

# Γονιδιωματική Μικροοργανισμών

Δημήτρης Καρπούζας

# Για τι θα μιλήσουμε σήμερα;

- Γονιδιώματα βακτηρίων – *παραδείγματα συναρμολογημένων γονιδιωμάτων*
- Γονιδιώματα μυκήτων
- Γονιδιώματα βακτηρίων που συμβιώνουν σε μύκητες
- Μεταγονιδίωμα – *παραδείγματα και κέρδη*
- Πλασμιδίωμα (plasmidome)

# Γονιδιώματα Βακτηρίων

## Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* Strain CT-43<sup>∇</sup>

Jin He,<sup>1\*</sup> Jieping Wang,<sup>1</sup> Wen Yin,<sup>1</sup> Xiaohu Shao,<sup>1</sup> Huajun Zheng,<sup>2</sup> Mingshun Li,<sup>1</sup> Youwen Zhao,<sup>1</sup> Ming Sun,<sup>1</sup> Shengyue Wang,<sup>2</sup> and Ziniu Yu<sup>1\*</sup>

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, No. 1 Shizishan St., Wuhan, Hubei 430070, People's Republic of China,<sup>1</sup> and Chinese National Human Center at Shanghai, 250 Bi Bo Road, Shanghai 201203, People's Republic of China<sup>2</sup>

Received 14 April 2011/Accepted 25 April 2011

**BMC Genomics**



Research article

Open Access

### *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications

Jorge Valdés<sup>1</sup>, Inti Pedroso<sup>1</sup>, Raquel Quatrini<sup>1</sup>, Robert J Dodson<sup>2</sup>, Herve Tettelin<sup>2,3</sup>, Robert Blake II<sup>6</sup>, Jonathan A Eisen<sup>2,4,5</sup> and David S Holmes\*<sup>1</sup>



GENOME ANNOUNCEMENT



### Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Strain 407

Anna E. Sheppard,<sup>a</sup> Anja Poehlein,<sup>b</sup> Philip Rosenstiel,<sup>c</sup> Heiko Liesegang,<sup>b</sup> Hinrich Schulenburg<sup>a</sup>

Department of Evolutionary Ecology and Genetics, Zoological Institute, Christian-Albrechts University of Kiel, Kiel, Germany<sup>a</sup>; Goettingen Genomics Laboratory, Institute of Microbiology and Genetics, Georg-August-University of Goettingen, Goettingen, Germany<sup>b</sup>; Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts University of Kiel, Kiel, Germany<sup>c</sup>

H.L. and H.S. contributed equally to this article.

*Bacillus thuringiensis* is an insect pathogen that has been used widely as a biopesticide strain 407 Cry-, which is used to study the genetic determinants of pathogenicity. The genome contains nine plasmids, including a novel 502-kb megaplasmid.

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Oct. 2011, p. 5541–5542

0021-9193/11/\$12.00 doi:10.1128/JB.05663-11

Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 193, No. 19

### Complete Genome Sequence of the Nicotine-Degrading *Pseudomonas putida* Strain S16

Hao Yu,<sup>†</sup> Hongzhi Tang,<sup>†</sup> Lijuan Wang, Yuxiang Yao, Geng Wu, and Ping Xu\*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism and School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, People's Republic of China

Received 25 June 2011/Accepted 18 July 2011

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, May 2003, p. 2759–2773

0021-9193/03/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JB.185.9.2759-2773.2003

Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 185, No. 9

### Complete Genome Sequence of the Ammonia-Oxidizing Bacterium and Obligate Chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*<sup>†</sup>

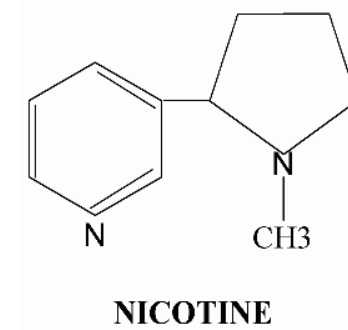
Patrick Chain,<sup>1,2</sup> Jane Lamerdin,<sup>1,2</sup> Frank Larimer,<sup>1,3</sup> Warren Regala,<sup>1,2</sup> Victoria Lao,<sup>1,2</sup> Miriam Land,<sup>1,3</sup> Loren Hauser,<sup>1,3</sup> Alan Hooper,<sup>4</sup> Martin Klotz,<sup>5</sup> Jeanette Norton,<sup>6</sup> Luis Sayavedra-Soto,<sup>7</sup> Dave Arciero,<sup>4</sup> Norman Hommes,<sup>7</sup> Mark Whittaker,<sup>4</sup> and Daniel Arp<sup>7\*</sup>

Joint Genome Institute, Walnut Creek, California 94598<sup>1</sup>; Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, California 94550<sup>2</sup>; Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee 37831<sup>3</sup>; University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55455<sup>4</sup>; University of Louisville, Louisville, Kentucky 40208<sup>5</sup>; Utah State University, Logan, Utah 84322<sup>6</sup>; and Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331<sup>7</sup>

# Γονιδιωματική ανάλυση βακτηρίων

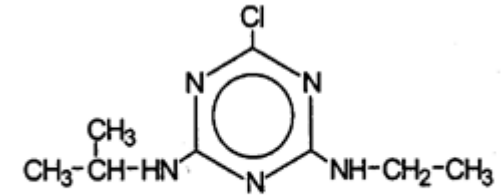
- **Βακτήρια που αποδομούν οργανικούς ρύπους**
  - *Pseudomonas putida* S16
  - *Arthrobacter aurescens*
- **Βακτήρια που χρησιμοποιούνται στην γεωργία**
  - *Bacillus thuringiensis*
  - *Burkholderia phytofirmans*
- **Βακτήρια που έχουν απομονωθεί και αναλυθεί στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

# *Pseudomonas putida* S16



- Αποδομεί την νικοτίνη
- Το γονιδίωμα αποτελείται από ένα χρωμόσωμα 5.98 MB χωρίς πλασμίδια και **περιεκτικότητα σε GC 62.8%**
- 5218 πιθανά γονίδια / 4058 γονίδια με διευκρινισμένο λειτουργικό ρόλο
- **29 γενωμικές νησίδες** με την μεγαλύτερη να έχει μέγεθος 44 Kb με 8 τρανσποζάσες, **περιεκτικότητα σε GC 52.4%** και περιέχει τα γονίδια για την αποδόμηση της νικοτίνης

# *Arthrobacter aurescens* TC1



- Απομονώθηκε από έδαφος σε περιοχή απόρριψης αποβλήτων από **atrazine** φαρμακοβιομηχανίες και είχε την ικανότητα να αποδομεί τριαζίνες (atrazine)
- Χρωμόσωμα 4.6 MB και δύο πλασμίδια PTC1 (408 KB) και PTC2 (300 KB)
- 10% gene duplication: στρατηγική για προσαρμογή στο περιβάλλον όπως ανθεκτικότητα σε μέταλλα, μεταβολισμό οργανικών μορίων για ενέργεια
- 11 γενωμικές νησίδες (vs 109 *P. putida* KT2440!!) και μόνο 2 από αυτές περιέχουν μεταθετά στοιχεία (vs 29 *P. putida* KT2440)



***To Arthrobacter ακολουθεί διαφορετική στρατηγική για να προσαρμόζει τις μεταβολικές του ανάγκες στο περιβάλλον (gene duplication) έναντι των Pseudomonas που χρησιμοποιούν την οριζόντια γονιδιακή μεταφορά ως αντίστοιχο μηχανισμό προσαρμογής***

# *Bacillus thuringiensis* στέλεχος CT43

- Εντομοπαθογόνο βακτήριο που παράγει τρεις διαφορετικές κρυσταλλικές τοξίνες με δράση εναντίων Λεπιδοπτέρων και Διπτέρων εντόμων
- 5.5 MB κυκλικό χρωμόσωμα με περιεκτικότητα σε GC 35.4%
- 10 πλασμίδια!! με μέγεθος από 6.9 – 281 Kb και περιεκτικότητα σε GC 30.8-35%
- Το μεγαλύτερο πλασμίδιο (pCT281) περιέχει μια γενωμική νησίδα με 4 γονίδια cry και το δεύτερο μεγαλύτερο (PCT127) περιέχει ένα γονίδιο cry και το μονοπάτι βιοσύνθεσης μια νέας τοξίνης με εντομοκτόνο δράση 'thuringiensin'

# *Burkholderia phytofirmans*

- Ενδοφυτικό βακτήριο που προάγει την φυτική ανάπτυξη
- 8.2 Mb δύο χρωμοσώματα και ένα πλασμίδιο
- Περιεκτικότητα σε GC 62.3%
- Χρωμόσωμα 1: Βασικές κυτταρικές λειτουργίες
- Χρωμόσωμα 2: Βοηθητικές λειτουργίες (ανθεκτικότητα σε μέταλλα και προστασία από καταπονήσεις κτλ)
- Πλασμίδιο: >70% γονίδια με άγνωστη λειτουργία



## ***Burkholderia phytofirmans* – Πως προάγει την φυτική ανάπτυξη?**

- *ACC deaminase*
- Δύο μονοπάτια βιοσύνθεσης IAA: *3-acetamide pathway & tryptophan side chain oxidation pathway*)
- Δεν παράγει αντιβιοτικά
- Δεν αζωτοδεσμεύει

