 244:266-284.
- 245.Little J.W. and Mount D.W. (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29:11-22.
- 246.Little J.W., Mount D.W. and Yanisch-Perron C.R. (1981) Purified LexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:4199-4203.
- 247.Liu C., Dong H.W., Zhong J., Ryu D.D., Bao J. (2010) Sorbitol production using recombinant *Zymomonas mobilis* strain. *J. Biotechnol*, 148: 105-112.
- 248.Liu C.Q., Goodman A.E. and Dunn N.W. (1988). Expression of cloned *Xanthomonas* d-xylose catabolic genes in *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.*, 7(1): 61-70.
- 249.Liu J., Huang C., Shin D. H. Yokota H., Jancarik J., Kim J.S., Adams P.D., Kim R. & Kim S.H. (2005). Crystal structure of a heat-inducible transcriptional repressor HrcA from *Thermotoga maritima*: structural insight into DNA binding and dimerization. *J. Mol. Biol.*, 350(5): 987-996.

6. Βιβλιογραφία

- 250.Liu Y.T., Chen C.G., Chao D.C., Lee F., Liao C.L., Sytwu H.K., Chou C.F. and Ji D.D. (1999) Sequence analysis of the *Gluconobacter oxydans* RecA protein and construction of a *recA*-deficient mutant. *Can. J. Microbiol.*, 45:347-351.
- 251.Lloyd R.G. and Buckman C. (1995). Conjugational recombination in *Escherichia coli*: genetic analysis of recombinant formation in Hfr x F-crosses. *Genetics*, 139(3): 1123-1148.
- 252.Lodge J., Fear J., Busby S., Gunasekaran P. and Kamini N. R. (1992). Broad host range plasmids carrying the *Escherichia coli* lactose and galactose operons. *FEMS Microbiol. Lett.*, 95(2-3): 271-276.
- 253.Lopes-Kulishev C.O., Alves I.R., Valencia E.Y., Pidhirnyj M.I., Fernandez-Silva F.S., Rodrigues T.R., Guzzo C.R. and Galhardo R.S. (2015) Functional characterization of two SOS-regulated genes involved in mitomycin C resistance in *Caulobacter crescentus*. *DNA repair*, 33: 78-89.
- 254.Lovett C.M., O'Gara T.M. and Woodruff J.N. (1994) Analysis of the SOS inducing signal in *Bacillus subtilis* using *Escherichia coli* LexA as a probe. *J. Bacteriol.*, 176(16): 4914-4923.
- 255.Lundin C., North M., Erixon K., Walters K., Jenssen D., Goldman A.S. and Helleday T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, 33(12): 3799-3811.
- 256.Luo Y., Pfuetzner R.A., Mosimann S., Paetzel M., Frey E.A., Cherney M., Kim B., Little J.W. and Strynadka N.C. (2001) Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell*, 106:585-594.
- 257.Luo Z. and Bao J. (2015) Secretive expression of heterologous β -glucosidase in *Zymomonas mobilis*. *Biores. Bioproc.*, 2(1): 29.
- 258.Lusetti S.L. and Cox M.M. (2002) The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu. Rev. Biochem.*, 71(1): 71-100.
- 259.Lyer R.R., Pluciennik A., Burdett V. and Modrich P.L. (2006) DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev.*, 106(2):302–323.
- 260.Mackay W.J., Han S. and Samson L.D. (1994). DNA alkylation repair limits spontaneous base substitution mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 176(11): 3224-3230.
- 261.Mankovich J.A., Lai P.H., Gokul N. and Konisky J. (1984). Organization of the colicin Ib gene. Promoter structure and immunity domain. *J. Biol. Chem.*, 259(14): 8764-8768.

6. Βιβλιογραφία

262. Martinez-Antonio A. and Collado-Vides J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6(5): 482-489.
263. Martinez-Salazar J.M., Romero D., Girard M.L. and Davila G. (1991) Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. *J. Bacteriol.*, 173:3035-3040.
264. Martins-Pinheiro M., Marques R.C. and Menck C.F. (2007) Genome analysis of DNA repair genes in the alpha proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *BMC Microbiol.*, 7(1): 17.
265. Masaki H. and Ohta T. (1985). Colicin E3 and its immunity genes. *J. Mol. Biol.*, 182(2): 217-227.
266. Mazón G., Campoy S., de Henestrosa A.R.F. and Barbé J. (2006) Insights into the LexA regulon of Thermotogales. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90(2): 123-137.
267. Mazon G., Erill I., Campoy S., Cortes P., Forano E. and Barbe J. (2004). Reconstruction of the evolutionary history of the LexA-binding sequence. *Microbiology*, 150(11): 3783-3795.
268. Mazon G., Lucena J.M. Campoy S., de Henestrosa A.R.F., Candau P. and Barbe J. (2004) LexA-binding sequences in Gram-positive and cyanobacteria are closely related. *Mol. Genet. Genomics*, 271(1): 40-49.
269. McGrew D.A. and Knight K.L. (2003). Molecular design and functional organization of the RecA protein. *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, 38(5): 385-432.
270. Mechanic L.E., Frankel B.A. and Matson S.W. (2000) *Escherichia coli* MutL loads DNA helicase II onto DNA. *J Biol Chem.*, 275(49):38337-38346.
271. Michel B. (2005). After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS Biol.*, 3(7): e255.
272. Mielecki D. and Grzesiuk E. (2014) Ada response—a strategy for repair of alkylated DNA in bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 355(1): 1-11.
273. Mikoč A., Vujaklija D. and Gamulin V. (1997). The *recA* gene from *Streptomyces rimosus* R6: sequence and expression in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.*, 148(5): 397-403.
274. Miller J.H. (1972) Assay of β -galactosidase. *Experiments in molecular genetics*, 352-355.
275. Miller H.I., Kirk M. and Echols H. (1981). SOS induction and autoregulation of the *himA* gene for site-specific recombination in *Escherichia coli*. *P. Natl. Acad. Sci.*, 78(11): 6754-6758.

6. Βιβλιογραφία

276. Millis N.F. (1956) A study of the cider-sickness bacillus; a new variety of *Zymomonas anaerobia*. *J. Gen. Microbiol.*, 15:521-528.
277. Misawa N., Okamoto T. and Nakamura K. (1988). Expression of a cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.*, 7(3): 167-177.
278. Misawa N., Okamoto T., Nakamura K., Kitamura K., Yanase H. and Tonomura K. (1986) Construction of a new shuttle vector for *Zymomonas mobilis*. *Agric. Chem. Soc. of Japan*, 50:3201-3203.
279. Modrich P. (1989) Methyl-directed DNA mismatch correction. *J Biol Chem.*, 264(12):6597–6600
280. Mohagheghi A., Dowe N., Schell D., Chou Y.C., Eddy C. and Zhang M. (2004). Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate. *Biotechnol. Lett.*, 26(4): 321-325.
281. Mohagheghi A., Evans K., Chou Y.C. and Zhang M. (2002) Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98-100:885-898.
282. Mohagheghi, A., Linger, J.G., Yang, S., Smith, H., Dowe, N., Zhang, M. and Pienkos, P.T. (2015). Improving a recombinant *Zymomonas mobilis* strain 8b through continuous adaptation on dilute acid pretreated corn stover hydrolysate. *Biotechnol. Biofuels*, 8(1): 55.
283. Moolenaar G.F., Herron M.F.P., Monaco V., van der Marel G.A., van Boom J.H., Visse R. and Goosen N. (2000) The role of ATP binding and hydrolysis by UvrB during nucleotide excision repair. *J Biol Chem.*, 275(11):8044–8050.
284. Morimatsu K. and Kowalczykowski S.C. (2003) RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Mol Cell*. 11(5):1337–1347
285. Morita R., Nakane S., Shimada A., Inoue M., Iino H., Wakamatsu T., Fukui K., Nakagawa N., Masui R. and Kuramitsu S. (2010). Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *J. Nucleic Acids*, 2010: 179594.
286. Moskvina O., McIlwain S. and On, I. (2014). Making sense of RNA-Seq data: from low-level processing to functional analysis. *bioRxiv*, 010488.
287. Motta E.S., Souza-Santos P.T., Cassiano T.R., Dantas F.J.S., Caldeira-De-Araujo A. and De Mattos J.C.P. (2010) Endonuclease IV is the main base excision repair enzyme involved in DNA damage induced by UVA radiation and stannous chloride. *J Biomed Biotechnol.*, 2010: 376218.

6. Βιβλιογραφία

288. Mount D.W. (1977) A mutant of *Escherichia coli* showing constitutive expression of the lysogenic induction and error-prone DNA repair pathways. *PNAS*, 74(1): 300-304.
289. Mount D.W., Low K.B. and Edmiston S.J. (1972). Dominant mutations (*lex*) in *Escherichia coli* K-12 which affect radiation sensitivity and frequency of ultraviolet light-induced mutations. *J. Bacteriol.*, 112(2): 886-893.
290. Movahedzadeh F., Colston M.J. and Davis E.O. (1997). Determination of DNA sequences required for regulated *Mycobacterium tuberculosis* RecA expression in response to DNA-damaging agents suggests that two modes of regulation exist. *J. Bacteriol.*, 179(11): 3509-3518.
291. Muro A.C., Rodríguez E., Abate C.M., and Siñeriz F. (2000). Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. *Biotechnol. Lett.*, 22(20): 1639-1642.
292. Mustard J.A. and Little J.W. (2000). Analysis of *Escherichia coli* RecA interactions with LexA, λ CI, and UmuD by site-directed mutagenesis of *recA*. *J. Bacteriol.*, 182(6): 1659-1670.
293. Myers K.S., Yan H., Ong I.M., Chung D., Liang K., Tran F., Keleş S., Landick R. and Kiley P.J. (2013) Genome-scale Analysis of *Escherichia coli* FNR Reveals Complex Features of Transcription Factor Binding. *PLoS Genet.*, 9(6): e1003565
294. Μπελετσιώτης E.A. (2003) Διερεύνηση επαγόμενης μεταλλαξογένεσης στο βακτήριο *Zymomonas mobilis*. Διδακτορική διατριβή, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
295. Napolitano R., Janel-Bintz R., Wagner J. and Fuchs R.P.P. (2000) All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J*, 19(22): 6259-6265.
296. Neale A.D., Scopes R.K., Wettenhall R.E. and Hoogenraad N.J. (1987) Nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene from *Zymomonas mobilis*. *Nucleic Acids Res.*, 15(4):1753-1761.
297. Neher S.B., Flynn J.M., Sauer R.T. and Baker T.A. (2003). Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes Dev.*, 17(9): 1084-1089.
298. Newmark K.G., O'Reilly E.K., Pohlhaus J.R. and Kreuzer K.N. (2005) Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in *Escherichia coli*. *Gene*, 356: 69-76.
299. Nuyts S., Van Mellaert L., Barbe S., Lammertyn E., Theys J., Landuyt W., Bosmans E., Lambin P. and Anné, J. (2001). Insertion or deletion of the Cheo box modifies radiation inducibility of *Clostridium promoters*. *Appl. Environ. Microb.*, 67(10): 4464-4470.

6. Βιβλιογραφία

300. O'Neil D., Glowatz H. and Schlumpberger M. (2013) Ribosomal RNA Depletion for Efficient Use of RNA-Seq Capacity. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 4-19.
301. Obmolova G., Ban C., Hsieh P. and Yang W. (2000) Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature*, 407(6805):703–710.
302. Oertel-Buchheit P., Schmidt-Dörr T., Granger-Schnarr M., and Schnarr M. (1993) Spacing requirements between LexA operator half-sites can be relaxed by fusing the LexA DNA binding domain with some alternative dimerization domains. *J. Mol. Biol.*, 229(1): 1-7.
303. Ohmori H., Hatada E., Qiao Y., Tsuji M. and Fukuda R. (1995) *dinP*, a new gene in *Escherichia coli*, whose product shows similarities to UmuC and its homologues. *Mutat. Res. Lett.*, 347(1): 1-7.
304. Okamoto T., Yamano S., Ikeaga H. and Nakamura K. (1994) Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 563–568
305. Olsson M. and Lindahl T. (1980) Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from *O*⁶-methylguanine to a protein cysteine residue. *J Biol Chem.*, 255(22):10569–10571
306. Orren D.K. and Sancar A. (1989) The (A)BC excinuclease of *Escherichia coli* has only the UvrB and UvrC subunits in the incision complex. *P Natl Acad Sci USA.*, 86(14):5237–5241.
307. Pacelli L.Z., Edmiston S.H. and Mount D.W. (1979) Isolation and characterization of amber mutations in the *lexA* gene of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 137(1): 568-573.
308. Paetzel M., Dalbey R.E. and Strynadka N.C. (1998) Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. *Nature*, 396:186-190.
309. Panesar P.S., Marwaha S.S. and Kennedy J.F. (2006) *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *J. Chem. Technol. Biot.*, 81(4): 623-635.
310. Pappas K.M. (2011). Mini-Mu transposon mutagenesis of ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Strain Engineering: Methods and Protocols*, 419-434.
311. Pappas K.M., Galani I. and Typas M.A. (1997). Transposon mutagenesis and strain construction in *Zymomonas mobilis*. *J. Appl. Microbiol.*, 82(3): 379-388.
312. Pappas K.M., Kouvelis V.N., Saunders E., Brettin T.S., Bruce D., Detter C., Balakireva M., Han C.S., Savvakis G., Kyrpides N.C. and Typas M.A. (2011) Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* Lectotype Strain ATCC 10988. *J. Bacteriol.*, 193:5051-5052.

6. Βιβλιογραφία

- 313.Park S.C. and Baratti J. (1991). Comparison of ethanol production by *Zymomonas mobilis* from sugar beet substrates. *Appl. Microbiol. Biot.*, 35(3): 283-291.
- 314.Patricelli M.P., Lovato M.A. and Cravatt B.F. (1999) Chemical and mutagenic investigations of fatty acid amide hydrolase: evidence for a family of serine hydrolases with distinct catalytic properties. *Biochemistry*, 38:9804-9812.
- 315.Perez-Llamas C. and Lopez-Bigas N. (2011) Gitoools: Analysis and Visualisation of Genomic Data Using Interactive Heat-Maps. *PLoS ONE* 6.: e19541
- 316.Piersen C.E., McCullough A.K. and Lloyd R.S. (2000) AP lyases and dRPases: commonality of mechanism. *Mutat Res.*, 459(1):43–53
- 317.Poosaran N., Heyes R.H. and Rogers P.L. (1985). Ethanol production from cassava starch using a highly productive strain of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602. *Biomass*, 7(3): 171-183.
318. Poza-Carrión C., Jiménez-Vicente E., Navarro-Rodríguez M., Echavarri-Erasun C. and Rubio L.M. (2014) Kinetics of nif gene expression in a nitrogen-fixing bacterium. *J. Bacteriol.*, 196(3): 595-603.
- 319.Pray L. (2008) DNA Replication and Causes of Mutation. *Nature Education* 1(1):214
- 320.Prierer U.B., Simon. R. and Pühler A. (1985) Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. *J. Bacteriol.*, 163: 324-330
- 321.Pugsley A.P., Goldzahl N. and Barker R.M. (1985). Colicin E2 production and release by *Escherichia coli* K12 and other Enterobacteriaceae. *Microbiology*, 131(10): 2673-2686.
- 322.Παππά Α.Μ. (1997) Μελέτη της μεταφοράς γονιδίων μέσω σύζευξης στο αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zymomonas mobilis*. Διδακτορική διατριβή, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 323.Πουλής Π. (2015). Μελέτη της SOS-εξαρτώμενης μεταγραφικής ρύθμισης στο αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zymomonas mobilis*. Διπλωματική εργασία, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 324.Quillardet P., Rouffaud M. A. and Bouige P. (2003). DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.*, 154(8): 559-572.
- 325.Radding C.M. (1978) Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.*, 47(1): 847-880.

6. Βιβλιογραφία

- 326.Radman M. (1975) Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis. In *Molecular and environmental aspects of mutagenesis*, pp. 128-142. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, IL.
- 327.Register J.C., Christiansen G. and Griffith J. (1987) Electron microscopic visualization of the RecA protein-mediated pairing and branch migration phases of DNA strand exchange. *J. Biol. Chem.*, 262(26): 12812-12820.
- 328.Rehr B., Wilhem C. and Sahn N. (1991) Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 144-148.
- 329.Reisch M.S.(2006) Fuels of the future chemistry and agriculture join to make a new generation of renewable fuels. *Chem. Eng. News*, 3
- 330.Renzette N., Gumlaw N. and Sandler S.J. (2007) DinI and RecX modulate RecA–DNA structures in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 63(1): 103-115.
- 331.Requena J.M. (Ed.). (2012). *Stress response in microbiology*. Horizon Scientific Press.
- 332.del Rey A., Diestra J., Fernandez de Henestrosa A.R. and Barbe J. (1999) Determination of the *Paracoccus denitrificans* SOS box. *Microbiology*, 145 (Pt 3):577-584.
- 333.Reynen M., Reipen I., Sahn H. and Sprenger G.A. (1990). Construction of expression vectors for the gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis*. *Mol. Gen. Genet. MGG*, 223(2): 335-341.
- 334.Rhee S.K., Lee G.M., Han Y.T., Yusof Z.A.M., Han M.H. and Lee K.J. (1984). Ethanol production from cassava and sago starch using *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.*, 6(9): 615-620.
- 335.Rhodius V.A. and Gross C.A. (2011) Using DNA microarrays to assay part function. *Methods Enzymol.*, 497:75-113
- 336.Riera J. and Barbe J. (1993) Sequence of the *Providencia rettgeri* *lexA* gene and its control region. *Nucleic Acids Res.*, 21(9): 2256-2256.
- 337.Riera J. and Barbé J. (1995) Cloning, sequence and regulation of expression of the *lexA* gene of *Aeromonas hydrophila*. *Gene*, 154(1): 71-75.
- 338.Riera J., Fernandez de Henestrosa A.R., Garriga X., Tapias A. and Barbe J. (1994) Interspecies regulation of the *recA* gene of gram-negative bacteria lacking an *E. coli*-like SOS operator. *Mol. Gen. Genet.*, 245:523-527.
- 339.Rizki R.M. and Rizki T.M. (1969). Somatic cell lesions induced by the base analog 5-bromodeoxyuridine. *Cancer research*, 29(1): 201-208

6. Βιβλιογραφία

- 340.Roca A.I. and Cox M.M. (1997) RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Prog. Nucleic Acid Re.*, 56: 129-223.
- 341.Rocha E.P., Cornet E. and Michel B. (2005). Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLOS Genet.*, 1(2): e15.
- 342.Rogers P.L., Goodman A.E., and Heyes R.H. (1984) *Zymomonas ethanol fermentations. Microbiol. Sci.*, 1: 133–136.
- 343.Rogers P.L., Jeon Y.J., Lee K.J. and Lawford H.G. (2007) *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 108:263-288.
- 344.Rogers P.L., Lee K.J., Skotnicki M.L. and Tribe D.E. (1982) Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng.*, 23:37-84.
- 345.Ron E.Z. (2013). Bacterial stress response. In *The Prokaryotes* (pp. 589-603). Springer Berlin Heidelberg.
- 346.Rubio L.M. and Ludden P.W. (2008) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62: 93-111.
- 347.Sakai A. and Cox M.M. (2009). RecFOR and RecOR as distinct RecA loading pathways. *J Biol Chem*, 284(5): 3264-3272.
- 348.Salmelin C. and Vilpo J. (2003). Induction of SOS response, cellular efflux and oxidative stress response genes by chlorambucil in DNA repair-deficient *Escherichia coli* cells (*ada*, *ogt* and *mutS*). *Mutat. Res./Fund. Mol. M.*, 522(1): 33-44.
- 349.Sambrook J. and Russell D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. *Third edition. Cold Spring Harbror Laboratory Press, New York.*
- 350.Sancar A. and Sancar G.B. (1988) DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem.* 57:29–67.
- 351.Sanchez-Alberola N., Campoy S., Barbé J. and Erill I. (2012). Analysis of the SOS response of *Vibrio* and other bacteria with multiple chromosomes. *BMC genomics*, 13(1): 58.
- 352.Sanchez-Alberola N., Campoy S., Emerson D., Barbé J. and Erill I. (2015). An SOS regulon under control of a noncanonical LexA-binding motif in the Betaproteobacteria. *J. Bacteriol.*, 197(16): 2622-2630.
- 353.Sarks C., Jin, M. Sato T.K., Balan V. and Dale B.E. (2014) Studying the rapid bioconversion of lignocellulosic sugars into ethanol using high cell density fermentations with cell recycle. *Biotechnol. Biofuels*, 7: 73

6. Βιβλιογραφία

- 354.Sassanfar M. and Roberts J.W. (1990) Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J. Mol. Biol.*, 212:79-96.
- 355.Savvakis G. and Pappas K.M. (2011) Study of SOS regulation in the ethanologenic *Zymomonas mobilis*. 6th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology & Bioinformatics (HSCBB), University of Patras Conference Center, Patras, October 7-9, Greece, pp 45
- 356.Savvides A.L., Kallimanis A., Varsaki A., Koukkou A.I., Drainas C., Typas M.A., and Karagouni A.D. (2000) Simultaneous ethanol and bacterial ice nuclei production from sugar beet molasses by a *Zymomonas mobilis* CP4 mutant expressing the *inaZ* gene of *Pseudomonas syringae* in continuous culture. *J Appl Microbiol.*, 89(6): 1002-1008.
- 357.Schaaper R.M. (1993) Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268: 23762–23765.
- 358.Schnarr M., Granger-Schnarr M., Hurstel S. and Pouyet J. (1988) The carboxy-terminal domain of the LexA repressor oligomerises essentially as the entire protein. *FEBS letters*, 234(1): 56-60.
- 359.Schnarr M., Pouyet J., Granger-Schnarr M. and Daune M. (1985) Large-scale purification, oligomerization equilibria, and specific interaction of the LexA repressor of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 24(11): 2812-2818.
- 360.Schreder K., Brunner R. and Hampe R. (1934) Die anaerobe und aerobe Gärung von *Pseudomonas lindneri* Klyuver in glucosehaltiger anorganischer Nährlösung. *Biochim. Z.*, 273:223-242
- 361.Schultz S.C., Shields G.C. and Steitz T.A. (1991) Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science*, 253:1001-1007.
- 362.Selbitschka W., Arnold W., Priefer U.B., Rottschäfer T., Schmidt M., Simon R. and Pühler A. (1991). Characterization of *recA* genes and *recA* mutants of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Mol. Gen. Genet.*, 229(1): 86-95.
- 363.Senthilkumar V., Rameshkumar N., Busby S. and Gunasekaran P. (2004) Disruption of the *Zymomonas mobilis* extracellular sucrose gene (*sacC*) improves levan production. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 671-676.
- 364.Seo J.S., Chong H.Y., Kim J.H. and Kim J.Y. Method for mass production of primary metabolites, strain for mass production of primary metabolites, and method for preparation thereof. US: Patent; 2007. p. 20090162910 A1.
- 365.Seo J.S., Chong H., Park H.S., Yoon K.O., Jung C., Kim J.J., Hong J.H., Kim H., Kim J.H., Kil J.I., Park C.J., Oh H.M., Lee J.S., Jin S.J., Um H.W., Lee H.J., Oh S.J., Kim J.Y., Kang H.L., Lee S.Y., Lee K.J. and Kang H.S. (2005) The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat. Biotechnol.*, 23:63-68.

