

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας,
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

**Μελέτη της βιοαποικοδόμησης του τολουολίου από το
βακτήριο *Pseudomonas sp.* pHDV1**

Κασσωτάκη Ελένη

Επιβλέπων καθηγητής : Τσιώτης Γεώργιος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επιστημονική επιμέλεια του καθηγητή κ. Τσιώτη Γεωργίου τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την καθοδήγηση του, κατά τη διάρκεια της μαθητείας μου στο εργαστήριό του.

Ευχαριστώ, επίσης, τους καθηγητές κ. Γανωτάκη Δημήτριο και κ. Περγαντή Σπυρίδων, που δέχτηκαν να είναι μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα του εργαστηρίου στο οποίο πραγματοποίησα την παρούσα εργασία, καθώς και τα άτομα του εργαστηρίου του κ. Γανωτάκη για την παροχή βοήθειας όποτε ήταν αναγκαίο και για τη συνεργασία τους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Κουτσολέλο Αθανάσιο καθώς και τα άτομα του εργαστηρίου του για τη συνεργασία τους.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ το Πανεπιστήμιο Κρήτης για την ευκαιρία που μου δόθηκε ως μεταπτυχιακή του φοιτήτρια.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Οργανικοί περιβαλλοντικοί ρύποι.....	7
1.2 Βιοαποικοδόμηση – Βιοεξυγίανση.....	8
1.3 Αρνητικά κατά Gram βακτήρια.....	10
1.3.1 Εξωτερική μεμβράνη.....	10
1.3.2 Περιπλασματικός χώρος.....	11
1.3.3 Κυταρροπλασματική μεμβράνη.....	13
1.3.4 Μεμβρανικές Πρωτεΐνες.....	14
1.4 Προσαρμογή των Βακτηρίων (Adaptation).....	15
1.5 Προσαρμοστικοί μηχανισμοί των βακτηρίων.....	16
1.6 Μεταβολικά μονοπάτια της βιοαποικοδόμησης των αρωματικών ενώσεων.....	18
1.7 Το βακτηριακό στέλεχος Pseudomonas phDV1.....	21
1.8 Πρωτεομική ανάλυση.....	23
1.9 Μέθοδοι πρωτεομικής ανάλυσης - MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization).....	24
1.10 Σκοπός της εργασίας.....	26
2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
2.1 Διαλύματα Καλλιιεργειών.....	26
2.2 Ρυθμιστικά και διαλύματα.....	27
2.3 Διάλυμα BRADFORD.....	29

2.4 Διαλύματα που χρησιμοποιούνται κατά την πρωτεολυτική διάσπαση σε πηκτή.....	30
2.5 Καλλιέργεια του στελέχους.....	30
2.5.1 Μέτρηση συγκέντρωσης φαινόλης με φασματοφωτόμετρο.....	30
2.5.2 Συλλογή Κυττάρων.....	32
2.6 Λύση κυττάρων – Συλλογή μεμβρανών.....	32
2.7 Κατεργασία μεμβρανών με Ethylene-dianine-tetra-acetic acid.....	33
2.8 Κατεργασία μεμβρανών με Na ₂ CO ₃	33
2.9 Διαλυτοποίηση μεμβρανικού κλάσματος με n-Dodecyl-β-D-Maltoside.....	33
2.10 Διαβάθμιση ζάχαρης.....	33
2.11 Μελέτη μεταβολικού μονοπατιού.....	34
2.12 Τεστ κινητικής του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης.....	34
2.13 Μέθοδος Bradford.....	34
2.13.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης Bradford.....	35
2.14 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών.....	35
2.15 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με ουρία (SDS-PAGE).....	36
2.16 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS -Tricine/ PAGE).....	37
2.17 Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με διαβάθμιση (Blue Native-PAGE).....	37
2.18 Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (Blue Native/SDS PAGE).....	38
2.19 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	38
2.20 Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας (MS/MS).....	39
2.21 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης με μεθόδους βιοπληροφορικής.....	40
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
3.1 Καλλιέργειες.....	41

3.2 Έλεγχος του μεταβολικού μονοπατιού.....	42
3.3 Μελέτη του κυτταροπλασματικού κλάσματος.....	46
3.4 Λειτουργική πρωτεομική ανάλυση του κυτταροπλασματικού πρωτεομάτος.....	49
3.5 Κατεργασία μεμβρανικού κλάσματος με Na_2CO_3	54
3.6 Διαλυτοποίηση μεμβρανών	55
3.7 Διαλυτοποίηση μεμβρανικού κλάσματος με n-Dodecyl-β-D-Maltoside	57
3.8 Πρωτεομική ανάλυση των μεμβρανικών κλασμάτων του βακτηρίου.....	59
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
4.1 Καλλιέργειες.....	65
4.2 Έλεγχος του μεταβολικού μονοπατιού.....	67
4.3 Μελέτη του κυτταροπλασματικού κλάσματος.....	68
4.4 Πρωτεομική ανάλυση του κυτταροπλασματικού κλάσματος.....	68
4.5 Κατεργασία μεμβρανικού κλάσματος με Na_2CO_3 ή EDTA.....	70
4.6 Διαλυτοποίηση μεμβρανών με n-Dodecyl-β-D-Maltoside.....	71
4.7 Πρωτεομική ανάλυση των μεμβρανικών κλασμάτων του βακτηρίου.....	71
4.8 Μελλοντικοί στόχοι.....	74
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75

Περίληψη

Πολλά στελέχη που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* χρησιμοποιούνται ευρέως για να μελετηθούν οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί που αναπτύσσουν, σε σχέση με την ανθεκτικότητά τους έναντι οργανικών διαλυτών αρωματικής κυρίως σύστασης όταν χρησιμοποιούν τις ενώσεις αυτές ως μοναδική πηγή άνθρακα. Το βακτηριακό στέλεχος rHdVI του γένους *Pseudomonas* απομονώθηκε σε περιοχή διυλιστηρίων της Δανίας και το κύριο χαρακτηριστικό του είναι ότι αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας οργανικούς ρύπους ως πηγή άνθρακα. Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε αυτό το στέλεχος, ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο. Ως πηγές άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν το ηλεκτρικό, το τολουόλιο και διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης. Μελετήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης καθώς και το μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης του τολουολίου και φαινόλης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη στο κυτταροπλασματικό και μεμβρανικό πρωτέωμα του βακτηρίου όταν αναπτύσσεται σε διαφορετικές πηγές άνθρακα. Για την μελέτη του μεμβρανικού πρωτεόματος οι απομονωμένες μεμβράνες κατεργάστηκαν με 5mM EDTA ή 100mM Na₂CO₃ και στη συνέχεια έγινε διαλυτοποίηση με 0,5% n-dodecyl-β-maltoside (DDM). Το κυτταροπλασματικό και μεμβρανικό πρωτέωμα αναλύθηκε με συνδυασμό μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης Blue Native-PAGE και αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης Tricine-SDS-PAGE. Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας (MALDI TOF/TOF MS/MS). Τέλος, ταυτοποιήθηκαν κυτταροπλασματικά και μεμβρανικά σύμπλοκα των βακτηρίων που έχουν καλλιεργηθεί σε διαφορετικές πηγές άνθρακα.

Abstract

A number of strains which belong to the *Pseudomonas* species have been widely used to elucidate the adaptive mechanisms underlying increased tolerance against toxic concentrations of aromatic compound organic solvents in Gram-negative bacteria, using them as a sole carbon source. A strain with high phenol-removal efficiency is *Pseudomonas* sp. strain pHDVI, which was isolated from enriched mixed culture from samples of petroleum contaminated soil in Denmark. In the present project this strain was studied, a Gram-negative bacterium which was selected for its ability to degrade aromatic compounds. As carbon sources was used toluene, different concentrations of phenol and succinic acid. Then, a study was conducted mainly for cytoplasm protein complexes (of the bacterium when grown on different carbon sources) involved in the degradation of aromatic pollutants. Additionally, study of membrane protein complexes was conducted by treating them with 5mM EDTA and 100mM Na₂CO₃ (where optimal treatment was chosen) and then solubilization was done with 0,5% n-dodecyl-b-maltoside (DDM). The cytoplasm and membrane fractions were separated via two dimensional electrophoresis Blue Native- SDS-PAGE. Finally, a comparative study and identification of the different proteins with MALDI TOF / TOF was conducted. In conclusion, cytoplasm and membrane complexes from bacteria grown on different carbon sources were identified.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οργανικοί περιβαλλοντικοί ρύποι

Αρκετές οργανικές ενώσεις είναι εξαιρετικά τοξικές για τους ζωντανούς οργανισμούς λόγω της ικανότητάς τους να διαταράσσουν την λειτουργία των βιολογικών μεμβρανών [1]. Η τοξικότητα μιας ουσίας συσχετίζεται με το λογάριθμο του συντελεστή κατανομής της σε n- οκτανόλη και νερό ($\log P_{ow}$). Οργανικές ουσίες με $\log P_{ow}$ μεταξύ 1,5 και 4,0 είναι εξαιρετικά τοξικές για τους μικροοργανισμούς και πολυκύτταρους οργανισμούς [2]. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια βακτηριακά στελέχη, που έχουν προσαρμοστεί στην παρουσία οργανικών ρύπων έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί. Αυτά τα στελέχη έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στην ανεκτικότητα τους στους ρύπους [1],[3]. Μεταξύ των διαφόρων περιβαλλοντικών ρύπων, μεγάλο ενδιαφέρον, σε σχέση με την αποικοδόμησή τους, παρουσιάζουν εκείνοι που περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους, καθώς συσσωρεύονται στο περιβάλλον παραμένοντας αδιάσπαστοι, εξαιτίας της υψηλής θερμοδυναμικής σταθερότητας του βενζολικού δακτυλίου [4]. Αυτοί μπορούν να δρουν ως διαλύτες οι οποίοι αυξάνουν τη διαπερατότητα του κυττάρου καταστρέφοντας την κυταρροπλασματική μεμβράνη, οδηγώντας στην απώλεια ιόντων, κυτταροπλασματικού υλικού και της διαβάθμισης πρωτονίων, μειώνοντας κατά συνέπεια και το διαθέσιμο ATP στο κύτταρο [5].

Η φαινόλη ($\log P_{ow}=1,5$), είναι ένας οργανικός αρωματικός ρύπος ο οποίος προέρχεται από βιομηχανικές δραστηριότητες, καθώς αποβάλλεται στο περιβάλλον μέσω διεργασιών παραγωγής και επεξεργασίας προϊόντων, όπως είναι τα εργοστάσια πολτοποίησης, τα ανθρακωρυχεία, τα διυλιστήρια, η βιομηχανία προϊόντων που χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση του ξύλου, η χημική βιομηχανία, η βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων [6]-[8], καθώς και τα βιομηχανικά απόβλητα που προκύπτουν από τις παραπάνω περιπτώσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εισέρχεται στο υδατικό οικοσύστημα, επιδρώντας αρνητικά (μειώνοντας τη γονιμότητα και/ή αναστέλλοντας την ανάπτυξη) στο σύνολο των υδρόβιων οργανισμών συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, των πρωτόζωων, των ασπόνδυλων και των σπονδυλωτών [9]. Επίσης διάφορες ανθρωπογενείς δραστηριότητες που αυξάνουν την ποσότητα φαινόλης στο περιβάλλον, αποτελούν τα καυσαέρια των αυτοκινήτων (άμεση εκπομπή και φωτοχημική αποικοδόμηση του βενζολίου) [8]. Το υψηλό επίπεδο τοξικότητας της φαινόλης καθώς και διαφόρων παραγώγων της, καθιστά τις ενώσεις αυτές ιδιαίτερα επικίνδυνες για την υγεία, καθώς έχει αναφερθεί ότι μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη σε εμβρυικό επίπεδο για τους διάφορους ζωικούς οργανισμούς, άλλα και να οδηγήσει σε νευροπαθολογικά συμπτώματα [10].

Το τολουόλιο, ($\log P_{ow}=1,47$) είναι ένα υδατοδιαλυτό συστατικό των προϊόντων διύλισης πετρελαίου (π.χ., καύσιμα αεροπορίας και βενζίνη) και είναι ένα ευρέως διαδεδομένο συστατικό των υπόγειων υδάτων κοντά σε διαρροές υπόγειων δεξαμενών αποθήκευσης, χώρους υγειονομικής ταφής, καθώς και άλλες ανεξέλεγκτες απελευθερώσεις των ορυκτών καυσίμων [11]. Το τολουόλιο μαζί με το

βενζόλιο, αιθυλοβενζόλιο, και ξυλόλιο, συλλογικά ονομάζονται BTEX και είναι ιδιαίτερα πτητικές ουσίες. Λόγω της σχετικά υψηλής διαλυτότητας και τοξικότητάς τους, αντιπροσωπεύουν μια σημαντική απειλή για τους ζωντανούς οργανισμούς σε μολυσμένα περιβάλλοντα [12]. Τα BTEX μπορούν είτε να δρουν ως αποσυζευκτές της αναπνευστικής αλυσίδας, μειώνοντας έτσι τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροβίων είτε να αλληλεπιδρούν με το DNA και να δημιουργούν μεταλλάξεις ή και καρκινογένεση [13]-[15].

1.2 Βιοαποικοδόμηση – Βιοεξυγίανση

Η βιοεξυγίανση (bioremediation) είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για την περιγραφή της καταστροφής ρύπων του περιβάλλοντος με τη βοήθεια μικροοργανισμών (όπως μύκητες ή βακτήρια). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ενεργοποίηση των μικροοργανισμών, ώστε να χρησιμοποιήσουν τους ρύπους ως πηγή ενέργειας, με τη δημιουργία ενός ευνοϊκού περιβάλλοντος. Αυτό περιλαμβάνει τη συνδυαστική χρήση οξυγόνου, θρεπτικών ουσιών και υγρασίας, κατάλληλη θερμοκρασία και pH [16]. Η βιοεξυγίανση στηρίζεται είτε σε αυτόχθονους μικροοργανισμούς (αυτοί που υπάρχουν φυσικά στο πεδίο) είτε σε εξωγενείς μικροοργανισμούς (αυτοί που εισάγονται στο πεδίο). Σε κάθε περίπτωση, οι τεχνολογίες βιοεξυγίανσης βελτιστοποιούν τις συνθήκες του περιβάλλοντος, έτσι ώστε οι κατάλληλοι μικροοργανισμοί να αναπτυχθούν και να καταστρέψουν την πλειονότητα των ρύπων [17].

Η βιοεξυγίανση είναι το αποτέλεσμα της βιολογικής διάσπασης ή βιοαποικοδόμησης τοξικών ενώσεων. Αν και δεν υπάρχει σαφής ορισμός της βιοαποικοδόμησης, η έννοια αυτής περιλαμβάνει γενικά τη διάσπαση τοξικών οργανικών ενώσεων από μικροοργανισμούς σε λιγότερο τοξικές ενώσεις. Η ενέργεια που παράγεται χρησιμοποιείται για την κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων των βακτηριακών κυττάρων. Η πλήρης αποικοδόμηση, αναφέρεται συχνά ως απολιθοποίηση (mineralization) και οδηγεί στο σχηματισμό νερού, διοξειδίου του άνθρακα υπό αερόβιες συνθήκες ή μεθανίου υπό αναερόβιες [18].

Η βιοαποικοδόμηση είναι αρκετά ευαίσθητη και επηρεάζεται από ένα μεγάλο αριθμό παραμέτρων όπως:

- Την αυξημένη συγκέντρωση τοξικών ουσιών στα προς επεξεργασία απόβλητα με τοξικές επιδράσεις στους υφιστάμενους μικροοργανισμούς
- Τον μικρό αριθμό μικροοργανισμών
- Τις μη ευνοϊκές συνθήκες για την επιβίωση και δράση των μικροοργανισμών: απουσία θρεπτικών συστατικών, οξυγόνου [17].

Έχει αποδειχθεί ότι οι περισσότεροι οργανικοί ρύποι, φυσικοί και ανθρωπογενείς, μπορούν να αποικοδομηθούν από μικροοργανισμούς, είτε με την χρήση τους ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, είτε μέσω διεργασιών μεταβολισμού [16]. Μετά την αποδόμηση των ρύπων, οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών πεθαίνουν.

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να καταταχθούν στις ακόλουθες ομάδες [19]:

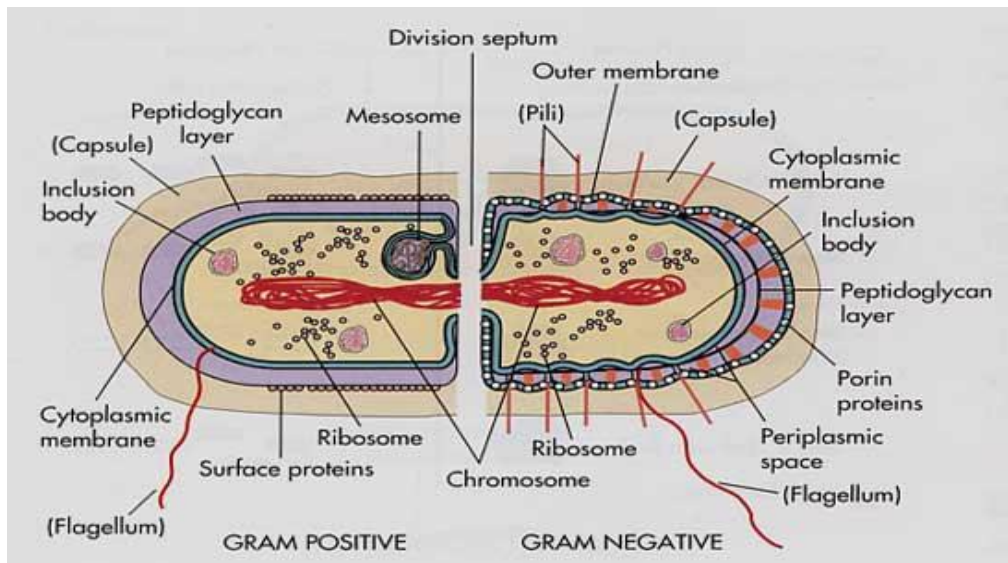
- Αερόβιοι. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μικροοργανισμών με αναγνωρισμένες δυνατότητες για αποδόμηση οργανικών ενώσεων είναι οι *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* και *Mycobacterium*. Γί αυτές τις ομάδες μικροβίων υπάρχουν πολλές αναφορές για διάσπαση μικροβιοκτόνων και υδρογονανθράκων, αλκανίων και πολυαρωματικών. Τα περισσότερα από αυτά τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιούν τους οργανικούς ρύπους ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν δύο είδη του γένους *Pseudomonas*, το *P. aeruginosa* και το *P. fluorescence*, τα οποία έχουν μελετηθεί για τη δυνατότητά τους να αποικοδομούν τη φαινόλη που προέρχεται από τα απόβλητα ενός διυλιστηρίου κάτω από συνθήκες συνεχούς καλλιέργειας. Η φαινόλη αποικοδομήθηκε επιτυχώς και από τα δύο είδη, ενώ υπήρχε μια θετική συσχέτιση μεταξύ της βιοαποικοδόμησης της φαινόλης και της μικροβιακής ανάπτυξης. Πρόκειται για μία μελέτη η οποία ανέδειξε τη δυνατότητα χρήσης αυτών των στελεχών για τη διαχείριση των αποβλήτων που προέρχονται από παρόμοιες βιομηχανικές μονάδες με τη λειτουργία του βιολογικού καθαρισμού [20].
- Αναερόβιοι. Τα αναερόβια βακτήρια δεν χρησιμοποιούνται το ίδιο συχνά με τα αερόβια. Υπάρχει όμως αυξητική τάση στην χρησιμοποίησή τους για διάσπαση των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCBs) στα ιζήματα ποταμών, για αποχλωρίωση του τριχλωροαιθυλενίου (TCE) και του χλωροφορμίου [19].
- Ligninolytic fungi. Μύκητες όπως ο *Phanaerochaete chrysosporium* έχουν την ιδιότητα να αποικοδομούν ένα μεγάλο εύρος ισχυρά τοξικών ρύπων όπως είναι το lignin ή η veratryl alcohol. Τα πιο συνήθη υποστρώματα που χρησιμοποιούνται είναι το άχυρο και ο κώνος καλαμποκιού [19].
- Μεθυλότροφοι μικροοργανισμοί. Πρόκειται για αερόβια βακτήρια που αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας μεθάνιο σαν πηγή άνθρακα και ενέργειας. Το αρχικό ένζυμο στην πορεία για αερόβια αποικοδόμηση, η μονοξυγενάση του μεθανίου, έχει μεγάλο εύρος υποστρωμάτων στα οποία εμφανίζεται και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορους ρύπους, μεταξύ των οποίων οι χλωριωμένοι αλιφατικοί υδρογονάνθρακες TCE και 1,2 DCE [19].