## ***Burkholderia phytofirmans* – Πως εισέρχεται στο φυτό?**

- Πλούσιο γονιδίωμα σε κυτταρινάσες και ενδογλυκανάσες που εμπλέκονται στην λύση του κυτταρικού τοιχώματος φυτικών κυττάρων
- *Flagella proteins*

## Γονιδιωματική ανάλυση *Sphingomonads*.....

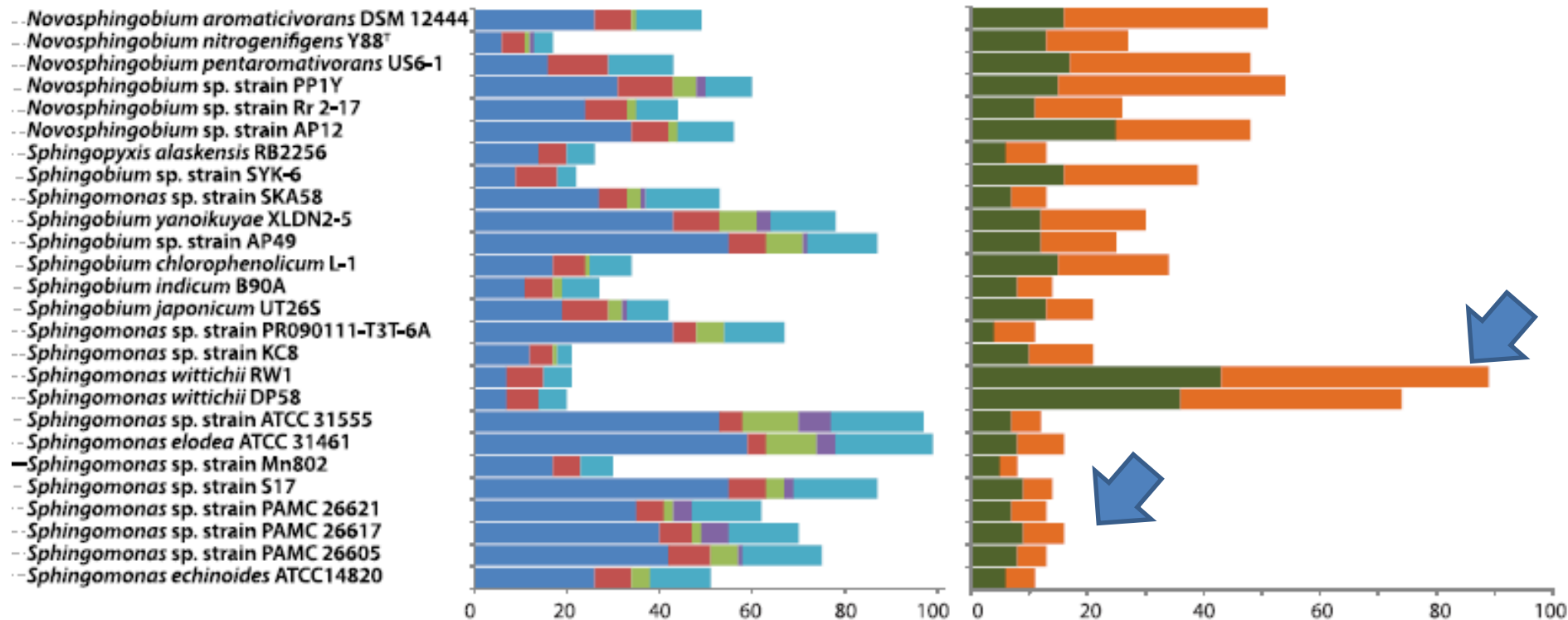
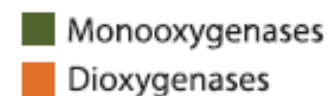
- Α-proteobacteria και περιλαμβάνει τα γένη *Sphingomonas*, *Sphingorhysis*, *Novosphingobium*, *Sphingobium*
- Ολιγότροφα βακτήρια που αποτελούν σημαντικούς αποδομητές οργανικών ρύπων
- Κατέχουν συνήθως ένα κυκλικό χρωμόσωμα και πλασμίδια ή μεγαπλασμίδια στα οποία εντοπίζονται κυρίως οπερόνια που εμπλέκονται στην αποδόμηση οργανικών ρύπων, πολυσακχαρίδιων και γενικότερα προσαρμογής στο περιβάλλον

## Glycoside Hydrolases

### Predicted Substrate



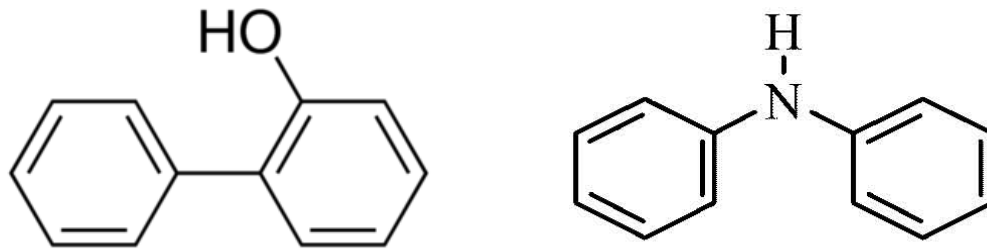
## Oxygenases



- Μεγάλος αριθμός οξυγενασών ή και υδρολασών γλυκοσιδίων
- Τα βακτήρια που έχουν μεγάλο αριθμό οξυγενασών εμφανίζουν μικρό αριθμό υδρολασών γλυκοσιδίων και αντίστροφα

# Γονιδιωματική ανάλυση βακτηρίων στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

- *Sphingomonas haloaromaticans*: Απομονώθηκε από έδαφος με πολυετή ρύπανση από το μυκητοκτόνο orthophenylphenol



- *Pseudomonas putida*: Απομονώθηκε από έδαφος με πολυετή ρύπανση από το αντιοξειδωτικό και συντηρητικό diphenylamine

## *S. haloaromaticans* OPP

- 4.8 Mb γονιδίωμα που συναρμολογήθηκε σε 3 ικριώματα: 4.5MB, 191 Kb, 90.7 Kb
- Γονιδιωματική ανάλυση εντόπισε 4 οπερόνια στα ικριώματα 1 και 3 με πιθανό λειτουργικό ρόλο στην αποδόμηση του OPP

## I. *ben/cat* (*ortho* pathway: benzoic acid degradation)

ShP3_01127	3-oxoadipate enol-lactonase 2 (pcaD)
ShP3_01128	Beta-ketoadipyl-CoA thiolase (pcaF)
ShP3_01129	putative succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase subunit B (pcaJ)
ShP3_01130	putative succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase subunit A (pcaI)
ShP3_01131	Glucose 1-dehydrogenase B (BenD)
ShP3_01132	Benzoate 1,2-dioxygenase electron transfer component (BenC)
ShP3_01133	2-halobenzoate 1,2-dioxygenase small subunit (BenB)
ShP3_01134	2-halobenzoate 1,2-dioxygenase large subunit (BenA)
ShP3_01135	Catechol 1,2-dioxygenase (catA)
ShP3_01136	Muconolactone Delta-isomerase (catC)
ShP3_01137	Muconate cycloisomerase 1 (catB)

Ικρίωμα 1

ShP3_04546	<b>Tn3 transposase DDE domain protein</b>
ShP3_04549	Beta-ketoadipyl-CoA thiolase (pcaF)
ShP3_04550	3-oxoadipate enol-lactonase 2 (pcaD)
ShP3_04551	putative succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase subunit B (pcaJ)
ShP3_04552	putative succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase subunit A (pcaI)
ShP3_04553	Levodione reductase (benD)
ShP3_04554	2-halobenzoate 1,2-dioxygenase small subunit (benB)
ShP3_04555	2-halobenzoate 1,2-dioxygenase large subunit (benA)
ShP3_04556	Catechol 1,2-dioxygenase 1 (catA)
ShP3_04557	Muconolactone Delta-isomerase (catC)
ShP3_04558	Muconate cycloisomerase 1 (catB)
ShP3_04559	HTH-type transcriptional regulator BenM
ShP3_04563	<b>Integrase core domain protein</b>
ShP3_04572	2-hydroxy-6-oxononadienedioate/2-hydroxy-6-oxononatrienedioate hydrolase
ShP3_04573	2,4-dichlorophenol 6-monooxygenase (putative hbpA)
ShP3_04576	3-methylcatechol 2,3-dioxygenase (putative hbpC)
ShP3_04577	2-hydroxymuconate semialdehyde hydrolase (putative hbpD)
ShP3_04578	2-keto-4-pentenoate hydratase (bphH)
ShP3_04579	Acetaldehyde dehydrogenase (bphJ)
ShP3_04580	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (bphI)
ShP3_04582	<b>Transposase</b>
ShP3_04583	<b>Integrase core domain protein</b>
ShP3_04584	<b>Integrase core domain protein</b>
ShP3_04585	2,4-dichlorophenol 6-monooxygenase (putative hbpA)
ShP3_04587	2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)hexa-2,4-dienoic acid hydrolase (HbpD)
ShP3_04590	Benzene 1,2-dioxygenase subunit alpha (bphA1)
ShP3_04591	Biphenyl dioxygenase subunit beta (bphA2)
ShP3_04592	Biphenyl dioxygenase ferredoxin subunit (bphA3)
ShP3_04593	Benzene 1,2-dioxygenase system ferredoxin--NAD(+) reductase subunit (bphA4)
ShP3_04594	Cis-2,3-dihydrobiphenyl-2,3-diol dehydrogenase (bphB)
ShP3_04595	2-keto-4-pentenoate hydratase (BphH)
ShP3_04597	<b>Tn3 transposase DDE domain protein</b>