6. Βιβλιογραφία

366. Shen C.H., Chiang Y.C., Hsu C.H. and Yang M.K. (2007). Identification and characterization of two *uvrA* genes of *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri. *Mol. Genet. Genomics*, 277(2): 149-160.
367. Shinagawa H. (1996). SOS response as an adaptive response to DNA damage in prokaryotes. *Stress-inducible cellular responses*: 221-235.
368. Shigenobu S., Watanabe H., Hattori M., Sakaki Y. and Ishikawa, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 407(6800): 81-86.
369. Shui Z.X., Qin H., Wu B., Ruan Z.Y., Wang L.S., Tan F.R., Wang J.L., Tang X.Y., Dai L.C., Hu G.Q. and He M.X. (2015). Adaptive laboratory evolution of ethanologenic *Zymomonas mobilis* strain tolerant to furfural and acetic acid inhibitors. *Appl. Microbiol. Biot.*, 99(13): 5739-5748.
370. Shurvinton C.E. and Lloyd R G. (1982). Damage to DNA induces expression of the *ruv* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 185(2): 352-355.
371. Sikdar R., Simmons, A.R. and Doerrler W.T. (2013). Multiple envelope stress response pathways are activated in an *Escherichia coli* strain with mutations in two members of the DedA membrane protein family. *J Bacteriol*, 195(1): 12-24.
372. Silveira M.M., Wisbeck E., Lemmel C., Erzinger G.S., Lopes da Costa J.P., Bertasso M. and Jonas R. (1999): Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.*, 75: 99-103.
373. Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1:784-791
374. Slilaty S.N., Rupley J.A. and Little J.W. (1986) Intramolecular cleavage of *lexA* and phage. λ . repressors: dependence of kinetics on repressor concentration, pH, temperature, and solvent. *Biochemistry*, 25(22): 6866-6875.
375. Skotnicki M.L., Tribe D.E. and Rogers P.L. (1980). R-plasmid transfer in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40(1): 7-12.
376. Skotnicki M.L., Lee K., Tribe D. and Rogers P. (1982) Genetic alteration of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. In Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals. Edited by: Hollaende, A., DeMoss, R.D., Kaplan, S., Konisky, J., Savage, D., Wolfe, R.S. New York: Plenum Press; 271-290.
377. Smollett K.L., Smith K.M., Kahramanoglou C., Arnvig K.B., Buxton R.S. and Davis E.O. (2012). Global analysis of the regulon of the transcriptional repressor LexA, a key component of SOS response in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, 287(26): 22004-22014.

6. Βιβλιογραφία

- 378.Smoot L.M., Smoot J.C., Graham M.R., Somerville G.A., Sturdevant D.E., Migliaccio C.A.L., Sylva G.L. and Musser J.M. (2001) Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A *Streptococcus*. *PNAS*, 98(18): 10416-10421.
- 379.So L.Y., Chen W.Y., Lacap-Bugler D.C., Seemann M. and Watt R.M. (2014). pZMO7-Derived shuttle vectors for heterologous protein expression and proteomic applications in the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*. *BMC Microbiol.*, 14(1): 68.
- 380.Spory A., Bosserhoff A., von Rhein C., Goebel W. and Ludwig A. (2002). Differential regulation of multiple proteins of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the transcriptional regulator SlyA. *J. Bacteriol.*, 184(13): 3549-3559.
- 381.Sprenger G.A. (1996) Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiol. Lett.* 145:301-307.
- 382.Sreekumar O. and Basappa S. (1991). Characterization of a superior thermotolerant mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 for ethanol production in glucose medium. *Biotechnol. lett.*, 13(5): 365-370
- 383.Srivastava S. (2003) Understanding bacteria. *Springer*.
- 384.Stasiak A., Stasiak A.Z. and Roller T. (1984) Visualization of RecA-DNA complexes involved in consecutive stages of an in vitro strand exchange reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 49, pp. 561-570). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 385.Steinborn G. (1978). *Uvm* mutants of *Escherichia coli* K 12 deficient in UV mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.*, 165(1): 87-93.
- 386.Stintzi A. (2003). Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. *J. Bacteriol.*, 185(6): 2009-2016.
- 387.Stohl E.A., Brockman J.P., Burkle K.L., Morimatsu K., Kowalczykowski S.C. and Seifert H.S. (2003). *Escherichia coli* RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, 278(4): 2278-2285.
- 388.Story R.M. and Steitz T.A. (1992). Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature* 355:374-376.
- 389.Strzelecki A.T., Goodman A.E. and Rogers P.L. (1987). Behavior of the IncW plasmid Sa in *Zymomonas mobilis*. *Plasmid*, 18(1): 46-53.
- 390.Su P., Delaney S.F. and Rogers P.L. (1989). Cloning and expression of a β -glucosidase gene from *Xanthomonas albilineans* in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.*, 9(2): 139-152.

6. Βιβλιογραφία

391. Sugino A., Peebles C.L., Kreuzer K.N. and Cozzarelli N.R. (1977) Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *PNAS*, 74(11): 4767-4771.
392. Swings J. and De Ley J. (1977) The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.*, 41:1-46.
393. Σαββάκης Ι. (2009) Κατασκευή *recA* στελέχους στο βακτήριο *Zymomonas mobilis*. Διπλωματική εργασία, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
394. Σαββάκης Ι. (2011) Μελέτη της επιδιόρθωσης DNA στο αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zymomonas mobilis*. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην Βιοπληροφορική, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
395. Σκρέκας Χ. (2014) Κλωνοποίηση και μελέτη του καταστολέα LexA στο αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zymomonas mobilis*. Διπλωματική εργασία, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
396. Tampakopoulou V.O., Papaggeli M., Davidova E. and Pappas K.M. (2015) Study of transformation in the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis*. 6th National Conference of the Hellenic Society for Microbiology 'Mikrobiokosmos' (MBK6), National Hellenic Research Foundation, Athens, 3-5 April, Greece
397. Tanaka H., Ishikawa H., Osuga K. and Takagi Y. (1990) Fermentative ability of *Zymomonas mobilis* under various oxygen supply conditions in batch culture. *J. Ferment. Bioeng.*, 69:234-239.
398. Tao F., Miao J.Y., Shi G.Y. and Zhang K.C. (2005) Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. *Process Biochem* 40: 183-187
399. Tapias A. and Barbé J. (1998). Mutational analysis of the *Rhizobium etli recA* operator. *J. Bacteriol.*, 180(23): 6325-6331.
400. Tapias A. and Barbé J. (1999) Regulation of divergent transcription from the *uvrA-ssb* promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.*, 262:121-130.
401. Tapias A., Campoy S. and Barbé J. (2000) Analysis of the expression of the *Rhodobacter sphaeroides lexA* gene. *Mol. Gen. Genet.*, 263:957-965.
402. Tapias A., de Henestrosa A.F. and Barbe J. (1997) Characterization of the promoter of the *Rhizobium etli recA* gene. *J. Bacteriol.*, 179(5): 1573-1579.
403. Tapias A., Fernandez S., Alonso J.C. and Barbé J. (2002) *Rhodobacter sphaeroides* LexA has dual activity: optimising and repressing *recA* gene transcription. *Nucleic Acids Res.*, 30:1539-1546.

6. Βιβλιογραφία

404. Taylor A.F., Schultz D.W., Ponticelli A.S. and Smith G.R. (1985). RecBC enzyme nicking at Chi sites during DNA unwinding: location and orientation-dependence of the cutting. *Cell*, 41(1): 153-163.
405. Theodore A., Lewis K. and Vulić M. (2013). Tolerance of *Escherichia coli* to fluoroquinolone antibiotics depends on specific components of the SOS response pathway. *Genetics*, 195(4): 1265-1276.
406. Thliveris A.T., Little J.W. and Mount D.W. (1991) Repression of the *E. coli recA* gene requires at least two LexA protein monomers. *Biochimie*, 73:449-456.
407. Tolmasky M.E., Gammie A.E. and Crosa J.H. (1992) Characterization of the *recA* gene of *Vibrio anguillarum*. *Gene*, 110(1): 41-48.
408. Tomes D., Lakshmanan P., and Songstad D. (Eds.). (2010). *Biofuels: global impact on renewable energy, production agriculture, and technological advancements*. Springer Science & Business Media.
409. Tonomura K., Okamoto T., Yasui M. and Yanase H. (1986) Shuttle vectors for *Zymomonas mobilis*. *Agric. and Biol. Chem.*, 50:805-808.
410. Traxler M.F., Summers S.M., Nguyen H.T., Zacharia V.M., Hightower G.A., Smith J.T. and Conway T. (2008). The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 68(5): 1128-1148.
411. Trewick S.C., Henshaw T.F., Hausinger R.P., Lindahl T. and Sedgwick B. (2002) Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature*, 419(6903):174–178.
412. Tribe D.E. and Rogers P.L. (1984) Ethanol production in a continuous process with cell recycle. U.S. patent 4443544.
413. Typas M.A. and Galani I. (1992). Chemical and UV mutagenesis in *Zymomonas mobilis*. *Genetica*, 87(1): 37-45.
414. Ubeda C., Barry P., Penadés J.R. and Novick R.P. (2007). A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. *P. Natl. Acad. Sci.*, 104(36): 14182-14188.
415. Ubeda C., Maiques E., Tormo M., Campoy S., Lasa Í., Barbé J., Novick R.P. and Penadés J.R. (2007) SaPI operon I is required for SaPI packaging and is controlled by LexA. *Mol. Microbiol.*, 65(1): 41-50.
416. Ulrich R.L., DeShazer D., Kenny T.A., Ulrich M.P., Moravusova A., Opperman T., Bavari S., Bowlin T.L., Moir D.T. and Panchal, R. G. (2013). Characterization of the *Burkholderia thailandensis* SOS response by using whole-transcriptome shotgun sequencing. *Appl. Environ. Microb.*, 79(19): 5830-5843.

6. Βιβλιογραφία

417. VanLoock M.S., Yu X., Yang S., Lai A. L., Low C., Campbell M.J. and Egelman E.H. (2003) ATP-mediated conformational changes in the RecA filament. *Structure*, 11(2): 187-196.
418. Vartholomatos G., Typas M. A. and Drinas C. (1993). An ultraviolet-sensitive mutant of *Zymomonas mobilis* affecting the stability of its natural plasmid pZMO2. *Plasmid*, 29(1): 10-18.
419. Vasan P.T., Piriya P.S., Prabhu D.I.G. and Vennison S.J. (2011). Cellulosic ethanol production by *Zymomonas mobilis* harboring an endoglucanase gene from *Enterobacter cloacae*. *Bioresource Technol.*, 102(3): 2585-2589.
420. Venkatesh R., Ganesh N., Guhan N., Reddy M. S., Chandrasekhar T. and Muniyappa K. (2002). RecX protein abrogates ATP hydrolysis and strand exchange promoted by RecA: insights into negative regulation of homologous recombination. *PNAS*, 99(19): 12091-12096.
421. Verhoeven E.E.A., Van Kesteren M., Moolenaar G.F., Visse R. and Goosen N. (2000) Catalytic sites for 3' and 5' incision of *Escherichia coli* nucleotide excision repair are both located in UvrC. *J Biol Chem.*, 275(7): 5120-5123.
422. Verly W.G. and Lacroix M. (1975). DNA and nitrous acid. *BBA Nucleic Acids*, 414(2): 185-192.
423. Vial L., Pothier J.F., Normand P., Moëgne-Loccoz Y., Bally R. and Wisniewski-Dyé F. (2004). Construction of a *recA* mutant of *Azospirillum lipoferum* and involvement of *recA* in phase variation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 236(2): 291-299.
424. Viikari L. (1986) By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. *Technical Research Centre of Finland. Publication 27*.
425. Viikari L. and Berry D.R. (1988) Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 7: 237-261.
426. Viikari L. and Korhola M. (1986). Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 24(6): 471-476.
427. Vinella D., Albrecht C., Cashel M. and D'Ari R. (2005) Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 56(4): 958-970.
428. Vogel J., Argaman L., Wagner E.G.H. and Altuvia S. (2004) The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Curr. Biol.*, 14(24): 2271-2276.
429. Wade J. T., Reppas N. B., Church G.M. and Struhl K. (2005). Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. *Genes Dev.*, 19(21): 2619-2630.

6. Βιβλιογραφία

430. Walker G.C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 48:60-93.
431. Walker G.C. (1987) The SOS response of *Escherichia coli*. In: Ingraham J, Low KB, Magasnik B, Niedhart F, Schaecter M, et al., editors. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Vols. I and II*. Washington (D.C.): American Society of Microbiology. Chapter 89.
432. Walter B.M., Cartman S.T., Minton N.P., Butala M. and Rupnik M. (2015) The SOS response master regulator LexA is associated with sporulation, motility and biofilm formation in *Clostridium difficile*. *PloS one*, 10(12): e0144763.
433. Walter B.M., Rupnik M., Hodnik V., Anderluh G., Dupuy B., Paulič N., Zgur-Bertok D. and Butala, M. (2014). The LexA regulated genes of the *Clostridium difficile*. *BMC Microbiol.*, 14(1): 88.
434. Wang G.J., Wang Z.S., Zhang Y.W. and Zhang Y.Z. (2012). Cloning and expression of *amyE* gene from *Bacillus subtilis* in *Zymomonas mobilis* and direct production of ethanol from soluble starch. *Biotechnol. Bioproc. E.*, 17(4): 780-786.
435. Wang H., Cao S., Wang W.T., Wang K.T., and Jia X. (2016a) Very high gravity ethanol and fatty acid production of *Zymomonas mobilis* without amino acid and vitamin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 43: 861.
436. Wang J.L., Wu B., Qin H., You Y., Liu S., Shui Z.X., Tan F.R, Wang Y.W., Zhu Q.L., Li Y.B., Ruan Z.Y., Ma K.D., Dai L.C., Hu G.Q., and Ruan Z. Y. (2016b). Engineered *Zymomonas mobilis* for salt tolerance using EZ-Tn5-based transposon insertion mutagenesis system. *Microb. Cell fact.*, 15(1): 101.
437. Wecker M.S.A., and Zall R.R. (1987). Production of acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2815–2820
438. Weel-Sneve R., Bjørås M. and Kristiansen K.I. (2008) Overexpression of the LexA-regulated *tisAB* RNA in *E. coli* inhibits SOS functions; implications for regulation of the SOS response. *Nucleic Acids Res.*, 36(19): 6249-6259.
439. Weigle J.J. (1953) Induction of mutations in a bacterial virus. *P. Nat. Acad. Sci.*, 39(7): 628-636.
440. Weisser P., Krämer R. and Sprenger G.A. (1996). Expression of the *Escherichia coli pmi* gene, encoding phosphomannose-isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker. *Appl. Environ. Microb.*, 62(11): 4155-4161.
441. Wertman K.F. and Mount D.W. (1985) Nucleotide sequence binding specificity of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 163(1): 376-384.

6. Βιβλιογραφία

442. Williams R.C. and Spengler S.J. (1986) Fibers of RecA protein and complexes of RecA protein and single-stranded ϕ X174 DNA as visualized by negative-stain electron microscopy. *J. Mol. Biol.*, 187(1): 109-118.
443. Winterling K.W. Chafin D. Hayes J.J., Sun J., Levine A.S., Yasbin R.E. and Woodgate R. (1998) The *Bacillus subtilis* DinR binding site: redefinition of the consensus sequence. *J. Bacteriol.*, 180(8): 2201-2211.
444. Winterling K.W., Levine A.S., Yasbin R.E. and Woodgate R. (1997). Characterization of DinR, the *Bacillus subtilis* SOS repressor. *J. Bacteriol.*, 179(5): 1698-1703.
445. Witkin E.M. (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.*, 40(4): 869.
446. Wojciechowski M.F., Peterson K.R. and Love P.E. (1991). Regulation of the SOS response in *Bacillus subtilis*: evidence for a LexA repressor homolog. *J. Bacteriol.*, 173(20): 6489-6498.
447. Wood J.M. (2015). Bacterial responses to osmotic challenges. *J Gen Physiol* jgp-201411296
448. Wood R.D. and Shivji M.K. (1997). Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes?. *Carcinogenesis*, 18(4): 605-610.
449. Wu R.Y., Zhang R.G., Zagnitko O., Dementieva I., Maltsev N., Watson J.D., Laskowski R, Gornicki P and Joachimiak A. (2003). Crystal structure of *Enterococcus faecalis* SlyA-like transcriptional factor. *J. Biol. Chem.*, 278(22): 20240-20244.
450. Yablonsky M.D., Goodman A.E., Stevnsborg N., Conçalves de Lima O., Falcao de Moraes J.O., Lawford H.G., Rogers P.L. and Eveleigh D.E. (1988) *Zymomonas mobilis* CP4: A clarification of strains via plasmid profiles. *J. Biotechnol.* 9: 71-80.
451. Yanase H., Fukushi H., Ueda N., Maeda Y., Toyoda A. and Tonomura K. (1991) Cloning, sequencing, and characterization of the intracellular invertase gene from *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 55(5):1383-1390.
452. Yanase H., Kurii J., and Tonomura K. (1986). Construction of a promoter-cloning vector in *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 50(11): 2959-2961.
453. Yanase H., Miyawaki H., Sakurai M., Kawakami A., Matsumoto M., Haga K., Kojima M. and Okamoto K. (2012). Ethanol production from wood hydrolysate using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 94(6): 1667-1678.
454. Yanase H., Nozaki K. and Okamoto K. (2005). Ethanol production from cellulosic materials by genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.*, 27(4): 259-263.

6. Βιβλιογραφία

455. Yang M.K., Yang Y.C. and Hsu C.H. (2002). Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* LexA: recognition of the LexA binding site. *Mol. Genet. Genomics*, 268(4): 477-487.
456. Yang S., Fei Q., Zhang Y., Contreras L.M., Utturkar S.M., Brown S.D., Himmel M.E. and Zhang M. (2016a) *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. *Microb. Biotechnol.*, 9(6): 699-717.
457. Yang S., Land M.L., Klingeman D.M., Pelletier D.A., Lu T.Y.S., Martin S.L., Guo H.B., Smith J.C. and Brown S.D. (2010). Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *P. Natl. Acad. Sci.*, 107(23): 10395-10400.
458. Yang S., Mohagheghi A., Franden M.A., Chou Y.C., Chen X., Dowe N., Himmel M.E., and Zhang M. (2016b) Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for 2,3-butanediol production from lignocellulosic biomass sugars. *Biotechnol Biofuels* 9: 189.
459. Yang S., Pan C., Tschaplinski T.J., Hurst G.B., Engle N.L., Zhou W., Dam P.A., Xu Y., Rodriguez M.J., Dice L., Johnson C.M., Davison B.H. and Brown S.D. (2013). Systems biology analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 ethanol stress responses. *PLoS One*, 8(7): e68886
460. Yang S., Pan C., Hurst G.B., Dice L., Davison B.H. and Brown S.D. (2014a). Elucidation of *Zymomonas mobilis* physiology and stress responses by quantitative proteomics and transcriptomics. *Front. Microbiol.*, 5: 246.
461. Yang S., Franden M.A., Brown S.D., Chou Y.C., Pienkos P.T. and Zhang M. (2014b). Insights into acetate toxicity in *Zymomonas mobilis* 8b using different substrates. *Biotechnol. Biofuels*, 7(1): 140.
462. Yang S., Pappas K.M., Hauser L.J., Land M.L., Chen G.L., Hurst G.B., Pan C., Kouvelis V.N., Typas M.A., Pelletier D.A., Klingeman D.M., Chang Y.J., Samatova N.F. and Brown S.D. (2009a) Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. *Nat. Biotechnol.*, 27:893-894.
463. Yang S., Tschaplinski T.J., Engle N.L., Carroll S.L., Martin S.L., Davison B.H., Palumbo A.V. Rodriguez M.J. and Brown S.D. (2009b). Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. *BMC Genomics*, 10(1): 34.
464. Yang S., Vera J.M., Grass J., Savvakis G., Moskvina O.V. Yan Y., McIlwain S.J., Zinonos I., Hebert A.S., Coon J.J., Bates D.M., Sato T.K., Brown S.D., Himmel M.E., Zhang M., Landick R., Pappas K.M. and Zhang Y. (2018). Complete genome sequence and the expression pattern of plasmids of the model ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 8b and 2032. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1): 125.