Το κυριότερο πλεονέκτημα των βιολογικών μεθόδων είναι ότι επιτυγχάνεται η αποικοδόμηση των τοξικών ενώσεων με χαμηλό κόστος, σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους. Για το λόγο αυτό τα τελευταία σχεδόν 25 χρόνια το ενδιαφέρον έχει μετατοπιστεί προς τη βιοεξυγίανση που είναι

εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδος σύμφωνα με τα σημερινά δεδομένα, η οποία μπορεί να συνδυαστεί άνετα με τις υπάρχουσες φυσικοχημικές μεθόδους επεξεργασίας των αποβλήτων.

1.3 Αρνητικά κατά Gram βακτήρια

Το κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων έχει διαφορετική δομή από το αντίστοιχο κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Σε αυτά υπάρχει μια επιπλέον κυτταρική μεμβράνη η εξωτερική μεμβράνη, εκτός από την κυταροπλασματική. Η κυταροπλασματική μεμβράνη περιβάλλεται από μια περιοχή η οποία ονομάζεται περιπλασματικός χώρος, όπου υπάρχει μια στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης, ενώ εξωτερικά της πεπτιδογλυκάνης υπάρχει η εξωτερική μεμβράνη (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση που παρουσιάζει τη διαφοροποίηση της δομής του κυτταρικού τοιχώματος των μεταξύ των Gram-αρνητικών και των Gram-θετικών βακτηρίων [21].

1.3.1 Εξωτερική μεμβράνη

Η εξωτερική μεμβράνη επιτελεί τις ακόλουθες λειτουργίες:

- Προσδίδει αρνητικό φορτίο στο κύτταρο.
- Επιλεκτική διαπερατότητα για την είσοδο υδρόφιλων μορίων.

- Περιέχει υποδοχείς φάγων.
- Παρουσιάζει παθογονικές ιδιότητες.
- Βοηθά την επικοινωνία των κυττάρων.
- Διατηρεί τα ένζυμα στο περίπλασμα.

Η εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων έχει μελετηθεί ευρέως, εξαιτίας του πολύ σημαντικού της ρόλου που σχετίζεται με τη μολυσματικότητα αυτής της κατηγορίας βακτηρίων. Πρόκειται για μια διπλοστοιβάδα λιπιδίων, που περιέχει πρωτεΐνες, αλλά και λιποσακχαρίτες (LPS). Η μεμβράνη αυτή έχει διακριτές πλευρές, με την πλευρά που περιέχει τους λιποσακχαρίτες να είναι προς τον εξωκυττάριο χώρο (Εικόνα 2) [22]. Τα είδη των διαφορετικών πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης είναι πολύ λιγότερα σε σύγκριση με αυτά που βρίσκονται στην κυταροπλασματική μεμβράνη λόγω της διαφορετικής λειτουργίας τους στο κύτταρο. Αποτελούν περίπου το 50% της συνολικής μάζας της εξωτερικής μεμβράνης [22]. Στην εξωτερική μεμβράνη βρίσκονται διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, αλλά, και λιποπρωτεΐνες. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι βασικές για τη διατήρηση της ακεραιότητας και της επιλεκτικής διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης [23]. Επιπλέον πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης, η έκφραση των οποίων συχνά ρυθμίζεται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην βακτηριακή παθογένεση αυξάνοντας την προσαρμοστικότητα των βακτηρίων σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι πορίνες είναι η βασική κατηγορία πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Τα δομικά χαρακτηριστικά τους είναι ότι αποτελούνται από δομές β-βαρελίου και συνήθως συναντώνται ως τριμερή. Πρόκειται για πρωτεΐνες που σχηματίζουν πόρους στην εξωτερική μεμβράνη, ώστε να επιτρέπεται η επιλεκτική διέλευση μικρών υδρόφιλων μορίων. Με τον τρόπο αυτό, επιτρέπεται η μεταφορά αυτών των μορίων στον περιπλασματικό χώρο και από εκεί μέσω της κυταροπλασματικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου.

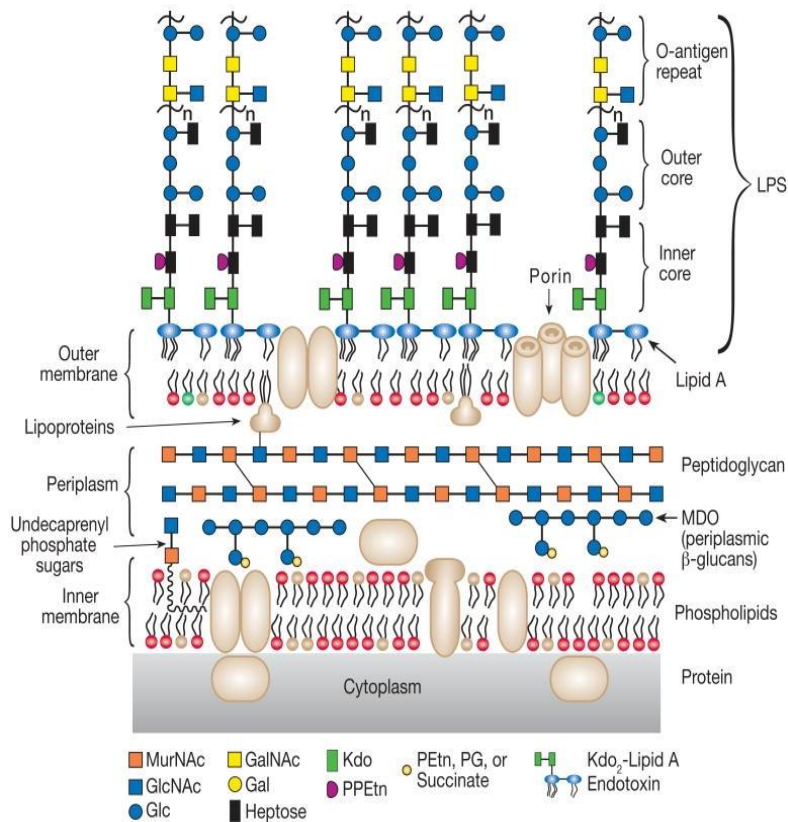
1.3.2 Περιπλασματικός χώρος

Ο περιπλασματικός χώρος είναι ο κυτταρικός χώρος μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης, όπου περιέχονται αρκετές διαφορετικές πρωτεΐνες. Στο χώρο αυτό βρίσκεται το στρώμα των πεπτιδογλυκανών που αποτελεί το κυτταρικό τείχος του βακτηρίου. Ο ρόλος των πρωτεϊνών του περιπλάσματος είναι να αναγνωρίζουν και να μεταφέρουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά εντός του κυττάρου, καθώς και τοξικές ουσίες εκτός αυτού. Μερικά παραδείγματα περιπλασματικών ενζύμων είναι:

1. Υδρολυτικά ένζυμα

- Φωσφατάσες
 - Πρωτεάσες
 - Ενδονουκλεάσες
2. Πρωτεΐνες πρόσδεσης που αναγνωρίζουν και μεταφέρουν διαμέσου της μεμβράνης συγκεκριμένες ενώσεις, όπως:
 - Σάκχαρα
 - Αμινοξέα
 - Ανόργανα ιόντα
 - Βιταμίνες
 3. Χημειοϋποδοχείς, βοηθούν την αναγνώριση της χημικής σύστασης του περιβάλλοντος από το κύτταρο.
 4. Ένζυμα αποτοξίνωσης, τροποποιούν τοξικές ενώσεις για το κύτταρο, π.χ. β- λακταμάση.
 5. Ένζυμα που παρέχουν στο κύτταρο οσμωτική προστασία.

Η πεπτιδογλυκάνη στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια περιέχει λιγότερες διασυνδέσεις και όχι πεπτιδικές διασυνδέσεις όπως παρατηρείται στη σύσταση των στρωμάτων πεπτιδογλυκάνης για τα κατά Gram θετικά βακτήρια. Επίσης η παρουσία ομοιοπολικά προσδεδεμένων λιποπρωτεϊνών στην πεπτιδογλυκάνη, οι οποίες αποτελούνται από υδρόφοβες περιοχές που προσδένονται στην εξωτερική μεμβράνη, συμβάλλει στην ισχυρή πρόσδεση της πεπτιδογλυκάνης στην εξωτερική μεμβράνη (Εικόνα 2).



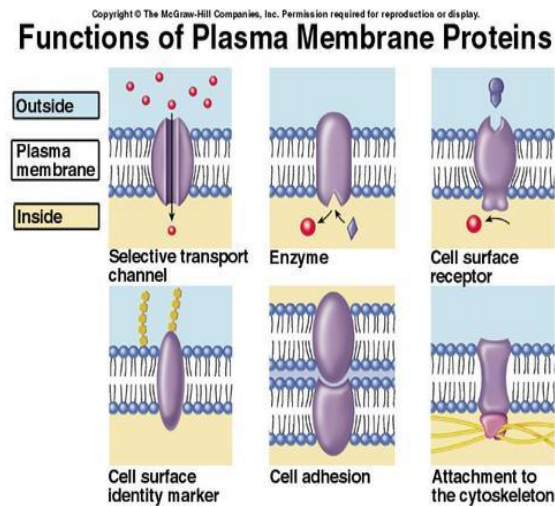
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού τοιχώματος ενός κατά Gram αρνητικού βακτηρίου [24].

1.3.3 Κυταροπλασματική μεμβράνη

Η κυταροπλασματική μεμβράνη αποτελείται από μια διλοστοιβάδα λιπιδίων, κυρίως φωσφολιπίδια, και πρωτεΐνες βυθισμένες στην λιπιδική στοιβάδα. Παρέχει επιλεκτική διαπερατότητα, καθώς περιέχει εξειδικευμένες μοριακές αντλίες και μοριακά κανάλια. Ειδικό υποδοχείς για εξωτερικά ερεθίσματα που βρίσκονται στην κυταροπλασματική μεμβράνη ελέγχουν την ροή πληροφοριών μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντος. Επίσης στην κυταροπλασματική μεμβράνη εδράζουν ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα καθώς και σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που σχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας για το κύτταρο (παραγωγή ATP), καθώς και πρωτεΐνες-μεταφορείς που μεταφέρουν βιομόρια με αλλαγή της διαμόρφωσής τους. Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν και οι αντλίες εκροής οι οποίες συμμετέχουν στην αποβολή ουσιών που έχει προσλάβει το κύτταρο, όταν οι συγκεντρώσεις τους στο εσωτερικό του είναι τοξικές για την επιβίωσή του.

1.3.4 Μεμβρανικές Πρωτεΐνες

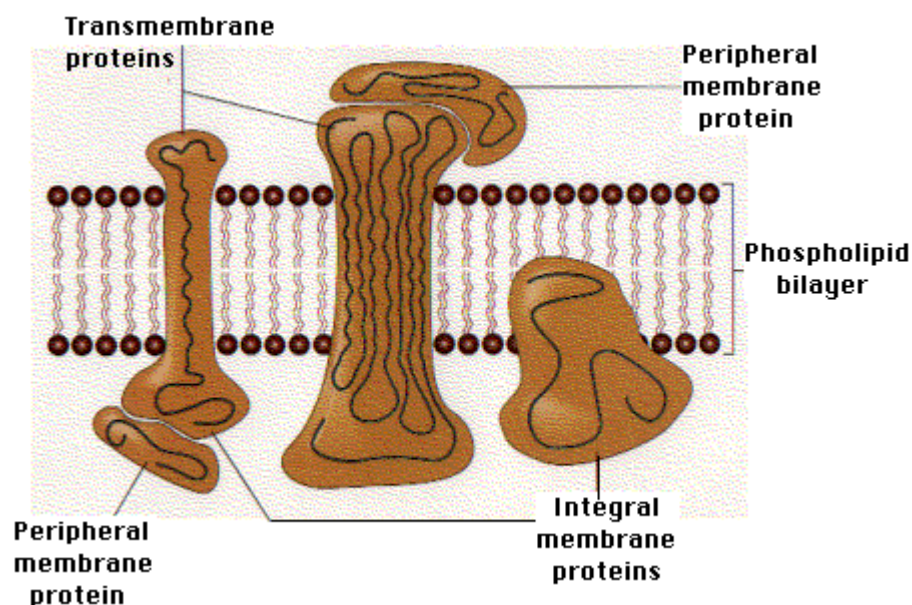
Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στις διάφορες λειτουργίες του κυττάρου. Αποτελούν θεμελιώδη συστατικά των βιολογικών μεμβρανών και συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες, όπως μετατροπή ενέργειας, μεταφορά μορίων, σύνθεση λιπιδίων, μετάδοση μηνύματος και κυτταρική αναγνώριση. Αν και έχει προβλεφθεί ότι το 20-30% όλων των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) σε βακτήρια, αρχαία, και ευκαριωτικούς οργανισμούς κωδικοποιούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, σχετικά λίγες είναι οι γνωστές δομές υψηλής ανάλυσης που έχουν δημοσιευτεί από αυτήν την κατηγορία πρωτεϊνών. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζονται οι κύριες λειτουργίες των μεμβρανικών πρωτεϊνών.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση βασικών λειτουργιών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών [25].

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ανάλογα με τη θέση τους στη μεμβράνη χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες (Εικόνα 4):

- I. Μερικά εισερχόμενες στην μεμβράνη (Integral membrane proteins).
- II. Διαμεμβρανικές, αυτές που διαπερνούν τη μεμβράνη με ένα ή πολλά μεμβρανικά τμήματα (Transmembrane proteins).
- III. Περιφερειακές, συνδεδεμένες με λιπίδια ή με άλλες πρωτεΐνες (Peripheral membrane proteins).



Εικόνα 4: Κατηγορίες των μεμβρανικών πρωτεϊνών [25].

1.4 Προσαρμογή των Βακτηρίων (Adaptation)

Ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης ενός οργανικού ρύπου επηρεάζεται, μεταξύ των άλλων και από το παρελθόν της μικροβιακής κοινότητας. Συγκεκριμένα το είδος των οργανικών ενώσεων παρουσία των οποίων ζουν και αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί επηρεάζει την ικανότητα βιοαποικοδόμησης αυτών. Ο όρος «προσαρμογή» περιλαμβάνει τη διαδικασία διαρκούς έκθεσης της βακτηριακής κοινότητας σε συγκεκριμένες οργανικές ενώσεις με άμεσο αποτέλεσμα τις περισσότερες φορές, την ενίσχυση της αποικοδομητικής ικανότητας των μικροοργανισμών έναντι αυτών [26]. Η χρήση εγκλιματισμένων βακτηρίων για τον εμβολιασμό νέων καλλιεργειών συμβάλλει στη μείωση της διάρκειας της φάσης προσαρμογής και την αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησης [27].

Τρεις είναι οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για την ενίσχυση της βιοαποικοδομητικής ικανότητας των μικροοργανισμών μέσω της προσαρμογής: η επαγωγή, η μετάλλαξη και η οριζόντια μεταφορά γονιδίων (induction, mutation, horizontal gene transfer).

Η παρουσία οργανικών ρύπων είναι δυνατό να προκαλέσει επαγωγή των κατάλληλων καταβολικών γονιδίων, εφόσον φυσικά προϋπάρχουν στο κύτταρο, με άμεσο αποτέλεσμα την αύξηση της βιομάζας και τον καταβολισμό της οργανικής ένωσης [28]. Επιπλέον τα κύτταρα προσαρμόζονται μέσω διαφόρων μεταλλάξεων, είτε λόγω τροποποιήσεων νουκλεοτιδίων στο μόριο του DNA, είτε λόγω

διαφόρων ανακατατάξεων τμημάτων του DNA, οι οποίες προκαλούν αύξηση της αντοχής ή αποικοδόμηση της συγκεκριμένης ένωσης. Ο τρίτος μηχανισμός αφορά τη μεταφορά γενετικών πληροφοριών είτε από ανάλογους ή από φυλογενετικά ξεχωριστούς μικροοργανισμούς με τη βοήθεια κινητών γενετικών στοιχείων δηλ. πλασμιδίων, τρανσποζονίων ή φάγων (mobile genetic elements). Η μεταφορά γενετικών πληροφοριών εντός μιας μικροβιακής κοινότητας επιτρέπει το φυσικό τρόπο εξέλιξης καταβολικών μονοπατιών [28]-[30].

1.5 Προσαρμοστικοί μηχανισμοί των βακτηρίων

Τα βακτήρια χρησιμοποιούν μια ευρεία ποικιλία μηχανισμών για να ανταπεξέλθουν την τοξικότητα του οργανικού διαλύτη. Σε γενικές γραμμές, τα βακτήρια προσπαθούν να μειώσουν την ρευστότητα της μεμβράνης, με το να πακετάρονται πυκνότερα οι υδρόφοβες περιοχές των μεμβρανών. Ωστόσο, η τροποποίηση αυτή δεν είναι αρκετή για να αποτρέψει την είσοδο των διαλυτών εντός του κυττάρου και αυτή η εισαγωγή προκαλεί την ενεργοποίηση μιας άμεσης γενικής αντίδρασης στην πίεση, που συμπεριλαμβάνει την έκφραση διάφορων σαπερώνων οι οποίες ξανά αναδιπλώνουν τις πρωτεΐνες που έχουν μετουσιωθεί από τον διαλύτη, και την ενεργοποίηση της οξειδωτικής απόκρισης της πίεσης. Αν και οι παραπάνω μηχανισμοί είναι αρκετοί για την προσαρμογή των βακτηρίων σε χαμηλές συγκεντρώσεις οργανικών διαλυτών, όταν οι συγκεντρώσεις είναι υψηλότερες απαιτείται η απομάκρυνση των διαλυτών με αντλίες εκροής. Ωστόσο, αυτές οι διεργασίες έχουν υψηλότερες ενεργειακές απαιτήσεις. Αναλυτικότερα, οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που αναπτύσσουν τα gram αρνητικά βακτήρια στους οργανικούς διαλύτες είναι οι εξής:

A. Αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη

Οι οργανικοί διαλύτες που συσσωρεύονται στις βακτηριακές μεμβράνες αυξάνουν τη ρευστότητα της μεμβράνης και πολλοί μικροοργανισμοί αντισταθμίζουν την αύξηση της ρευστότητας αυτής τροποποιώντας τη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Ορισμένα βακτήρια (του γένους των *Pseudomonas* και *Vibrio*) ισομεριώνουν τα *cis* ακόρεστα λιπαρά οξέα σε *trans* ακόρεστα λιπαρά οξέα, μία αντίδραση που προκαλείται από την *cis-trans* ισομεράση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα εκτός του ότι οι μεμβράνες γίνονται λιγότερο ρευστές τα κύτταρα να προσαρμόζονται αμέσως στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα βακτήρια μπορούν επίσης να αλλάξουν την αναλογία κορεσμένων προς ακόρεστων λιπαρών οξέων και σε άλλες περιπτώσεις, το μήκος των ακυλ-αλυσίδων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το Rh8 μετάλλαξη του *Clostridium acetobutylicum* όπου βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα PlsX (συμμετέχει στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων /φωσφολιπιδίων), και της FabF [3-οχοacyl-(acyl-carrier protein)συνθάσης II] [31].