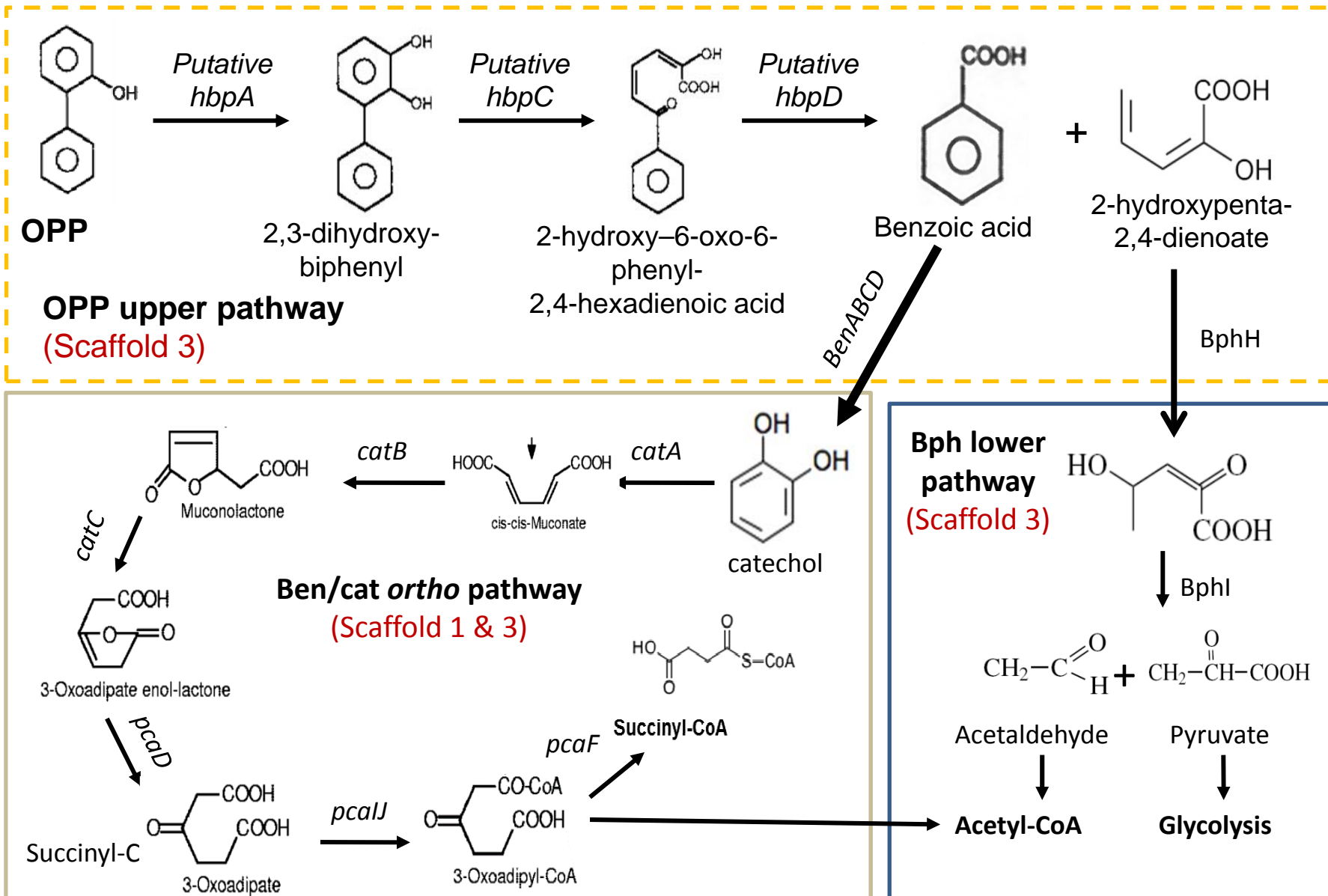
Ικρίωμα\_3

II. *ben/cat ortho* pathway: benzoic acid degradation

III. OPP upper pathway + *bph* (*biphenyl*) lower pathway

IV. OPP upper pathway + *bph* upper pathway

# Πρόβλεψη Μεταβολικού Μονοπατιού βασιζόμενη στην γονιδιωματική ανάλυση





## Τι βλέπουμε από την γονιδιωματική ανάλυση.....

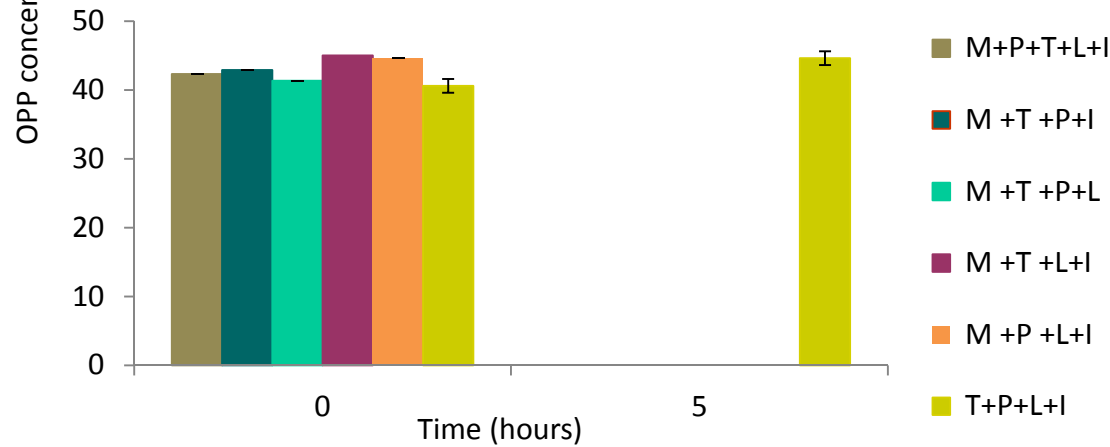
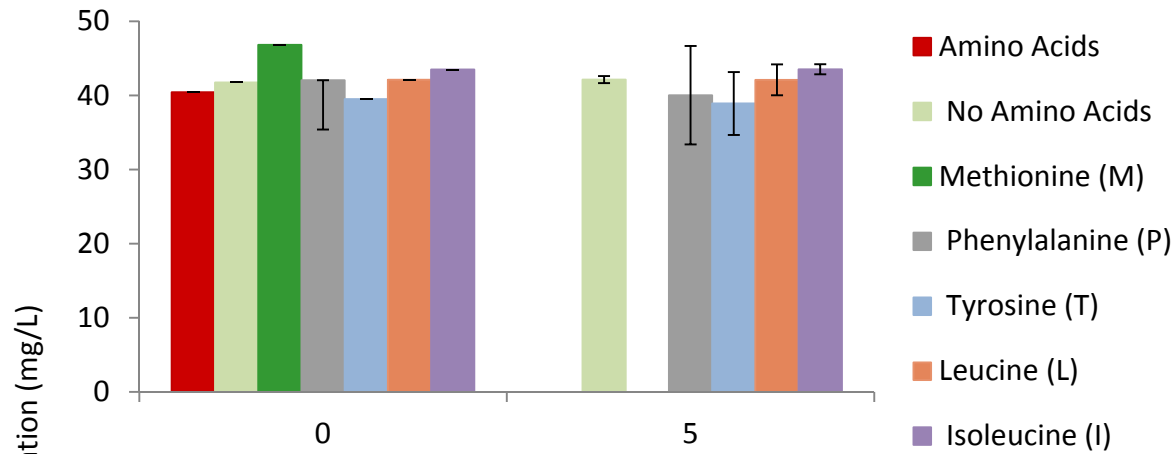
- Το στέλεχος *S. haloaromaticans* έχει δύο οπερόνια με την ίδια οργάνωση και την ίδια λειτουργία (ben/cat operons) και ομολογία των αντίστοιχων γονιδίων 70-80% σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας
- 3 από τα 4 καταβολικά οπερόνια περιέχουν τρανσποζάσες