6. Βιβλιογραφία

465. Yang Y.C., Hsu C.H., Chou C.P. and Yang M.K. (2002) Genetic organization of the *lexA*, *recA* and *recX* genes in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 209(2): 149-154.
466. Yasuda T., Morimatsu K., Horii T., Nagata T. and Ohmori H. (1998). Inhibition of *Escherichia coli* RecA coprotease activities by DinI. *EMBO J.*, 17(11): 3207-3216.
467. Yi X., Gu H., Gao Q., Liu Z.L. and Bao J. (2015). Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment. *Biotechnol. Biofuels*, 8(1): 153.
468. Yoon K.H. and Pack M.Y. (1987). Construction of a shuttle vector between *Escherichia coli* and *Zymomonas anaerobia*. *Biotechnol. Lett.*, 9(3): 163-168.
469. Zannini E., Waters D.M., Coffey A. and Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biot.*, 100(3): 1121-1135.
470. Žgur-Bertok D. (2012) Regulating colicin synthesis to cope with stress and lethality of colicin production. *Biochemical Society Transactions*, 40(6): 1507-1511.
471. Zhang A.P., Pigli Y.Z. and Rice P.A. (2010a) Structure of the LexA-DNA complex and implications for SOS box measurement. *Nature*, 466:883-886.
472. Zhang M., Eddy C., Deanda K., Finkelstein M. and Picataggio S. (1995) Metabolic Engineering of a Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 267:240-243.
473. Zhang Y., Ma R., Zhao Z., Zhou Z., Lu W., Zhang W. and Chen M. (2010b). *irrE*, an exogenous gene from *Deinococcus radiodurans*, improves the growth of and ethanol production by a *Zymomonas mobilis* strain under ethanol and acid stress. *J Microbiol Biotechnol*, 20(7): 1156-1162.
474. Zhang X., Wang T., Zhou W., Jia X., and Wang H. (2013) Use of a Tn5-based transposon system to create a cost-effective *Zymomonas mobilis* for ethanol production from lignocelluloses. *Microb. Cell Fact.*, 12: 41
475. Zhao B. and Houry W.A. (2010) Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survival *Biochem Cell Biol* 88(2):301-14
476. Zhao N., Bai Y., Zhao X.Q., Yang Z.Y. and Bai F.W. (2012). Draft genome sequence of the flocculating *Zymomonas mobilis* strain ZM401 (ATCC 31822). *J. Bacteriol.*, 194(24): 7008-7009.
477. Zhao N., Pan Y., Liu H. and Cheng Z. (2016). Draft genome sequence of *Zymomonas mobilis* ZM481 (ATCC 31823). *Genome announcements*, 4(2): e00193-16

6. Βιβλιογραφία

- 478.Zhao X. and McEntee K. (1990) DNA sequence analysis of the *recA* genes from *Proteus vulgaris*, *Erwinia carotovora*, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 222(2-3): 369-376.
- 479.Zharkov D.O. (2008) Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci.*, 65(10):1544–1565.
- 480.Zheng G., Qin Y., Clark W.C., Dai Q., Yi C., He C., Lambowitz A.M. and Pan T. (2015) Efficient and quantitative high-throughput tRNA sequencing. *Nat. methods*, 12(9): 835-837.
- 481.Zyskind J.W., Svitil A.L., Stine W.B., Biery M.C. and Smith D.W. (1992). RecA protein of *Escherichia coli* and chromosome partitioning. *Mol. Microbiol.*, 6(17): 2525-2537.

7. Δημοσιεύσεις και Συνέδρια

Δημοσιεύσεις

1. Pappas K.M., Kouvelis V.N., Saunders E., Brettin T.S., Bruce D., Detter C., Balakireva M., Han C.S., **Savvakis G.**, Kyripides N.C. and Typas M.A. (2011) Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* Lectotype Strain ATCC 10988. *J. Bacteriol.* 193:5051.
2. Yang S., Vera J.M., Grass J., **Savvakis G.**, Moskvina O., Yang Y., McIlwain S., Lyu Y., Zinonos I., Hebbert A., Coon J.J., Bates D.M., Sato T.K., Brown S.D., Himmel M.E., Zhang M., Landick R., Pappas K.M. and Zhang Y. (2018) Complete genome sequence and the expression pattern of plasmids of the model ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 8b and 2032. *Biotechnol Biofuels*, 11(1): 125.

Δημοσίευση σε συνέδριο

Savvakis G. and Pappas K.M. (2011) ‘Study of SOS regulation in the ethanologenic *Zymomonas mobilis*’. 6th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology & Bioinformatics (HSCBB), University of Patras Conference Center, Patras, October 7-9, Greece, pp 45.

Συνέδρια

υπογραμμίζονται οι προφορικές παρουσιάσεις

1. **Savvakis, G.** & Pappas, K.M. (2011) ‘Study of DNA repair in the bioethanol-producer *Zymomonas mobilis*’. 11th Bacterial Genetics and Ecology International Meeting (BAGECO11) with main theme “Microbial Genetics and Ecology inspire the Biotechnology of an Evolving Global Economy”, Corfu, Greece (May 29-June 2), pp. 61
2. **Savvakis, G.** & Pappas, K.M. (2011) ‘Study of SOS regulation in the ethanologenic *Zymomonas mobilis*’. 6th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology & Bioinformatics (HSCBB), University of Patras Conference Center, Patras, Greece (October 7-9), pp. 29. *Winner of the “Best Poster Award”*
3. *όπως στο 2.* 4th National Conference of the Hellenic Society for Microbiology ‘Mikrobiokosmos’ (MBK4), Ioannina, Greece (October 21-23), pp. 28-29 *Oral presentation awarded by the C.Drainas Award*

7. Δημοσιεύσεις και Συνέδρια

4. **Savvakis, G.** & Pappas, K.M. (2013) ‘Characteristics of a *recA* mutant and *in silico* analysis of SOS regulation in the ethanol-producing *Zymomonas mobilis*’. 5th congress of European Microbiologists, FEMS 2013, Leipzig, Germany (July 21-25), pp. 285
5. **Savvakis, G.** & Pappas, K.M. (2013) ‘SOS regulation in the bioethanol-producer *Zymomonas mobilis*’. 1st Hellenic Forum of Young Scientists of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Eugenides Foundation, Athens, Greece (December 5), pp. 16
6. *όπως στο 5*. 64th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), Eugenides Foundation, Athens, Greece (December 6-8), pp. 49
7. Poulis P., **Savvakis, G.** & Pappas K.M. (2015) ‘Preliminary study of *recA* and *lexA* regulation in *Zymomonas mobilis* using *in vivo* transcription assays’. 66th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), Eugenides Foundation, Athens, Greece (December 11-13), pp. 250
8. **Savvakis, G.** & Pappas, K.M. (2016) ‘Transcriptomic analysis of *Zymomonas mobilis* under SOS-induction’. 5th International Conference on Microbial Physiology and Genomics, Hilton Heathrow, London, United Kingdom (September 29-30), pp. 43
9. *όπως στο 8*. 4th Young Scientist Forum (YSF), ‘Karolos Papoulias’ Conference Center, University of Ioannina, Ioannina, Greece (November 24), pp. 108
10. *όπως στο 8*. 67th Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), ‘Karolos Papoulias’ Conference Center, University of Ioannina, Ioannina, Greece (November 25-27), pp. 23
11. Poulis, P., **Savvakis, G.**, Skrekas, C. & Pappas, K.M. (2017) ‘Evidence for LexA-dependent regulation of the *Zymomonas mobilis recA* and *lexA* genes’. 7th National Conference of the Hellenic Society for Microbiology ‘Mikrobiokosmos’ (MBK7), National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece (April 7-9), pp. 165-166

Study of SOS regulation in the bioethanol-producer *Zymomonas mobilis*.Giannis Savvakis^{1,*} and Katherine M. Pappas^{1,*}¹Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, School of Sciences, University of Athens, Panepistimiopolis, Ilissia, Athens 15701, Greece

*Correspondence to: isavvakis@biol.uoa.gr; kmpappas@biol.uoa.gr

ABSTRACT

Zymomonas mobilis is an α -proteobacterium with a great potential for industrial bioethanol production, due to its ability to produce ethanol from simple sugars, at optimal rates and yields. Among traits of this organism important to applications, stress tolerance is of particular interest, since it entails adapting to and performing in challenging bioprocessing environments.

Genes that are induced by stress imposed by mutagens, irradiation or phage invasion, mostly include DNA-repair genes and are often coordinately expressed. A major example for this is given by the SOS regulon of *E. coli*, which is governed by the RecA/LexA proteins. LexA is the global repressor of SOS genes and under DNA-damaging conditions undergoes autocleavage by RecA. This allows transcription of all regulon members to ensue. In this work, *in silico* analysis was employed to identify gene orthologs of the enterobacterial or α -proteobacterial SOS systems, in two different *Z. mobilis* strain genomes that have been sequenced (<http://www.jgi.gov>; 1,2). Furthermore, indications for coordinate regulation were sought, based on the conservation of the α -proteobacterial SOS box [G(T/A)(T/A)CN₇G(T/A)(T/A)C] that lies upstream from regulon members and serves as a LexA binding target.

Methods: *Z. mobilis* candidate SOS genes were identified by automated annotation and BLAST similarity searches. A C language program was developed to search for SOS-box conservation in the *Z. mobilis* ZM4 and NCIMB 11163 strain genomes (GenBank acc. No. AE008692 and CP001722, respectively). Results were corroborated and further enriched by the use of FITOM (<http://compbio.umbc.edu/9466/>; 3), employed to scan for SOS-box motifs in 300-bp spans upstream from putative regulon members or for entirely new hits. Lastly, protein conservation and motif search for RecA and LexA were carried out by ClustalW alignments and relied on previous data (4,5).

Results: The *Z. mobilis* LexA and RecA proteins bear conserved patterns and characteristic functional motifs, such as the autocleavage site of the former and

co-protease residues of the latter, which indicate their conserved role in SOS regulation in *Z. mobilis*. Searching the two examined strain genomes for DNA-repair genes, ca. 40 candidates were found in each, and were scanned for presence of SOS-boxes in their promoter regions. At least 8 such genes bore boxes with no (*recA* and *lexA*) or one consensus mismatch. A considerable number of putative repair genes also bore boxes with two or more mismatches.

An interesting finding of whole-genome searches was that, apart from repair genes, perfect or near-perfect SOS-box motifs were found to precede a large number of unexpected genes, i.e. genes involved in membrane lipid biosynthesis, metabolism, tolerance to organic agents, protein synthesis machinery or transcriptional regulation. In total, approximately 70 genes were preceded by perfect or near-perfect motifs bearing one or two base substitutions.

Discussion – Future prospects: Computational analysis indicates that *Z. mobilis* may harbor a functional SOS system, governed by the RecA/LexA proteins and comprising of both DNA-repair genes and, notably, genes of other important functions. Transcriptional analysis will further corroborate *in silico* predictions and lead to discover yet new regulon members. Towards this goal, a *recA*⁻ strain of *Z. mobilis*, recently constructed in our lab (strain UA1), will be implemental in providing a non-inducible genotype and will aid in elucidating SOS regulation in *Z. mobilis*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research sponsored by the NKUA Research Committee award 70/4/7809 to K. M. Pappas.

REFERENCES

- (1) Yang S., Pappas K.M., Hauser L.J., Land M.L., Chen G.L., Hurst G.B., et al. (2009) *Nat Biotechnol*, 27:893-894.
- (2) Kouvelis V.N., Saunders E., Brettin T.S., Bruce D., Detter C., Han C., et al. *J Bacteriol*, 191:7140-7141.
- (3) Erll I., O'Neill M.C. (2009) *BMC Bioinformatics*, 10:57.
- (4) Luo Y., Pfuetzner R.A., Mosimann S., Paetzel M., Frey E.A., Chermey M., et al. (2001) *Cell*, 106:585-594.
- (5) McGrew D.A., Knight, K.L. (2003) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* 38, 385-432.

Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* Lectotype Strain ATCC 10988[∇]

Katherine M. Pappas,^{1*} Vassili N. Kouvelis,¹ Elizabeth Saunders,² Thomas S. Brettin,² David Bruce,³ Chris Detter,² Mariya Balakireva,² Cliff S. Han,² Giannis Savvakis,¹ Nikos C. Kyrpides,³ and Milton A. Typas¹

Department of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15701, Greece¹; DOE Joint Genome Institute, Bioscience Division, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico 87545²; and DOE Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, California 94598³

Received 26 May 2011/Accepted 22 June 2011

***Zymomonas mobilis* ATCC 10988 is the type strain of the *Z. mobilis* subsp. *mobilis* taxon, members of which are some of the most rigorous ethanol-producing bacteria. Isolated from *Agave cactus* fermentations in Mexico, ATCC 10988 is one of the first *Z. mobilis* strains to be described and studied. Its robustness in sucrose-substrate fermentations, physiological characteristics, large number of plasmids, and overall genomic plasticity render this strain important to the study of the species. Here we report the finishing and annotation of the ATCC 10988 chromosomal and plasmid genome.**

Zymomonas mobilis is a natural fermentative bacterium that has been studied for decades due to its remarkable ethanologenic properties. Among isolates deriving from various parts of the world, ATCC 10988, identified in the 1920s in Mexican pulque fermentations (initially called “*Thermobacterium mobile*”) (17), is one of the longest-studied *Zymomonas* strains and has served for most biochemical and physiological works on the organism. ATCC 10988 exhibits fermenting performances that equal that of industrial strain CP4 in sucrose-rich media (15) and has also attracted attention due to its split genome: it bears multiple different plasmids, six of which are reported in this work, while the smallest have been cloned and sequenced in earlier works (2, 10, 12). Most species-specific vectors constructed and used for *Z. mobilis*, indeed, derive from the small multicopy plasmids of ATCC 10988 (16, 19, 21).

Total and plasmid DNA from ATCC 10988 was prepared (11) and used for whole-genome shotgun sequencing at the US DOE Joint Genome Institute after a 8.9-kb DNA library was constructed. Draft assemblies were based on 8,950 reads, providing 5.4× coverage. In addition to Sanger sequencing, 454 pyrosequencing was done to 20× coverage. The Phred/Phrap/Consed software package was used for sequence assembly and quality assessment, while after the shotgun stage, misassemblies and gaps were corrected as previously reported (7). The completed genome of ATCC 10988 contains 10,920 reads, achieving an average of 6-fold sequence coverage per base and an error rate of less than 1 in 100,000.

Coding gene prediction and annotation were performed using Prodigal (<http://compbio.ornl.gov/prodigal/>) and BLAST (1); tRNA and rRNA genes were identified with tRNAscan-SE and RNAmmer (8, 9). Functional gene assignment was based on the SPTR (TrEMBL) (3), Pfam (5), TIGRFAMs (13),

COG (18), and KEGG (6) databases. Genome structure comparisons relied on ACT (4), BLASTN (1), and MegaBLAST (22).

ATCC 10988 contains a single, circular chromosome of 2,021,773 bp and six plasmids reported in this work, p10988_1 to p10988_6, of 32,479 bp, 32,283 bp, 31,692 bp, 18,461 bp, 4,023 bp, and 2,750 bp, respectively. The chromosome and plasmids have GC contents of 46.22% and 43.46%, 45.41%, 43.23%, 41.79%, 37.63% and 41.31%, correspondingly. The entire genome contains 1,875 protein-encoding genes and 48 tRNA and 6 rRNA genes (two rRNA clusters) in the chromosome.

The chromosome is 34,590 bp smaller than that of ATCC 31821 (ZM4) (20), with an average of 98% sequence identity. Four large syntenic units, shuffled in order and direction compared to ZM4, are discerned (ranging from 732 kb to 179 kb). In their junctions identical transposase genes are met. In total, 36 transposase genes are found in this organism, a number far exceeding those for the *Z. mobilis* strains sequenced so far. Additionally, 54 indels are found scattered, the largest of which is 25.3 kb in size and corroborates previous microarray findings comparing ZM4 to ATCC 10988 (14). The plasmids harbor genes implicated in replicon sustenance and in transport, regulation, transposition, DNA restriction/modification, and metabolism. They share variable regions of homology, albeit no full-length identity, with plasmids from previously sequenced *Z. mobilis* strains.

Nucleotide sequence accession numbers. The ATCC 10988 genome received GenBank accession numbers CP002850 for the chromosome and CP002851 to CP002856 for the six plasmids.

We acknowledge collaborators at JGI that participated in the sequencing, assembly, and automated annotation processes. Special thanks to Tanja Woyke and Lynne Goodwin for help with the project and support.

Work at JGI is financed by the U.S. DOE Office of Science, contract no. DE-AC02-05CH11231. K.M.P. acknowledges the NKUA Research Committee for providing award 70/4/7809.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Ilissia, Athens 15701, Greece. Phone: 30-210-7274-340. Fax: 30-210-7274-318. E-mail: kmpappas@biol.uoa.gr.

[∇] Published ahead of print on 1 July 2011.

REFERENCES


1. Altschul, S. F., et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
2. Arvanitis, N., et al. 2000. Characterization and replication properties of the *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 plasmids pZMO1 and pZMO2. *Plasmid* **44**:127–137.
3. Boeckmann, B., et al. 2003. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* **31**:365–370.
4. Carver, T. J., et al. 2005. ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics* **21**:3422–3423.
5. Finn, R. D., et al. 2008. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **36**(Suppl. 1):D281–D288.
6. Kanehisa, M., et al. 2008. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.* **36**:D480–D484.
7. Kouvelis, V. N., et al. 2011. Genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. *pomaceae* lectotype strain ATCC 29192. *J. Bacteriol.* **193**:5050–5051.
8. Lagesen, K., et al. 2007. RNAMmer: consistent annotation of rRNA genes in genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* **35**:3100–3108.
9. Lowe, T. M., and S. R. Eddy. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of tRNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* **25**:955–964.
10. Misawa, N., K. Nakamura, and K. Kitamura. 1985. Three 1.7 kilobase pair plasmids in *Zymomonas mobilis* NRRL B-806. *Agric. Biol. Chem.* **49**:2769–2771.
11. Pappas, K. M., I. Galani, and M. A. Typas. 1997. Transposon mutagenesis and strain construction in *Zymomonas mobilis*. *J. Appl. Microbiol.* **82**:379–388.
12. Scordaki, A., and C. Drainas. 1987. Analysis of natural plasmids of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. *J. Gen. Microbiol.* **133**:2547–2556.
13. Selengut, J. D., et al. 2007. TIGRFAMs and Genome Properties: tools for the assignment of molecular function and biological process in prokaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* **35**:D260–D264.
14. Seo, J.-S., et al. 2005. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat. Biotechnol.* **23**:63–68.
15. Skotnicki, M. L., K. J. Lee, D. E. Tribe, and P. L. Rogers. 1981. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:889–893.
16. Sprenger, G. A., M. A. Typas, and C. Drainas. 1993. Genetics and genetic engineering of *Zymomonas mobilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**:17–24.
17. Swings, J., and J. De Ley. 1977. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* **41**:1–46.
18. Tatusov, R. L., E. V. Koonin, and D. J. Lipman. 1997. A genomic perspective on protein families. *Science* **278**:631–637.
19. Tonomura, K., T. Okamoto, M. Yasui, and H. Yanase. 1986. Shuttle vectors for *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.* **50**:805–808.
20. Yang, S., et al. 2009. Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. *Nat. Biotechnol.* **27**:893–894.
21. Zhang, M., C. Eddy, K. Deanda, M. Finkelstein, and S. Picataggio. 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* **267**:240–243.
22. Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* **7**:203–214.

RESEARCH

Open Access



Complete genome sequence and the expression pattern of plasmids of the model ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 8b and 2032

Shihui Yang^{1,2*†} , Jessica M. Vera^{3†}, Jeff Grass³, Giannis Savvakis⁴, Oleg V. Moskvina³, Yongfu Yang¹, Sean J. McIlwain³, Yucai Lyu^{3,8}, Irene Zinonos⁴, Alexander S. Hebert³, Joshua J. Coon³, Donna M. Bates³, Trey K. Sato³, Steven D. Brown^{5,6,9}, Michael E. Himmel⁷, Min Zhang², Robert Landick³, Katherine M. Pappas^{4*} and Yaoping Zhang^{3*†}

Abstract

Background: *Zymomonas mobilis* is a natural ethanologen being developed and deployed as an industrial biofuel producer. To date, eight *Z. mobilis* strains have been completely sequenced and found to contain 2–8 native plasmids. However, systematic verification of predicted *Z. mobilis* plasmid genes and their contribution to cell fitness has not been hitherto addressed. Moreover, the precise number and identities of plasmids in *Z. mobilis* model strain ZM4 have been unclear. The lack of functional information about plasmid genes in ZM4 impedes ongoing studies for this model biofuel-producing strain.