Ορισμένα στελέχη όταν εκτίθεται σε τοξικές χημικές ουσίες παράγουν μεμβρανικά κυστίδια που αποτελούνται από φωσφολιπίδια, εξωπολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες. Αυτό χρησιμεύει ως ένας

δραστικός μηχανισμός για την απελευθέρωση των συσσωρευμένων οργανικών διαλυτών, και για την τροποποίηση της υδροφοβικότητας των μεμβρανών των κυττάρων. Το στέλεχος *P. putida* DOT-T1E έχει παρατηρηθεί ότι συνθέτει πιο υδρόβιους λιποσακχαρίτες, οι οποίοι μετατοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνεται ο συσσωρευμένος οργανικός διαλύτης στο εξωτερικό [32].

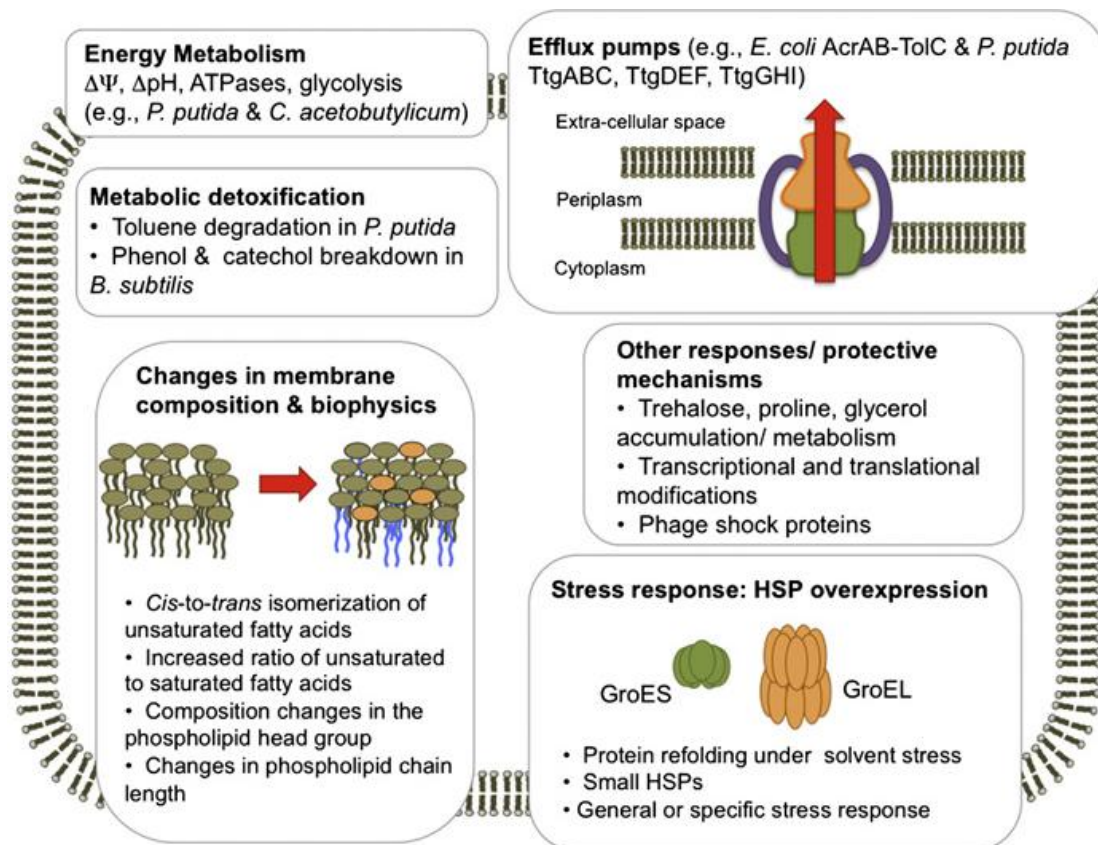
B. Συμμετοχή σαπερώνων

Έχει παρατηρηθεί ότι πρωτεΐνες ή γονίδια από την κατηγορία «απόκτησης θερμικής πίεσης» (*groES*, *groL*, *grpE*, *dnaK*) υπερεκφράζονται με την παρουσία διαλυτών όπως η αιθανόλη, βουτανόλη, τολουόλιο ή ξυλόλιο [31]. Η παρουσία οργανικών διαλυτών στο κυτταρόπλασμα και στο περίπλασμα μεταβάλλει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, έτσι είναι αναμενόμενο να εκφράζονται διαφορετικές σαπερόνες ώστε να αντιμετωπίσει αυτό το πρόβλημα.

Γ. Αντλίες εκροής ενισχύουν την ανθεκτικότητα σε οργανικούς διαλύτες

Αντλίες εκροής, ιδίως εκείνες που ανήκουν στην RND οικογένεια, θεωρούνται ο πιο αποτελεσματικός μηχανισμός για την ανθεκτικότητα σε οργανικούς διαλύτες των gram- αρνητικών βακτηρίων. Οι RND είναι μεταφορείς πρωτονίων που σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, το οποίο αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες, και εκτείνεται από την εσωτερική μεμβράνη στην εξωτερική μεμβράνη μέσω δύο πιθανών οδών: από το περίπλασμα στο εξωτερικό μέσο ή από το κυτταρόπλασμα προς το εξωτερικό μέσο. Άλλες αντλίες εκροής που συμμετέχουν στην ανθεκτικότητα σε οργανικούς διαλύτες είναι μέλη των ABC-μεταφορέων (ATP Binding Cassette). Στο στέλεχος *P. putida* DOT-T1E που καλλιεργήθηκε σε τολουόλιο βρέθηκαν τρεις, διαφορετικές αλλά επικαλυπτόμενες όσον αφορά το υπόστρωμα, αντλίες εκροής RND να συμμετέχουν άμεσα στο μηχανισμό για την ανθεκτικότητα στο τολουόλιο. Η παρουσία του TtgGHI, που κωδικοποιείται στο πλασμίδιο 133-kb pGRT1, βρέθηκε να είναι απολύτως απαραίτητη για να επιβιώσει το βακτήριο σε καλλιέργεια με 0.3% (v / v) τολουόλιο [31][32].

Δεδομένου ότι τα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν μια πρόσθετη εξωτερική μεμβράνη που αποτελείται από φωσφολιπίδια και λιποπολυσακχαρίτες σε σύγκριση με την ενιαία κυταροπλασματική μεμβράνη των Gram-θετικών βακτηριδίων, θεωρείτε ότι τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι καλύτερα 'εξοπλισμένα' για να αντιμετωπίσουν τις τοξικές οργανικές ενώσεις. Πρόσφατα, στελέχη Gram-θετικών βακτηρίων, όπως *Bacillus*, *Rhodococcus* και *Arthrobacter* βρέθηκαν ανθεκτικά στο βενζόλιο. Ορισμένοι από τους παραπάνω μηχανισμούς, όπως αλλαγές της κυτταρικής μεμβράνης, γενικές αποκρίσεις του στρες ή εκροή των διαλυτών έχουν προταθεί και σε Gram-θετικά βακτήρια, ωστόσο, οι μηχανισμοί δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί. Ένα ερώτημα που δημιουργείτε είναι ότι ενώ τα Gram-αρνητικά βακτήρια δείχνουν ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις τολουολίου, τα Gram-θετικά όπως είναι το *Rhodococcus* sp., το *Arthrobacter* ST-1, το *Bacillus* DS-944 και το DS-1906 δε δείχνουν ανθεκτικότητα στο τολουόλιο αλλά στο βενζόλιο το οποίο είναι πολύ πιο τοξικό από τολουόλιο [31]-[34].

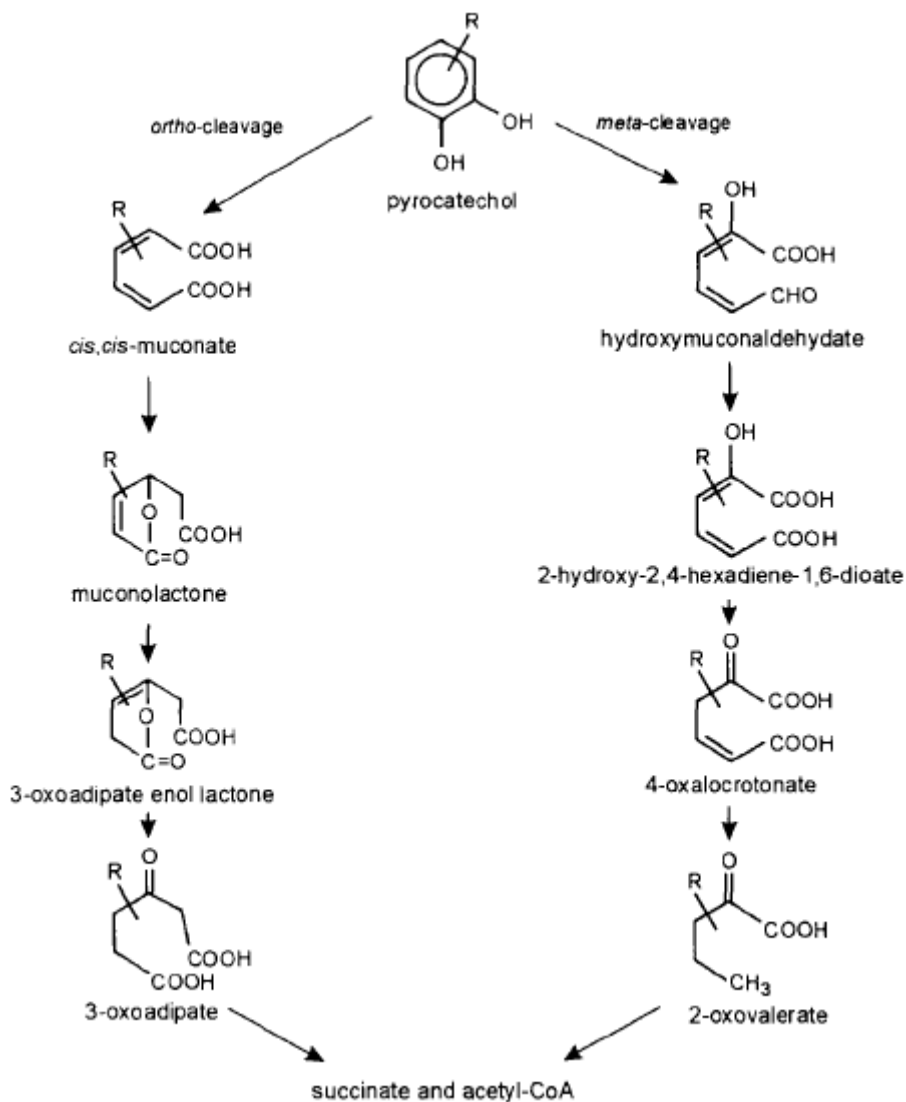


Εικόνα 5: Κυτταρικές αποκρίσεις παρουσία τοξικών διαλυτών από Gram-αρνητικούς ή /και Gram-θετικούς προκαρυωτικούς οργανισμούς και / ή ζυμομύκητες [34].

1.6 Μεταβολικά μονοπάτια της βιοαποικοδόμησης των αρωματικών ενώσεων

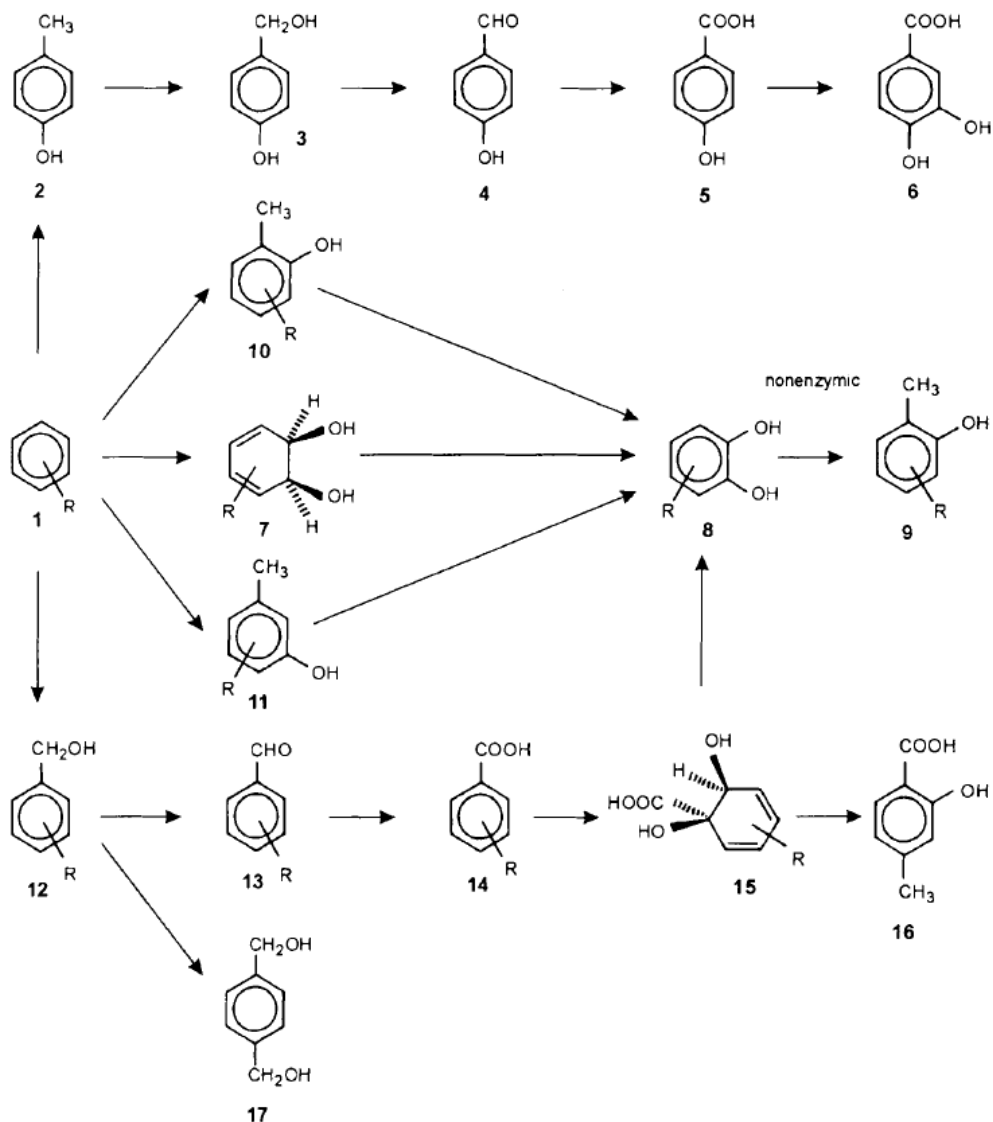
Στην αερόβια αποικοδόμηση αρωματικών ενώσεων, οι ρύποι που παρουσιάζουν διάφορες δομές, σε ένα πρώτο στάδιο μετατρέπονται σε ενδιάμεσους μεταβολίτες, μέσω διαφορετικών περιφερικών μονοπατιών. Ακολούθως με τη σειρά τους διοχετεύονται μέσω κεντρικών μεταβολικών μονοπατιών στον κυτταρικό μεταβολισμό. Στα περισσότερα περιφερικά μονοπάτια λαμβάνουν μέρος αντιδράσεις οξείδωσης οι οποίες καταλύονται από μόνο- και διοξυγενάσες μετατρέποντας τους αρωματικούς ρύπους σε “διυδροξυ-” αρωματικά ενδιάμεσα. Οι μονοοξυγενάσες παράγουν οξείδια ως ενδιάμεσα χρησιμοποιώντας μόνο ένα άτομο οξυγόνου από το μόριο του οξυγόνου κατά τη διάρκεια της οξείδωσης. Θα πρέπει να είναι συζευγμένες με μια υδρατάση ή να υπάρχει υπεροξείδιο για να παραχθούν τρανς-διόλες. Οι μονοοξυγενάσες τολουολίου-ξυλολίου της *Pseudomonas mendocina* KRI και της *Burkholderia ceracia* G4 χρησιμοποιούν μη-αιμικό σίδηρο ως αποδέκτη ηλεκτρονίων [35]. Οι διοξυγενάσες βρέθηκαν μόνο σε βακτήρια και δημιουργούν ενδιάμεσα υπεροξείδια, τα οποία μετατρέπονται αυθόρμητα σε *cis*-διόλες. Χρησιμοποιούν και τα δύο άτομα οξυγόνου από ένα μόριο

οξυγόνου. Οι διοξυγενάσες είναι μη-αιμικά ένζυμα σιδήρου (3^+) και είναι περισσότερο εκλεκτικές (ως προς το υπόστρωμα) σε σχέση με τις μονοοξυγενάσες. Οι μονο- και διοξυγενάσες χρησιμοποιούν τα “διυδροξυ-” αρωματικά ενδιάμεσα ως υποστρώματα και διασπούν τον αρωματικό δακτύλιο, με το να εισάγουν ένα μόριο οξυγόνου ανάμεσα στις δύο υδροξυλικές ομάδες (*ortho*-διάσπαση) ή δίπλα στη μία από τις δύο υδροξυλικές ομάδες (*meta*-διάσπαση). Τα νέα ενδιάμεσα που προκύπτουν εισέρχονται στα κεντρικά μεταβολικά μονοπάτια, που οδηγούν στο σχηματισμό των ενδιάμεσων του κύκλου του Krebs [35].



Εικόνα 6: *ortho*- και *meta*- πορείες κατά τη διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου [36].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αερόβια αποικοδόμηση των ΒΤΕΧ (βενζολίου, τολουολίου, εθυλοβενζολίου και ξυλλίου). Έχει παρατηρηθεί ότι η αποικοδόμησή τους γίνεται με πέντε διαφορετικούς τρόπους. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 7) απεικονίζονται τα διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια.



Εικόνα 7: Διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια αποικοδόμησης [36]. Το R μπορεί να είναι CH₃ (τολουόλιο), 1-CH₃, 3-CH₃ (m-ξυλλίοιο), 1-CH₃, 4-CH₃ (p-ξυλλίοιο), 1-CH₃, 3-CH₃CH₂ (m-εθυλοτολουόλιο), 1-CH₃, 2-CH₃, 4-CH₃ (1,2,4 τριμέθυλοβενζόλιο)

Για παράδειγμα το στέλεχος *P. putida* Idaho, αναπτύσσεται παρουσία τολουολίου, μ-ξυλλίου, π-ξυλλίου, 1,2,4-τριμεθυλοβενζολίου (ψευδοκουμηνίου), 3-αιθυλοτολουολίου, βενζυλαλκοόλης,

βενζοϊκού οξέος, μ-τολουϊκού οξέος, π- τολουϊκού οξέος, 4-υδροξυβανζιλικής αλκοόλης, μ-κρεσόλης και π-κρεσόλης [37]. Οξειδώνει αυτούς τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες σε αντίστοιχες βενζυλαλκόλες (12) και καρβοξυλικά οξέα (14), τα οποία σχηματίζονται από την οξείδωση της μεθυλικής ομάδας. Αυτό το στέλεχος χρησιμοποιεί την ίδια μεταβολική οδό όπως το *P. putida* mt-2 για την αποικοδόμηση των αλκυλο-υποκατεστημένων αρωματικών υδρογονανθράκων [37].