**Οριζόντια Γονιδιακή Μεταφορά**



# Ποιά ή ποια από αυτά τα αμινοξέα τελικά χρειάζεται?



**Μεθειονίνη**

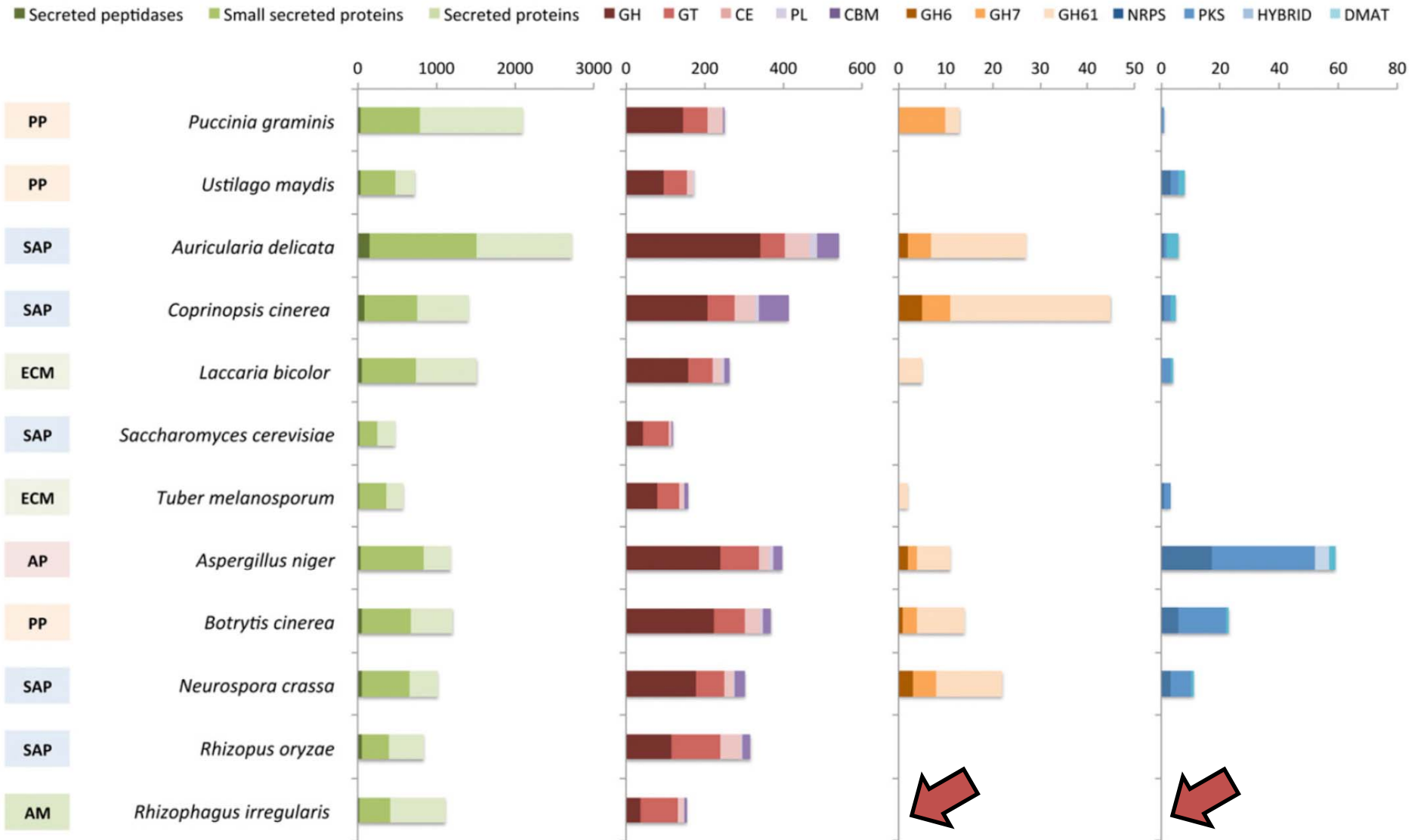
# Γονιδιωματική Μυκήτων

## Το γονιδιωμα του *Rhizorhagus irregularis*

- Συναρμολογημένο γονιδίωμα 101 Mb
- ‘Φτωχό’ σε γονίδια που εμπλέκονται στον δευτερογενή μεταβολισμό (πχ. τοξίνες κτλ)
- ‘Φτωχό’ σε γονίδια που εμπλέκονται στην αποδόμηση κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων
- ‘Φτωχό’ σε γονίδια όπως *invertases* και *sucrose transporters*
- ‘Πλούσιο’ σε γονίδια που εμπλέκονται στην αφομμίωση N και S

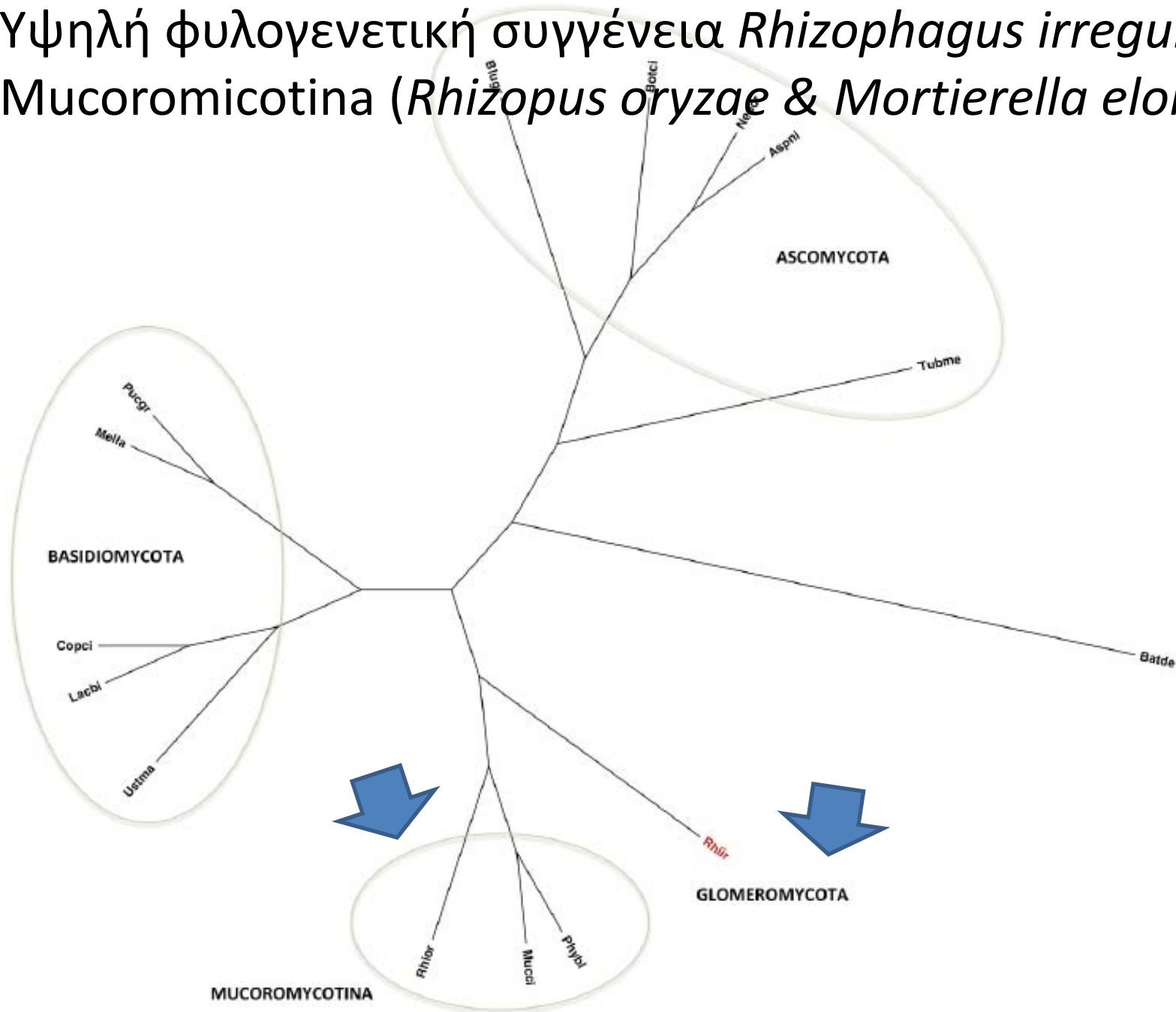


Εξελικτική προσαρμογή του γενετικού υλικού ως ‘υποχρεωτικός συμβιωτής’



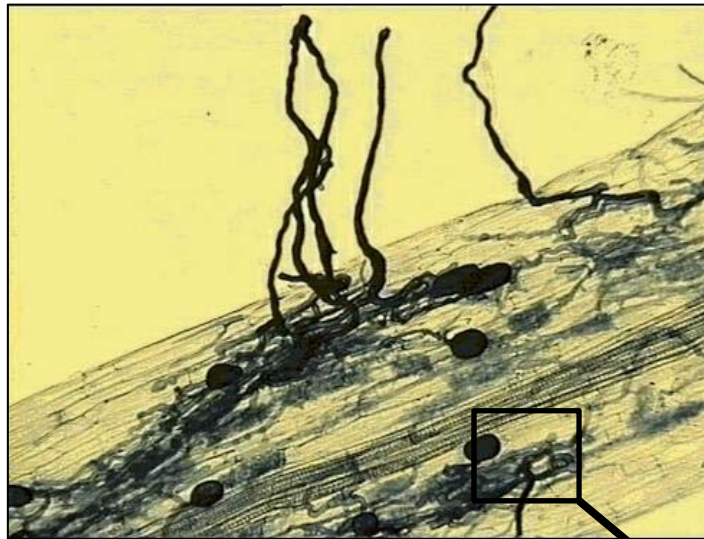
Tisserant et al. (2013) PNAS 110(50):20117-20122