Results: In this study, we determined the complete chromosome and plasmid sequences of ZM4 and its engineered xylose-utilizing derivatives 2032 and 8b. Compared to previously published and revised ZM4 chromosome sequences, the ZM4 chromosome sequence reported here contains 65 nucleotide sequence variations as well as a 2400-bp insertion. Four plasmids were identified in all three strains, with 150 plasmid genes predicted in strain ZM4 and 2032, and 153 plasmid genes predicted in strain 8b due to the insertion of heterologous DNA for expanded substrate utilization. Plasmid genes were then annotated using Blast2GO, InterProScan, and systems biology data analyses, and most genes were found to have apparent orthologs in other organisms or identifiable conserved domains. To verify plasmid gene prediction, RNA-Seq was used to map transcripts and also compare relative gene expression under various growth conditions, including anaerobic and aerobic conditions, or growth in different concentrations of biomass hydrolysates. Overall, plasmid genes were more responsive to varying hydrolysate concentrations than to oxygen availability. Additionally, our results indicated that although all plasmids were present in low copy number (about 1–2

*Correspondence: Shihui.Yang@hubu.edu.cn; kmpappas@biol.uoa.gr; yzhang8@wisc.edu

†Shihui Yang, Jessica M. Vera and Yaoping Zhang contributed equally to this work

¹ Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Environmental Microbial Technology Center of Hubei Province, Hubei Key Laboratory of Industrial Biotechnology, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China

³ DOE-Great Lakes Bioenergy Research Center (GLBRC), University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA

⁴ Department of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), Panepistimiopolis, 15701 Athens, Greece

Full list of author information is available at the end of the article



per cell), the copy number of some plasmids varied under specific growth conditions or due to heterologous gene insertion.

Conclusions: The complete genome of ZM4 and two xylose-utilizing derivatives is reported in this study, with an emphasis on identifying and characterizing plasmid genes. Plasmid gene annotation, validation, expression levels at growth conditions of interest, and contribution to host fitness are reported for the first time.

Keywords: *Zymomonas mobilis*, Plasmid, Genome, Genome resequencing, Annotation, RNA-Seq, Copy number, Hydrolysate, Fermentation

Background

Advances in next-generation sequencing (NGS) technology, mass spectrometry, and integrative omics approaches have facilitated more detailed studies of microbial responses to environmental and stress conditions. However, integrative analysis of multi-omic datasets requires the availability of complete genome sequences, i.e., chromosomal and extrachromosomal genomic content, in addition to accurate gene identification and functional annotation.

Zymomonas mobilis is a natural ethanologen being developed for industrial conversion of biomass feedstocks into biofuels [1, 2]. Unlike the classical ethanologen *Saccharomyces cerevisiae*, which uses the Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) pathway for glycolysis, *Z. mobilis* uses the Entner–Doudoroff (ED) pathway, resulting in less ATP produced per molecule of glucose consumed and higher ethanol yield [3]. Furthermore, *Z. mobilis* is tolerant to many inhibitors found in biomass hydrolysates and therefore has the potential to be developed as a platform catalyst using feedstocks from widely different sources [4–6]. Recently, it was demonstrated that *Z. mobilis* can utilize atmospheric N₂ as the sole nitrogen source during fermentation without affecting ethanol yield, which could significantly reduce the cost of cellulosic ethanol production [7]. Besides ethanol, *Z. mobilis* has recently been engineered to produce 2,3-butanediol, which can serve as a precursor for the generation of advanced biofuels and bioplastics [8].

Phenotype microarray profiling of *Z. mobilis* ZM4 indicates that *Z. mobilis* is closely related to yeast physiologically [9]. Following the first transcriptomic and metabolomic study of *Z. mobilis* during aerobic and anaerobic fermentation [10], transcriptomics has been widely used to study the stress responses of *Z. mobilis* to high glucose concentration, ethanol, furfural, phenolic compounds, and other inhibitors [11–14]. In addition, proteomics studies have provided an in-depth understanding of acetate and ethanol stress responses [15, 16]. With the rapidly decreasing costs of next-generation sequencing (NGS), it is expected that NGS-based systems biology studies will be widely applied in the future. However, despite advances in this direction, improvements in genome sequencing accuracy and annotation

are still required to meaningfully interpret microbial physiology via high-throughput omics analyses.

To facilitate multi-omic data analyses, the genomes of eight *Z. mobilis* strains have been completely sequenced, including model strain ZM4 [17–23]. In 2009, we improved the genome annotation of *Z. mobilis* ZM4 (AE008692.2) [24]. We additionally reported the sequence and annotation of five plasmids in ZM4, which were absent in the original ZM4 genome sequence report in 2005 [17]. These plasmids, pZZM401 to pZZM405, were deposited in 2010 under the GenBank Acc. No. CP001881.1–CP001885.1. However, due to a strain identity issue propagated by scientific literature, patent deposits, and bacterial culture collections in both Europe and USA [20, 25], these plasmid sequences were actually derived from strain CP4 instead of the previously reported ZM4. This issue became apparent when (1) CP4 was sequenced to completion in 2013 and proved not to be identical to ZM4 as previously thought [20]; (2) an already sequenced ZM4 41-kb plasmid (plasmid 1; AY057845.1) was not identical to any reported ZM4 or CP4 plasmids, instead each and every newly sequenced CP4 plasmid has high similarity to plasmids from pZZM401 to pZZM405; and (3) NGS reads of ZM4 from both genome resequencing and RNA-Seq studies were unable to map to the majority of the pZZM401 to pZZM405 plasmid sequences.

Because of these discrepancies, we decided to resequence *Z. mobilis* ZM4 as well as two engineered xylose-utilizing derivatives 2032 and 8b that are implemented in lignocellulose fermentations. Our foremost aim was to identify and annotate missing ZM4 plasmids and assign potential physiological roles for plasmid genes by evaluating gene expression in a variety of growth conditions and lignocellulosic hydrolysates. Plasmid copy numbers were also examined under different conditions.

Results and discussion

Genome sequences of *Z. mobilis* ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 2032 and 8b

Identification of four plasmids in ZM4 and its derivatives

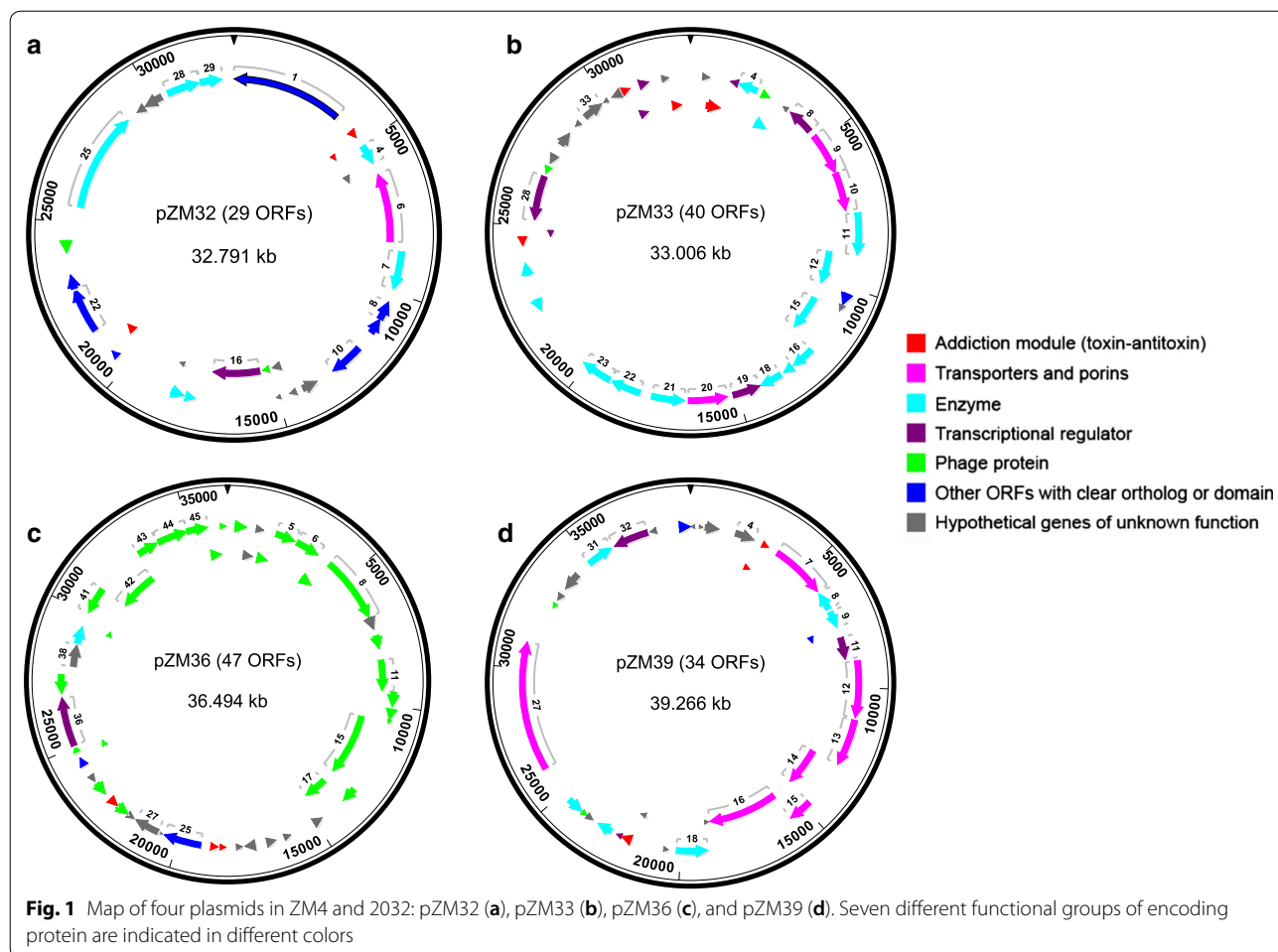
To re-examine the genome of the *Z. mobilis* model strain ZM4 and obtain an unequivocal view of its plasmids, we

combined and cross-compared DNA and RNA sequencing results of wild-type ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 2032 and 8b from five different research laboratories in the USA, Greece, and China. The genome of strain 2032 was sequenced at the Great Lakes Bioenergy Research Center (GLBRC). The genomes of both ZM4 and 8b were sequenced in three laboratories (NREL, GLBRC, and Hubei University) in 2011, 2014, and 2016, respectively. Lastly, the ZM4 plasmids were re-sequenced anew from plasmid-only DNA samples at the DOE Joint Genome Institute (JGI) in 2013. The results from each sequencing endeavor were assembled independently using different bioinformatics pipelines.

These parallel sequencing efforts consistently identified a total of four plasmids in strain ZM4, which were named according to their sequence sizes: pZM32 (32,791 bp), pZM33 (33,006 bp), pZM36 (36,494 bp), and pZM39 (39,266 bp) in ZM4 and 2032 (Fig. 1). Final plasmid sequence assemblies were confirmed by primer walking (Additional file 1: Figure S1A), and our results were consistent with previously published gel electrophoresis

results in which three plasmids, approximately 32.5, 34, and 40.5 kb in size, were observed in ZM4 [25]. The estimated sizes of these plasmids are very close to the sizes of the four plasmids presented here. The plasmid number discrepancy between gel electrophoresis size estimation and our results is likely due to the fact that pZM32 (32,791 bp) and pZM33 (33,006 bp) are too similar in size to be resolved in an agarose gel and likely migrate together as a single 32.5-kb band. This 32.5-kb band indeed appeared to be more intense in the gel image [25] further supporting the presence of additional DNA migrating at this size. Additionally, our restriction fragment length polymorphism of ZM4 plasmid preparations coincided with previous reports [25].

In strain 8b, sequencing analysis revealed that the *Peno_talB-tktA-cat* cassette was randomly inserted into gene ZMOp41x016 of plasmid pZM36, resulting in plasmid size increase from 36,494 to 40,858 bp. This larger version of pZM36, e.g., the pZM36::*Peno_talB-tktA-cat* derivative, was named pZM41 (Additional file 2: Table S1). Therefore, all three strains contain pZM32,



pZM33, and pZM39, while ZM4 and 2032 possess pZM36 and 8b contains pZM41 with *Peno_talB-tktA-cat* inserted into pZM36.

pZM39 showed high sequence identity (99%) to the previously published ZM4 plasmid 1 sequence (AY057845). Plasmid 1 is 40,991 bp and appears to contain small portions of other sequences not found in pZM39. By contrast, the four new plasmids reported here show very low sequence identity to the previously published five plasmids (pZMZ 401–405) with the exception of a 27-kb region of pZM36 and a 12-kb region of pZM32 with 95–99 and 90% sequence identity to pZMZ401 and pZMZ405 [24], respectively. pZM33 showed no extensive identity to any previously published ZM4 plasmid sequences. These results confirmed that *Z. mobilis* plasmid 1 sequence in GenBank is derived from ZM4 and that plasmids analyzed and reported herein are new for ZM4.

Functional annotation of plasmid genes

As shown in Fig. 1 and Additional file 2: Table S1, a total of 150 genes were identified in all four plasmids across strains ZM4, 2032, and 8b, excluding exogenous genes in the *Peno_talB-tktA-cat* cassette in pZM41. One hundred and nine plasmid ORFs encode proteins that have either apparent sequence homology to proteins with defined functions in other organisms or identifiable conserved domains. The remaining 41 ORFs match to “hypothetical protein” BLAST hits from other organisms. Most plasmid genes have an ATG start codon, except for rare cases of well-predicted ORFs (i.e., highly homologous to other bacteria) that start with GTG or TTG. Gene ZMOp39x026 (ParA ATPase), which shows high sequence homology to ParA ATPase genes in other *Z. mobilis* strains and members of *Burkholderiales*, was identified as a probable pseudogene as it contains a nonsense mutation at position 24,563. ZMOp33x025 encoding a putative transposase IS4/IS5 family protein was also identified as a probable pseudogene due to an N-terminal frameshift mutation. Lastly, frameshift mutations were found in ZMOp32x029 (Mrr endonuclease), resulting into two separate in-frame ORFs comprising N-terminal and C-terminal regions, respectively, which we combined into a single, but disrupted, ORF (Additional file 2: Table S1).

As shown in Additional file 2: Table S1, several genes involved in endonuclease and other restriction systems were found in pZM32 (ZMOp32x025, ZMOp32x028, and ZMOp32x029). Interestingly, most predicted genes in pZM36 (27 out of 47) are phage-related, encoding phage structure proteins, including tail, head, capsid, and baseplate assembly proteins, and other phage-related functions. All four plasmids encode addiction modules,

including toxin-antitoxin systems (DinJ, YafQ, RelB, RelE/ParE, and BrnT), which have been reported to regulate stress adaptation and replicon persistence [26–31]. Genes encoding membrane-associated transporters, symporters, and porins (ABC-transporters, TonB-like, and OprB-like transporters) were also found in the plasmids, especially in pZM39. These efflux pumps have been shown to be functional for carbohydrate uptake or multidrug resistance, and might also play roles in the resistance to cellulosic biomass inhibitors [32–34]. A few transcriptional regulators were also identified in each plasmid. Lastly, several genes, especially those in pZM33, encode enzymes for metabolic functions, such as dehydrogenase, NADPH-dependent oxidoreductase, nucleoside triphosphate hydrolase, amidase, Acyl-CoA *N*-acyltransferase, *D*-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, dihydrofolate reductase, pyridoxal phosphate-dependent transferase, and amidohydrolase (Additional file 2: Table S1).

Comparisons of chromosomal sequences of ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 2032 and 8b

As described in “Methods,” the chromosomal sequence of ZM4, 2032, and 8b were also assembled. The new ZM4 genome reported here is 2058,755 bp, which is 2392 bp larger than the previously published *Z. mobilis* ZM4 genomic sequence (GenBank Acc. No. AE008692.2). The additional sequence consists of a single 2400-bp insertion located in gene ZMO0133, which was confirmed by both PCR and Sanger sequencing using three primer sets covering this region (Additional file 1: Figure S1B). This insertion resulted in the shortening of ZMO0133 from 2493 to 2169 bp (831–723 in amino acid sequence), and added two new ORFs, named ZMO2040 and ZMO2041. Similar to ZMO0133, both of these new ORFs are Sell domain protein repeat-containing proteins [35]. RNA-Seq data analysis confirmed the expression of both ZMO2040 and ZMO2041. The expression of ZMO2041, ZMO0133, ZMO0134, ZMO0135, and ZMO0136 was very low in ZM4 when grown in rich medium under both anaerobic and aerobic conditions. However, ZMO2040 was well expressed, but highly variable in rich medium under both anaerobic and aerobic conditions, with highest levels of expression observed at late stationary phase under aerobic conditions.

Resequencing of ZM4 also identified 65 SNPs in both coding and non-coding regions (Table 1) relative to current ZM4 genome release (AE008692.2). Most SNPs are located in non-coding regions or in ribosomal RNA genes (ZMOr002, r005, and r008). We also identified two 1-bp deletions in pseudogene ZM4_P003 (a.k.a. ZMO0983) which results in a 1395-bp continuous ORF encoding an ABC transporter substrate-binding protein.

We therefore removed the pseudogene designation and restored this ORF under its initial name ZMO0983. A 7-bp duplicated sequence originally reported in the pseudogene ZMO1617 was found to be absent in all three strains and was confirmed by Sanger sequencing (data not shown). The 7-bp deletion results in a continuous open reading frame for ZMO1617 which we reinstated as a protein-coding gene. In comparison with orthologs from other *Z. mobilis* strains and other bacteria, we also observed that several chromosomal genes have nonsense mutations (stop codons) or frameshift mutations, including ZMO0171, ZMO0955, ZMO1535, and ZMO2036. Lastly, we merged ZMO0168 and ZMO0170 into a single annotation, ZMO0168, encoding a glycerophosphodiester phosphodiesterase (coordinates 151,491–155,014). BLAST analysis revealed that the original ORFs ZMO0168 and ZMO0170 encoded the C-terminal and N-terminal regions of glycerophosphodiester phosphodiesterase, respectively, relative to locus AEH62510 in *Z. mobilis* ATCC 10988. This was likely missed in previous genome annotations as this ORF is disrupted by a large sequence insertion that includes ZMO2000 and ZMO0169. It should be noted here that all new features in the genome sequence of ZM4 were also present in the sequences of 2032 and 8b, and thus were corroborated in triplicate.

The chromosomes of 2032 and 8b are 2072,170 and 2064,754 bp in size, respectively, and are 13,415 and 5999 bp larger than the revised ZM4 chromosome reported in this work. Both 2032 and 8b also have the 2400-bp insertion found in the new ZM4 sequence. Sequencing results confirmed that both strains bear insertions of the exogenous genes that were used to engineer xylose metabolism [36]. In both 2032 and 8b, the 6010-bp *Pgap_xylA-xylB-yiaB'-yiaA'-wecH'-tetA* cassette was found to be inserted at the 3' end of ZMO1237 (*ldhA*). Interestingly in 2032, integration of *Pgap_xylA-xylB-yiaB'-yiaA'-wecH'-tetA* led to a duplication of *xylA* and partial duplication of *xylB* and ZMO1237 (Table 2, Fig. 2) which was also confirmed by PCR and Sanger sequencing (data not shown). The *Pgap_talB-tktA-cat* cassette that further enables C5-sugar metabolism was found to be chromosomally inserted in strain 2032 into the promoter region between two divergent hypothetical protein-coding genes, ZMO1268 and ZMO2012, while *Peno_talB-tktA-cat* was inserted in strain 8b into gene ZMOp41x016 of plasmid pZM41, as described above (Tables 2 and 3).