Το στέλεχος *Pseudomonas raucimobilis* Q1 οξειδώνει το τολουόλιο σε βενζυλαλκόλη (12), έπειτα σε βενζαλδεύδη (13) και βενζοϊκό (14) όπου μετατρέπεται σε πυροκατεχόλη (8), η οποία ανοικοδομείται μέσω του m-μονοπατιού [38]. Το στέλεχος *P. mendocina* KR1 χρησιμοποιεί ένα πολυ-ενζυματικό σύστημα (μονοξυγενάση του τολουολίου) το οποίο καταλύει τις αντιδράσεις της μονοξυγενάσης. Αυτό το σύστημα εξαρτάται από τα αναγωγικά ισοδύναμα (NADH ή NADPH) και το οξυγόνο. Μετατρέπει το τολουόλιο σε π-κρεζόλη (2) όπου στη συνέχεια οξειδώνεται (έπειτα από αρκετά βήματα) σε πρωτοκατεχουϊκό οξύ (6), το οποίο αποικοδομείται περαιτέρω μέσω ortho-διάσπασης [39].

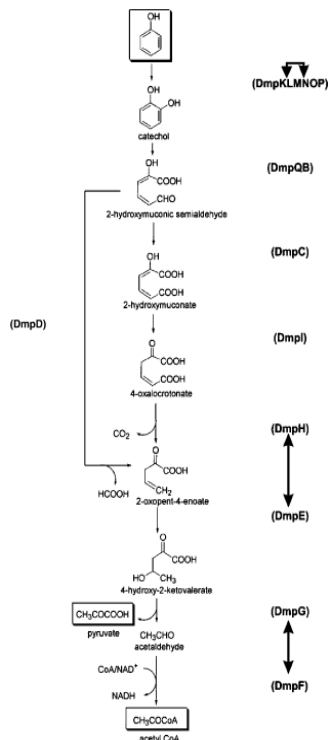
1.7 Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* rhDV1

Το βακτηριακό στέλεχος rhDV1 του γένους *Pseudomonas* απομονώθηκε από περιοχή διυλιστηρίων στην Δανία και το κύριο χαρακτηριστικό του είναι το γεγονός ότι αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα και ενέργειας οργανικούς ρύπους. Πρόκειται για ένα κατά Gram αρνητικό αερόβιο βακτήριο το οποίο ανήκει στο φύλο των Πρωτεοβακτηρίων, στην κλάση γάμμα Πρωτεοβακτήρια, στην οικογένεια *Pseudomonaceae* και στο γένος *Pseudomonas*. Φυλογενετική ανάλυση με βάση την αλληλουχία του 16S rRNA του στελέχους rhDV1 βρέθηκε ότι παρουσιάζει 99,8% ομοιότητα με το είδος *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, ενώ ο βέλτιστος ρυθμός ανάπτυξης για το βακτήριο επιτυγχάνεται υπό συνθήκες 30° C και 200mg/L συγκέντρωση φαινόλης, ενώ η ικανότητα αποικοδόμησης της φαινόλης ανέρχεται στα 52mg/L την ώρα [40].

Το ένζυμο που συμμετέχει στη *meta*- διάσπαση της κατεχόλης, η 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης έχει απομονωθεί και έχει χαρακτηριστεί [41]. Επίσης, έχουν αναγνωριστεί και όλα τα υπόλοιπα ένζυμα που συμμετέχουν στο *meta* μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης φαινόλης από το στέλεχος αυτό, μετά από κλασματοποίηση του κυτταροπλάσματικού πρωτεόματος [42]. Μέσω ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων - μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (Blue Native PAGE) σε συνδυασμό με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-Tricine/PAGE) –και με φασματοσκοπία μάζας, έχουν ταυτοποιηθεί τα λειτουργικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα που λαμβάνουν μέρος στο μεταβολισμό της φαινόλης (Εικόνα 8). Αυτά είναι:

i) η αποκαρβοξυλάση του 4-οξαλοκροτονικού με την υδρατάση του 2-υδροξυπεντ- 2,4 διενοϊκού,

- ii) η αφυδρογονάση της ακεταλδεΐδης και η αλδολάση του 4-υδροξυ-2-οξοβαλερικού,
- iii) η μονοξυγενάση του βενζολίου και η υδροξυλάση της φαινόλης [43].



Εικόνα 8: Το *meta*-μεταβολικό μονοπάτι κατά την αποικοδόμηση της φαινόλης (φαίνονται το σύνολο των ενζύμων που συμμετέχουν στα επιμέρους βήματα και ενδεχόμενες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ταυτοποιημένων ενζύμων).

Πρόσφατα, η μελέτη του μεμβρανικού πρωτεόματος κατά την ανάπτυξή του σε θρεπτικό υλικό LB, γλυκόζη και φαινόλη, οδήγησε στην ταυτοποίηση δύο πρωτεϊνών που εκφράζονται μόνο κατά την ανάπτυξη παρουσία του αρωματικού υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης η οποία συμμετέχει στη μεταφορά και αποικοδόμηση αρωματικών υδρογονανθράκων (A4XT65) καθώς και για μία πορίνη η οποία πιθανότατα συμμετέχει στη διαδικασία μεταφοράς και αποικοδόμησης αρωματικών ενώσεων (Q88GR2)[44].

1.8 Πρωτεομική ανάλυση

Με τον όρο πρωτέομα ονομάζουμε το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού σε δεδομένες συνθήκες. Όλοι οι οργανισμοί διαθέτουν γονίδια των οποίων τα προϊόντα έκφρασης είναι υπεύθυνα για σημαντικές λειτουργίες, καθώς και γονίδια που εκφράζουν πρωτεΐνες οι οποίες παρέχουν μοναδικές λειτουργίες, ειδικές για κάθε κύτταρο. Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες, η αύξηση των πληροφοριών στο επίπεδο των γονιδίων, παρέχει το έναυσμα για την πρωτεομική ανάλυση, προσφέροντας ένα πλαίσιο εργασίας βασιζόμενο κυρίως στην αλληλουχία βάσεων του γονιδιώματος, για την εξερεύνηση του πρωτεόματος. Τα τελευταία χρόνια η πρωτεομική ανάλυση αναπτύσσεται ραγδαία, εξαιτίας κυρίως του διαρκώς αυξανόμενου αριθμού των γονιδιωμάτων οργανισμών που αποκωδικοποιούνται πλήρως.

Αν και το γονιδίωμα μας δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των πρωτεϊνών ενός οργανισμού δε σχετίζεται άμεσα με την έκφραση των πρωτεϊνών. Η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών κατά τη μεταγραφή και τη μετάφραση, αλλά και οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών (δημιουργία τεταρτοταγούς δομής, φωσφορυλιώσεις, γλυκοζυλιώσεις, αφαίρεση σηματοδοτικών αλληλουχιών κ.α.) αποτελούν τους βασικούς λόγους της μη συσχέτισης μεταξύ της γονιδιακής αλληλουχίας και της πρωτεϊνικής λειτουργίας. Η μεγαλύτερη λοιπόν πρόκληση στον τομέα της πρωτεομικής ανάλυσης είναι η εύρεση τρόπων με τους οποίους θα καταστεί δυνατή η ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού διακριτών πρωτεϊνικών μορίων, τα περισσότερα εκ των οποίων απαντώνται σε χαμηλά επίπεδα, ενώ πολλά από αυτά υπάρχουν σε πολλαπλές τροποποιημένες μορφές [45].

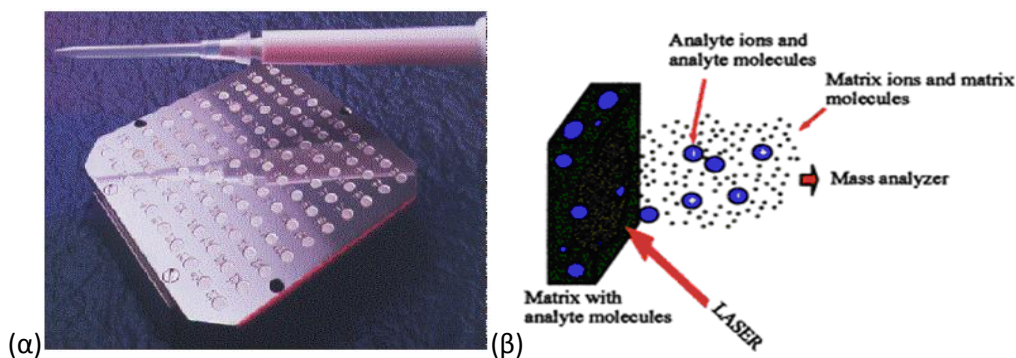
Σημαντικό βήμα στην ανάπτυξη της πρωτεομικής ανάλυσης αποτέλεσε το γεγονός ότι, μέσω την εισαγωγή διαφόρων σημαντικών καινοτομιών είναι δυνατόν να γίνει ανάλυση και χαρακτηρισμός πρωτεϊνών με την φασματομετρία μάζας [46],[47]. Η πρωτεομική ανάλυση μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις βασικούς τομείς, χαρακτηριστικό των οποίων είναι ότι ο ένας συμπληρώνει τον άλλο. Αυτοί είναι:

- (α) η πρωτεομική ανάλυση έκφρασης,
- (β) η λειτουργική πρωτεομική ανάλυση και
- (γ) η ανάλυση με τη χρήση της βιοπληροφορικής.

1.9 Μέθοδοι πρωτεομικής ανάλυσης - MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)

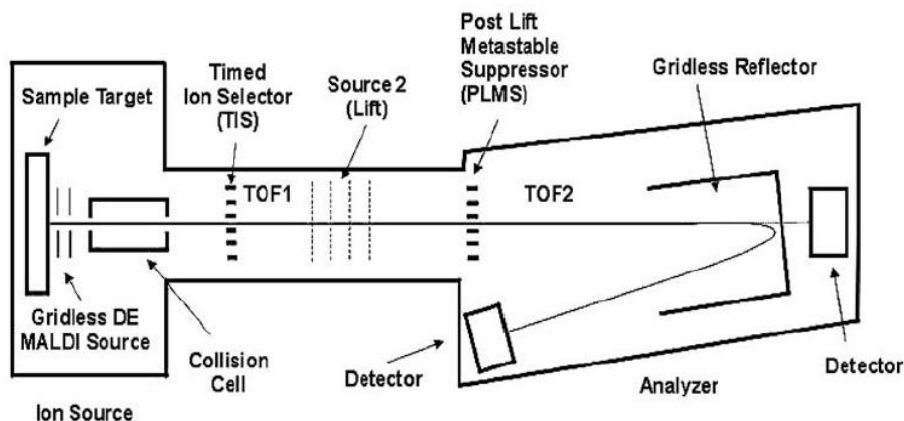
Στην πρωτεομική ανάλυση χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές μέθοδοι ήπιου ιονισμού των πεπτιδίων: η απόπτωση με laser υποβοηθούμενη από υπόστρωμα (Matrix-Assisted Laser Desorption) και ο ηλεκτροψεκασμός (ElectroSpray). Η πρώτη μέθοδος αναπτύχθηκε ταυτόχρονα από τους Karas & Hillenkamp 1988 και τους Tanaka et al. 1988 [46],[47]. Στη μέθοδο αυτή, για να εξαχθούν στην αέρια φάση, τα βιομόρια συνκρυσταλλώνονται με μεγάλη ποσότητα υποστρώματος (μήτρας) πάνω σε μεταλλική επιφάνεια. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι ακτινοβολούνται από παλμό laser, συνήθως αζώτου με μήκος κύματος 337 nm (Εικόνα 9(β)). Το υπόστρωμα είναι συνήθως μικρό οργανικό μόριο που εμφανίζει απορρόφηση στο μήκος κύματος του laser που χρησιμοποιείται. Τα ιδανικά υποστρώματα όταν αναλύονται μικρά μόρια (π.χ πεπτίδια) είναι το α-κυάνο-4-κιναμινικό οξύ (HCCA), και το διυδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB), για την περίπτωση μεγάλων μορίων πρωτεΐνης). Τα υποστρώματα διαφέρουν ως προς την στην ενέργεια που μεταφέρουν στο βιομόριο κατά την απόπτωση και τον ιονισμό και έτσι καθορίζουν το βαθμό θραυσματοποίησης του. Η διαδικασία ιονισμού που επιτυγχάνεται στο MALDI παραμένει ως ένα μεγάλο βαθμό ακόμα άγνωστη. Η ένταση του σήματος που ανιχνεύεται, εξαρτάται από την ποσότητα των πεπτιδίων στον κρύσταλλο, τη δυνατότητα του βιομορίου να προσλάβει ή να δώσει ένα πρωτόνιο κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, από τις χημικές ιδιότητες των πεπτιδίων καθώς και από ένα μεγάλο αριθμό άλλων παραγόντων. Για το λόγο αυτό είναι δύσκολη η αντιστοιχία της κορυφής του πεπτιδίου με την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται.

Τρεις είναι οι βασικές αρχές διαχωρισμού και ανάλυσης μαζών: διαχωρισμός στηριζόμενος στο χρόνο πτήσης των ιόντων (time of flight, TOF), διαχωρισμός από τετραπολικό ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από μεταλλικές ράβδους (quadrupole MS), ή από επιλεκτική εισαγωγή ιόντων σε τρισδιάστατο πεδίο παγίδευσης (ion trap). Για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών μέσω πεπτιδίων, μια επιπλέον διαδικασία, πέραν της αποτύπωσης της μάζας τους (Peptide Mass Fingerprint, PMF), αποτελεί ο προσδιορισμός της αμινοξικής τους αλληλουχίας. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται η φασματοσκοπία μάζας σε σειρά (MS/MS), η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί εφαρμόζοντας δύο φορές την ίδια αρχή διαχωρισμού των ιόντων ή συνδυάζοντας δύο διαφορετικές αρχές.



Εικόνα 9: (α) η μεταλλική επιφάνεια πάνω στην οποία εφαρμόζονται τα δείγματα (β) το συγκρυσταλλωμένο επάνω σε μεταλλικό πλακίδιο δείγμα με το υπόστρωμα ακτινοβολείται με δέσμη laser και επιτυγχάνεται η εξάχνωση και ο ιονισμός των πεπτιδίων

Στην Εικόνα 10 φαίνεται η διάταξη ενός φασματογράφου μάζας που συνδυάζει τη μέθοδο ιονισμού MALDI με τη μέθοδο διαχωρισμού TOF/TOF. Κατά τη διαδικασία αυτή τα δείγματα αρχικά συγκρυσταλλώνονται με μόρια του αναλύτη πάνω σε μεταλλική επιφάνεια (Εικόνα 9α). Τα δείγματα στη συνέχεια ακτινοβολούνται από παλμό laser, δημιουργώντας μία μικρή δέσμη ιόντων. Τα ιόντα επιταχύνονται με καθορισμένο ποσό κινητικής ενέργειας και στη συνέχεια ταξιδεύουν στο σωλήνα πτήσης (Εικόνα 10). Τα μικρότερα ιόντα έχουν μεγαλύτερη ταχύτητα και φτάνουν στον ανιχνευτή πριν από τα μεγαλύτερα ιόντα, παράγοντας το φάσμα του χρόνου πτήσης. Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί η οργανολογία του MALDI LIFT TOF/TOF φασματογράφου μάζας, ο οποίος περιλαμβάνει τη διάταξη “lift”. Μέσω της διάταξης αυτής αυξάνεται η δυναμική ενέργεια των ιόντων, προσαυξάνοντας έτσι την αρχική τους κινητική ενέργεια, προκειμένου να ανιχνευθούν κατόπιν της θραυσματοποίησης του αρχικού πρόδρομου ιόντος/πεπτιδίου. Σε ακολουθία βρίσκεται η διάταξη “post lift metastable suppressor” (PLMS), η οποία απομακρύνει τα εναπομείναντα πρόδρομα ιόντα που δεν έχουν θραυσματοποιηθεί, εμποδίζοντας το σχηματισμό μη επιθυμητών θραυσμάτων ιόντων καθώς και ο δεύτερος αναλυτής μάζας χρόνου πτήσης [48]. Η υψηλή αποτελεσματικότητα και ακρίβεια της μεθοδολογίας LIFT δίνει MS/MS φάσματα με υψηλή διακριτική ικανότητα, ενώ το σύνολο των πληροφοριών που προκύπτουν από τη διαδικασία του MS/MS μπορούν να ληφθούν στο επίπεδο του fmoI εντός μερικών δευτερολέπτων.



Εικόνα 10: Η διάταξη ενός LIFT-TOF/TOF φασματογράφου μάζας.

1.10 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της βιοαποικοδόμηση του τολουολίου από το βακτήριο *Pseudomonas* sp. ρhDV1. Παράλληλα, μελετάτε η ανάπτυξη του βακτηρίου χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα το τολουόλιο, και διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης. Αναπτύσσεται μεθοδολογία για την απομόνωση του μεμβρανικού και κυτταροπλασματικού πρωτεόματος. Τέλος, πραγματοποιείται μελέτη των μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών πρωτεόματος του στελέχους αυτού αναπτυσσόμενο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης, τολουολίου και ηλεκτρικού.

2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν απιονισμένο, με στήλη ιοντοανταλλακτικών ρητινών και δισαπιονισμένο από ειδικό σύστημα αντίστροφης όσμωσης.