# Υψηλή φυλογενετική συγγένεια *Rhizophagus irregularis* & Mucoromicotina (*Rhizopus oryzae* & *Mortierella elongata*)

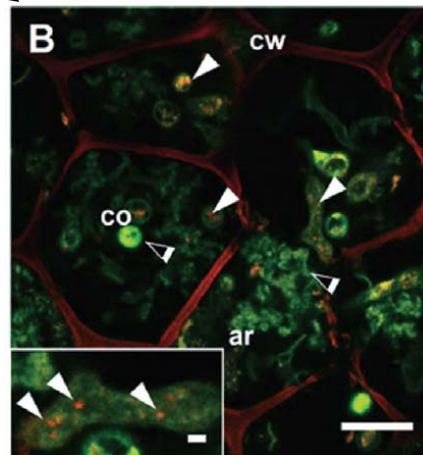


# Γονιδιώματα βακτηρίων που συμβιώνουν με δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες

Φυτά – Δενδρόμορφοι Μυκορριζικοί Μύκητες



Δενδρόμορφοι Μυκορριζικοί  
Μύκητες –  
Βακτήρια (Κλάση Mollicutes)

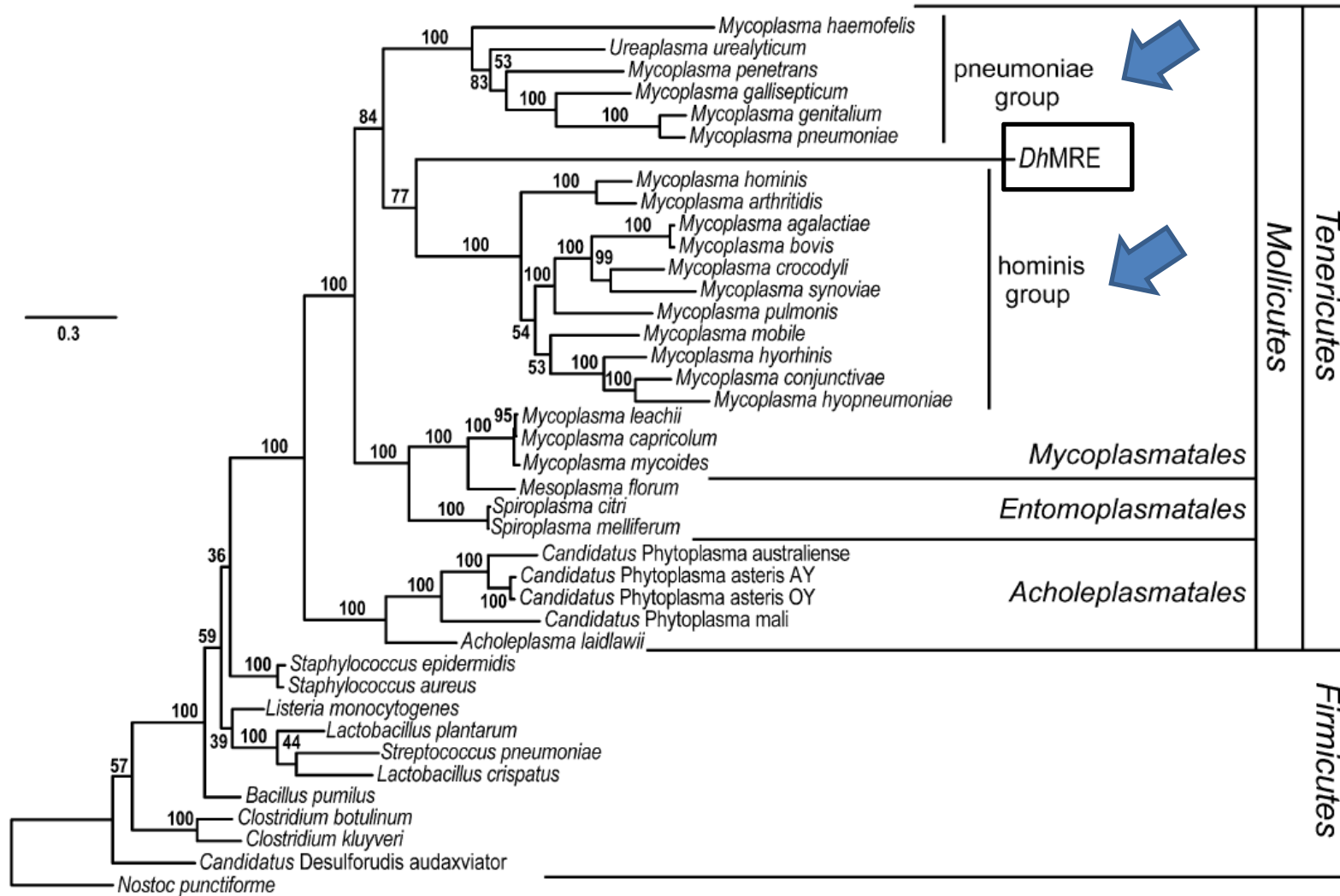


Τριμερής Συμβιωτική Σχέση

- Φυτά
- Μύκητες
- Βακτήρια





# Ενδομυκορριζικά Mollicutes

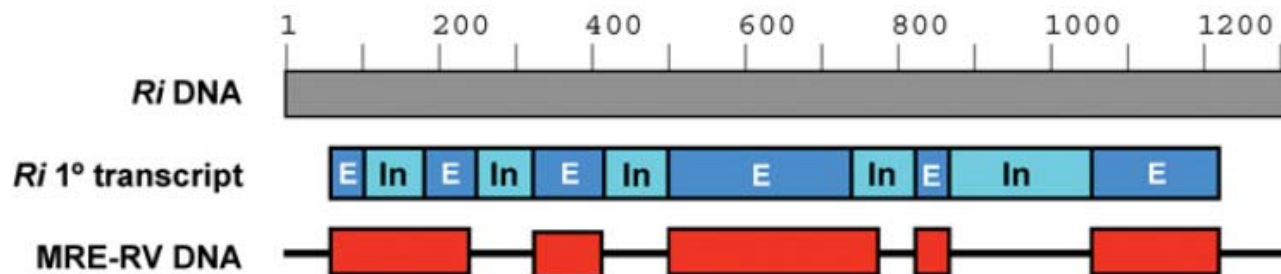


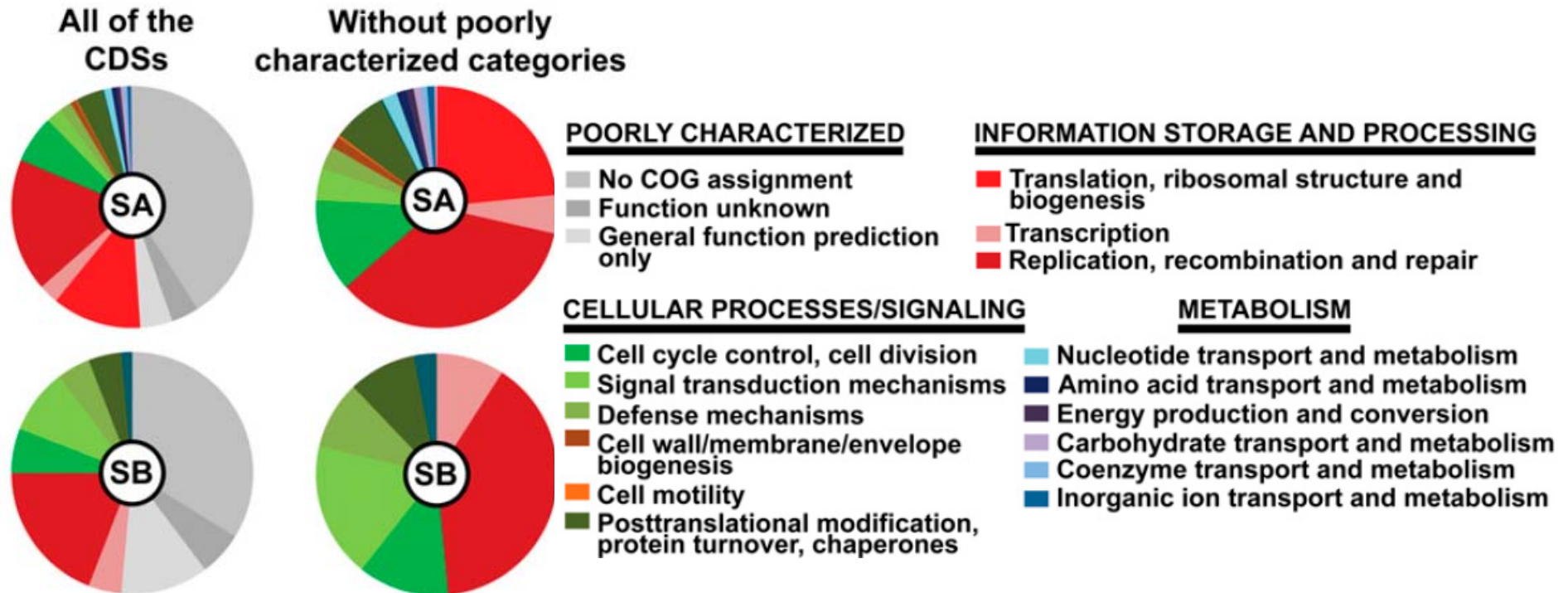
**Φυλογενετικά συγγενείς μυκοπλασμάτων που προκαλούν σοβαρές ασθένειες σε ανώτερους ζωικούς οργανισμούς**