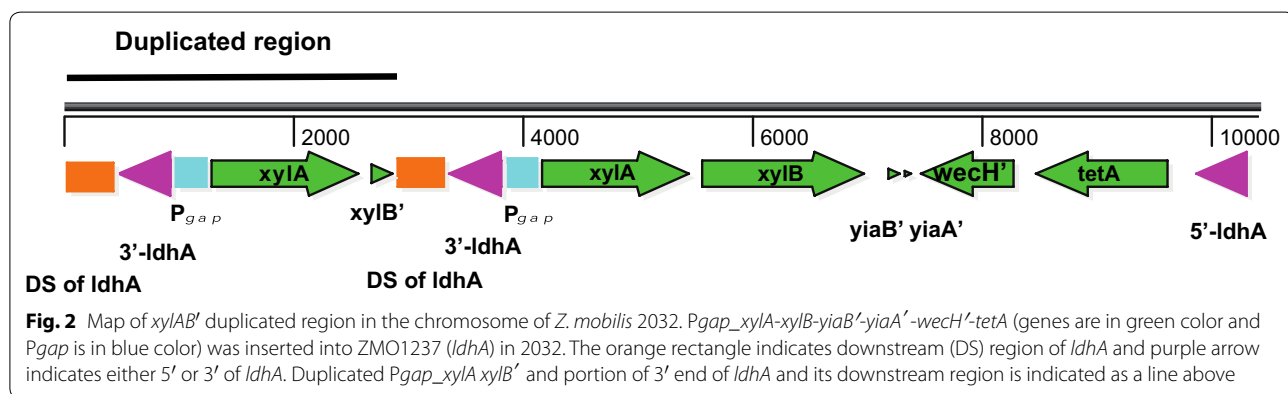
Both 2032 and 8b have all 65 SNPs identified from the new ZM4 sequence (Table 1). They also have additional sequence variations not present in strain ZM4 (Tables 2 and 3), including a synonymous SNP in ZMO1237, which

Table 1 SNPs in *Z. mobilis* ZM4 by comparing new sequence and previous published and modified *Z. mobilis* ZM4 genomic sequence (GenBank: AE008692.2)

Start and end position in ZM4	Location in coding or no-encoding region	Description of SNP in previously published ZM4 sequence (changes from previous one to current one)
122195–122196	ZMO0133 (<i>hemE</i>)	Missing 2400 bp fragment. Shorten ZMO0133 from 831 bp to 723 bp, and add two new ORFs (ZMO2040 and ZMO2041)
140833–140857	Promoter of ZMO0152 (<i>pyk</i>) and ZMO0153 (<i>yebC</i>)	agaaaaatcgattttctggtggcg to TgTTTatcgaACGGATgAACgAcT
140900–140916	Promoter of ZMO0152 (<i>pyk</i>) and ZMO0153 (<i>yebC</i>)	aaataaaaaacgcacc (16 bp) to CTatTTaGaaGCCaAGT (17 bp)
561507–561515	ZMO0561	ggggggggg to CAACTTTTC (480APPP to 480GKVA)
851609–851609	ZMO0843 (<i>argS</i>)	C to T (L471L)
851712–851712	ZMO0843 (<i>argS</i>)	C to A (P505H)
973460–973460	ZMO0955/ZM4_P002 pseudogene	T to A
977904–977948	Promoter region of ZMO0961 (<i>cyc_C552</i>)	taagatcttatagcagagttctaagtcttaatatagatgttagct to GaaAatTt-tatagcagagttTtagGcttTatagCtaTtttGAcG.
1004680–1004681	ZMO0983/ZM4_P003 pseudogene	Extra A in previously published ZM4 sequence
1004686–1004687	ZMO0983/ZM4_P003 pseudogene	Extra T in previously published ZM4 sequence
1614974–1614974	Downstream of ZMO1579 and downstream of ZMOt037	G to A
1615565–1615565	ZMOr002	G to A
1659861–1659867	ZMO1617	Extra cagtttc in previously published ZM4 sequence
1900714–1900714	ZMOr005	G to A
1913696–1913701	Downstream of ZMO1864 and downstream of ZMOt046	cttatt to TttatC
1914566–1914566	ZMOr008	G to A
2058155–2058155	Promoter region of ZMO1998 and ZMO0001	T to C

Table 2 SNPs in *Z. mobilis* 2032 by comparing with new *Z. mobilis* ZM4 genome sequence

Start and end position in ZM4	Location in coding or no-encoding region	Description of SNP (changes from ZM4 to 2032)
995001–995001	ZMO0976	Insertion one “A,” and frame-shift and shorten ZMO0976 from 1023 to 708 bp (in both 2032 and 8b)
1015532–1015532	Promoter of ZMO0998	C to T
1263984–1265916	ZMO1237 (<i>ldhA</i>)	11 bp (CATGGGCATA) deletion and 2881-bp duplicated <i>Pgap</i> - <i>xylA</i> <i>xylB'</i> inserted into ZMO1237 (<i>ldhA</i>) 3'-end, with ZMO1237 shorten from 996 bp to 498 bp
1265917–1266864	ZMO1237 (<i>ldhA</i>)	Duplicated downstream and 3' end of ZMO1237 sequence
1266865–1272874	ZMO1237 (<i>ldhA</i>)	6010 bp <i>Pgap</i> - <i>xylA</i> <i>xylB</i> <i>viaB</i> <i>viaA</i> <i>wech</i> <i>tetA</i> cassette inserted into ZMO1237
1272889–1272889	ZMO1237 (<i>ldhA</i>)	G to A (S157S) (in both 2032 and 8b)
1295154–1299678	Promoter region of ZMO1268 and ZMO2012	4525 bp <i>Tn5</i> <i>cat</i> <i>Pgap</i> - <i>talB</i> <i>tktA</i> inserted between ZMO1268 and ZMO2012
1299679–1299687	Promoter region of ZMO1268 and ZMO2012	Duplicated 9 bp <i>ttcctagat</i> (same sequence at 1295145–1295153)
2007353–2007353	ZMO1934	C to T (E50K) (in both 2032 and 8b)



encodes D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding protein and a non-synonymous SNP in ZMO1934 resulting in an E50K substitution of N-6 DNA methylase. Most *Z. mobilis* strains have a glutamate residue at position 50 of ZMO1934. Both strains also have a single adenosine insertion in ZMO0976 (xylulose reductase), resulting in a frameshift at codon 211 and a premature stop codon at 236, which might beneficially impact xylose utilization through reduced xylitol production if the premature stop codon results in a reduced or loss of function protein [37]. We also identified 64 SNPs, within coding and non-coding regions, that are unique to strain 8b when compared to 2032 and ZM4 (Table 3), which could have been generated during the chemical mutagenesis and directed evolution performed on 8b to increase xylose utilization efficiency after incorporation of *E. coli* xylose-metabolizing genes.

In addition to the genome sequence revisions described here, we updated all chromosomal gene annotations based on data compiled from new NCBI-blast and InterProScan searches, previous ZM4 GenBank submissions,

and Microbes Online (www.microbesonline.org). All chromosomal sequences and annotation revisions for strains ZM4, 2032, and 8b are available at GenBank under the following accession number: CP023715-9 for ZM4 chromosome, pZM32, pZM33, pZM36, and pZM39, respectively; CP023677-81 for 2032 chromosome, pZM32, pZM33, pZM36, and pZM39, respectively; and CP023682-6 for 8b chromosome, pZM32, pZM33, pZM39, and pZM41, respectively.

Evaluation of plasmid copy number changes during anaerobic and aerobic growth

To characterize the newly identified ZM4 plasmids, and how they may broadly impact host biology, we examined plasmid copy numbers in cells grown in rich media containing 2% glucose under anaerobic and aerobic conditions (Fig. 3a, b) and monitored plasmid copy numbers when cells were shifted from aerobic to anaerobic conditions (Fig. 3c). Using calibrator plasmids grown in *E. coli* (see “Methods” and Additional file 3: Table S2) as a reference, pZM32, pZM36, and pZM39 showed similarly

Table 3 SNPs in *Z. mobilis* 8b by comparing with new *Z. mobilis* ZM4 genome sequence

Start and end position	Location in coding or no-encoding region	Description of SNP (changes from ZM4 to 8b)
95726–95726	ZMO0109	C to T (C150C)
131578–131578	ZMO0143	C to T (L55F)
508460–508460	ZMO0505 (<i>rluC</i>)	G to A (G165G)
511672–511672	ZMO0510 (<i>pdhC</i>)	G to A (G81S)
512937–512937	ZMO0511	G to A (V63I)
519279–519279	ZMO0516	G to A (V142I)
529169–529169	ZMO0533 (<i>rpsE</i>)	G to A (S198N)
529994–529994	ZMO0536 (<i>rplO</i>)	G to A (V128I)
532460–532460	ZMO0538 (<i>adk</i>)	G to A (G217D)
537400–537400	ZMO0543 (<i>acnA</i>)	G to A (G433D)
569817–569817	ZMO0566	G to A (P13S)
625382–625382	Promoter of ZMO0629 (<i>fliC</i>)	C to T
630791–630791	ZMO0636	C to T (P42S)
643884–643884	ZMO0653	A to G (I148I)
658560–658560	ZMO0663 (<i>radC</i>)	G to A (L174L)
674692–674692	ZMO0680	G to A (P276P)
691579–691579	ZMO0692 (<i>gyrA</i>)	G to A (N220N)
698481–698481	Promoter of ZMOt012	G to A
716406–716406	ZMO0715 (<i>aspS</i>)	C to T (L544L)
743017–743017	ZMO0743 (<i>prfC</i>)	C to T (T136I)
846559–846559	ZMO0840	G to A (R350R)
849934–849934	ZMO0842 (<i>dgtP</i>)	G to A (G366D)
905206–905206	ZMO0893	C to T (A14T)
916878–916878	ZMO0904 (<i>bga</i>)	C to T (G760D)
950749–950749	ZMO0927 (<i>aat</i>)	G to A (L125L)
995001–995001	ZMO0976	Insertion one "A," and frame-shift and shorten ZMO0976 from 1023 to 708 bp (in both 2032 and 8b)
1019918–1019918	Promoter of ZMO1001	C to T
1044279–1044279	ZMO1025 (<i>nrdD</i>)	C to T (T509I)
1051161–1051161	ZMO1036 (<i>argG</i>)	C to T (L46F)
1079284–1079284	ZMO1064	C to T (L11F)
1130189–1130189	ZMO1113 (<i>ndh</i>)	G to A (V239I)
1159680–1159680	ZMO1139 (<i>ivl</i>)	C to T (S524F)
1176064–1176064	ZMO1156 (<i>rpsB</i>)	C to T (R97H)
1179870–1179870	ZMO1162	C to T (A94 V)
1250454–1250454	Promoter of ZMO1223 (<i>fabD</i>) and ZMO1225 (<i>rpsF</i>)	C to T
1262326–1262326	ZMO1236 (<i>adhA</i>)	C to T (A153T)
1263377–1263378	Promoter of ZMO1236 (<i>adhA</i>) and downstream of ZMO1237 (<i>ldhA</i>)	Missing one base "C"
1263983–1269992	ZMO1237 (<i>ldhA</i>)	11 bp (CATGGGTCATA) deletion and 6010 bp Pgap-xylA xylB yiaB yiaA wecH tetA inserted into ZMO1237 3'-end, with ZMO1237 shorten from 996 to 498 bp
1270007–1270007	ZMO1237 (<i>ldhA</i>)	G to A (in both 2032 and 8b)
1330074–1330074	ZMO1307 (<i>fumA</i>)	C to T (T69I)
1363705–1363705	ZMO1341	C to T (G248D)
1367432–1367432	ZMO1345 (<i>pepN</i>)	C to T (A493T)
1397162–1397162	ZMO1377	G to A (P447S)
1412666–1412666	ZMO1390	G to A (L243F)
1417484–1417484	ZMO1395 (<i>hutG</i>)	G to A (A257V)
1430724–1430724	ZMO1409 (<i>cbbF</i>)	G to A (G220G)

Table 3 (continued)

Start and end position	Location in coding or no-encoding region	Description of SNP (changes from ZM4 to 8b)
1442443–1442443	ZMO1422	G to A (I400I)
1447932–1447932	ZMO1424 (<i>clpB</i>)	G to A (V374I)
1461618–1461618	ZMO1435 (<i>leuS</i>)	G to A (H13Y)
1488113–1488113	ZMO1461	G to A (L174F)
1498927–1498927	ZMO1470	G to A (A277V)
1499416–1499416	ZMO1470	G to A (P114L)
1509299–1509299	ZMO1479 (<i>etfA</i>)	G to A (A48V)
1519583–1519583	ZMO1485	C to T (D284D)
1542900–1542900	ZMO1511	G to A (R130K)
1572765–1572765	ZMO1535	C to T (S9F)
1585059–1585059	ZMO1544 (<i>cobS</i>)	C to T (A263T)
1639561–1639561	ZMO1592 (<i>ahr</i>)	A to G (Y92Y)
1698229–1698229	ZMO1646	G to A (E364 K)
1713092–1713092	ZMO1657	G to A (K176K)
1715028–1715028	ZMO1659 (<i>ftsH</i>)	G to A (V68I)
1739226–1739226	ZMO1685 (<i>serA</i>)	A to G (T93A)
1890021–1890021	ZMO1842 (<i>nosX</i>)	C to T (G277D)
1894604–1894604	ZMO1848	C to T (K347K)
1917360–1917360	ZMO1862	C to T (A33T)
1945390–1945390	ZMO1886	C to T (V343I)
1999937–1999937	ZMO1934	C to T (E50K) (in both 2032 and 8b)
2018321–2018321	ZMO1955 (<i>yqkJ</i>)	G to A (S388F)

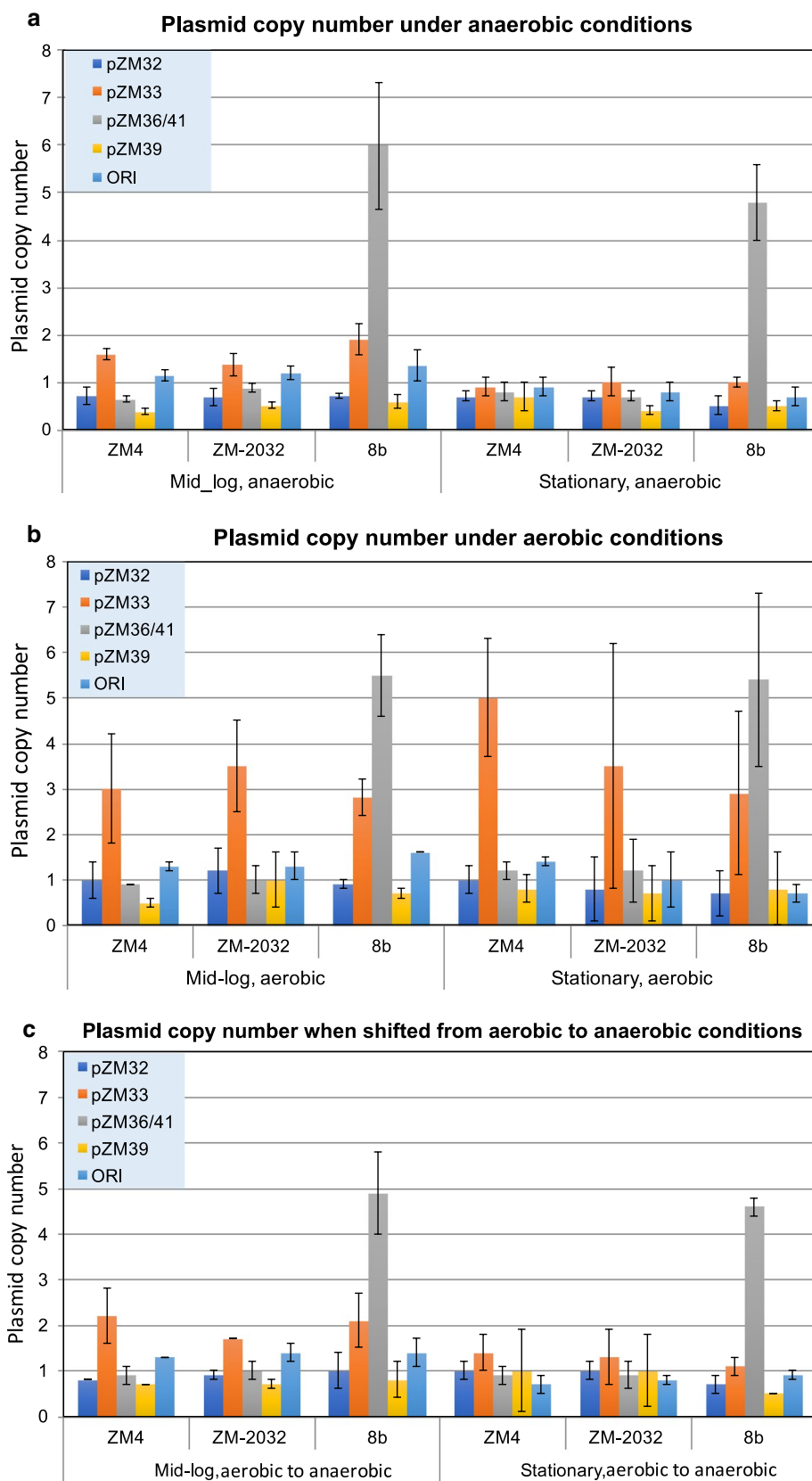
low copy numbers (~1 copy/cell) in all strains under anaerobic conditions, with pZM33 showing a slightly higher copy number during exponential growth. pZM41 in 8b showed markedly elevated copy numbers under anaerobic conditions, with six and five copies at mid-log and stationary phases, respectively (Fig. 3a). In aerobic conditions, pZM32, pZM36, and pZM39 again showed similarly low copy numbers and pZM33 was again higher, showing as much as 5–6 times more copies relative to other plasmids under aerobic growth (Fig. 3b). Interestingly, pZM33 was ~two- to sixfolds higher in aerobic conditions compared to anaerobic conditions at both mid-log and stationary phases, which may indicate a role for pZM33 genes in mediating aerobic growth. pZM41 in 8b was also elevated to over five copies under aerobic conditions, and slightly increased in copy number as growth progressed. The parental copy of pZM41, pZM36 in ZM4 and 2032, did not change considerably in aerobic conditions, suggesting that elevated copy number is

a distinct feature of pZM41 in strain 8b. When cells were shifted from aerobic to anaerobic conditions, plasmid copy numbers closely resembled anaerobic growth levels, with pZM33 somewhat retaining its elevated copy number and pZM41 remaining of considerably higher copy number than the parental pZM36 and remaining plasmids (Fig. 3c).

The dramatic increase in the copy number of pZM41 compared to that of the parental pZM36 might be related to the insertion of *Peno_talB-tktA-cat*. Beside the effect of the insertion on backbone plasmid features and on the knock-out of the affected gene (a putative phage tail assembly gene), another possibility is that either transketolase (*tktA*), transaldolase (*talB*) alone or both are beneficial to *Z. mobilis*, possibly via increased production of D-ribose-5-phosphate for nucleic acid biosynthesis and D-erythrose-4-phosphate for aromatic amino acids biosynthesis (shikimate pathway). Although *Z. mobilis* is not a native pentose-fermenting organism, there

(See figure on next page.)

Fig. 3 Plasmid copy numbers in *Z. mobilis* ZM4, 2032, and 8b under anaerobic conditions (a), aerobic conditions (b), and shift from aerobic to anaerobic conditions (c). All *Z. mobilis* strains were grown in RMG medium under anaerobic, aerobic or shift from aerobic-to-anaerobic conditions, and plasmid copy numbers were measured at both Mid-log and Stationary phases relative to the chromosome terminus assigned as 1 and corrected for PCR efficiency (see “Methods”). The chromosome *ori* copy number was determined as a control. Plasmid copy number measurements were based on at least three biological replicates, with the standard deviation indicated as error bar



is a transketolase (ZMO0176) encoded in the chromosome of ZM4, suggesting that transketolase might be an important enzyme for metabolic function beyond pentose utilization in *Z. mobilis*. Enzymes of the pentose phosphate pathway have been found in some other non-pentose metabolizing organisms, including *S. cerevisiae*, which metabolize glucose for amino acid and nucleic acid synthesis [38].

These results indicate that ZM4 native plasmids have very low copy numbers under anaerobic conditions, which increase mildly under aerobic conditions in all strains tested. In contrast, the copy number of pZM41 (pZM36::Peno_talB-*tktA-cat*) could be manifesting a five- to sixfold increase in 8b compared to the parental pZM36 in ZM4, while the copy number of pZM33 also seemed to increase moderately under aerobic conditions.

Verification of plasmid gene expression through omic and physiological studies

Evaluation of rRNA depletion approaches to enrich mRNA for RNA-Seq

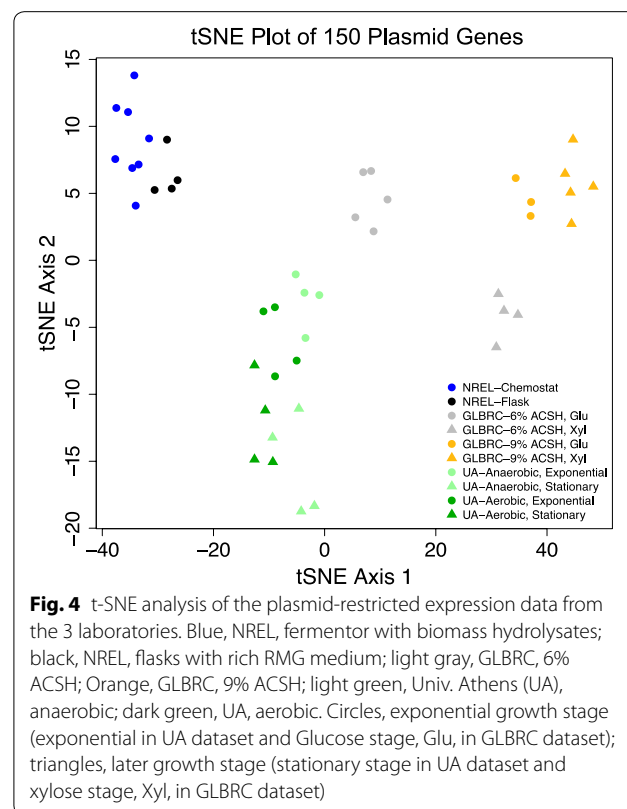
To assess the function of plasmid genes in response to environmental conditions, we analyzed gene expression (RNA-Seq) data from ZM4, 2032, and 8b grown in rich media containing glucose as a carbon source, as well as in biomass hydrolysates at the logarithmic or stationary stage (see RNA-Seq metadata in Additional file 4: Table S3). Data from 45 RNA-Seq samples with 2–5 biological replicates for each condition were included for analyses (Additional file 4: Table S3). The ORNL/NREL group tested several rRNA depletion methods/kits for rRNA depletion in *Z. mobilis* since 2009, which were inefficient at that time due to poor matches to probe sequences used for subtractive hybridization. A customized *Zymomonas* rRNA depletion kit was then developed with Life Technologies and verified by RT-qPCR. The new kit reduced rRNA content from 90% or more of the total RNA to less than 8.5% for several strains grown under different conditions (Additional file 1: Figure S2A–C). After rRNA depletion with this customized kit, samples showed good correlation with a coefficient R-square value in a range of 0.96–0.98 (Additional file 1: Figure S2D). The GLBRC group likewise tested several rRNA depletion methods/kits for rRNA depletion in *Z. mobilis* and found that the Ribo-Zero rRNA Removal Kit from Epicentre/Illumina was the most effective, removing up to 90% rRNA. This same kit was able to remove about 50% of the rRNA for samples processed at JGI, where RNA-Seq was performed for GLBRC and the NKUA.

Multivariate analysis of RNA-Seq data

To broadly assess transcriptomic differences in our RNA-Seq data, we clustered the expression of all 150 plasmid

genes across a range of growth conditions and growth phases obtained by our three research groups (NKUA, GLBRC, and NREL). To avoid both batch effects associated with these independent sets of data generated from three different locations and the possible influence of chromosomal responses after genome-wide normalization, RNA-Seq data were normalized in the following way: (1) reads mapped to plasmid genes were isolated; (2) FPKM (fragments per kilobase per million mapped reads) values were computed specifically for the plasmid set; and (3) the plasmid-specific FPKM values were additionally quantile-normalized.