2.1 Διαλύματα Καλλιιεργειών

ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ LB

Peptone	NaCl	Yeast Extract	Beef Extract
5 g / L	5 g / L	2 g / L	1 g / L

Γίνεται ρύθμιση του pH = 7,4

Για το στερεό θρεπτικό υλικό: προσθήκη 1,5% άγαρ

ΘΡΕΠΤΙΚΟ M₉R

5 x M9 άλατα*	Θειικάάλατα**	1M MgSO ₄	1M CaCl ₂	dH ₂ O
200 ml/L	7 ml/L	2 ml/L	0,1 ml/L	800 ml/L

* Διάλυμα 5 x M9 άλατα

Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	NaCl	NH ₄ Cl
37,61 g/L	1,5 g/L	2,5 g/L	5 g/L

Ρύθμιση του pH = 7,4

**Θειικά άλατα

MgSO ₄ x 7H ₂ O 10% w/v	FeSO ₄ x 7H ₂ O 1% w/v
---	--

ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

Disodium Succinate 10mM (2,70 gr/L) [49]

Φαινόλη (MB=94,1) 2,17mM και 8,4mM(200mg/L και 800mg/L)

Τολουόλιο (MB=92,14 και d=0,865g/ml) 2,17mM (200mg/L)

2.2 Ρυθμιστικά και διαλύματα

Ρυθμιστικό Tris/H₂SO₄: pH=8 (50mM Trisma base, Mr=121,14)

Διαλύματα παρασκευής αποδιατακτικής πηκτής (SDS – Tricine/ PAGE) [50]

Ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο (AB-mix-solution 49,5%T, 3% C)

Ακρυλαμίδιο 48% w/v	Δισακρυλαμίδιο 1,5% w/v
---------------------	-------------------------

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής (Gel Buffer) 3X

Tris 3M	SDS 0,3% (w/v)
---------	----------------

pH 8,45 (ρύθμιση με HCl)

Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (Sample Buffer)

SDS 12% (w/v)	Glycerol 10% (w/v)	Mercapto ethanol* 6% (v/v)	Coomasie Brilliant Blue G- 250 0,05%	Trisma base 150mM	pH=7 με HCl
------------------	-----------------------	----------------------------------	--	----------------------	----------------

*Η μερκαπτοαιθανόλη προστίθεται στο διάλυμα γιατί συντελεί στη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών στα μόρια των πρωτεϊνών

Ρυθμιστικό διάλυμα Ανόδου (10X)

Tris 1M pH = 8,9 (ρύθμιση με HCl)

Ρυθμιστικό διάλυμα Καθόδου (10X)

Tris 1M	Tricine 1M	SDS 1,0% (w/v)	pH = 8,25
---------	------------	----------------	-----------

Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού 300ml (10%) (για πλάκες 10cm x 10cm x 0,2cm)

AB-mix solution 60ml	Gel buffer 3x 100ml	Glycerol 30gr	APS 10% w/v 1500μl	TEMED 150μl
-------------------------	------------------------	------------------	-----------------------	----------------

Διάλυμα πηκτής επιστοίβασης 150ml (14%) (για πλάκες 10cm x 10cm x 0,2cm)

AB-mix solution 10ml	Gel buffer 3x 40ml	APS 10% w/v 900μl	TEMED 90μl
-------------------------	-----------------------	----------------------	---------------

Διαλύματα παρασκευής μη αποδιατακτικής πηκτής (BN/ PAGE) [51]

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής (Gel Buffer 3x)

6-αμινο-καπροϊκό οξύ (6-aminohexanoic acid) 1500 mM

Bis-Tris 150mM, Ρύθμιση του pH με HCl, pH=7

Ρυθμιστικό διάλυμα Ανόδου

BisTris/HCl 50 mM, pH=7

Ρυθμιστικό διάλυμα Καθόδου

Tricine/ 50 mM	HCl	Bis-Tris 15 mM	Coomassie Brilliant Blue G-250 0,02% (w/v)	DDM 0,02% (για μεμβρανικά κλάσματα)
-------------------	-----	-------------------	--	---

Διαλύματα χρώσης/αποχρωματισμού πηκτών

Κολλοειδής Χρώση Coomassie Brilliant Blue G-250 (Blue Silver)** [52]

Coomassie brilliant Blue G-250 0,12% w/v	Θεικό αμμώνιο 10% v/v	Φωσφορικό οξύ, H ₃ PO ₄ 10% v/v	Μεθανόλη 20% v/v
---	--------------------------	--	---------------------

Διάλυμα αποχρωματισμού

Οξικό οξύ 7% v/v	Μεθανόλη 5% v/v
------------------	-----------------

2.3 Διάλυμα BRADFORD

Stock 30ml

Αιθανόλη 9,5ml	H ₃ PO ₄ (85%) 20,7ml	Coomassie Blue G 35mg
----------------	---	-----------------------

Working solution

dd H ₂ O 425ml	Αιθανόλη 14,25ml	H ₃ PO ₄ (85%) 31,06ml	Stock solution 30ml
------------------------------	---------------------	---	------------------------

2.4 Διαλύματα που χρησιμοποιούνται κατά την πρωτεολυτική διάσπαση σε πηκτή

- 1) Διάλυμα διττανθρακικού αμμωνίου 50mM (Ammonium bicarbonate Solution, ABS)
- 2) Διάλυμα αποχρωματισμού (50% v/v Acetonitrile, ACN)
- 3) Διάλυμα αναγωγής/αποδιάταξης 10mM διθειοθρεϊτόλης, DTT σε 50mM ABS
- 4) Διάλυμα αλκυλίωσης 55mM ιωδοατεταμιδίου, IAA σε 50mM ABS
- 5) Ρυθμιστικό διάλυμα θρυψίνης, 10mM ABS, 10% ACN

2.5 Καλλιέργεια του στελέχους

Αρχικά το βακτήριο τοποθετείται σε τριβλία με θρεπτικό LB στους 30° C όπου μετά από μια μέρα επώασης σχηματίζονται αποικίες. Στη συνέχεια λαμβάνεται μία αποικία και τοποθετείται σε θρεπτικό LB για 12 περίπου ώρες, στους 30° C υπό ανακίνηση και ακολουθεί εμβολιασμός, με 1:50 αραιώση αυτής της καλλιέργειας είτε σε θρεπτικό M_{9R} [53], όπου περιέχεται η φαινόλη ως πηγή άνθρακα σε συγκέντρωση 200mg/L (2,1mM) ή το τολουόλιο σε συγκέντρωση 200mg/L (2,1mM) ή το ηλεκτρικό σε συγκέντρωση 2,7gr/lit (10mM). Η ποσότητα του ρύπου που δεν καταναλώνεται μετράται με φασματομετρία απορρόφησης ορατού. Το ποσό του ρύπου που καταναλώθηκε αναπληρώνεται ως την επιθυμητή τιμή. Η μέτρηση αυτή επαναλαμβάνεται κάθε 3 ώρες σε καλλιέργειες με μοναδική πηγή άνθρακα την φαινόλη και 4 με 6 ώρες για το τολουόλιο. Για το ηλεκτρικό δεν γίνεται αναπλήρωση. Όταν η απορρόφηση στα 600nm (OD₆₀₀) της καλλιέργειας φτάσει μεταξύ 0,6-0,8 τα κύτταρα συλλέγονται ή χρησιμοποιούνται για εμβολιασμό, (με 1:25 αραιώση) σε θρεπτικό M_{9R} [53], όπου περιέχεται η φαινόλη ως πηγή άνθρακα σε συγκέντρωση 400mg/L. Όταν η OD₆₀₀ της καλλιέργειας φτάσει ξανά μεταξύ 0,6-0,8 τα κύτταρα συλλέγονται ή γίνεται ξανά εμβολιασμός, με 1:25 αραιώση αυτής της καλλιέργειας σε θρεπτικό M_{9R} [53], όπου περιέχεται η φαινόλη ως πηγή άνθρακα σε συγκέντρωση 600mg/L ή 800mg/L. Όταν η OD₆₀₀ της καλλιέργειας φτάσει μεταξύ 0,6-0,8 τα κύτταρα συλλέγονται.

2.5.1 Μέτρηση συγκέντρωσης φαινόλης με φασματοφωτόμετρο

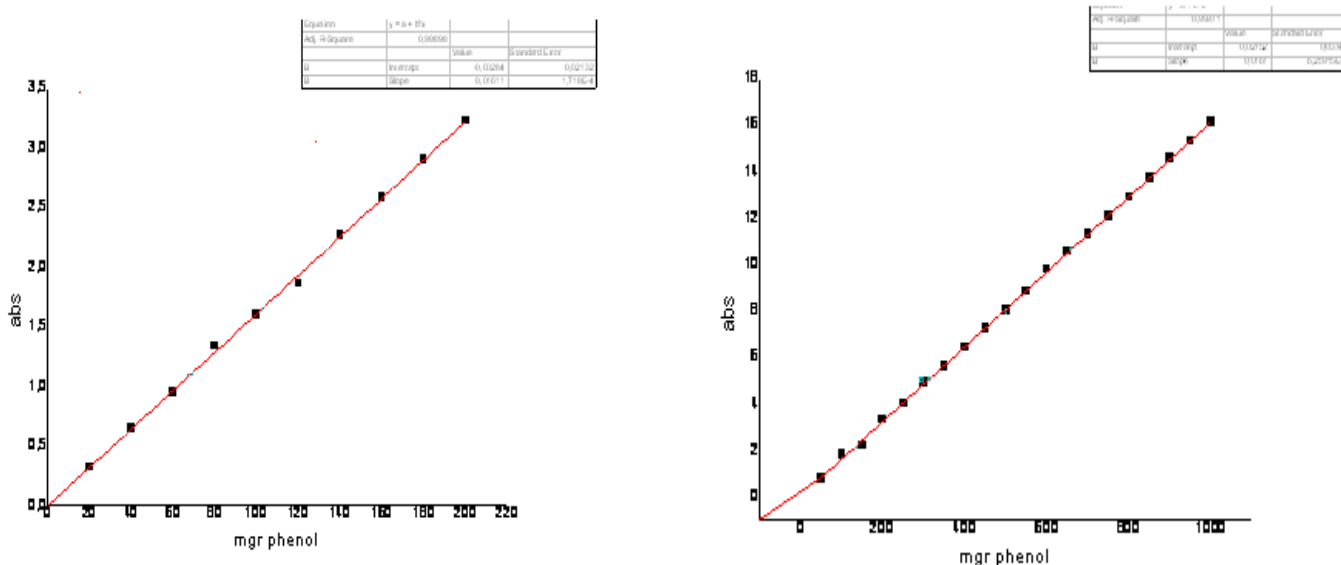
Σχηματίστηκαν δύο πρότυπες καμπύλες συγκέντρωσης της φαινόλης σε συνάρτηση με την απορρόφηση στα 270nm, όπου σε αυτό το μήκος κύματός απορροφά η φαινόλη (πίνακας 1). Βάσει των πρότυπων καμπυλών υπολογίζεται η συγκέντρωση της φαινόλης σε κάθε δείγμα. Στα δείγματα αυτά έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις.

Πίνακας 1

Στήλη 1

Στήλη 2

Abs 270nm	mgr φαινόλης	Abs 270nm	mgr φαινόλης
0,32275	20	0,80525	50
0,6457	40	1,6115	100
0,9483	60	2,41621	150
1,3365	80	3,321	200
1,60075	100	4,02722	250
1,86225	120	4,9311	300
2,26223	140	5,63681	350
2,582	160	6,442	400
2,90475	180	7,24725	450
3,2275	200	8,04982	500
		8,85765	550
		9,773	600
		10,46836	650
		11,2734	700
		12,07875	750
		12,911	800
		13,67925	850
		14,5845	900
		15,29975	950
		16,105	1000



Εικόνα 11&12: Καμπύλες απορρόφησης στα 270nm προς mgr φαινόλης.

2.5.2 Συλλογή Κυττάρων

Εφόσον η εκάστοτε καλλιέργεια φτάσει σε OD=0,6-0,8, η καλλιέργεια φυγοκεντρίται στα 6000g, για 20min, στους 4° C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris/ H₂SO₄, pH=8 (1,5mL ανά 1g κυττάρων) πριν την αποθήκευσή τους στους -40° C.

2.6 Λύση κυττάρων – Συλλογή μεμβρανών

Στο κυτταρικό εναίωρημα που συλλέχθηκε, προστίθενται 200μl 50mM βενζαμιδίνης και 200μl 50mM αμινοκαπροϊκού οξέος σε κάθε 10 ml κυτταρικού αιωρήματος (τελική συγκέντρωση 1mM). Γίνεται ομογενοποίηση των κυττάρων και λύση τους με υπέρηχους (30 watt, για 20min σε 20 κύκλους, 15sec σε υπέρηχους και 45sec σε ηρεμία για κάθε κύκλο) στους 4°C. Έπειτα προστίθενται λυσοζύμη τελική συγκέντρωση 50μg/ml και το κυτταρικό διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 20min στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 4500g, για 10min, στους 4°C. Το υπερκείμενο που συλλέγεται και φυγοκεντρίται για 1h, 10000g σε ρότορα TFT 50.38, στους 4°C. Το ίζημα (μεμβρανικό κλάσμα) συλλέγεται και επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris/H₂SO₄, pH=8, γίνεται ομογενοποίηση του στους 4°C και φυλάσσεται στους -40°C. Το υπερκείμενο (κυτταροπλασματικό κλάσμα) συλλέγεται ξεχωριστά.

2.7 Κατεργασία μεμβρανών με Ethylene-dianine-tetra-acetic acid

1mg πρωτεϊνικού διαλύματος των απομονωμένων μεμβρανών επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris/H₂SO₄, pH=8, όγκου 5ml, που περιέχει 5mM Ethylene-dianine-tetra-acetic acid (EDTA). Τα δείγματα τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων (BANDELIN SONOREX, RK 255H), στους 4 °C, για 6min περίπου. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 1 h, 100000g, στους 4 °C. Το ίζημα συλλέγεται, επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris/H₂SO₄, pH=8 και γίνεται ομογενοποίησή του στους 4 °C.

2.8 Κατεργασία μεμβρανών με Na₂CO₃ [54]

2mg πρωτεϊνικού διαλύματος μεμβρανών επωάζεται σε διάλυμα 100mM Na₂CO₃, όγκου 5ml στους 4 °C με περιστασιακό vortex για 30min. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 45min, με 100000g, στους 4 °C. Το ίζημα, που αποτελεί το μεμβρανικό κλάσμα συλλέγεται, επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris/H₂SO₄, pH=8 και γίνεται ομογενοποίησή του.

2.9 Διαλυτοποίηση μεμβρανικού κλάσματος με n- Dodecyl-β-D-Maltoside

Το μεμβρανικό κλάσμα διαλυτοποιείται, αρχική πρωτεϊνική συγκέντρωση 1mg/ml, με το ήπιο μη ιονικό απορρυπαντικό n-Dodecyl-β-D-Maltoside (DDM) συγκέντρωσης 0,5% (αναλογία απορρυπαντικού προς πρωτεΐνη 5:1). Η διαλυτοποίηση περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων στον πάγο υπό ήπια ανάδευση για 15min, 30min και 45min, ενώ ακολουθεί φυγοκέντρωση για 2h, σε 35000g, στους 4°C. Ακολούθως συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο στη συνέχεια είτε κατακρημνίζεται με TCA ή ακετόνη εφόσον πρόκειται να διαχωριστεί σε συνθήκες αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης SDS-Tricine/ PAGE, είτε προστίθεται σε αυτό 10% γλυκερόλη στην περίπτωση που ακολουθεί μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση Blue Native-PAGE.

2.10 Διαβάθμιση ζάχαρης

Διαλύματα ζάχαρης σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris/H₂SO₄ pH=8 που περιέχει 10mM ακετόνης

Σε ειδικά tubes προστίθενται 3ml 30% w/v διαλύματος ζάχαρης, 4ml 20% w/v διαλύματος ζάχαρης, 2ml 10% w/v διαλύματος ζάχαρης και στο επάνω μέρος 1ml κυτταροπλασματικού κλάσματος. Στη

συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10000g για 18h στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης γίνεται συλλογή των κλασμάτων.

2.11 Μελέτη μεταβολικού μονοπατιού

Από το εναιώρημα κυττάρων λαμβάνονται 150μl και αραιώνονται με 2ml ρυθμιστικού διαλύματος. Σε κυψελίδα χαλαζία, μήκους 1cm, που περιέχει μαγνητάκι για ανάδευση εισάγονται τα 2ml διαλύματος, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 0,6mg βακτηριακής μάζας. Σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, λαμβάνεται φάσμα απορροφήσεων στο εύρος μηκών κύματος 250nm-450nm, το οποίο αποτελεί το φάσμα μάρτυρα. Στη συνέχεια προστίθενται 0,05mM διαλύματος κατεχόλης και λαμβάνονται φάσματα κάθε 2min για την ίδια περιοχή μηκών κύματος.

2.12 Τεστ κινητικής του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης

Λαμβάνονται 2ml διαλύματος, που αντιστοιχούν σε που περιέχουν 1mg πρωτεΐνης και αποτελούν το διάλυμα αναφοράς. Στη συνέχεια προστίθενται 0,05mM διαλύματος κατεχόλης. Μετρούνται time-based φάσματα απορρόφησης στα 270nm και στα 375nm.

2.13 Μέθοδος Bradford [55]

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ενός δείγματος. Αρχικά κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις της αλβουμίνης που προέρχεται από ορό βοδιού (Bovine Serum Albumin, BSA) μετρώντας την απορρόφηση στο ορατό (595nm). Κατόπιν μετράται η απορρόφηση στα 595nm του πρωτεϊνικού δείγματος και μέσω της πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται η συνολική πρωτεϊνική συγκέντρωση σε mg/ml.

2.13.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης Bradford

Πίνακας 2: μl BSA, ρυθμιστικού Tris/H₂SO₄ και διαλύματος Bradford

BSA (μl)	Tris/H ₂ SO ₄ (μl)	Bradford (μl)
0	100	900
2,5	97,5	900
5	95	900
7,5	92,5	900
10	90	900
12,5	87,5	900
15	85	900
17,5	82,5	900
20	80	900

Τα δείγματα μετά από ισχυρή ανάδευση αφήνονται να ηρεμήσουν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, μετράται η απορρόφηση στα 595nm. Η καμπύλη που κατασκευάζεται είναι η απορρόφηση σε συνάρτηση των μg BSA.

2.14 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών

- **Με τριχλωροξικό οξύ TCA**

Στην ποσότητα του εκάστοτε πρωτεϊνικού διαλύματος προστίθενται 100% τριχλωροξικού οξέος TCA (100% w/v) τελική συγκέντρωση 10% και το διάλυμα παραμένει στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 11500g, για 10min και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το ίζημα πλένεται προσθέτοντας κρύα ακετόνη και γίνεται νέα φυγοκέντρηση σε 11500g, στους 4°C, για 10min. Η διαδικασία της πλύσης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Τέλος, απομακρύνεται το υπερκείμενο, αφήνεται να στεγνώσει το ίζημα για λίγη ώρα και επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος

ηλεκτροφόρησης SDS-Tricine, το οποίο επάζεται σε λουτρό υπερήχων για 30min περίπου, προτού φορτωθεί στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

- **Με ακετόνη**

Στην ποσότητα του εκάστοτε πρωτεϊνικού διαλύματος προστίθενται τριπλάσιος όγκος ακετόνης παραμένει στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 11500g, για 10min και απομακρύνεται το υπερκείμενο, αφήνεται να στεγνώσει το ίζημα για λίγη ώρα και επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος ηλεκτροφόρησης SDS-Tricine, το οποίο επάζεται σε λουτρό υπερήχων για 30min περίπου, προτού φορτωθεί στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

2.15 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με ουρία (SDS – PAGE)

Η σύσταση και ο τελικός όγκος των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και στοίβαξης για 4 gels (διαστάσεις 20cm x 22 cm, 1 mm πάχος διαχωριστικού μεταξύ τους) είναι η εξής:

Αντιδραστήρια (ml)	Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (10%)	Διάλυμα πηκτής στοίβαξης (4%)
AB-mix	60	8,3
Gel-buffer (3X)	100	25
Urea	109,5g	-
τελικός όγκος με προσθήκη ddH ₂ O	300	100
APS 10% (w/v)	1,5	0,75
TEMED	0,15	0,075

Το διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού μεταφέρεται μεταξύ γυάλινων πλακών και στη συνέχεια τοποθετείται βουτανόλη για τη δημιουργία λείας επιφάνειας. Μετά τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου αφαιρείται η βουτανόλη και τοποθετείται το διάλυμα της πηκτής στοίβαξης, στο οποίο προσαρμόζεται το χτενάκι για τη δημιουργία πηγαδιών. Στα πηγαδάκια φορτώνονται 80 μl δείγματος και η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε σταθερή τάση 80V για ~16h. Η χρώση και ο αποχρωματισμός γίνονται με τα διαλύματα για την απλή χρώση Coomassie, είτε για την κolloειδή Coomassie (Blue Silver) και με παραμονή της πηκτής στο καθένα για ~24

2.16 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS – Tricine/ PAGE)

Η σύσταση και ο τελικός όγκος των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και στοίβαξης για 4 gels (διαστάσεις 20cm x 22 cm, 1 mm πάχος διαχωριστικού μεταξύ τους) είναι η εξής:

Αντιδραστήρια (ml)	Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (10%)	Διάλυμα πηκτής στοίβαξης (4%)
AB-mix	60	8,3
Gel-buffer (3X)	100	25
Glycerol	30g	-
τελικός όγκος με προσθήκη ddH ₂ O	300	100
APS 10% (w/v)	1,5	0,75
TEMED	0,15	0,075