# Ενδομυκορριζικά Mollicutes

- Τα μικρότερα γνωστά βακτήρια που δεν έχουν κυτταρικά τοιχώματα
- Μικρό μέγεθος γονιδιώματος (**663, 709, 740** και **1228 kb**) με GC content 32-34%  *Χαρακτηριστικό στην εξέλιξη υποχρεωτικά συμβιωτικών μικροοργανισμών*
- 3-5% των γονιδίων τους προέρχονται από τον ΔΜΜ που τα φιλοξενεί μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς  *Τα χρειάζονται για να αλληλεπιδρούν με τους ΔΜΜ*





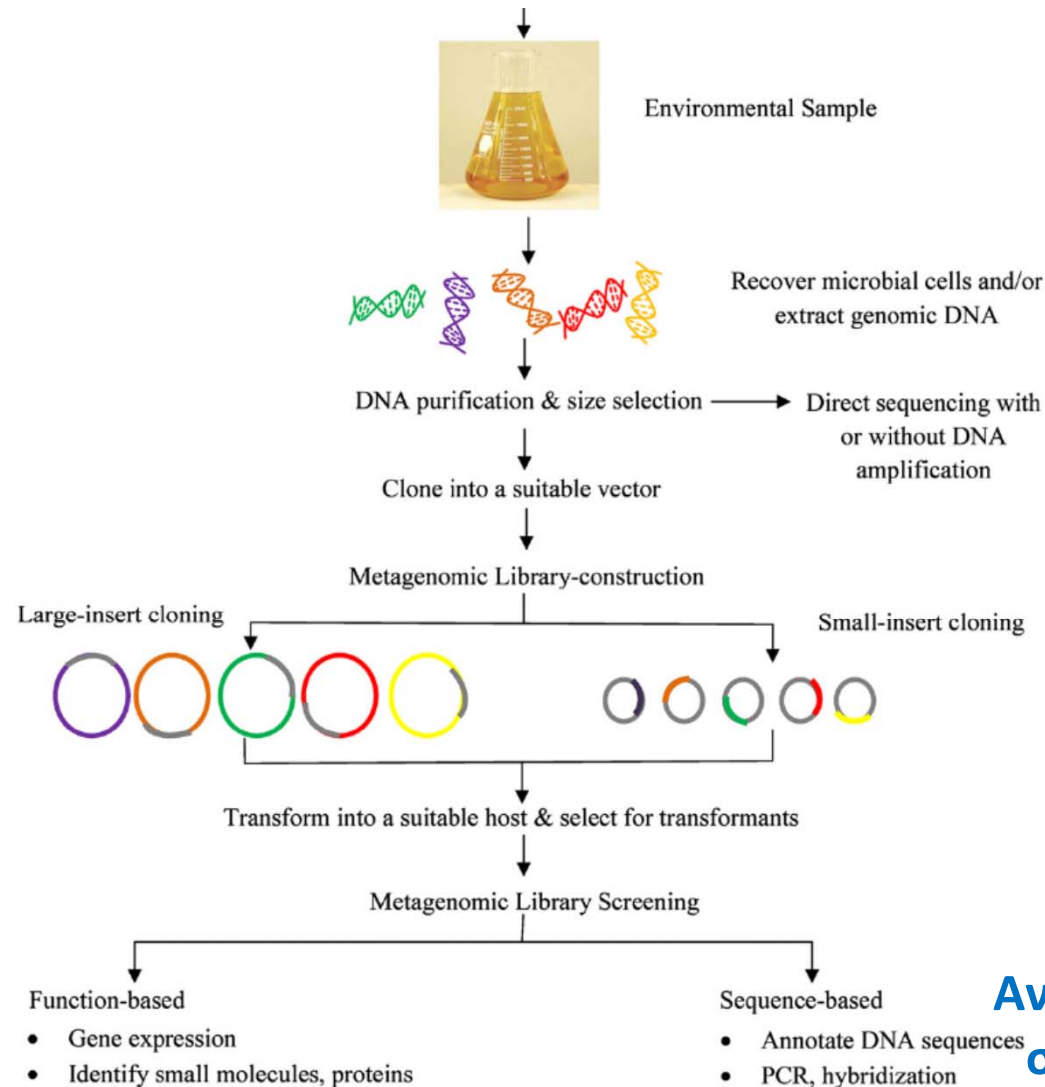
- Δεν κατέχουν γονίδια για οξειδωτική φωσφορυλίωση, σύνθεση αμινοξέων και νουκλεοτιδίων, κύκλο του Krebs, DNA/RNA polymerases
- Για > 50% των γονιδίων τους δεν βρέθηκε λειτουργικός ρόλος



**Μεταβολική εξάρτηση από τον ΔΜΜ που τα φιλοξενεί**



## Στρατηγικές Μεταγονιδιωμάτικης



**Λειτουργική  
Ανάλυση**

**Ανάλυση βασιζόμενη  
στην αλληλούχιση**

# Μεταγονιδιωματική

- Ανάλυση μεταγονιδιωμάτων βασιζόμενων στην αλληλούχηση

Μπορεί να ελεγχθούν διαφορετικά γονίδια-στόχοι με την ίδια μέθοδο  
Συνήθως δεν οδηγεί σε ανακάλυψη νέων γονιδίων / ενζύμων με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον

- Λειτουργική ανάλυση μεταγονιδιωμάτων

Οδηγεί σε ανακάλυψη Νέων και Πλήρως λειτουργικών ενζύμων με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον

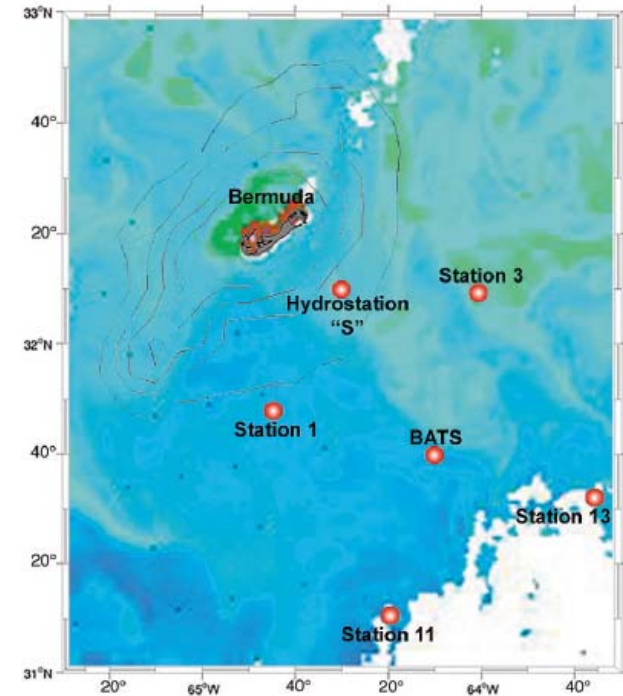
Η επιτυχία της στηρίζεται στην ύπαρξη απλού και γρήγορου φαινοτυπικού τεστ και στην επιτυχή έκφραση του ενζύμου στόχου στον ετερόλογο φορέα

# Ανάλυση μεταγονιδιωμάτων βασισόμενη στην αλληλούχιση

- Μαζική αλληλούχιση του μεταγονιδιώματος της θάλασσας των Σαρκασών
- 1.36 Gb και 265 Mbp συνολικό μέγεθος του μεταγονιδιώματος που αλληλουχήθηκε
- Βιοπληροφορική ανάλυση για την συναρμολόγηση γονιδιωμάτων γονιδιωμάτων μικροοργανισμών (binning)



*Σε ένα ικρίωμα που ανήκει σε Αρχαία περιέχονταν μια μονοξυγενάση της αμμωνίας (amoA) που αποτέλεσε το έναυσμα για την μελέτη των Κρεναρχαίων ως νιτροποιητές*



# Λειτουργική Μεταγονιδιωματική

- Χαμηλά ποσοστά επιτυχία (πχ. 1/100000 fosmid clones) σε πολύπλοκα μεταγονιδιώματα