Normalized FPKM values were used for global structure identification with t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) algorithm (Fig. 4). The t-SNE algorithm is a viable alternative to principal component analysis (PCA) to detect main trends in omic data [39, 40], particularly when analyzing fewer data points. Based on the results of Fig. 4, stationary growth stage was separated by having a higher value of t-SNE mapping along Axis 1 for each dataset that included samples from both exponential and stationary growth stages (NKUA and GLBRC). Moreover, different glucan-loading (6% vs. 9%) AFEX-corn stover hydrolysates (ACSH) in the GLBRC dataset and, to lesser extent, different oxygen concentrations (anaerobic vs. aerobic) in the NKUA dataset, or



fermenter (biomass hydrolysate) and flask experiments (rich medium with glucose) in NREL dataset, may be separated using the expression information for 150 plasmid genes exclusively.

Interestingly, when cells were grown in hydrolysate from higher biomass loading (i.e., 9% glucan loading), this appeared to shift exponential growth phase (glucose stage) plasmid gene expression patterns towards an expression state more similar to that of stationary growth phase (xylose stage) in low biomass loading (i.e., 6% glucan loading). This phenomenon was visible in t-SNE analysis (Fig. 4, large right-shift along the first t-SNE axis of both 9% ACSH samples and 6% ACSH samples at Glucose stage), hierarchical clustering (Additional file 1: Figure S3, high closeness of expression signatures of 6% ACSH at xylose stage and 9% ASCH at glucose stage), and global correlation screening across all RNA-Seq libraries (data not shown).

Verification of plasmid gene expression through RNA-Seq analysis

To compare plasmid gene expression under various growth conditions, we performed fermentations with *Z. mobilis* under anaerobic and aerobic conditions, as well as in different lignocellulosic hydrolysates (see “Methods,” and RNA-Seq metadata in Additional file 4: Table S3). Plasmid gene expression data are shown in Additional file 5: Table S4. We chose two datasets for further analysis: anaerobic vs. aerobic for strain ZM4, and 6% vs. 9% glucan loading ACSH for strain 2032, focusing on exponential time point samples only.

Hierarchical clustering of plasmid gene expression showed distinct clustering by growth conditions, with biological replicates clustered together (Additional file 1: Figure S3 and Additional file 6: Table S5). Anaerobic and aerobic conditions were more related to one another than ACSH samples. As shown in Additional file 2: Table S1, Additional file 7: Table S6 and Additional file 8: Table S7, among genes that show statistical significance of differential expression (see “Methods”), 65 genes were either up-regulated or down-regulated by more than twofold in 9% ACSH compared to those in 6% ACSH, while only 11 genes showed greater than twofold changes between aerobic and anaerobic conditions. Among those 11 genes, only three genes from plasmids pZM32, pZM33, and pZM39 showed consistent differential expression at a minimum cutoff value of 1.5-fold change (considering all replicate libraries in two groups), or critical coefficient [41]. Given the greater number of dysregulated plasmid genes in highly concentrated ACSH, these results suggest that plasmid genes may have an important role in mediating fermentation of lignocellulosic hydrolysates. Conversely, our results suggest that plasmid genes may have a

more limited role for conventional, rich media growth in both anaerobic and aerobic conditions during exponential growth.

While a considerable number of microarray-based transcriptomic studies have been performed with *Z. mobilis*, to the best of our knowledge, this is the first report of RNA-Seq transcriptional profiling in *Z. mobilis*. RNA-Seq technology offers a number of advantages compared to microarrays especially broad linear range, cross comparison, and higher sensitivity in transcript recognition. The assessment of rRNA depletion methods reported here as well as the pipeline of RNA-Seq data analysis and resulting data sets, will benefit future RNA-Seq transcriptomic studies in this model ethanologenic bacterium.

Proteomic and phenotypic analysis of plasmid genes

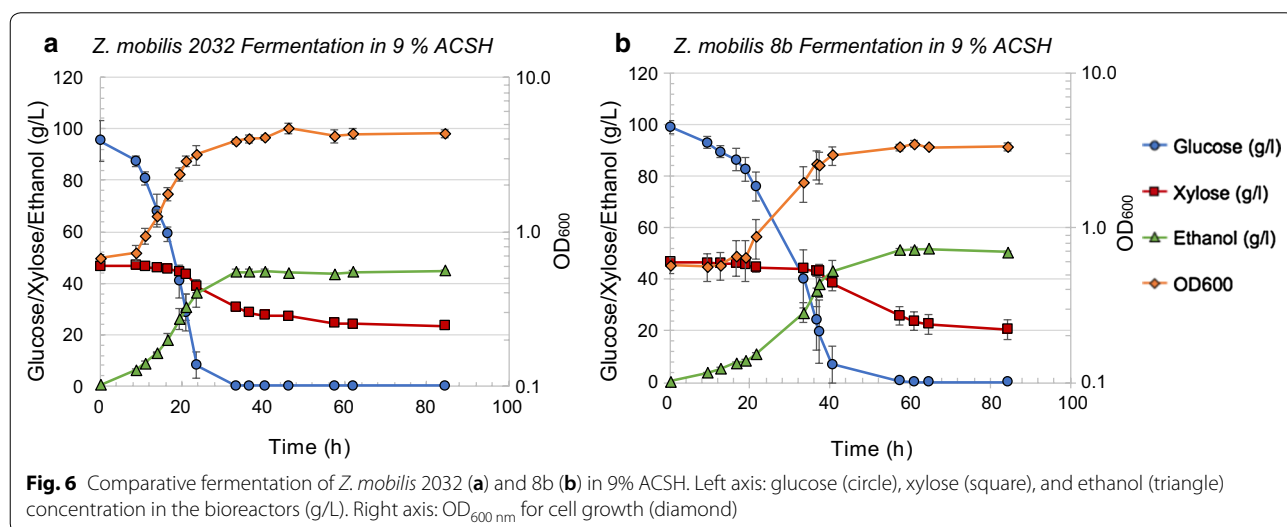
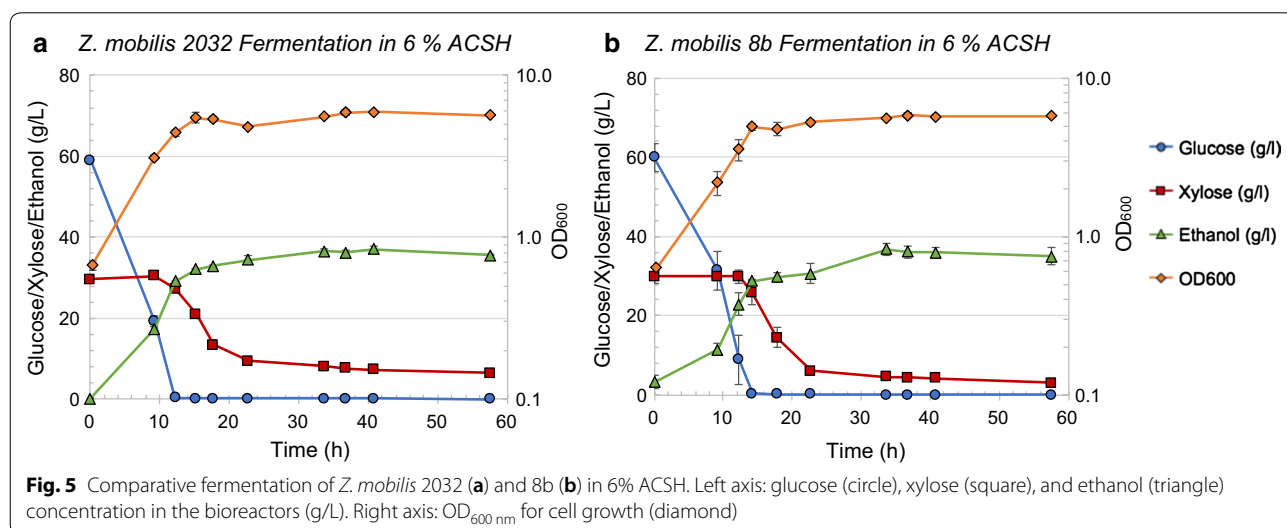
To further validate and characterize *Z. mobilis* ZM4 plasmid genes, proteomic mass spectrometry data were collected for ZM4 in anaerobic and aerobic fermentation in rich and minimal media at GLBRC independently of the aforementioned RNA-Seq sample collection. We also analyzed proteomic data for ZM4 in ethanol shock and sodium acetate stress conditions at two different time points reported previously [15, 16]. Proteomic data analysis in ethanol shock and sodium acetate stress conditions identified 48 plasmid protein peptides, including phage proteins, membrane proteins, transporters, and toxin-antitoxin systems (Additional file 2: Table S1 and Additional file 9: Table S8). Seventy-one plasmid protein peptides (about 47% of total plasmid ORFs) were identified under anaerobic and aerobic fermentation conditions (Additional file 2: Table S1 and Additional file 10: Table S9), including transporters, toxin-antitoxin systems, and transcriptional regulators. Among them, 40 plasmid protein peptides were detected independently in both research institutes. A total of 79 plasmid encoded proteins were detected across all proteomic data sets that we analyzed, while another 40 plasmid encoded proteins were detected in at least one experiment.

Previously, Deutschbauer et al. [42] used a chemical genomic approach to assay mutant phenotypes using a barcoded transposon library of *Z. mobilis* ZM4. Transposon insertions were mapped to the then published pZZM4015 to pZZM405 plasmid sequences, identifying transposons in 60 plasmid genes. As we have demonstrated in this study, plasmids pZZM401-405 did not originate from *Z. mobilis* strain ZM4, suggesting that plasmid transposon insertions, and subsequent phenotypes, were misattributed to pZZM401-405 genes. We extrapolated the findings of Deutschbauer et al. to identify possible mutant phenotypes for plasmid genes identified in our study to more accurately

reflect possible functions of plasmid genes in *Z. mobilis* ZM4. Using BLAST, we identified sequence homologs between genes from previous mutant phenotypic studies and genes identified in pZM32, pZM33, pZM36, and pZM39 (Additional file 2: Table S1). In doing so, we assigned 54 mutant phenotypes to *Z. mobilis* ZM4 plasmid genes (Additional file 2: Table S1). Because of incorrect ZM4 plasmid sequences, past transposon libraries screens missed many actual ZM4 plasmid genes, underscoring the impact that our findings will have on future screens of this kinds. Our RNA-Seq work suggests a role for plasmid genes during biomass hydrolysate fermentation, and further work should be taken to identify mutant phenotypes for all ZM4 plasmid genes through the construction of new DNA-barcoded mutant libraries.

Comparison of growth and sugar utilization of *Z. mobilis* 2032 in differently concentrated corn stover hydrolysates (6 and 9% ACSH)

Comparative fermentations of each strain in both 6% and 9% ACSH (Figs. 5 and 6). Consistent with previous reports [4], 2032 grew well in 6% ACSH without any supplementation and consumed glucose completely and ~20 g/L of the xylose within 40 h. Comparatively, and as shown in Fig. 5, 8b showed marginally slower growth and glucose utilization in 6% ACSH, but utilized slightly more xylose (~3 g/L xylose left) than 2032 (~7 g/L xylose left). In this respect, the observed trend of 8b to outperform 2032 in RMGX was repeated in 6% ACSH. However, the process ethanol yields were very similar in both strains: 80 ± 1 and 78 ± 2% for 2032 and 8b in 6% ACSH, respectively.



When 2032 and 8b were grown in highly concentrated 9% ACSH, the lag phase was shorter for 2032 (10 h) compared to 8b (~20 h) (Fig. 6). Consequently, 8b required more time to completely consume glucose than 2032. The inhibition of cell growth for strain 8b in 9% ACSH might be caused by greater sensitivity to higher osmolality or higher concentrations of inhibitors such as lignocellulose-degradation products. In contrast to fermentation of 6% ACSH, both 8b and 2032 consumed only small amounts of xylose when glucose was nearly depleted but failed to consume additional xylose once glucose was completely depleted (Fig. 6). The process ethanol yields were 69 ± 2 and $59 \pm 1\%$ for 2032 and 8b in 9% ACSH, respectively. Further experiments are needed to elucidate the mechanism(s) of poor xylose utilization by *Z. mobilis* in highly concentrated ACSH hydrolysates.

Although both 8b and 2032 were engineered to metabolize xylose by the introduction of two separate expression cassettes, a different promoter of *Peno* was used to control the expression of *talB* and *tktA* in 8b relative to the *Pgap* promoter used to control the expression of these genes in 2032. Differences in the activity and regulation of these two promoters, *Peno* and *Pgap* in 8b and 2032, respectively, may likewise affect the expression of *talB* and *tktA* and consequently the growth on xylose. Likewise, differences in gene amplifications in 2032, e.g., duplication of *xylA*, and 8b, e.g., increased copy number of the pZM41 plasmid that carries the *talB* and *tktA* genes (Fig. 3a, b), may contribute to observed phenotypic differences. Additional genetic differences identified between these two strains (Table 3), e.g., mutations in transport and membrane proteins ZMO0143, ZMO0566, ZMO1659, and ZMO1886, could facilitate differences in xylose transportation and utilization, possibly at the expense of lignocellulosic-derived inhibitor uptake. Additional studies are needed to investigate if and how such factors may account for differences observed between 8b and 2032 performance in ACSH and the previously reported superiority of 8b in assimilating xylose in RMGX medium.

Conclusions

In summary, the genome sequences including complete chromosomal and plasmid sequences in the model ethanologen *Z. mobilis* strain ZM4 and its xylose-utilizing derivatives of 2032 and 8b have been determined and characterized with their possible contribution to cell fitness inferred through a joint effort from four laboratories in three countries. Resequencing of the ZM4 chromosome identified 65 SNPs and a 2400-bp insertion relative to previously published ZM4 chromosomal sequence (AE008692.2). These sequence variants were

present across all strains, and additional strain-specific SNPs were identified, especially in strain 8b which had undergone strain adaptation to improve xylose utilization capability. Our findings also suggest that the discovered genetic differences between two xylose-utilizing strains may be pertinent to the observed differences in fermentation performance and hint to engineering strategies that can be adopted during strain development for biofuel production.

Moreover, four native plasmids were identified in all strains, ranging in size from 32 to 39 kb, and harboring in total 150 predicted ORFs. Plasmid sequences across all three strains are identical except for plasmid pZM36, whose allelic replicon in 8b (pZM41) bears an insertion of the heterologous genes *talB*, *tktA*, and *cat*. Plasmid genes were further functionally annotated and characterized through transcriptomic and proteomic studies as well as results from published mutant phenotypic screens. Our results also indicate that all plasmids are present at relatively low copy number except for plasmid pZM33, whose copy number detectably increased in aerated cultures. Plasmid copy number could be affected by growth conditions and heterologous gene insertion in pZM41.

Our findings also suggest that the discovered genetic differences between two xylose-utilizing strains may be pertinent to the observed differences in fermentation performance and hint to engineering strategies for strain development. The revision of the genome of the model ethanologenic *Z. mobilis* strain ZM4 and its xylose-utilizing derivatives of 2032 and 8b will also facilitate future systems biology studies for strains in the ZM4 lineage and could stand as a standard for other *Zymomonas* strains as well.

Methods

Strains and growth media

Three *Z. mobilis* strains, the wild-type ZM4 (ATCC31821), and its xylose-utilizing derivatives 2032 (ATCC31821-5C *Pgap_taltkt/PgapxylAB*, PTA-6977) and 8b (ATCC31821-5C *Peno_taltkt/PgapxylAB*, PTA-6976), were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) or from NREL. Both 2032 and 8b were engineered at the National Renewable Energy Laboratory (NREL) for xylose utilization by introducing *Escherichia coli* *xylA*, *xylB*, *talB*, and *tktA* genes into *Z. mobilis* ZM4 by either homologous recombination or Tn5 transposon insertion [36]. All strains were grown in rich media (RM) [43] with glucose (RMG): 10 g/L yeast extract, 2 g/L KH_2PO_4 , 20 g/L glucose or different glucose concentrations as indicated.

Biomass hydrolysate production

NREL hydrolysate preparation

Deacetylation of corn stover (P120927DCS) Corn stover provided by Idaho National Labs (INL) Lot #3 was used for the preparation of deacetylated corn stover used in this study. Deacetylation was performed at 8% (w/w) total solids (TS) concentration with 1500 kg total mass at 80 °C, 2 h, and 0.4% (w/w) NaOH in the dynamic impregnator (DI) vessel at NREL. The DI was mixed at 15 rpm during deacetylation. After deacetylation, the spent caustic liquor was drained from the vessel, leaving the remaining solids at 12% TS. The remaining solids were then rinsed with 950 kg of water, which was drained from the vessel and discarded.

Acid impregnation of corn stover (P120927CS) For the non-deacetylated material (P120927CS), corn stover (INL Lot #3) was added at 8% (w/w) TS with 1500 kg total mass into the DI. The corn stover was soaked in a 0.8% (w/w) sulfuric acid solution for 2 h, then dewatered to 45–50% (w/w) TS prior to pretreatment using a Vincent model CP-10 screw press (Tampa, FL). For the deacetylated material (P120927DCS), water and sulfuric acid were added to the rinsed solids to achieve 8% (w/w) TS and 0.8% (w/w) sulfuric acid in the DI. This slurry was mixed at 15 rpm for two hours prior to dewatering to 45–50% (w/w) TS using the Vincent screw press (Tampa, FL) prior to pretreatment.

Pretreatment of corn stover The corn stover feedstock used to feed the Metso 1-ton/day pretreatment reactor was INL Lot 5, which was knifed milled through a 3/4" screen and pretreated at 160 °C for 10 min with the residence time based on the assumption of plug flow in the reactor. Pretreatment of deacetylated and non-deacetylated corn stover was performed in the 1-ton/day continuous horizontal pretreatment reactor. Pretreated corn stover was stored at 4 °C prior to further processing.

Enzymatic hydrolysis (EH) Pretreated corn stover (PCS) lots, P120927CS/PCS-01 Drum #1 and P120927DCS/DCS-02 (deacetylated) Drum #1 were neutralized to pH 5.3 using 30% ammonium hydroxide (NH₄OH, 29.8% assayed as NH₃, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). The substrate was mixed using a Kitchen Aid mechanical mixer. For each lot of PCS, 2 kg of material was placed in the mixing bowl. Lot P120927CS/PCS-01 had an initial pH of 1.72 and required 32 mL of 30% NH₄OH to reach a final pH of 5.33. Lot P120927DCS/DCS-02 had an initial pH of 1.66 and required 19 mL of 30% NH₄OH to reach a final pH of 5.29. The pH-adjusted PCS was stored at 4 °C overnight. Novozymes CTec2 (Lot #VCPI0007) was added to the neutralized slurry supplemented with sterile DI water to

constitute 20% total solids at a loading of 40 mg protein/g cellulose for saccharification (48 °C, 150 rpm shaking). After 120 h, the saccharified material was centrifuged at 10,000 rpm using a Sorvall Evolution R centrifuge for 10 min, and then filter sterilized using 0.2 µm Nalgene filters.

6 and 9% glucan-loading AFEX-corn stover hydrolysate production at GLBRC

6% glucan-loading corn stover hydrolysate (6% ACSH) was produced from AFEX-pretreated feedstocks using enzymatic hydrolysis methods as described previously [4]. For making highly concentrated 9% glucan-loading corn stover hydrolysate (9% ACSH), we separated single biomass and enzyme loading used for 6% ACSH into three loadings: 5, 2, and 2%. The first loading of biomass was added into the 15-L vessel of Applikon ez-control bioreactor system (Applikon Biotechnology, Foster City, CA) with water, and the entire vessel was autoclaved for 2 h at 121 °C. After cooling to ~50 °C, undiluted HCl was added to decrease the initial pH and optimize enzyme activity, and then mixed into the slurry by hand shaking the vessel. First loading of CTec2 and HTec2 from Novozymes (Franklinton, NC) was added. After the hydrolysis was carried out at 50 °C for overnight (~16–18 h), the second 2% biomass and enzyme loading were added. Since the biomass in the second loading is not autoclaved, we added tetracycline (final concentration at 6.25 µg/mL) to control contamination observed before [4]. After hydrolysis for another 6 h, the third 2% biomass and enzyme loading were added. The hydrolysis was carried out at 50 °C for 5 days with a stirring speed of 700 rpm. We also increased total enzyme loading by 1.5-fold compared to that used for 6% ACSH.

Growth and fermentation conditions

Anaerobic and aerobic flask growth conditions for collecting RNA samples have been previously described [44]. Aerated cultures are shaken at 200 rpms in flasks filled to one-fifth of volume at 30 °C.

Fermentations were also conducted in 0.5-L bioreactors (BIOSTAT Qplus system from Sartorius Stedim North America Inc., Bohemia, New York, USA) containing 250–300 mL of biomass hydrolysates or rich RMG medium as described previously [4, 10]. Fermentations were conducted at 30 °C with continuous stirring (150–300 rpm) and sparging (150 mL/min; 100% N₂), and pH was controlled at 5.8–6.0. Samples were periodically removed from the bioreactors for an OD_{600 nm} measurement to monitor cell growth and for HPLC-RID analysis of the concentration of glucose, xylose, ethanol, and other end products. Process ethanol yields represent the ethanol produced based on the amount theoretically possible

from complete conversion of the glucose and xylose in each hydrolysate (0.51 g ethanol/g sugar).

Cells for RNA isolation (10 mL) were also collected into 15-mL conical tubes containing 1.25-mL ice-cold unbuffered phenol in ethanol (5%, v/v) [45] and pelleted by centrifugation at 10,000g, 4 °C, for 3 min, then flash frozen in dry ice-ethanol bath, and stored at 80 °C.