Η διαδικασία που λαμβάνει χώρα αναφέρεται παραπάνω (τμήμα 2.15)

2.17 Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με διαβάθμιση (Blue Native – PAGE) [57]

Η μονοδιάστατη μη-αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (BN-PAGE) είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό υδατοδιαλυτών και μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων με μοριακό βάρος μεταξύ 100 και 1,000 kDa. Η διακριτική της ικανότητα στην περιοχή 10-100 kDa είναι χαμηλή. Πρόκειται για μία μέθοδο διαχωρισμού που εξαρτάται από το μέγεθος των συμπλόκων. Στην ηλεκτροφορική κινητικότητα των πρωτεϊνών συνεισφέρει η πρόσδεση του αρνητικά φορτισμένου μορίου της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Παρασκευάζονται δυο διαλύματα πολυακρυλαμιδίου διαφορετικών συγκεντρώσεων όπου μεταφέρονται στη συσκευή ανάμιξης, όπου μετά την προσθήκη των APS και TEMED, τα διαλύματα ανακινούνται ελαφρά, έτσι ώστε ο καταλύτης και ο εκκινητής να δράσουν σε όλο τον όγκο του διαλύματος με αποτέλεσμα ο πολυμερισμός να γίνει ομοιόμορφα. Παράλληλα γίνεται και η διαβάθμιση της πηκτής διαχωρισμού. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου, για την μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, παρασκευάστηκαν σε πλάκες διαστάσεων 19,5cmx16,5cmx0,13cm. Τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν περιείχαν 10%

γλυκερόλη. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 10°C, αρχικά σε χαμηλή τάση (~80 V) και στη συνέχεια στα 160 V και είχε διάρκεια περίπου 12 ώρες. Η ακριβής σύσταση για την παρασκευή μίας πηκτής είναι η εξής:

Αντιδραστήρια (ml)	Διάλυμα πηκτής (13%)	Διάλυμα πηκτής (4%)
AB-mix	6,85	2,10
Gel-buffer (3X)	8,69	8,69
Glycerol	5,84g	-
ddH ₂ O	5,84	15,21
APS 10% (w/v)	0,11501	0,2447
TEMED	0,0115	0,02447

2.18 Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (Blue Native PAGE/SDS PAGE)

1^η διάσταση : Blue Native PAGE (Περιγράφεται στην παράγραφο 2.17)

2^η διάσταση : SDS-Tricine PAGE

Τα διαχωρισμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα ηλεκτροφορήθηκαν σε μια δεύτερη διάσταση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης SDS-Tricine PAGE, για τον προσδιορισμό των συμπλόκων που συγκροτούν τα σύμπλοκα αυτά. Η ζώνη από τη μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση που φέρει τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, επώαστηκε για 30 λεπτά σε διάλυμα που περιέχει 1%w/v SDS και άλλα 30 λεπτά σε διάλυμα 1%v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, προκειμένου αυτά να αποδιαταχθούν. Ακολούθως η ζώνη της πηκτής ηλεκτροφορήθηκε σε μια δεύτερη διάσταση αποδιατακτικής πηκτής SDS-Tricine PAGE, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω χρησιμοποιώντας μόνο την πηκτή διαχωρισμού που έχει συγκέντρωση 10% ακρυλαμιδίου/δισ ακρυλαμιδίου.

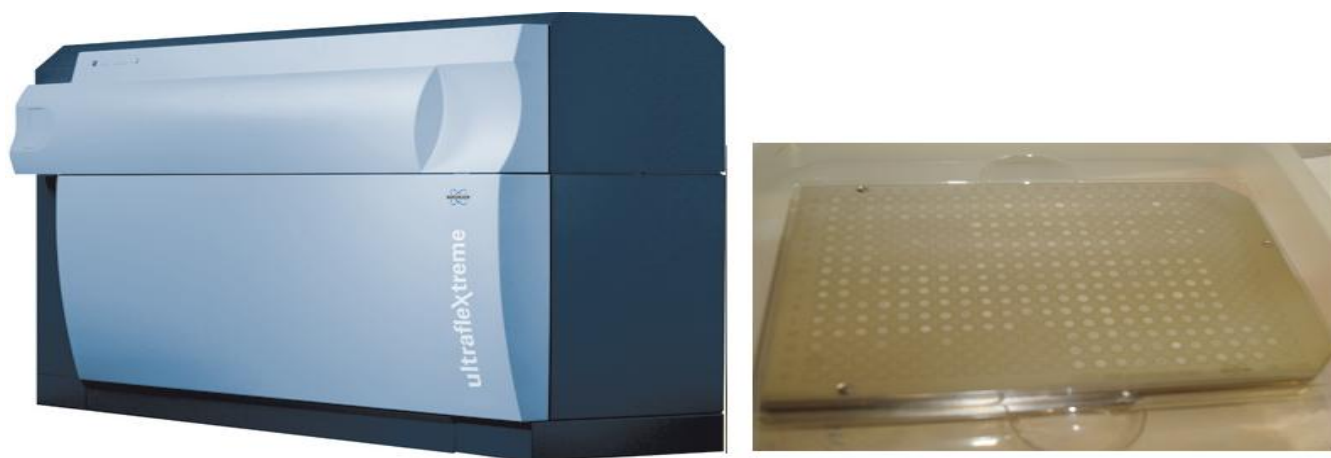
2.19 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου [58]

Η θρυψίνη είναι το περισσότερο χρησιμοποιούμενο ένζυμο το οποίο διασπάει στο C-τερματικό των πεπτιδικών δεσμών αργινίνης ή λυσίνης. Οι πρωτεολύσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν απευθείας στην πηκτή του πολυακρυλαμιδίου (*in situ*) έπειτα από αποδιατακτική (2D Blue-native-SDS-PAGE) ηλεκτροφόρηση και χρώση με μπλε Coomassie (Blue Silver). Το πρωτόκολλο που ακολουθείται έχει ως εξής: τα στίγματα των πρωτεϊνών αποκόπτονται από τις βαμμένες με μπλε Coomassie πηκτές

και αποχρωματίζονται με τα διαλύματα 50%v/v ACN και 50mM διττανθρακικό αμμώνιο, με τρεις πλύσεις εναλλάξ διάρκειας 10min η καθεμία. Στη συνέχεια προστίθενται 100% ACN και επώαση για 10min. Ακολουθεί αναγωγή των ξηραμένων πηκτών με 10mM DTT σε 50mM διττανθρακικό αμμώνιο και επώαση για 45min στους 56°C. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται οι πλύσεις με τα διαλύματα 50%v/v ACN και 50mM διττανθρακικό αμμώνιο, εναλλάξ διάρκειας 10min η καθεμία. Στη συνέχεια προστίθενται 100% ACN και επώαση για 10min. Έπειτα, ακολουθεί αλκυλίωση με 55mM ιοδοακεταμίδιο σε 50mM διττανθρακικό αμμώνιο για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Τα κομμάτια της πηκτής πλένονται με 50mM διττανθρακικό αμμώνιο και με 50% ACN, επαναλαμβάνοντας ουσιαστικά τη διαδικασία που ακολουθείται και στο αποχρωματισμό. Στα κομμάτια της πηκτής προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεόλυσης το οποίο περιέχει 125ng θρυψίνης από πάγκρεας χοίρου και αφήνονται για 90min σε πάγο. Κατόπιν τοποθετούνται στους 37°C. Μετά από 14-16h τα πεπτίδια από τα κομμάτια της πηκτής ανακτώνται με διαδοχικά βήματα ένωσης των υπερκειμένων που προκύπτουν από δύο διαδοχικές επώσεις διάρκειας 30min σε 50% ACN, 0,1% TFA και τέλος σε διάλυμα 100% ACN. Το συνολικό διάλυμα που προκύπτει ξηραίνεται.

2.20 Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας (MS/MS)

Τα ξηρά δείγματα, μετά από τη διαδικασία της πρωτεόλυσης, επαναδιαλύθηκαν σε 8μl 50% ACN, 0,1% TFA, χρησιμοποιώντας δισαπιονισμένο νερό. Επάνω σε μεταλλικό πλακίδιο 384 θέσεων (Εικόνα 13 (β))τοποθετήθηκαν 1μl από το κάθε δείγμα και 1μl διαλύματος 8,33 mg/ml w/v α-κυανο-4-υδροξυκινναμικό οξύ σε 50% ACN, 0,1% TFA 0,1%. Τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και το πλακίδιο τοποθετήθηκε σε φασματογράφο μάζας Ultraflextreme (Bruker Daltonics), (Εικόνα 13(α)).



Εικόνα 13: α) ο φασματογράφος μάζας Ultraflextreme (Bruker Daltonics) και β) ο μεταλλικός στόχος πάνω στον οποίο τοποθετούνται τα δείγματα

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της αργής εξαγωγής (delayed extraction) και με τη χρήση του ανακλαστήρα με τις παρακάτω παραμέτρους: laser smartbeam II συχνότητας 200Hz, για τα φάσματα MS με τάση επιτάχυνσης 20,15kV για την ion source 1 και 18,10kV για την ion source 2, 90ns καθυστέρηση και πύλη χαμηλού μοριακού βάρους 600kDa, για τα φάσματα MS/MS με τη μεθοδολογία LIFT με τάση επιτάχυνσης 19,06kV για την ion source 1 και 3,80kV για την ion source 2. Ο ανακλαστήρας τέθηκε στην κατάσταση ανάλυσης θετικών ιόντων με κλάσμα τάσης 2,3 και ελήφθησαν φάσματα με εύρος μαζών από 700-3900 kDa .

Τα φάσματα που ελήφθησαν βαθμονομήθηκαν εξωτερικά με το μίγμα εννέα πεπτιδίων Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik GmbH), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3 χρησιμοποιώντας το λογισμικό flexcontrol 3.3 (Bruker Daltonics). Για κάθε τελικό φάσμα μάζας αθροίστηκαν 1000 έως και 2000 επιμέρους φάσματα. Όλα τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό flexanalysis 3.3 (Bruker Daltonics) για την εξομάλυνσή τους, το φιλτράρισμα του θορύβου και την επιλογή των μονοισοτοπικών κορυφών, ενώ μέσω του λογισμικού BioTools version 3.2 (Sequence editor version) έγινε η αναζήτηση στο Mascot server για τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* από τη βάση δεδομένων NCBI (Απρίλιος 2013). Το περιθώριο λάθους ορίστηκε στα 30ppm, ο μέγιστος αριθμός αποτυχημένων πρωτεολύσεων σε 1 και οι πιθανές τροποποιήσεις αμινοξέων ορίστηκαν οι καρβαμιδομεθυλίωση των κυστεϊνών και η οξειδωση των μεθειονινών.

Πίνακας 3: Μίγμα πεπτιδίων βαθμονόμησης MALDI TOF MS, με τα αντίστοιχα μοριακά βάρη των πεπτιδίων.

Peptide	[M+H] ⁺ Mono isotopic	[M+H] ⁺ Average
Bradykinin 1-7	757.3992	757.86
Angiotensin II	1046.5418	1047.19
Angiotensin I	1296.6848	1297.49
Substance P	1347.7354	1348.64
Bombesin	1619.8223	1620.86
Renin Substrate	1758.9326	1760.03
ACTH clip 1-17	2093.0862	2094.43
ACTH clip 18-39	2465.1983	2466.68
Somatostatin 28	3147.4710	3149.57

2.21 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης με μεθόδους βιοπληροφορικής

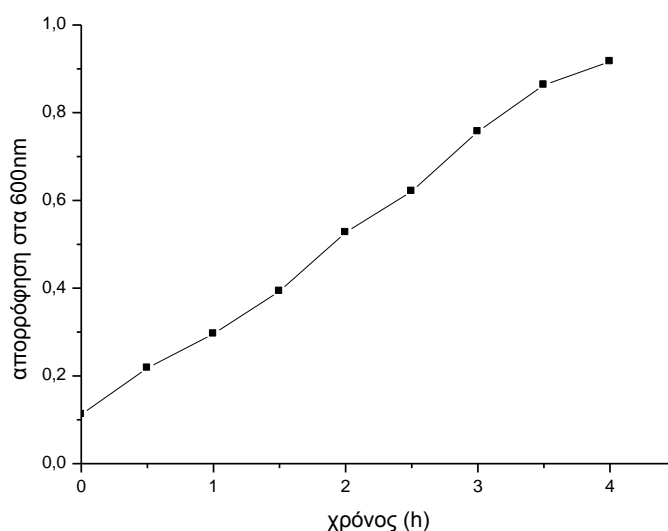
Οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες που προέκυψαν από τα φάσματα MS/MS επεξεργάστηκαν με διάφορα προγράμματα που είναι διαθέσιμα στο δίκτυο (<http://expasy.org>), για τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων τους. Η θέση και

λειτουργία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών στο βακτήριο προβλέφθηκε με τα προγράμματα PSORT [59]. Η πρόβλεψη διαμεμβρανικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την χρήση των λογισμικών TMtrep [60] και PRED-TMBB [61] που ανιχνεύουν διαμεμβρανικές α-έλικες και διαμεμβρανικές δομές β-βαρελιού στην αλληλουχία αμινοξέων των πρωτεϊνών. Το ισοηλεκτρικό σημείο, το μοριακό βάρος καθώς και η τιμή GRAVY κάθε πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα ProtParam (<http://expasy.org>).

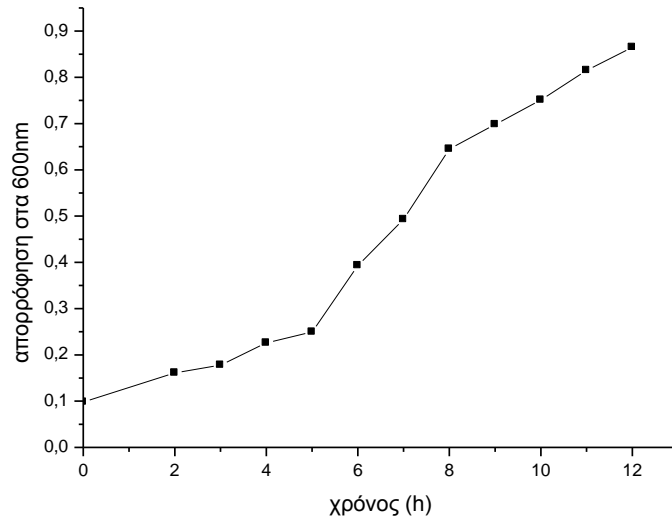
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Καλλιέργειες

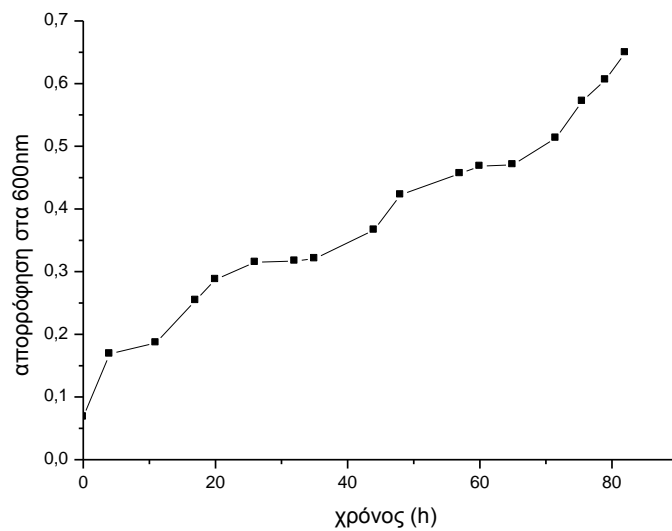
Παρακάτω φαίνονται τα διαγράμματα ανάπτυξης όταν το βακτήριο αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας σα πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό, τη φαινόλη και το τολουόλιο σε καλλιέργεια συνολικού όγκου 250ml. Παρατηρείτε ότι με το ηλεκτρικό φθάνει σε απορρόφηση (στα 600nm) 0,6 σε λιγότερο από 3 ώρες σε αντίθεση με τη φαινόλη που φθάνει σε 7 με 8 ώρες (δηλαδή σε κάτι περισσότερο από διπλάσιο χρόνο σε σχέση με το ηλεκτρικό). Με το τολουόλιο χρειάζονται 70 με 80 ώρες, δηλαδή σε δεκαπλάσιο χρόνο σε σχέση με τη φαινόλη. Επιπλέον, παρατηρώντας τη καμπύλη ανάπτυξης για το τολουόλιο βλέπουμε ότι δεν υπάρχει μια ξεκάθαρη εκθετική φάση αλλά υπάρχουν διαστήματα όπου η βιομάζα δεν αυξάνεται.



Εικόνα 14: Διάγραμμα ανάπτυξης για το ηλεκτρικό



Εικόνα 15: Διάγραμμα ανάπτυξης για τη φαινόλη

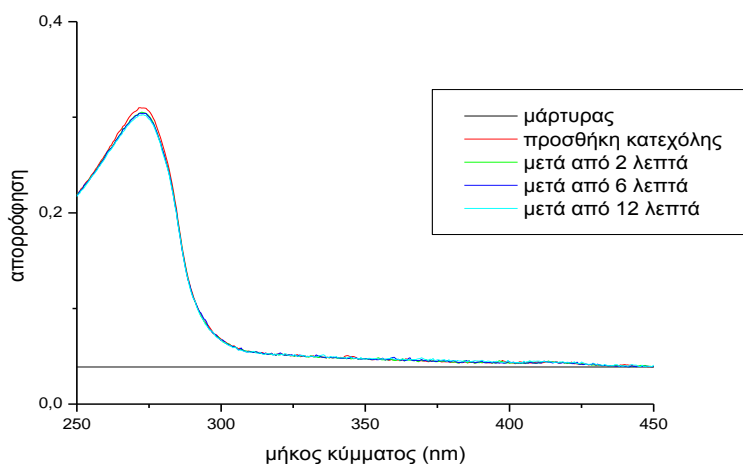


Εικόνα 16: Διάγραμμα ανάπτυξης για το τολουόλιο

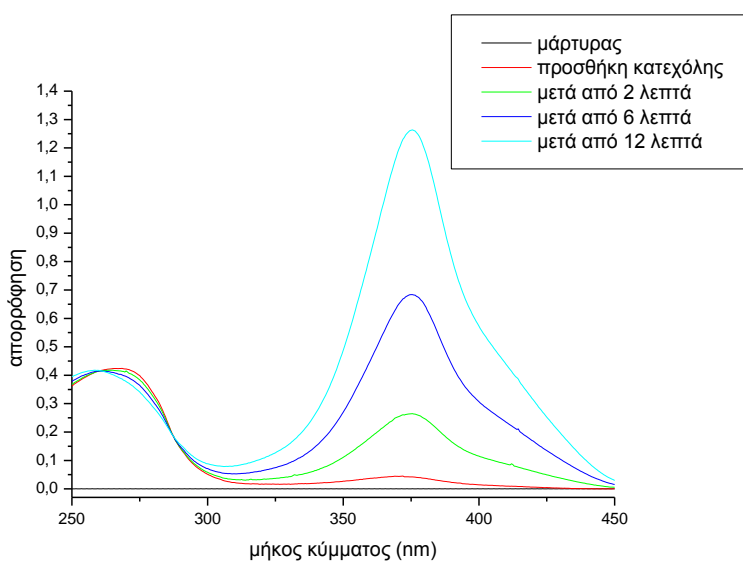
3.2 Έλεγχος του μεταβολικού μονοπατιού

Έγινε έλεγχος του μεταβολικού μονοπατιού που ακολουθείται καθώς και κινητικές μελέτες του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση του κατεχολικού δακτυλίου για τις διαφορετικές πηγές άνθρακα στις οποίες αναπτύχθηκε το βακτήριο. Οι κινητικές μελέτες έγιναν στο ολικό κυτταροπλασματικό πρωτόσμα