**Table 1**  
**Activity-based approach to screen enzymes in the period 2007 to early 2009**

Environment	Target gene	Host, vector	Average size of insert (kb)	# of positives/# of screened clones	1 positive/Mb DNA screened	Assay technique	Reference
Compost	Esterase	<i>E. coli</i> , plasmid	3.2	14/21 000	1/4.8	Agar plate assay	[7*]
	Amylase			13/31 967	1/7.9		
	Phosphatase			38/31 967	1/2.7		
	Dioxygenase			2/31 967	1/51.1		
	Protease			0/31 967	0/102.3		
Compost (artificially contaminated with poly-lactic acid disks)	Esterase	<i>E. coli</i> , plasmid	2.5	3/40 000	1/33.3	Agar plate assay	[8]
Soil (nonspecified)	Xylanase	<i>E. coli</i> , plasmid	8.5	1/24 000	1/204	Agar plate assay	[9]
Loam soil	Oxygenase	<i>E. coli</i> , plasmid	5.5	1/65 000	1/357.5	Agar plate assay	[10]
Mining shaft, compost soil, sediments (sewage plant, sea, lake, and river)	Protease	<i>E. coli</i> , plasmid	4.0	4/389 000	1/389	Agar plate assay	[11]
Gypsy moth midgut	Production of <i>N</i> -acylhomoserine lactons	<i>E. coli</i> , plasmid	3.3	1/800 000	1/2640	Reporter assay	[12]
Rhizosphere soil from near side of acid mine drainage	Nickel resistance	<i>E. coli</i> , plasmid	2.5	13/726 500	1/139.7	Growth assay	[13]
Glacial ice	DNA polymerase I	<i>E. coli</i> , plasmid	4	230/230 000	1/4	Growth assay	[14*]
Ground water from crude-oil storage cavity	Aromatic hydrocarbon catabolic operon	<i>E. coli</i> , plasmid	7	35/152 000	1/30.4	Reporter assay	[15]
Intertidal flat sediment	Lipase	<i>E. coli</i> , fosmid	N.A. <sup>a</sup>	1/6000		Agar plate assay	[16]
Deep-sea sediment	Lipase	<i>E. coli</i> , fosmid	32.3	1/8823	1/285	Agar plate assay	[17]
Activated sludge treating coke plant wastewater	Extradiol dioxygenase	<i>E. coli</i> , fosmid	33	91/96 000	1/34.8	Cell lysate assay	[18*]
Soil (pasture)	Degradation of <i>N</i> -acylhomoserine lactons	<i>E. coli</i> , fosmid	35	1/10 121	1/354.2	Reporter assay	[19]
Activated sludge treating coke plant wastewater	Bleomycin resistance gene	<i>E. coli</i> , fosmid	33	3/96 000	1/1056	Growth assay	[20]
Forest rhizosphere soils	Fungal antagonism	<i>E. coli</i> , fosmid	35	1/113 700	1/3979.5	Growth inhibition	[21]
Human fecal from healthy parson and patients of Crohn's disease	Epithelial cell growth modulation	<i>E. coli</i> , fosmid	43	20/20 725 (inhibition) 30/20 725 (stimulation)	1/44.6 (inhibition) 1/29.7 (stimulation)	Cell lysate assay	[22]
Glacial ice	DNA polymerase I	<i>E. coli</i> , fosmid	36	20/4000	1/7.2	Growth assay	[14*]
Surface seawater	Esterase	<i>E. coli</i> , BAC	70	4/20 000	1/350	Agar plate assay	[23]
Pig fecal	Tetracycline-resistance gene	<i>E. coli</i> , BAC	15	10/9000	1/13.5	Growth assay	[24]
Rabbit cecum	Cellulase	<i>E. coli</i> , cosmid	35.1	11/32 500	1/103.7	Agar plate assay	[25]
Soil (wetland and sandbars)	4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	<i>E. coli</i> , cosmid	40	5/30 000	1/240	Liquid-based assay	[26]
Cow rumen	Mannanase/glucanase/xylanase	<i>E. coli</i> , phagemid	3	1/50 000	1/150	Agar plate assay	[27]
Soil	Degradation of <i>N</i> -acylhomoserine lactons	<i>E. coli</i> , phagemid	4.3	3/7392	1/10.60	Reporter assay	[28]
Oil-contaminated soil	Naphthalene dioxygenase	<i>Pseudomonas putida</i> , cosmid	25	2/24 000	1/300	Growth assay	[29]

# Λειτουργική Μεταγονιδιωματική

Καθοριστική η επιλογή του φορέα για την δημιουργία της βιβλιοθήκης

- Πλασμίδια (5 kb ένθεμα)
- Κοσμίδια (40-50 kb ένθεμα)
- **Φοσμίδια (40-50 kb ένθεμα)**
- BACs (100 kb ένθεμα)



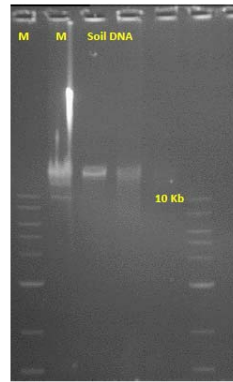
# Λειτουργική Μεταγονιδιωματική

- **Κύριος στόχος:** Η απομόνωση νέων ενζύμων με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον όπως **λιπάσες, χιτινάσες, εστεράσες**

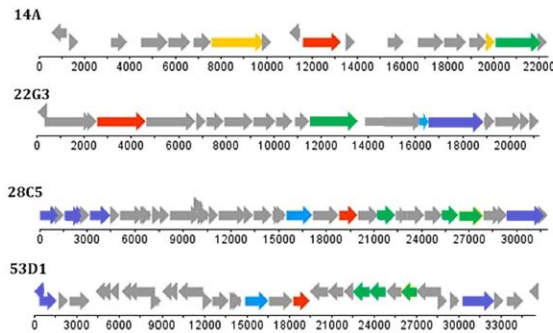
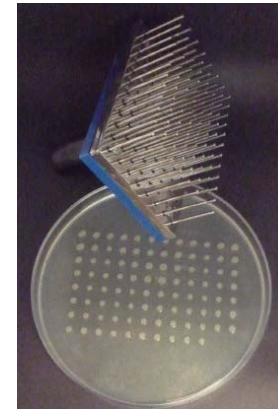
**Ποια είναι τα κύρια βήματα για την λειτουργική μεταγονιδιωματική ανάλυση;**



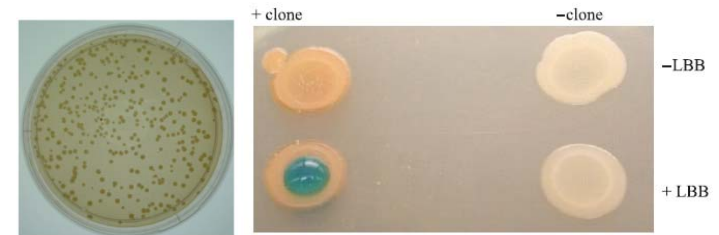
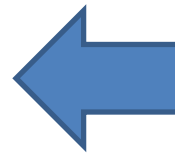
Απομόνωση DNA  
μεγάλου μοριακού  
βάρους > 40 kb



Ένθεση σε πλασμίδια,  
φοσμίδια, τεχνητά  
χρωμοσώματα  
βακτηρίων και  
μετασχηματισμός σε  
*E.coli* ή *Streptomyces*

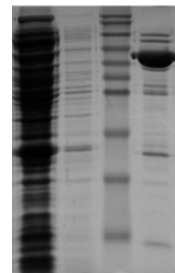


Αλληλούχιση  
θετικών κλώνων &  
εντοπισμός  
γονιδίων με τον  
φαινότυπο - στόχο



Έλεγχος μεγάλου αριθμού κλώνων  
μέσω απλών χρωματομετρικών  
ΤΕΣΤ

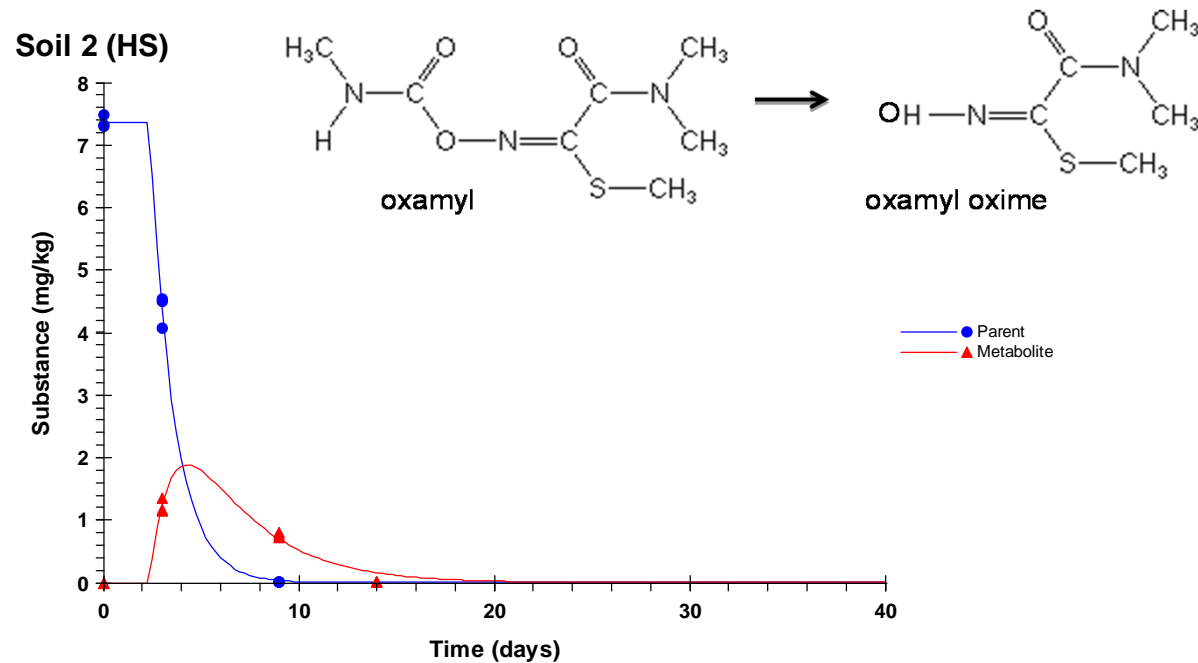
Απομόνωση, ετερόλογη  
υπερέκφραση και  
καθαρισμός των επιλεγμένων  
πρωτεϊνών