DNA isolation and NGS genome resequencing

For the isolation of total DNA for genomic and plasmid resequencing, all strains were grown in RMG to mid-log phase. Total DNA (containing both genomic DNA and plasmid DNA) was isolated using MasterPure DNA isolation Kit (Epicentre, Madison, Wisconsin, USA) or CTAB isolation protocol [46]. Samples were submitted to University of Wisconsin-Madison Biotechnology Center (<http://www.biotech.wisc.edu/>) for Illumina sequencing with paired-end 250 bp sequencing and Mate-Pair sequencing.

Alternatively, at NREL, genomic DNA was extracted from *Z. mobilis* cells grown in either RMG or RMX using Qiagen DNEasy Kit and sent to the University of Utah for next-generation sequencing using Illumina HiSeq 2000 after samples passed the quality requirements. NGS-based genome resequencing using Illumina HiSeq 2500 was performed at Genewiz (HangZhou, China) for samples sent from Hubei University, China.

Genome assembling

Nextera mate-pair reads were processed using NextClip v.1.3.1 [47], with the default parameters. The resulting A, B, and C type trimmed mate-pairs were kept. The short-pair reads were trimmed using Trimmomatic v 0.32 [48] and using the Illumina TruSeq adapters with parameters: seed mismatches of 2, palindrome clip threshold of 30, simple clip threshold of 10, headcrop of 0, and minlen of 10. Trimmed short-pair reads were normalized using `insilico_read_normalization.pl` provided by the Trinity software package [49] using `KMER_SIZE={21, 23, 24, 25, 27, 29}` and `max_cov={10,15, 25, 35, 50}`. For each setting of `KMER_SIZE` and `max_cov`, a genome assembly was generated using ALLPATHS-LG v.44837 (<http://software.broadinstitute.org/allpaths-lg/blog/>) [50, 51] using the trimmed/normalized short-pair reads and the NextClip processed mate-pair reads. Assembly statistics were collected using `assemblathon_stats.pl` [52]. Gaps in the scaffolds were then filled in by mapping the reads to the ALLPATHS-LG scaffolds and SeqMan NGen software (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA).

Alternatively, at NREL and Hubei University, the quality of FASTQ genome resequencing data was checked using FastQC program, data passing the quality control were imported into CLC Genomics Workbench for data

analysis to identify the potential small genetic changes such as SNP and Indels. Briefly, sequencing reads after trimming to remove reads with poor quality were mapped against the reference genome sequence followed by resequencing analysis using both probabilistic variant detection and quality-based variant detection tools. The variants identified were filtered to remove those with less than 80% confident frequency level [53] before comparing among different strains. In addition, the fastq files were combined for each strain and used for de novo assembly using CLC Genomics Workbench. Contigs were compared with published genome sequence and primer sets were designed for primer walking to confirm the correct orientation and sequence of the plasmid and chromosomal sequences.

Gene annotation

Blast2Go (<https://www.blast2go.com>) and InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) were used to collect the latest comprehensive protein function information by submitting the translated sequences to InterPro-supported databases. Additional gaps in functional annotation were partially filled by searching SMART protein domain database (<http://smart.embl-heidelberg.de>) and using this information in conjunction with information on operon structure to gain insights on possible function of unannotated genes.

Plasmid copy number measurement

Plasmid copy numbers were measured by quantitative PCR and comparison of plasmid-based amplicons to a chromosome amplicon at the replication terminus (*ter*), assuming the copy number of the chromosome replication terminus is one. Amplicons corresponding to randomly chosen segments of pZM32, pZM33, pZM36, and pZM39, the chromosome replication terminus, and, for reference, the chromosome replication origin (90–150 bp; Additional file 3: Table S2) were identified using Primer3 (<http://primer3.ut.ee>) [54]. The amplification fidelity and efficiency of each PCR amplicon were assessed prior to selecting the amplicons used for the assay. DNA segments containing the amplicons were cloned into pUC19 to create calibrator plasmids by Gibson assembly (Additional file 3: Table S2). Each calibrator plasmid contained two DNA segments, a DNA segment from one of the *Z. mobilis* plasmids with 250 bp flanking the PCR amplicon and an adjacent segment from the *Z. mobilis* chromosome replication terminus with 250 bp flanking the PCR amplicon. The sequences of the entire inserted segments were confirmed by Sanger sequencing using M13 forward and reverse primers.

For plasmid copy number experiments, *Z. mobilis* strains were grown overnight in RMG medium. Cells

were then pelleted and diluted to apparent OD_{600nm} value around 0.10–0.15 in RMG and grown either aerobically in a baffled flask at 30 °C and 250 rpm or anaerobically in a 50-mL tube or bottle with the cap open 1/2 of a turn at 30 °C. At harvest, 0.6–1.2 mL cells were pelleted, resuspended in 100–200 µL 100 mM Tris–HCl, pH 8.0, lysed at 95 °C for 20 min, and stored at –20 °C. For each condition, replicate samples were then subjected to quantitative PCR using each amplicon to determine the plasmid copy numbers relative to chromosome replication terminus, with correction for amplification efficiency using the calibrator plasmids. qPCR was performed with a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma, St. Louis, MO, USA) in a 25-µL reaction volume using 1-µL 25 µM forward and reverse primer and 1.5-µL whole cell lysate. Cell lysates were diluted 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, and 1/160 in the replicates.

Plasmid copy numbers (PCN) were determined by $\Delta\Delta\text{Ct}$ method [55], using the following formulas:

$$\text{Plasmid copy number (PCN)} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (sample)} - \Delta\text{Ct (calibrator plasmid)};$$

$$\Delta\text{Ct (sample)} = \text{Ct (target 1)} - \text{Ct (reference 1)};$$

$$\Delta\text{Ct (calibrator plasmid)} = \text{Ct (target 2)} - \text{Ct (reference 2)};$$

$$\text{target 1} = \text{target region from plasmid};$$

reference 1 = terminator region of *Z. mobilis* chromosome;

target 2 = *Z. mobilis* plasmid target region on calibrator plasmid;

reference 2 = terminator region of *Z. mobilis* chromosome on calibrator plasmid (DH10B transformed with calibrator plasmid).

RNA isolation and RNA-Seq data analysis

Cells for RNA isolation were collected using an ice-cold ethanol/phenol stop solution, and RNA was extracted using hot phenol method as described previously [45]. RNA samples were submitted to DOE-Joint Genome Institute (JGI: <http://jgi.doe.gov/>) for RNA-Seq. RiboZero™ rRNA Removal Kits from Epicentre was used for ribosomal RNA (rRNA) depletion. Alternatively, at NREL, rRNA was removed by using a customized rRNA depletion kit developed together with Life Technologies using species-specific rDNA probes, and the rRNA-depleted total RNA was sent to University of Utah for RNA-Seq using illumina directional RNA-Seq library construction and sequencing. The rRNA-depleted total RNA was also used as the template for cDNA synthesis

and qPCR following previous protocol [10, 56, 57] to determine the rRNA depletion efficiency.

Sequencing reads that passed standard Illumina quality control procedures were used for the alignment and counting. Transcriptome alignment was performed using Bowtie version 0.12.7 [58], followed by probabilistic counting with RSEM version 1.2.4 [59]. Strand-specificity of the libraries (generated with dUTP protocol) was accounted for as “–forward-prob 0” RSEM parameter. At NREL, the quality of RNA-Seq fastq data was checked using FastQC program (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>); data passing the quality control were imported into CLC genomics workbench (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench/>), and the reads were trimmed for nucleotides with quality score less than 30 before RNA-Seq analysis to get the RPKM values of protein-coding genes and rRNA genes. The RPKM values were then imported into JMP genomics (https://www.jmp.com/en_us/home.html) and log₂-transformed before statistical analysis similar to microarray-based transcriptomic analysis was performed [10, 56, 57].

For data normalization and testing for differential expression, Pearson correlation between vectors of counts that belong to biological replicates was employed to detect outlier libraries. All the retained libraries show the inter-replicate Pearson correlation of at least 0.95. Features representing rRNA and tRNA were removed from the matrix before the normalization. The matrix of counts for the entire set of libraries was pre-normalized as a pool using linear scaling to equilibrate the median values across the libraries. The pool of gene length- and library size-normalized values (FPKM) was additionally quantile-normalized via Bioconductor “affy” package [60]. The differential expression testing was performed using EBSeq [41], the Empirical Bayesian-based differential expression calling package. Genes with posterior probability of differential expression above 0.95 were subject to further filtering based on the quantile-normalized FPKM matrix, using a critical coefficient [61] cutoff of 1.5. Genes that pass both of the two selection criteria were called responsive and used in the functional analysis stage. For estimating replicon-wide relative expression, FPKM values for the chromosome and plasmids were generated using the sum of all non-rRNA, non-tRNA counts mapped to the respective replicon and the total length of the non-rRNA, non-tRNA features on the replicon.

The data structure was visualized using both hierarchical clustering and t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) [39]. For gene set enrichment analysis (GSEA), gene ontology (GO) associations were extracted from the results of InterProScan with translated plasmid

ORF sequences. Cluster-based enrichment test with sets of responsive genes (FDR < 0.05) was performed with goseq package [62] from Bioconductor (<http://bioconductor.org>), the two gene-level statistics summarization tests—Fisher's combined probability test [63] and summarization of median gene-level fold changes—using piano package [64] from Bioconductor. Statistical significance of the enrichment tests was estimated with 100,000 data permutations.

Proteomic sample preparation, quantitative proteome measurement, and data analysis

The proteomic sample processing and data analysis in Additional file 9: Table S8 has been reported previously at ORNL [15, 16]. We here described the method for GLBRC proteomic data shown in Additional file 10: Table S9. Ten milliliters of *Z. mobilis* cells was collected at different growth conditions by centrifugation at 15,000g for 3 min, and quickly frozen in ethanol/dry ice bath and stored at -80°C until use. Cells were lysed by suspension in 6 M guanidine hydrochloride (GnHCl), followed by addition of MeOH to 90%. Samples were centrifuged at 15,000g for 5 min. Supernatant was discarded and pellets were allowed to dry for ~ 5 min. Pellets were resuspended in 200 μL 8 M urea, 100 mM Tris (pH 8.0), 10 mM TCEP, and 40 mM chloroacetamide, then diluted to 2 M urea in 50 mM Tris (pH 8). Trypsin was added at an estimated 50:1 (protein to enzyme) ratio, and samples were incubated overnight at ambient temperature. Each sample was desalted over a PS-DVB solid phase extraction cartridge and dried down. Peptide mass was assayed with the peptide colorimetric assay.

For each analysis, 2 μg of peptides was loaded onto a 75 μm i.d. 30-cm-long capillary with an imbedded electrospray emitter and packed with 1.7 μm C18 BEH stationary phase. The mobile phases used were A: 0.2% formic acid and B: 0.2% formic acid in 70% acetonitrile. Peptides were eluted with increasing gradient of acetonitrile from 0 to 53% B over 75 min followed by a 5 min 100% B wash and a 10-min equilibration in 0% B [65]. Eluting peptides were analyzed with an Orbitrap Fusion Lumos. Survey scans were performed at $R=60,000$ with wide isolation analysis of 300–1350 mz . Data-dependent top speed (2 s) MS/MS sampling of peptide precursors was enabled with dynamic exclusion set to 45 s on precursors with charge states 2–6. MS/MS sampling was performed with 1.6 Da quadrupole isolation, fragmentation by HCD with NCE of 30, analysis in the Orbitrap at $R=15,000$ with max inject time of 22 ms, and AGC target set to 2×10^5 .

Raw files were analyzed using MaxQuant 1.5.8.3. Spectra were searched using the Andromeda search engine against a target decoy database generated in house. As

described previously [66, 67], label-free quantitation and match between runs were toggled on and the number of peptides measurements for each protein was set to 1. Default parameters were used for all other analysis parameters. Peptides were grouped into subsumable protein groups and filtered to 1% FDR, based on target decoy approach.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Completion of plasmid sequences by primer walking with a list of the primers used for each plasmid (A). PCR amplification of ZM4 chromosome region containing a 2.4-kb fragment near ZMO0133 locus that is absent in previously reported ZM4 genome sequence (B). A schematic is shown detailing the location of primers used to PCR, and PCR products on agarose gel are also shown. **Figure S2.** Customized rRNA depletion kit was developed with Life Technologies for *Z. mobilis* mRNA enrichment, and RNA-Seq result of the percentage of rRNA, tRNA, and mRNA in *Z. mobilis* total RNA was calculated (A). qRT-PCR measurement of rRNA content before and after rRNA depletion of total RNA using the customized kit (B). rRNA reduction is reported as the fold change in the target rRNA in total RNA relative to depleted RNA. Measurements were collected in WT (*Z. mobilis* strain 33C derived from *Z. mobilis* 8b) and MT (a mutant strain of 33C) grown in either rich media with 5% glucose (RMG) or rich media with 5% xylose (RMX) and collected in two biological replicates. Error is reported as standard deviation. Residual rRNA contamination and rRNA depletion efficiency of samples described in (B) was detected by RNA-Seq (C). Error is reported as standard deviation. An example of pairwise replicate correlation of RNA-Seq pseudo read counts (i.e. \log_2 transformed following addition of La Place constant of 1) for two biological replicates after rRNA depletion (D). **Figure S3.** Heatmap of RNA-Seq data from 6% and 9% ACSH, anaerobic (AN) and aerobic (AE) conditions. Coloring by condition (left color bar) corresponds to the one used for the Fig. 4. Blue, NREL, fermentor with biomass hydrolysates; black, NREL, flasks with rich RMG medium; light grey, GLBRC, 6% ACSH; Orange, GLBRC, 9% ACSH; light green, Univ. Athens, anaerobic; dark green, Univ. Athens (UA), anaerobic; dark green, UA, aerobic. Top index bar shows expression clusters (see Additional file 6: Table S5 for gene-cluster assignments). Right annotation bar shows generalized factor that is applicable to experimental designs across all the 3 research centers: "Early" and "Late" are growth stages.

Additional file 2: Table S1. Plasmid gene annotation and functional analysis.

Additional file 3: Table S2. Primers, amplicons, and calibrator plasmids used for plasmid copy number determination.

Additional file 4: Table S3. RNA-Seq metadata.

Additional file 5: Table S4. Plasmid gene RNA-Seq counts.

Additional file 6: Table S5. Comparison of RNA-Seq from 6% and 9% ACSH.

Additional file 7: Table S6. Comparison of RNA-Seq from anaerobic and aerobic conditions.

Additional file 8: Table S7. Proteomic data of ZM4 in ethanol shock and sodium acetate stress conditions.

Additional file 9: Table S8. Proteomic data of ZM4 in anaerobic and aerobic fermentation in rich and minimal media.

Additional file 10: Table S9. Assignments of plasmid genes to expression clusters identified by inter-center expression meta-analysis (see Additional file 1: Figure S3).

Abbreviations

RMG: glucose-rich medium for *Zymomonas mobilis*; ACSH: hydrolysate produced using AFEX-pretreated corn stover.

Authors' contributions

SY and YZ led, designed, and coordinated the overall project, with significant contributions from JG, RL, KMP, MZ, TKS, DMB, MEH, and SDB; YZ, SY, and JG wrote the manuscript with input from all authors. SY, JMV, JG, YY, GS, SJM, YL, IZ, and YZ performed DNA preparation for sequencing and sequence data analysis; JMV, YZ, and SY prepared files for submitting sequences to GenBank. JG performed plasmid copy number estimation experiments; SY, YZ, and GS performed growth experiments, cell collection for RNA isolation, and RNA isolation; OM, JMV, and SY performed RNA-Seq analysis; YZ, JMV, SY, SDB, ASH, JJC for proteomic sample collection and data analysis. All authors helped draft and revise the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Environmental Microbial Technology Center of Hubei Province, Hubei Key Laboratory of Industrial Biotechnology, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China. ² DOE-National Bioenergy Center, National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO 80401, USA. ³ DOE-Great Lakes Bioenergy Research Center (GLBRC), University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA. ⁴ Department of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), Panepistimiopolis, 15701 Athens, Greece. ⁵ DOE-BioEnergy Science Center, Oak Ridge National Laboratory (ORNL), Oak Ridge, TN 37831, USA. ⁶ DOE-Biosciences Division, Oak Ridge National Laboratory (ORNL), Oak Ridge, TN 37831, USA. ⁷ DOE-Biosciences Center, National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO 80401, USA. ⁸ Present Address: China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China. ⁹ Present Address: LanzaTech, Inc., Skokie, IL 60077, USA.

Acknowledgements

We thank Jeffery Skerker and Adam Deutschbauer at Lawrence Berkeley National Laboratory, USA for providing information about *Z. mobilis* barcoded transposon library.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials**Nucleotide sequence accession numbers**

The complete genomic sequences have been deposited in GenBank under accession number CP023715 for ZM4 chromosome and its four plasmids: CP023716 for pZM32, CP023717 for pZM33, CP023718 for pZM36 and CP023719 for pZM39; CP023677 for 2032 chromosome and its four plasmids: CP023678 for pZM32, CP023679 for pZM33, CP023680 for pZM36 and CP023681 for pZM39; and CP023682 for 8b chromosome and its four plasmids: CP023683 for pZM32, CP023684 for pZM33, CP023685 for pZM39 and CP023686 for pZM41.

Consent for publication

All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The authors declare that this study does not involve human subjects, human material, and human data.

Funding

This work was funded by the DOE Bioenergy Technology Office (BETO) under contract number DE-AC36-08-GO28308 to NREL. NREL is a national laboratory of the US Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, operated by the Alliance for Sustainable Energy, LLC. This work was also supported in part by the DOE Great Lakes Bioenergy Research Center (DOE BER Office of Science DE-FC02-07ER64494 and DE-SC0018409) and the BioEnergy Science Center (BESC), which are US Department of Energy Bioenergy Research Centers supported by the Office of Biological and Environmental Research in the DOE Office of Science. ORNL is managed by UT-Battelle, LLC, Oak Ridge, TN, USA, for the DOE under contract DE-AC05-00OR22725. RNA-Seq was conducted by the US Department of Energy Joint Genome Institute, a DOE Office of Science User Facility, is supported by the Office of Science of the US Department of Energy under contract no. DE-AC02-05CH11231. KMP, GS, and IZ acknowledge the EU/GSRT fund 11SYN-7-1579;

KMP and GS also acknowledge the Research Projects for Excellence IKY/SIEMENS Award.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 1 February 2018 Accepted: 11 April 2018

Published online: 02 May 2018

References

- Yang S, Fei Q, Zhang Y, Contreras LM, Utturkar SM, Brown SD, Himmel ME, Zhang M. *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. *Microb Biotechnol*. 2016;9(6):699–717.
- He MX, Wu B, Qin H, Ruan ZY, Tan FR, Wang JL, Shui ZX, Dai LC, Zhu QL, Pan K, et al. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7:101.
- Rutkis R, Kalnenieks U, Stalidzans E, Fell DA. Kinetic modelling of the *Zymomonas mobilis* Entner–Doudoroff pathway: insights into control and functionality. *Microbiology*. 2013;159(Pt 12):2674–89.
- Serate J, Xie D, Pohlmann E, Donald C, Shabani M, Hinchman L, Higbee A, Mcgee M, Reau A, Klinger GE, et al. Controlling microbial contamination during hydrolysis of AFEX-pretreated corn stover and switchgrass: effects on hydrolysate composition, microbial response and fermentation. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8(1):1–17.
- Ong RG, Higbee A, Bottoms S, Dickinson Q, Xie D, Smith SA, Serate J, Pohlmann E, Jones AD, Coon JJ, et al. Inhibition of microbial biofuel production in drought-stressed switchgrass hydrolysate. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9(1):237.
- Franden MA, Pilath HM, Mohagheghi A, Pienkos PT, Zhang M. Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnol Biofuels*. 2013;6(1):99.
- Kremer TA, LaSarre B, Posto AL, McKinlay JB. N₂ gas is an effective fertilizer for bioethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(7):2222–6.
- Yang S, Mohagheghi A, Franden MA, Chou YC, Chen X, Dowe N, Himmel ME, Zhang M. Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for 2,3-butanediol production from lignocellulosic biomass sugars. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9(1):189.
- Bochner B, Gomez V, Ziman M, Yang S, Brown SD. Phenotype microarray profiling of *Zymomonas mobilis* ZM4. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;161(1–8):116–23.
- Yang S, Tschaplinski TJ, Engle NL, Carroll SL, Martin SL, Davison BH, Palumbo AV, Rodriguez M Jr, Brown SD. Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. *BMC Genom*. 2009;10:34.
- Zhang K, Shao H, Cao Q, He MX, Wu B, Feng H. Transcriptional analysis of adaptation to high glucose concentrations in *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(4):2009–22.
- He MX, Wu B, Shui ZX, Hu QC, Wang WG, Tan FR, Tang XY, Zhu QL, Pan K, Li Q, et al. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under ethanol stress. *Biotechnol Biofuels*. 2012;5(1):75.
- He MX, Wu B, Shui ZX, Hu QC, Wang WG, Tan FR, Tang XY, Zhu QL, Pan K, Li Q, et al. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under furfural stress. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;95(1):189–99.
- Yi X, Gu H, Gao Q, Liu ZL, Bao J. Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8:153.
- Yang S, Pan C, Hurst GB, Dice L, Davison BH, Brown SD. Elucidation of *Zymomonas mobilis* physiology and stress responses by quantitative proteomics and transcriptomics. *Front Microbiol*. 2014;5:246.
- Yang S, Pan C, Tschaplinski TJ, Hurst GB, Engle NL, Zhou W, Dam P, Xu Y, Rodriguez M Jr, Dice L, et al. Systems biology analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 ethanol stress responses. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e68886.
- Seo JS, Chong H, Park HS, Yoon KO, Jung C, Kim JJ, Hong JH, Kim H, Kim JH, Kil JI, et al. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat Biotechnol*. 2005;23(1):63–8.