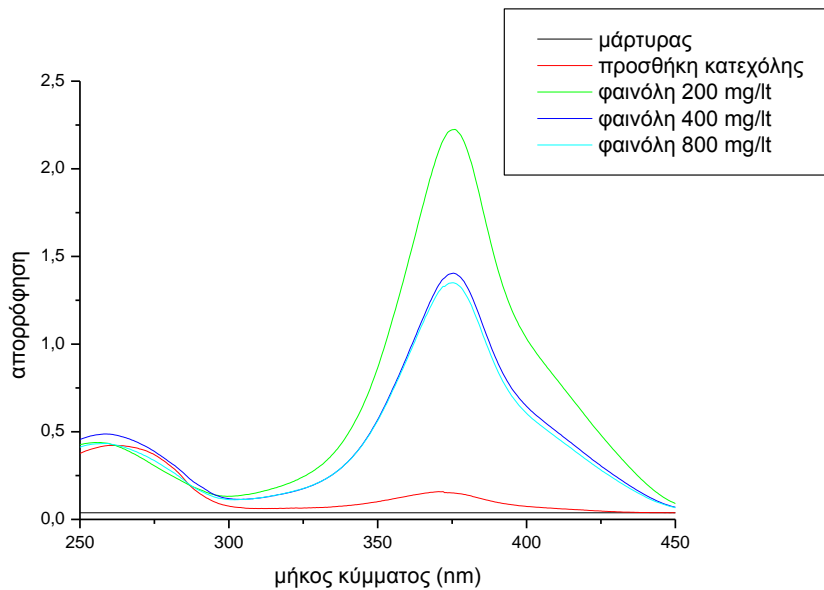
αλλά και σε εμπλουτισμένο κλάσμα του ενζύμου μετά από την διαβάθμιση ζάχαρης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 17: Έλεγχος μεταβολικού μονοπατιού που ακολουθείται κατά την αποικοδόμηση του ηλεκτρικού

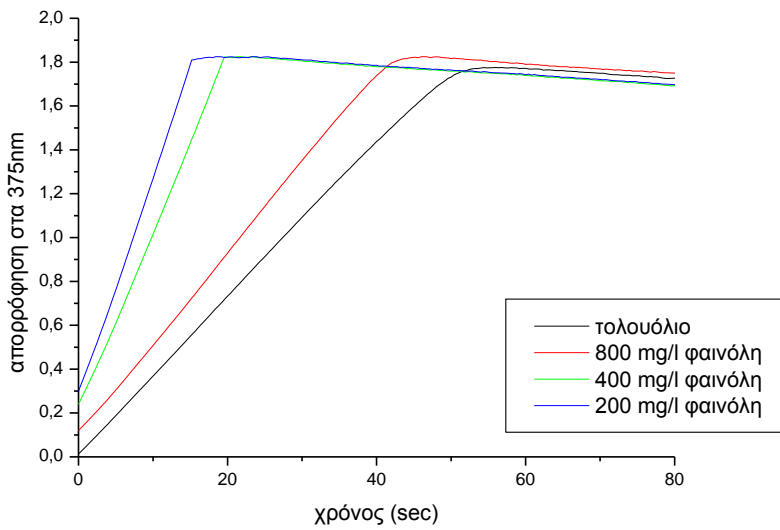


Εικόνα 18: Έλεγχος μεταβολικού μονοπατιού που ακολουθείται κατά την αποικοδόμηση του τολουολίου

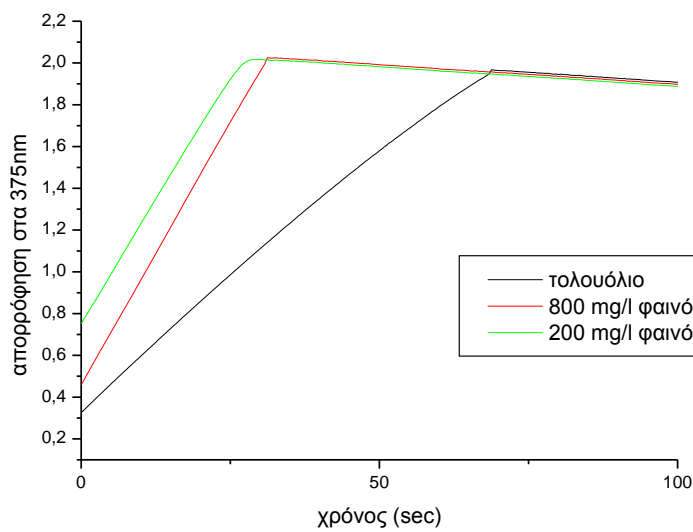


Εικόνα 19: Έλεγχος μεταβολικού μονοπατιού που ακολουθείται κατά την αποικοδόμηση των διάφορων συγκεντρώσεων φαινόλης έπειτα από 6 λεπτά μετά τη προσθήκη κατεχόλης

Στις εικόνες 17, και 18 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης της 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης, αρχικά απουσία της κατεχόλης, παρουσία κατεχόλης μετά από 2 λεπτά, από 6 λεπτά και από 12 λεπτά αντίδρασης. Εξάιρεση αποτελεί η εικόνα 19 όπου δε φαίνονται τα φάσματα μετά από 2 λεπτά και από 12 λεπτά αντίδρασης για λόγους απλοποίησης. Τα φάσματα δείχνουν ότι η κορυφή της κατεχόλης στα 260nm μειώνεται, ενώ η κορυφή της 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης στα 375nm αυξάνεται, εξάιρεση αποτελεί όταν το βακτήριο καλλιεργείται με ηλεκτρικό όπου δεν εμφανίζεται κορυφή στα 375nm. Η μη εμφάνιση κορυφής δεν αποτελεί έκπληξη διότι χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό (προϊόν του μεταβολισμού) η αλδεΐδη δεν δημιουργείται. Όπως έχει περιγραφεί η παραγωγή της 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης καταδεικνύει το *meta* μεταβολικό μονοπάτι που ακολουθεί το βακτήριο για τον καταβολισμό της φαινόλης καθώς και του τολουολίου.



Εικόνα 20: Έλεγχος κινητικής του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης στις τέσσερις διαφορετικές περιπτώσεις καλλιεργειών ως μοναδική πηγή άνθρακα τη φαινόλη ή το τολουόλιο

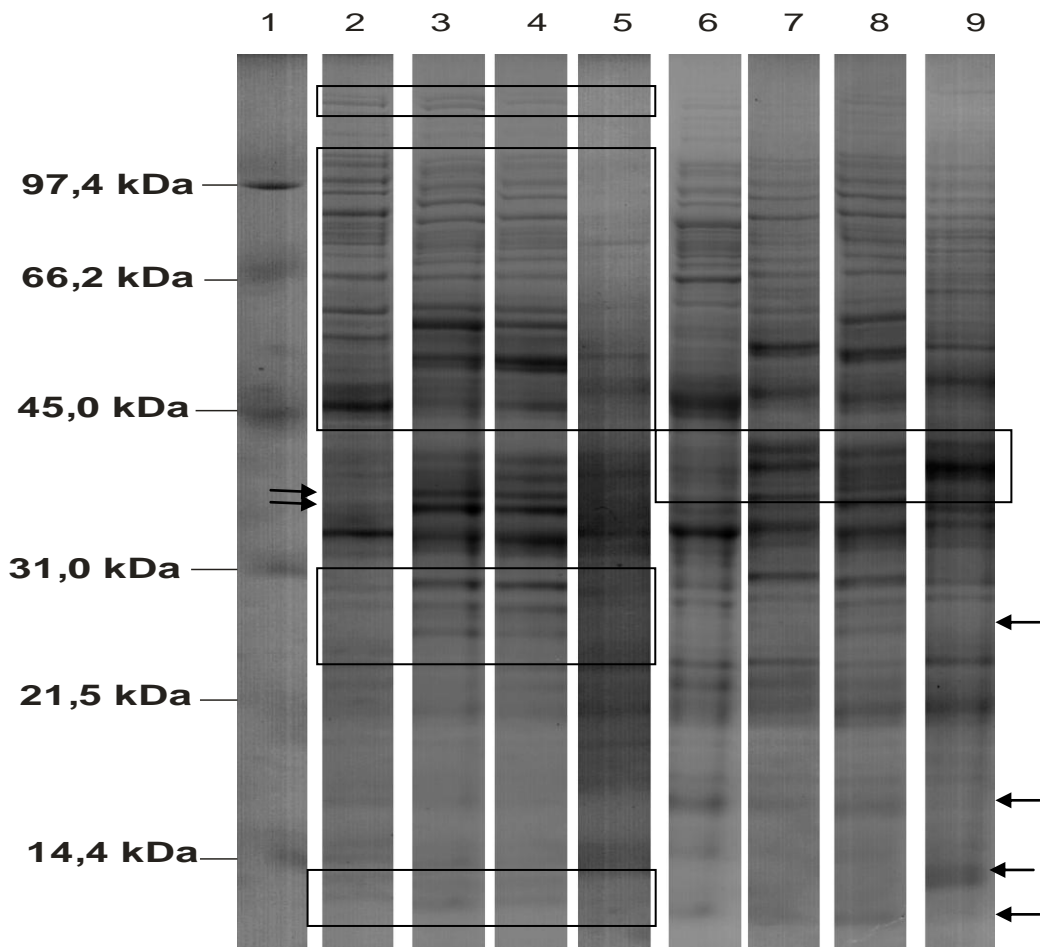


Εικόνα 21: Έλεγχος κινητικής του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης στις τρεις διαφορετικές περιπτώσεις καλλιεργειών ως μοναδική πηγή άνθρακα τη φαινόλη ή το τολουόλιο μετά τη διαβάθμιση ζάχαρης (για το κλάσμα 10% που βρέθηκε η ενεργότητα)

Στις εικόνες 20 και 21 φαίνονται οι καμπύλες της κινητικής του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης στις τέσσερις διαφορετικές περιπτώσεις καλλιεργειών ως μοναδική πηγή άνθρακα τη φαινόλη ή το τολουόλιο και στις τρεις διαφορετικές περιπτώσεις καλλιεργειών ως μοναδική πηγή άνθρακα τη φαινόλη ή το τολουόλιο μετά τη διαβάθμιση ζάχαρης (για το κλάσμα 10% που βρέθηκε η ενεργότητα) αντίστοιχα. Έχουν ληφθεί time-based φάσματα απορρόφησης στα 375nm και 260nm. Στα 260nm δεν υπήρχε κάποια μεταβολή σε καμία από τις 4 περιπτώσεις και γι αυτό το λόγο και δεν παρουσιάζονται τα γραφήματα.

3.3 Μελέτη του κυτταροπλασματικού κλάσματος

Αρχικά, έγινε διαχωρισμός των κυτταροπλασματικών κλασμάτων από τις διάφορες πηγές άνθρακα στις οποίες αναπτύσσεται το βακτήριο καθώς και των κλασμάτων (που βρέθηκε η ενεργότητα του ενζύμου) τα οποία συλλέχθηκαν έπειτα από τη διαβάθμιση ζάχαρης σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-Tricine-PAGE). Όπως αναφέρεται και παραπάνω η ενεργότητα σε όλες τις περιπτώσεις βρέθηκε στο κλάσμα όπου η συγκέντρωση της ζάχαρης ήταν 10%. Στην εικόνα 22 παρουσιάζονται τα επιμέρους κλάσματα που αντιπροσωπεύουν το κυτταροπλασματικό πρωτέομα βακτηρίων όπου έχουν αναπτυχθεί ως μοναδική πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό, τη φαινόλη (συγκέντρωσης 200mg/l και 800mg/l) και το τολουόλιο, καθώς και το κυτταροπλασματικό κλάσμα στο οποίο βρέθηκε ενεργότητα έπειτα από τη διαβάθμιση ζάχαρης βακτηρίων όπου έχουν αναπτυχθεί στις τέσσερις παραπάνω συνθήκες.



Εικόνα 22: SDS-PAGE των διάφορων κυτταροπλασματικών κλασμάτων; Μάρτυρας (1), κυτταροπλασματικό κλάσμα βακτηρίων όπου έχουν αναπτυχθεί παρουσία ηλεκτρικού (2), 200mg/l φαινόλης (3), 800mg/l φαινόλης (4), τολουολίου(5); κυτταροπλασματικό κλάσμα έπειτα από τη διαβάθμιση σουκρόζης βακτηρίων όπου έχουν αναπτυχθεί παρουσία; Ηλεκτρικού (6), 200mg/l φαινόλης (7), 800mg/l φαινόλης (8), τολουολίου (9). Με ειδικά πλαίσια και βέλη επισημαίνονται διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών.

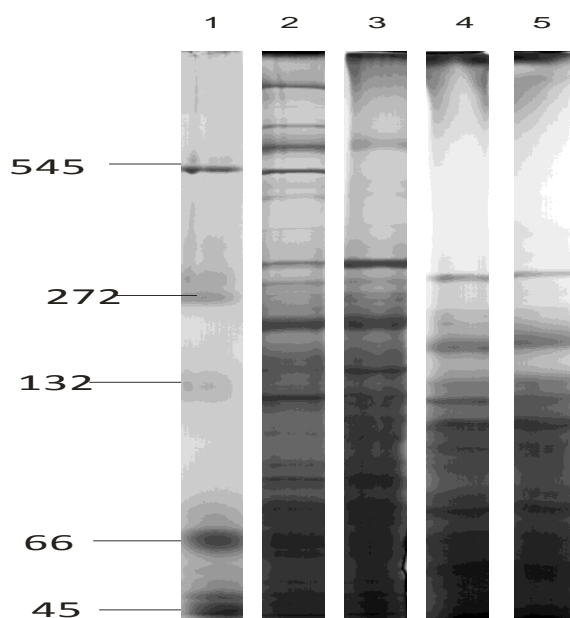
Από τη σύγκριση των κυτταροπλασματικών κλασμάτων όταν έχουν διαχωριστεί σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Εικόνα 22) προκύπτει ότι το τολουόλιο εμφανίζει ένα διαφορετικό μοτίβο πρωτεϊνών. Ωστόσο, όταν γίνεται σύγκριση μεταξύ των κυτταροπλασματικών κλασμάτων που έχουν προέλθει από τη διαβάθμιση ζάχαρης το μοτίβο είναι παρόμοιο για όλα τα κυτταροπλασματικά κλάσματα.

Όσον αφορά τα ολικά κυτταροπλασματικά πρωτεόματα παρατηρείτε στα υψηλά μοριακά βάρη (πάνω από 98 kDa) η εμφάνιση δύο μπαντών σχετικά κοντά μεταξύ τους όπου η ένταση τους εξασθενεί στα 800mg/l φαινόλης, ενώ δεν εντοπίζονται στο τολουόλιο. Στα κλάσματα από τη διαβάθμιση ζάχαρης υπάρχουν ίχνη αυτών των μπαντών. Κοντά στα 97 kDa έως τα 45 kDa οι εντάσεις των μπαντών που εμφανίζονται διαφοροποιούνται. Όσο αφορά το τολουόλιο εμφανίζονται ίχνη

μπαντών, ενώ όσο αφορά τις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης και το ηλεκτρικό υπάρχουν αυξομειώσεις των εντάσεων. Ωστόσο, στην ίδια περιοχή για τα κλάσματα από τη διαβάθμιση ζάχαρης παρατηρούμε αύξηση των εντάσεων των μπαντών του τολουολίου.

Στα 40 kDa περίπου στο κλάσμα μετά από τη διαβάθμιση ζάχαρης για το τολουόλιο εμφανίζεται μια έντονη μπάντα όπου υπάρχει σε μικρότερη ένταση στα 200 ενώ ίχνη στα άλλα δύο. Η ίδια μπάντα σε λιγότερη ένταση εμφανίζεται και στα ολικά κυτταροπλασματικά κλάσματα. Σε μικρότερο μοριακό βάρος εμφανίζονται δύο εντονες μπάντες στις δύο διαφορετικές συνθήκες της φαινόλης. Στα 30 kDa περίπου εμφανίζονται στα ολικά κυτταροπλασματικά πρωτεόματα τρεις μπάντες όπου η ένταση τους μειώνεται για το τολουόλιο και το ηλεκτρικό, άλλα και για τα κλάσματα της διαβάθμισης. Διαφορές εμφανίζονται και σε χαμηλότερα μοριακά βάρη, όπως δύο μπάντες που εμφανίζονται στα 14,4 kDa και μόνο στα κλάσματα του τολουολίου.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (Blue Native) για το διαχωρισμό των κυτταροπλασματικών κλασμάτων έπειτα από τη διαβάθμιση ζάχαρης στα οποία βρέθηκε η ενεργότητα του ενζύμου. Στην εικόνα 23 παρουσιάζονται τα παραπάνω κλάσματα που αντιπροσωπεύουν το κυτταροπλασματικό κλάσμα βακτηρίων όπου έχουν αναπτυχθεί παρουσία ηλεκτρικού, 200mg/l και 800mg/l φαινόλης και τολουολίου.

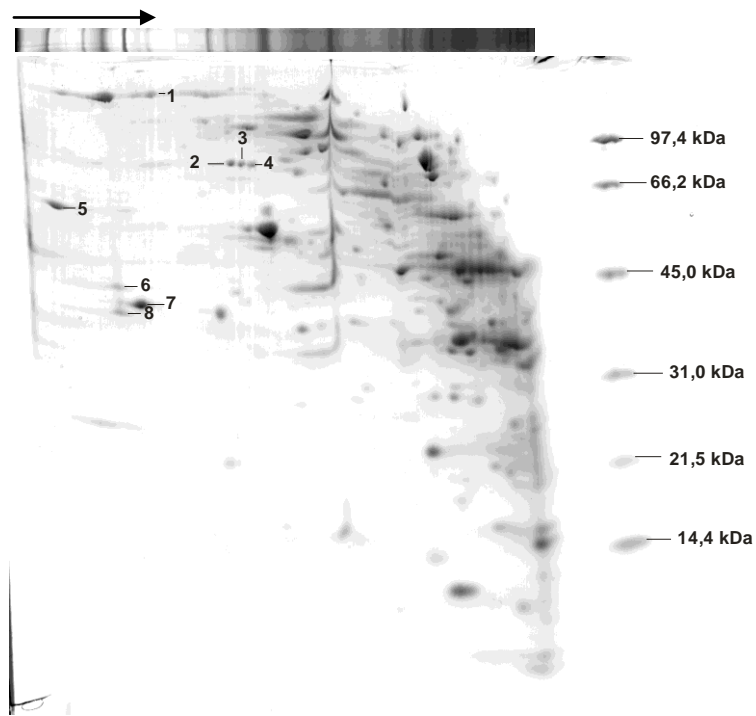


Εικόνα 23: Blue Native-PAGE των διάφορων κυτταροπλασματικών κλασμάτων έπειτα από τη διαβάθμιση ζάχαρης; Μάρτυρας (1), κυτταροπλασματικό κλάσμα βακτηρίων όπου έχουν αναπτυχθεί παρουσία ηλεκτρικού (2), 200mg/l φαινόλης (3), 800mg/l φαινόλης (4) και τολουολίου (5).