# Παράδειγμα λειτουργικής μεταγονιδιωματικής ανάλυσης

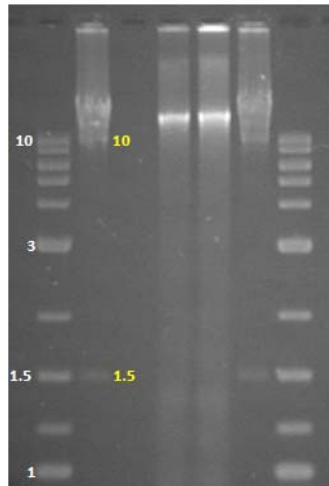
- **Στόχος:** Απομόνωση εστερασών υπεύθυνων που αποτοξικοποιούν και υδρολύουν νευροτοξικά γεωργικά φάρμακα
- **Βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον:** Η δημιουργία αντιδότην για την αντιμετώπιση περιστατικών οξείας τοξικότητας από έκθεση σε καρβαμιδικά
- **Πηγή νέων ενζύμων:** Έδαφος που παρουσιάζει ικανότητα να αποδομεί / υδρολύει ταχύτατα καρβαμιδικά εντομοκτόνα

# Παράδειγμα λειτουργικής μεταγονιδιωματικής ανάλυσης



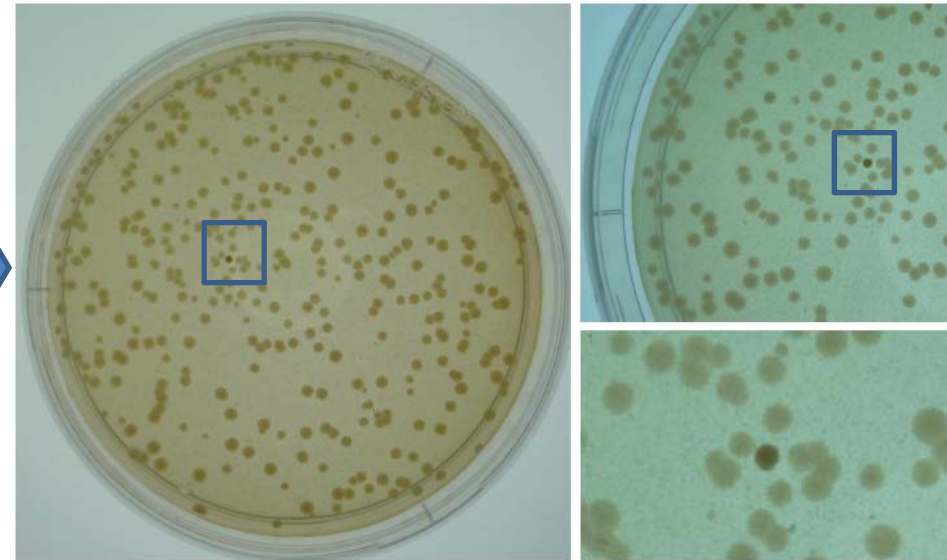
Έδαφος που παρουσίαζε ταχύτατη αποδόμηση καρβαμιδικών όπως το oxamyl

# Παράδειγμα λειτουργικής μεταγονιδιωματικής ανάλυσης

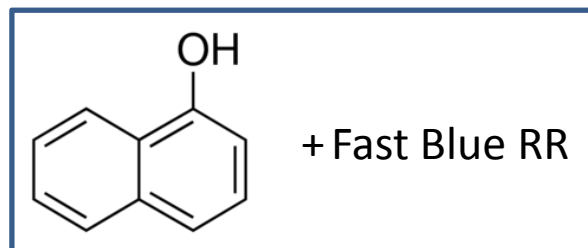
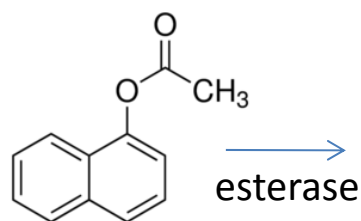


Εξαγωγή  
Μεγάλου  
Μοριακού  
Βάρους DNA από  
το έδαφος

➔ Δημιουργία  
βιβλιοθήκης  
φοσμιδίων



Screening για εστεράσες με το τεστ  
naphthyl acetate – Fast Blue RR salt



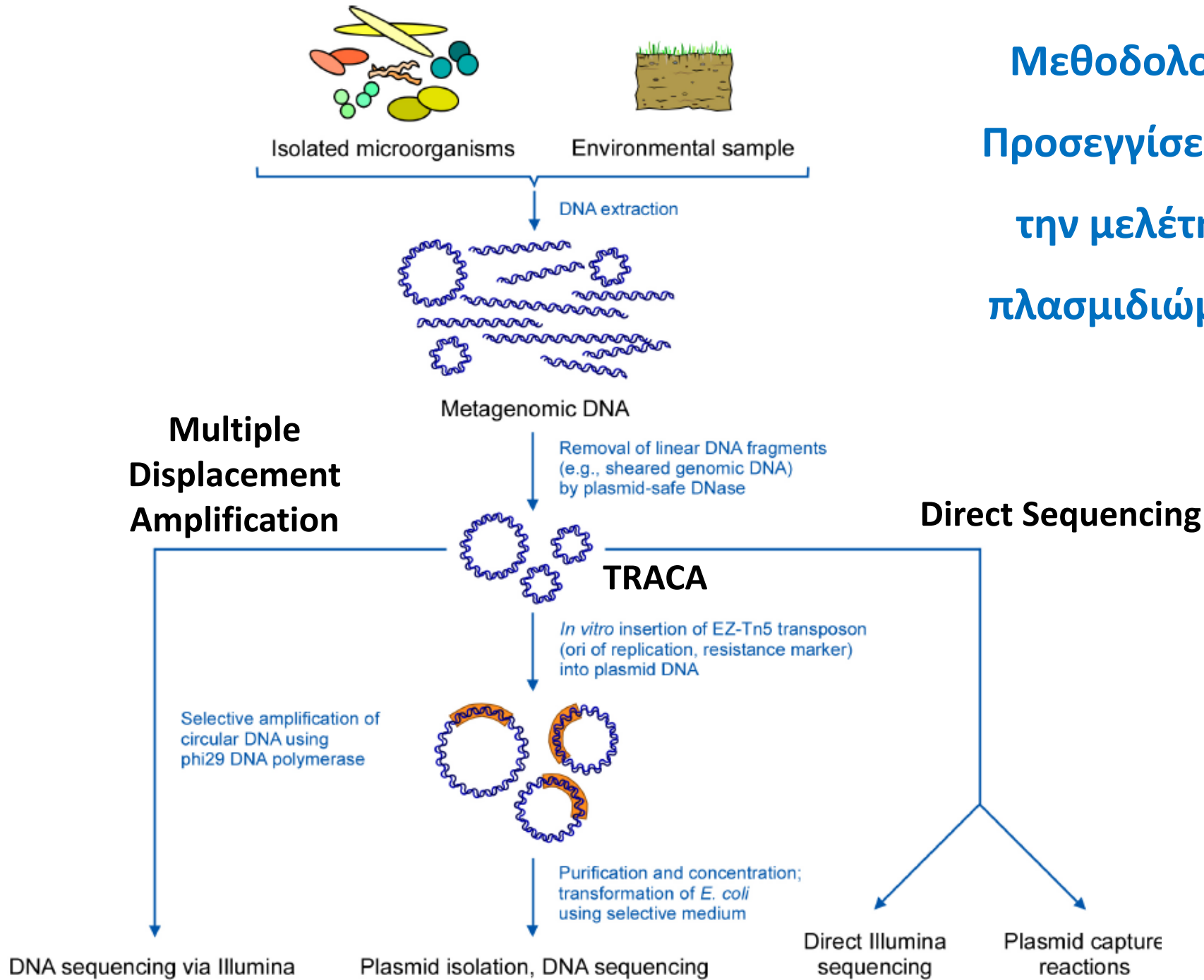
➔ 6 κλώνοι θετικοί  
(καφέ κόκκινο χρώμα στο τριβλίο)

➔ Αλληλούχιση σε σύστημα PacBio

# Πλασμιδίωμα (plasmidome)

- Τι είναι το πλασμιδίωμα: το σύνολο των πλασμιδίων που περιέχονται σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα
- Γιατί θέλουμε να μελετήσουμε το πλασμιδίωμα: γιατί στα πλασμίδια περιέχονται γονίδια με σημαντικό περιβαλλοντικό και βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον όπως
  - ανθεκτικότητα σε μέταλλα
  - ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά
  - αποδόμηση οργανικών ρύπων

# Μεθοδολογικές Προσεγγίσεις για την μελέτη του πλασμιδιώματος



# Πλασμιδίωμα από δύο μονάδες επεξεργασίας υγρών αστικών αποβλήτων