18. Kouvelis VN, Davenport KW, Brettin TS, Bruce D, Detter C, Han CS, Nolan M, Tapia R, Damoulaki A, Kyrpides NC, et al. Genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. *pomaceae* lectotype strain ATCC 29192. *J Bacteriol.* 2011;193(18):5049–50.
19. Kouvelis VN, Saunders E, Brettin TS, Bruce D, Detter C, Han C, Typas MA, Pappas KM. Complete genome sequence of the ethanol producer *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163. *J Bacteriol.* 2009;191(22):7140–1.
20. Kouvelis VN, Teshima H, Bruce D, Detter C, Tapia R, Han C, Tampakopoulou VO, Goodwin L, Woyke T, Kyrpides NC, et al. Finished genome of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* strain CP4, an applied ethanol producer. *Genome Announc.* 2014;2(1):e00845–13.
21. Pappas KM, Kouvelis VN, Saunders E, Brettin TS, Bruce D, Detter C, Balakireva M, Han CS, Savvakis G, Kyrpides NC, et al. Genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* lectotype strain ATCC 10988. *J Bacteriol.* 2011;193(18):5051–2.
22. Desiniotis A, Kouvelis VN, Davenport K, Bruce D, Detter C, Tapia R, Han C, Goodwin LA, Woyke T, Kyrpides NC, et al. Complete genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* centrotypic ATCC 29191. *J Bacteriol.* 2012;194(21):5966–7.
23. Chacon-Vargas K, Chirino AA, Davis MM, Deblor SA, Haimer WR, Wilbur JJ, Mo X, Worthing BW, Wainblat EG, Zhao S, et al. Genome Sequence of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-1960. *Genome Announc.* 2017;5(30):e00562–00517.
24. Yang S, Pappas KM, Hauser LJ, Land ML, Chen GL, Hurst GB, Pan C, Kouvelis VN, Typas MA, Pelletier DA, et al. Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. *Nat Biotechnol.* 2009;27(10):893–4.
25. Yablonsky MD, Goodman AE, Stevnsborg N, de Lima OG, de Morais JF, Lawford HG, Rogers PL, Eveleigh DE. *Zymomonas mobilis* CP4: a clarification of strains via plasmid profiles. *J Bacteriol.* 1988;9(1):71–9.
26. Goeders N, Van Melderen L. Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins.* 2014;6(1):304–24.
27. Unterholzner SJ, Poppenberger B, Rozhon W. Toxin-antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mob Genet Elements.* 2013;3(5):e26219.
28. Pedersen K, Christensen SK, Gerdes K. Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol Microbiol.* 2002;45(2):501–10.
29. Prysak MH, Mozdziejczak CJ, Cook AM, Zhu L, Zhang Y, Inouye M, Woychik NA. Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Mol Microbiol.* 2009;71(5):1071–87.
30. Motiejūnaitė R, Armalytė J, Markuckas A, Sužiedėlienė E. *Escherichia coli* *dinJ-yafQ* genes act as a toxin-antitoxin module. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;268(1):112–9.
31. Heaton BE, Herrou J, Blackwell AE, Wysłocki VH, Crosson S. Molecular structure and function of the novel BrnT/BrnA toxin-antitoxin system of *Brucella abortus*. *J Biol Chem.* 2012;287(15):12098–110.
32. Schauer K, Rodionov DA, de Reuse H. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends Biochem Sci.* 2008;33(7):330–8.
33. Chan YY, Chua KL. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. *J Bacteriol.* 2005;187(14):4707–19.
34. Mima T, Schweizer HP. The BpeAB-OprB efflux pump of *Burkholderia pseudomallei* 1026b does not play a role in quorum sensing, virulence factor production, or extrusion of aminoglycosides but is a broad-spectrum drug efflux system. *Antimicrob Agents CH.* 2010;54(8):3113–20.
35. Mittl PR, Schneider-Brachert W. Sel1-like repeat proteins in signal transduction. *Cell Signal.* 2007;19(1):20–31.
36. Zhang M, Chou YC, Howe W, Eddy C, Evans K, Mohagheghi A. *Zymomonas* pentose-sugar fermenting strains and uses thereof. US20030162271.
37. Agrawal M, Chen RR. Discovery and characterization of a xylose reductase from *Zymomonas mobilis* ZM4. *Biotechnol Lett.* 2011;33(11):2127–33.
38. Schaaff-Gerstenschläger I, Miosga T, Zimmermann FK. Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol.* 1994;50(1):59–64.
39. van der Maaten L. Accelerating t-SNE using tree-based algorithms. *J Mach Learn Res.* 2014;15:3221–45.
40. van der Maaten L, Hinton G. Visualizing data using t-SNE. *J Mach Learn Res.* 2008;9:2579–605.
41. Leng N, Dawson JA, Thomson JA, Ruotti V, Rissman AI, Smits BM, Haag JD, Gould MN, Stewart RM, Kendziora C. EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments. *Bioinformatics.* 2013;29(8):1035–43.
42. Deuschbaur A, Price MN, Wetmore KM, Tarjan DR, Xu Z, Shao W, Leon D, Arkin AP, Skerker JM. Towards an informative mutant phenotype for every bacterial gene. *J Bacteriol.* 2014;196(20):3643–55.
43. Skotnicki ML, Tribe DE, Rogers PL. R-plasmid transfer in *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol.* 1980;40(1):7–12.
44. Pappas KM. Mini-Mu transposon mutagenesis of ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Methods Mol Biol.* 2011;765:419–34.
45. Rhodius VA, Gross CA. Using DNA microarrays to assay part function. In: Chris V, editor. *Methods in enzymology*, vol. 497. New York: Academic Press; 2011. p. 75–113.
46. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM, editor. *Current protocols in molecular biology*. New York: Wiley; 2001.
47. Leggett RM, Clavijo BJ, Clissold L, Clark MD, Caccamo M. NextClip: an analysis and read preparation tool for Nextera long mate pair libraries. *Bioinformatics.* 2013;30(4):566–8.
48. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114–20.
49. Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat Protoc.* 2013;8(8):1494–512.
50. Ribeiro FJ, Przybylski D, Yin S, Sharpe T, Gnerre S, Abouelleil A, Berlin AM, Montmayeur A, Shea TP, Walker BJ, et al. Finished bacterial genomes from shotgun sequence data. *Genome Res.* 2012;22(11):2270–7.
51. Gnerre S, MacCallum I, Przybylski D, Ribeiro FJ, Burton JN, Walker BJ, Sharpe T, Hall G, Shea TP, Sykes S, et al. High-quality draft assemblies of mammalian genomes from massively parallel sequence data. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(4):1513–8.
52. Bradnam KR, Fass JN, Alexandrov A, Baranay P, Bechner M, Birol I, Boisvert S, Chapman JA, Chapuis G, Chikhi R, et al. Assemblathon 2: evaluating de novo methods of genome assembly in three vertebrate species. *GigaScience.* 2013;2(1):10.
53. Yang S, Land ML, Klingeman DM, Pelletier DA, Lu TY, Martin SL, Guo HB, Smith JC, Brown SD. Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(23):10395–400.
54. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):e115.
55. Tao L, Jackson RE, Cheng Q. Directed evolution of copy number of a broad host range plasmid for metabolic engineering. *Metab Eng.* 2005;7(1):10–7.
56. Yang S, Franden MA, Brown SD, Chou YC, Pienkos PT, Zhang M. Insights into acetate toxicity in *Zymomonas mobilis* 8b using different substrates. *Biotechnol Biofuels.* 2014;7(1):140.
57. Mohagheghi A, Linger J, Smith H, Yang S, Dowe N, Pienkos PT. Improving xylose utilization by recombinant *Zymomonas mobilis* strain 8b through adaptation using 2-deoxyglucose. *Biotechnol Biofuels.* 2014;7(1):19.
58. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 2009;10(3):R25.
59. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinform.* 2011;12(1):323.
60. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics.* 2004;20(3):307–15.
61. Moskvina OV, McClain S, Ong IM. CAMDA 2014: making sense of RNA-Seq data: from low-level processing to functional analysis. *Syst Biomed.* 2014;2(2):31–40.
62. Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* 2010;11(2):R14.
63. Fisher RA. *Statistical methods for research workers*. Edinburgh: Oliver and Boyd; 1932.
64. Våremo L, Nielsen J, Nookaew I. Enriching the gene set analysis of genome-wide data by incorporating directionality of gene expression

- and combining statistical hypotheses and methods. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(8):4378–91.
65. Hebert AS, Richards AL, Bailey DJ, Ulbrich A, Coughlin EE, Westphall MS, Coon JJ. The one hour yeast proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(1):339–47.
66. Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(9):2513–26.
67. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotech.* 2008;26(12):1367–72.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Curriculum Vitae

2018

Full Name : IOANNIS (GIANNIS) SAVVAKIS
Father's name : ROSSETOS
Date of birth : 09 March 1987
Address : KARIATIDOS 151, PERISTERI
12135, ATHENS, GREECE
Tel. : +30 2105763139, +30 6942207261
E-mail : isavvakis@biol.uoa.gr

1. EDUCATION

2004:	Certificate of studies, I. Tsiamoulis Lyceum, Greece (GPA: 19.3 out of 20)
2004-2009:	BSc Degree (GPA: 7.9 out of 10.00, Grade "Very Good") Faculty of Biology, School of Sciences, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA) <i>3rd position among 127 graduates of the year 2008-09 (at the top 2,5% of graduates)</i>
2009-2012:	Master of Science in Bioinformatics (GPA: 9.2 out of 10.00, Grade "Honors") Faculty of Biology, School of Sciences, NKUA <i>1st position among graduates of master in science of the year 2011-12</i>
2012-2018:	PhD student, Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, NKUA ("Study of SOS response in the ethanol-producing bacterium <i>Zymomonas mobilis</i> "). Under the supervision of Assistant Professor KM Pappas (Dept. of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, NKUA)

2. AWARDS & SCHOLARSHIPS

2012-2015: M. Mitsopoulou Scholarship (Academy of Athens) in Genetics ('Study of SOS response in the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*')

2016-2017: Excellence IKY/SIEMENS award for the Research Project: "Biotechnological and genomic study of an ethanologenic *Zymomonas mobilis* strain, mutant towards homologous recombination, for the purpose of optimizing bioethanol production " from the State Scholarships Foundation

3. PARTICIPATION IN RESEARCH PROGRAMS

1. US Department of Energy-Joint Genome Institute and NKUA bilateral collaboration (FY2008_CSP_788284); topic: 'Sequencing of *Zymomonas mobilis* strains CP4, ATCC 10988 and ATCC 29191 (subsp. *mobilis* lectotype and phenotypic centrotpe), ATCC 29192 (subsp. Pomaceae lectotype) and *Z. mobilis* sp. NCIB 11163. Sequencing of strain ZM4 (ATCC 31821) plasmids.' Principal Investigator: K. M. Pappas. Involved in preparing samples of ZM4 plasmid DNA for sequencing
2. US Department of Energy-Joint Genome Institute and NKUA collaboration (FY2010_CSP_52); 'Resequencing *Zymomonas mobilis* industrial strain ZM4. Sequencing *Zymomonas mobilis* transcriptomes'. Principal Investigator: K. M. Pappas. Involved in a) collection of samples from different growth conditions, b) RNA purifications at the laboratories of Wisconsin Energy Institute in collaboration with the GLBRC group of Prof. R. Landick, c) analysis of the results of the RNA sequencing in collaboration with the GLBRC group
3. EU/GSRT co-sponsored Research Program 'COOPERATION'. Academic-industrial collaboration framework between the National Technical University of Athens, the NKUA, the University of Thessaly, the Centre for Research and Technology Hellas (CERTH), AgrosBiosystems, Motor Oil Hellas, and Planning MC; topic: 'Sustainable Integrated Method for the Production of Lignocellulosic Ethanol -SIMPLE'. Network coordinator Prof. D. Kekos, NTUA. Involved in a) study of ethanol production from different *Z. mobilis* strains, b) strategies for cloning and expression of foreign genes in *Z. mobilis* cells, c) screening the viability and growth of different strains in different hydrolysates

4. MONOGRAPHS

1. BSc Dissertation, Faculty of Biology, NKUA – topic: 'Study of genes involved in homologous recombination in ethanol-producing bacterium *Z. mobilis*', under the supervision of Assistant Professor K.M. Pappas (Dept. of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, NKUA), 2009
2. MSc Thesis in 'Bioinformatics', Faculty of Biology, NKUA - topic: 'Study of DNA repair in the ethanol-producing *Zymomonas mobilis*', under the supervision of Assistant Professor K.M. Pappas (Dept. of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, NKUA), 2012
3. PhD Thesis, Faculty of Biology, NKUA – topic: 'Study of SOS response in the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*'. Supervision committee: Assistant Professor K.M. Pappas (Faculty of Biology, NKUA), Professor U. Kalnieks (Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia), Associate Professor A.I. Koukkou (Faculty of Chemistry, University of Ioannina), 2018

5. PRESENTATIONS - PUBLICATIONS

Publications

1. Pappas K.M., Kouvelis V.N., Saunders E., Brettin T.S., Bruce D., Detter C., Balakireva M., Han C.S., **Savvakis G.**, Kyrpidis N.C. and Typas M.A. (2011) Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* Lectotype Strain ATCC 10988. *J. Bacteriol.*, 193:5051-5052.
2. Yang S., Vera J.M., Grass J., **Savvakis G.**, Moskvina O.V., Yang Y., McIlwain S.J., Lyu Y., Zinonos I., Hebert A.S., Coon J.J., Bates D.M., Sato T.K., Brown S.D., Himmel M.E., Zhang

M., Landick R., Pappas K.M. and Zhang Y. (2018). Complete genome sequence and the expression pattern of plasmids of the model ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 8b and 2032 (*submitted in Biotechnology for Biofuels*)

Conference Presentations

- 1. Savvakis, I.**, Beletstiotis, E., Typas, M. A. & Pappas, K. M. (2009) ‘Construction of a *recA* knock-out strain for the ethanol – producing *Zymomonas mobilis* CP4’. 2nd National Conference of the Hellenic Society for Microbiology ‘Mikrobiokosmos’ (MBK2), Caravel, Athens, December 4-6, Greece, pp. 112-113
2. as in (1) (2010). 32nd Conference of the Hellenic Society for Biological Sciences (EEBE), Karpnisi, May 20-22, Greece, pp. 330-331 *Oral presentation*
- 3. Savvakis, I.** & Pappas, K. M. (2011) ‘Study of DNA repair in the bioethanol-producer *Zymomonas mobilis*’. 11th Bacterial Genetics and Ecology International Meeting (BAGECO11) with main theme “Microbial Genetics and Ecology inspire the Biotechnology of an Evolving Global Economy”, Corfu, 29 May-2 June, Greece, pp 61
- 4. Savvakis, G.** & Pappas, K. M. (2011) ‘Study of SOS regulation in the ethanologenic *Zymomonas mobilis*’. 6th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology & Bioinformatics (HSCBB), University of Patras Conference Center, Patras, October 7-9, Greece, pp 45. *Winner of the “Best Poster Award”*
5. as in (4) (2011). 4th National Conference of the Hellenic Society for Microbiology ‘Mikrobiokosmos’ (MBK4), Ioannina, October 21-23, Greece, pp. 28-29 *Oral presentation awarded*
- 6. Kouvelis, V. N., Savvakis, G.,** Saunders, E., Brettin, T. S., Detter, C., Han, C., Davenport, K., Tapia, R., Nolan, M., Balakireva, M., Bruce, D., Kyrpides, N., Typas M. A. & Pappas, K. M. (2011) ‘The complete genomes of ethanol-producing *Zymomonas mobilis* strains: Insights in comparative genomics’. 5th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics, ProkaGENOMICS 2011, Göttingen 18-21 September, Germany
- 7. Savvakis, G.** & Pappas, K. M. (2013) ‘Characteristics of a *recA* mutant and *in silico* analysis of SOS regulation in the ethanol-producing *Zymomonas mobilis*’. 5th congress of European Microbiologists, FEMS 2013, Leipzig, 21-25 July, Germany, pp. 285
- 8. Savvakis, G.** & Pappas, K. M. (2013) ‘SOS regulation in the bioethanol-producer *Zymomonas mobilis*’. 1st Hellenic Forum of Young Scientists of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Eugenides Foundation, Athens, 5 December, Greece, pp. 16 *Oral presentation*
9. as in (7) (2013). 64th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), Eugenides Foundation, Athens, 6-8 December, Greece, pp. 49
- 10. Logotheti M., Savvakis G.,** Tampakopoulou V.O., Pilalis E., Typas M. A., Pappas K.M. & Kolisis F. (2015) '*In silico* aided metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for improved ethanol production'. 6th National Conference of the Hellenic Society for Microbiology ‘Mikrobiokosmos’ (MBK6), National Hellenic Research Foundation, Athens, 3-5 April, Greece, pp. 195-6
- 11. Poulis P., Savvakis G.** & Pappas K.M. (2015) '*Preliminary study of recA and lexA regulation in Zymomonas mobilis using in vivo transcription assays*'. 66th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), Eugenides Foundation, Athens, 11-13 December, Greece, pp. 250
- 12. Savvakis, G.** & Pappas, K. M. (2016) '*Transcriptomic analysis of Zymomonas mobilis under*

SOS-induction'. 5th International Conference on Microbial Physiology and Genomics, Hilton Heathrow Hotel, London, 29-30 September, United Kingdom, pp. 43

13. as in 12 (2016). 4th Young Scientists Forum, "Karolos Papoulias" Conference Center, University of Ioannins, Ioannina, 24 November, Greece, pp. 108
14. as in 12 (2016). 67th Panhellenic Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), "Karolos Papoulias" Conference Center, University of Ioannins, Ioannina, 25-27 November, Greece, pp. 23 *Oral presentation*
15. **Savvakis G.**, Moysi K., Roussou M., Zhang M., Typas M.A., Hatzinikolaou D.G., Pappas K.M. (2017) 'Performance of *Zymomonas mobilis* C5/C6-sugar assimilating strains in ethanol production from Greek lignocellulosic biomass'. 39th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals (SBFC), San Francisco Marriott Marquis, San Francisco, 1-4 May, U.S.A.
16. Poulis P., **Savvakis G.**, Skrekas C. and Pappas K.M. (2017) 'Evidence for the LexA-dependent regulation of the *Zymomonas mobilis* *recA* and *lexA* genes'. 7th Conference of the Hellenic Society for Microbiology 'Mikrobiokosmos' (MBK6), National Hellenic Research Foundation, Athens, 7-9 April, Greece, pp. 166

6. ATTENDANCE AT WORKSHOPS AND SEMINARS

1. "Mikrobiokosmos and DNA microarrays: from theory to applications" supported by the EU FP7 European Program "MicrobeGR: Supporting Environmental Microbiology and Biotechnology Research Potential in Western Greece", University of Ioannina, Agrinio 24-26 March 2010, Greece
2. 2nd Summer School "Proteins: From the gene to the structure protein and more..." Coordinator: Prof. C.E. Vorgias. National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Athens 18-20 May 2012, Greece

7. KNOWLEDGE AND SKILLS

Skills

2011-2015: Guidance to Bachelor students during their BSc dissertations

2013-2015: Guidance and assistance to laboratory colleagues in the EU/GSRT co-sponsored Research Program 'COOPERATION'

2013-2016: Teaching assistance in the undergraduate student laboratory courses for "Genetics" (2nd year, Mutagenesis) and "Biotechnology" (4th year, Molecular Cloning)

Knowledge of laboratory techniques:

Genetic Engineering:

DNA digestion and restriction analysis – construction of restriction maps, DNA isolations (plasmid and total) and RNA isolation with and without using chromatography columns (mini and midi prep), cloning, polymerase chain reaction – PCR (hot start, thermal cycle sequencing etc), DNA gel extraction, Southern blots (vacuum blotting), hybridizations with non-radioactive probes (DIG probes), analysis of sequencing results from Licor analyzer, quantification of nucleic acids via NanoDrop

Microbiology:

Construction of bacterial growth curves, study of bacterial viability using UV radiation or chemical mutagens, transformation of bacterial cells by electroporation or by heat-shock method, conjugation of bacterial cells using nitrocellulose filters, chemical mutagenesis, Tn5 mutagenesis, measurement of quantities of ethanol using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Gas Chromatography (GC), screening the growth of bacterial strains in different hydrolysates via high throughput techniques

Biochemistry:

Measuring concentrations of reducing sugars with DNS and GOD-PAP methods, measuring beta-galactosidase activity with Miller assays, blood tests with the clinical chemistry analyzer ARCITECT c16000/c8000 (Abbott Diagnostics), serum protein electrophoresis

Knowledge of computer:

- Sequence analysis tools: Clustal Omega, BLAST, Lasergene-DNAStar, FITOM, WebLogo 3
- RNA Sequencing analysis tools: BWA, Cufflink, GLSeq, IGV
- Molecule visualization tools: PyMol, WHATIF
- Data bases and online search tools: GenBank, UniProt-SwissProt-TrEMBL, PROSITE, PDB, CATH, SCOP, SRS, Entrez, PubMed
- Programming languages C, PERL, Java, R
- Knowledge at operating Linux operating system
- Word processor tools: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint

Languages: **English:** Proficiency – University of Cambridge
 Proficiency – University of Michigan

8. MEMBER OF SOCIETIES AND ASSOCIATIONS

2005-: Hellenic Society for Biological Sciences

2008-: Hellenic Society for Microbiology ‘Mikrobiokosmos’

2009-: Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology

2009-: Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics