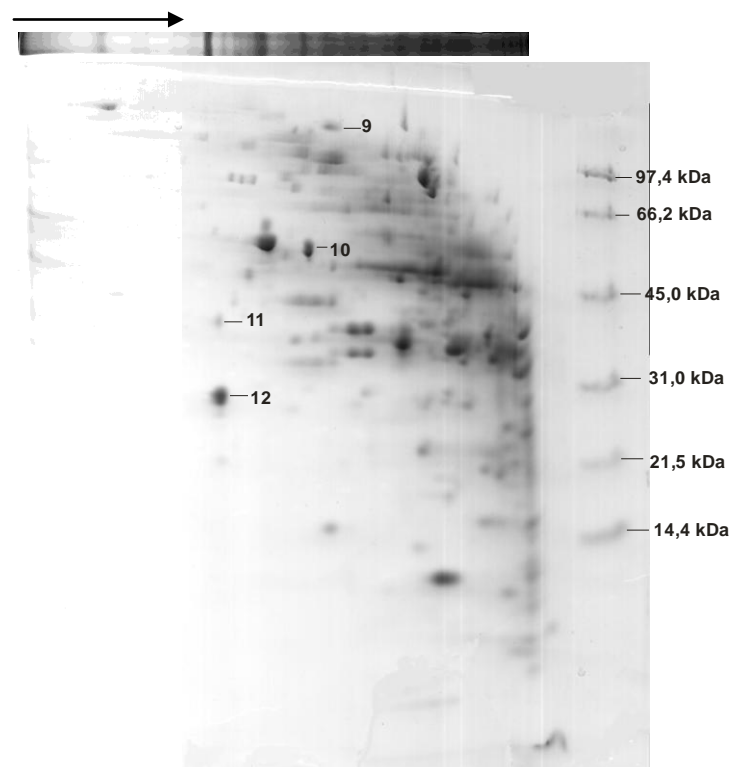
Η εμφανέστερη διαφορά μεταξύ των υποπρωτεομάτων βρίσκεται στα υψηλά μοριακά βάρη όπου το κλάσμα του ηλεκτρικού εμφανίζει μια πλειάδα από μπάντες που αντιστοιχούν σε σύμπλοκα σε αντίθεση με τα 200mg/l φαινόλης (όπου διακρίνονται ορισμένα) και στις άλλες δύο συνθήκες (800mg/l φαινόλης και τολουόλιο) όπου δε διακρίνονται μπάντες. Διαφορές σε εντάσεις υπάρχουν σε όλα τα μοριακά βάρη. Στα ενδιάμεσα μοριακά βάρη υπάρχουν διαφορές σε μπάντες όπου εμφανίζονται στο ηλεκτρικό και στα 200mg/l φαινόλης και δεν εμφανίζονται στα άλλα δύο. Στα μικρά μοριακά βάρη λόγω διάχυσης δεν είναι ιδιαίτερα διακριτές οι μπάντες και οι εντάσεις τους. Γενικότερα, παρατηρείται μια έλλειψη σε 'μπάντες' επομένως ίσως και συμπλόκων όσο αφορά τα 800mg/l φαινόλης και το τολουόλιο σε αντίθεση με τα 200mg/l φαινόλης και το ηλεκτρικό.

3.4 Λειτουργική πρωτεομική ανάλυση του κυτταροπλασματικού πρωτεοματος

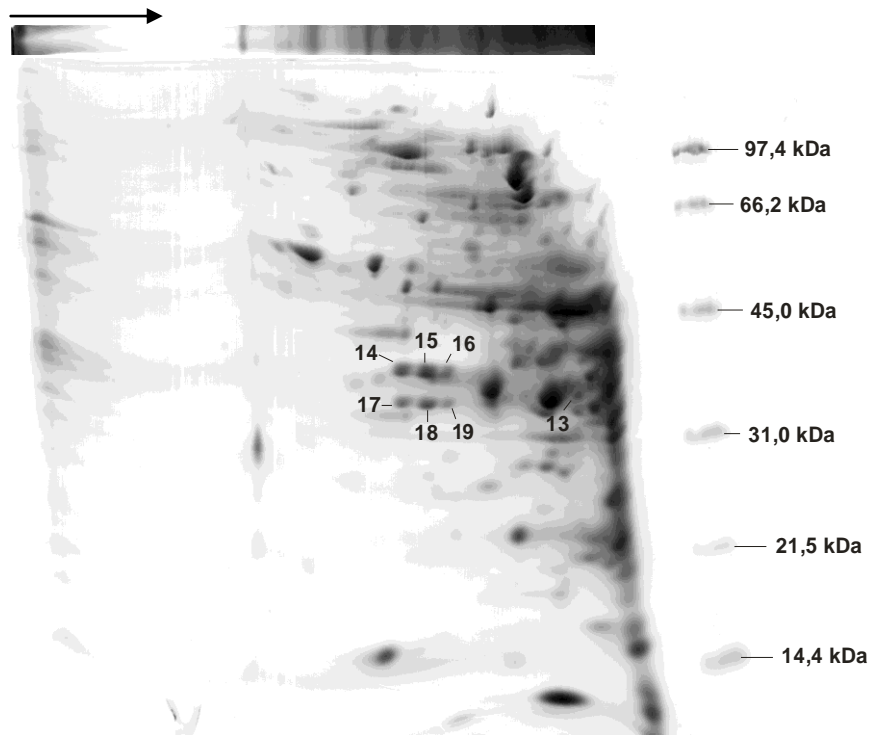
Για το διαχωρισμό και τη ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών συμπλοκών των κυτταροπλασματικών κλασμάτων που προέκυψαν έπειτα από τη διαβάθμιση ζάχαρης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτοφόρησης δύο διαστάσεων, όπου η πρώτη διάσταση πραγματοποιήθηκε σε μη αποδιατακτικές συνθήκες Blue Native-Page και τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος (Εικόνα 23). Στη συνέχεια, η δεύτερη διάσταση πραγματοποιήθηκε σε αποδιατακτικές συνθήκες SDS-Tricine-PAGE, οπότε και οι πρωτεΐνες των επιμέρους συμπλόκων, είτε εκείνες που αλληλεπιδρούσαν μεταξύ τους, διαχωρίστηκαν περαιτέρω με βάση το μοριακό τους βάρος. Η μεθοδολογία αυτή ακολουθήθηκε για τις τρεις διαφορετικές πηγές άνθρακα: ηλεκτρικό, φαινόλη και τολουόλιο καθώς και για τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης 200mg/l και 800mg/l. Στην συνέχεια συγκρίθηκαν μεταξύ τους και ταυτοποιήθηκαν οι οπτικές διαφορές τους καθώς και επιλεγμένα στίγματα. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου. Τα στίγματα που ταυτοποιήθηκαν επισημαίνονται με αριθμούς.



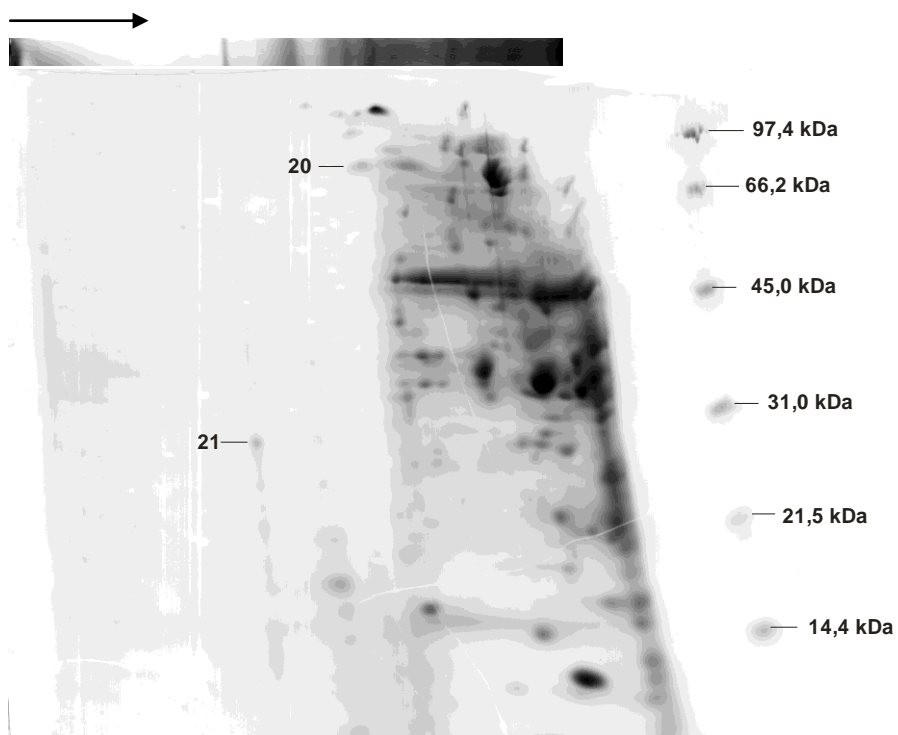
Εικόνα 24: Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση Blue Native- SDS PAGE του κυτταροπλασματικού κλάσματος του βακτηρίου καλλιεργημένο σε ηλεκτρικό



Εικόνα 25: Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση του κυτταροπλασματικού κλάσματος του βακτηρίου καλλιεργημένο σε φαινόλη συγκέντρωσης 200mg/lit.



Εικόνα 26: Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση του κυτταροπλασματικού κλάσματος του βακτηρίου καλλιεργημένο σε φαινόλη συγκέντρωσης 800mg/l



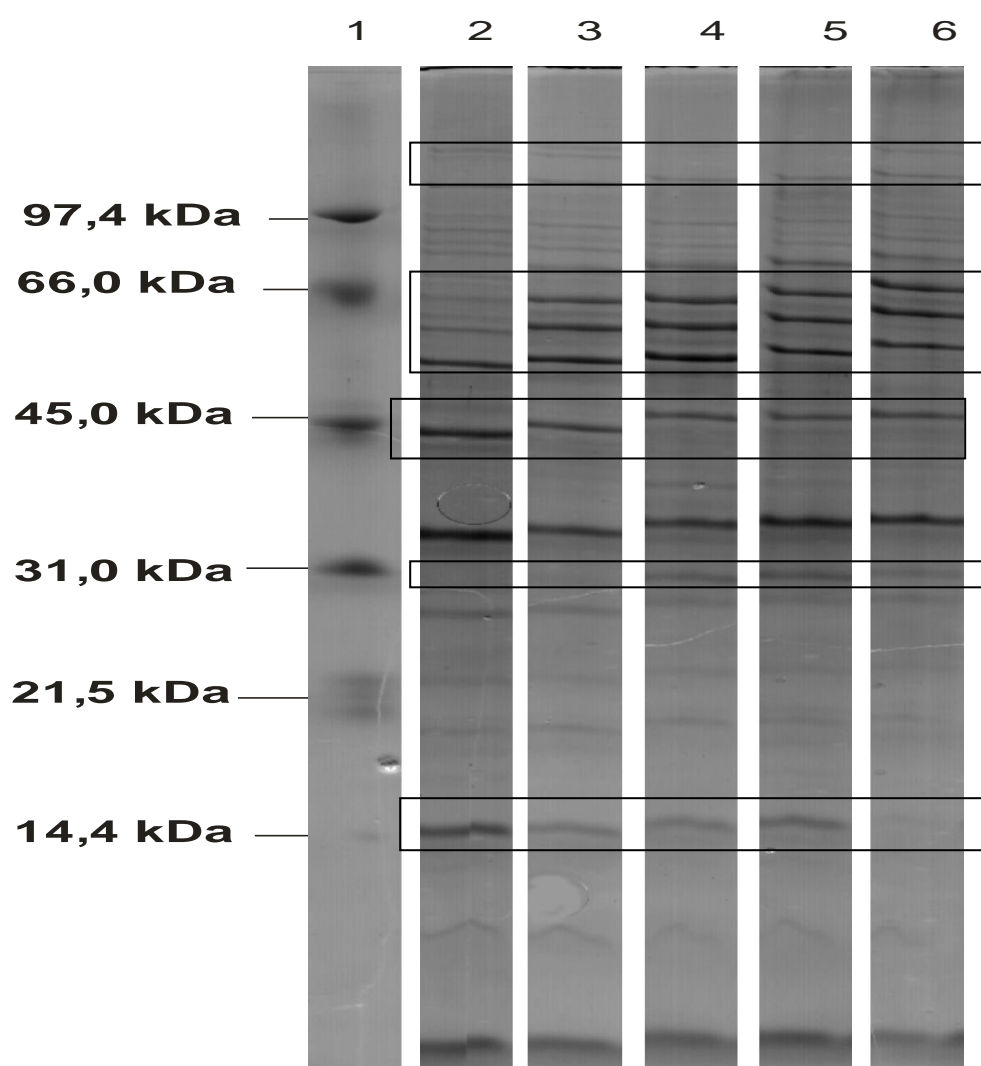
Εικόνα 27: Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση του κυτταροπλασματικού κλάσματος του βακτηρίου καλλιεργημένο σε τολουόλιο.

Παρατηρείται για το κλάσμα που προέρχεται από βακτήρια καλλιεργημένα σε τολουόλιο ένα διαφορετικό μοτίβο έκφρασης πρωτεϊνών. Με βέλη και αριθμούς επισημαίνονται οι κύριες ορατές διαφορές μεταξύ των κυτταροπλασματικών κλασμάτων. Εξάριση αποτελούν τα στίγματα 14-19 που βρέθηκαν σε όλα τα κλάσματα εκτός από το κλάσμα βακτηρίων σε ηλεκτρικό. Τα παραπάνω στίγματα ταυτοποιήθηκαν και τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Από αυτά τα 11 (αριθμοί στιγμάτων: 10, 12, 14-19 και 21) συμμετέχουν στο meta μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης αρωματικών ενώσεων. Όσο αφορά τα στίγματα 14-19, οι δύο πρωτεΐνες που βρέθηκαν να δρουν συνεργειακά και εμπλέκονται και αυτές στο meta μεταβολικό μονοπάτι είναι η 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (J2PBG0) (η οποία καταλύει την αντίδραση 4-hydroxy-2-oxopentanoate \rightleftharpoons acetaldehyde + pyruvate) και η Acetaldehyde dehydrogenase (Q5206) (η οποία καταλύει την αντίδραση $\text{CH}_3\text{CHO} + \text{NAD}^+ + \text{CoA} \rightarrow \text{acetyl-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+$). Η παρουσία των δυο πρωτεϊνών σε τρεις μπάντες, πολύ κοντά μεταξύ τους, στην μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση υποδηλώνει την ύπαρξη ενός συμπλόκου το οποίο αποτελείται από δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, που αν κρίνουμε από την ένταση των στιγμάτων είναι σε αναλογία ένα προς ένα. Αν λάβουμε υπ όψιν το γεγονός ότι αντί για μία μπάντα έχουμε τρεις και κοιτάξουμε και τη διαφορά στο μέγεθος παρατηρούμε ότι το σύμπλοκο αυτό είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από δύο ετεροδιμερή, και το βρίσκουμε σε διμερή (στίγματα 14,17), τριμερή (στίγματα 15,18) και στη τετραμερή (στίγματα 16,19) μορφή.

No. of spot	Identified protein	Mascot score	peptides matched	Protein MW	pI-Value	Swissprot no.	function
1	Glutamate synthase subunit alpha [Pseudomonas mendocina (strain NK-01)]	379	6	160579.00	5.90	F4DMG9	Glutamate synthase
2	Fatty acid oxidation complex subunit alpha [Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344]	231	4	77521.00	5.60	I7EM2	Degradation of long-chain fatty acid
3	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase [Pseudomonas stutzeri RCH2]	157	4	75461.00	5.00	I0GLJ2	Transferase
4	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase [Pseudomonas mendocina (strain NK-01)]	330	5	75451.00	5.00	F4DVV0	Transferase
5	60 kDa chaperonin [Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344]	365	4	56936.00	4.80	I7KAL4	Chaperone
	Cpn60 (fragment) [Pseudomonas sp. (strain CF600)]	136	2	194112	4.67	Q8KPB8	Chaperone
6	Ketol-acid reductoisomerase [Pseudomonas fluorescens WH6]	107	2	37102	4.67	E2XV46	Amino-acid biosynthesis
	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha [Pseudomonas mendocina (strain ymp)]	392	5	36661.00	4.70	A4XZ65	Transferase
7	Ornithine carbamoyltransferase [Pseudomonas sp. (strain M1)]	217	2	38050.00	5.90	I1HZU2	Transferase
8	Ketol-acid reductoisomerase [Pseudomonas mendocina (strain ymp)]	406	5	36501.00	5.40	A4XR11	Amino-acid biosynthesis
9	Catalase-peroxidase [Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344]	243	3	77230.00	5.20	I7KBC2	Peroxidase
10	2-hydroxymuonic semialdehyde dehydrogenase [Pseudomonas sp. (strain CF600)]	417	4	52049.00	5.30	P19059	Aromatic compound metabolism
11	ATP-dependent transcriptional regulator [Brevibacillus sp. BC25]	37	1	98114.00	5.70	J2GTL3	Transcription
12	2-oxopent-4-enoate hydratase [Pseudomonas putida (Arthrobacter siderocapsulatus)]	120	1	28150.00	4.60	D5MPG9	Catalytic activity
	4-oxalocrotonate decarboxylase [Pseudomonas sp. (strain CF600)]	93	3	28523	5.13	P49156	Aromatic compound metabolism
13	alcohol dehydrogenase GroEs domain protein [Pseudomonas mendocina (strain ymp)]	76	1	36419	5.81	A4MNH8	Oxidoreductase
	Thioredoxin reductase [Pseudomonas mendocina (strain ymp)]	335	3	33971.00	5.40	A4XUX9	Oxidoreductase
14	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase [Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344]	469	5	37506.00	5.70	I7IF69	Aromatic compound metabolism
15	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase [Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344]	105	2	36023	5.93	I7JJ45	Amino-acid biosynthesis
	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase [Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344]	316	5	37506.00	5.70	I7IF69	Aromatic compound metabolism
16	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase [Pseudomonas sp. GM25]	193	3	37102.00	5.60	J2PB60	Aromatic compound metabolism
17	Acetaldehyde dehydrogenase [Pseudomonas sp. (strain CF600)]	474	4	32778.00	5.80	Q52060	Aromatic compound metabolism
	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase [Variovorax sp. CF313]	93	2	37102	5.65	J3CQL6	Aromatic compound metabolism
18	Acetaldehyde dehydrogenase [Pseudomonas sp. (strain CF600)]	649	4	32778.00	5.80	Q52060	Aromatic compound metabolism
19	Acetaldehyde dehydrogenase [Pseudomonas sp. (strain CF600)]	632	4	32778.00	5.80	Q52060	Aromatic compound metabolism
	short-chain alcohol dehydrogenase associated with acetoin utilization [Pseudomonas syringae pv. avellanae str. ISPaVe013]	48	1	28295	5.29	K2SK17	oxidoreductase activity
20	Dihydropyridyl dehydrogenase [Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344]	336	4	49976.00	6.20	I7K240	oxidoreductase activity
21	4-oxalocrotonate decarboxylase [Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344]	201	3	28392.00	5.30	I7K6M3	Aromatic compound metabolism
	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase [Pseudomonas sp. GM25]	65	1	37102	5.65	J2PB60	Aromatic compound metabolism

3.5 Κατεργασία μεμβρανικού κλάσματος με Na_2CO_3

Μετά από την κατεργασία του μεμβρανικού κλάσματος με Na_2CO_3 , όπως αυτό προέκυψε κατόπιν της λύσης των κυττάρων, ακολούθησε η ανάλυση αυτού του μεμβρανικού πρωτεϊνικού κλάσματος, για τις περιπτώσεις των διάφορων πηγών άνθρακα, κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου, σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-Tricine-PAGE. Στην Εικόνα 28 παρουσιάζονται τα επιμέρους κλάσματα που αντιπροσωπεύουν το κλάσμα των μεμβρανών βακτηρίου που έχει αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας σαν μοναδική πηγή άνθρακα ηλεκτρικό, τολουόλιο και φαινόλη σε συγκεντρώσεις 200mg/lit, 400mg/lit και 800mg/lit.

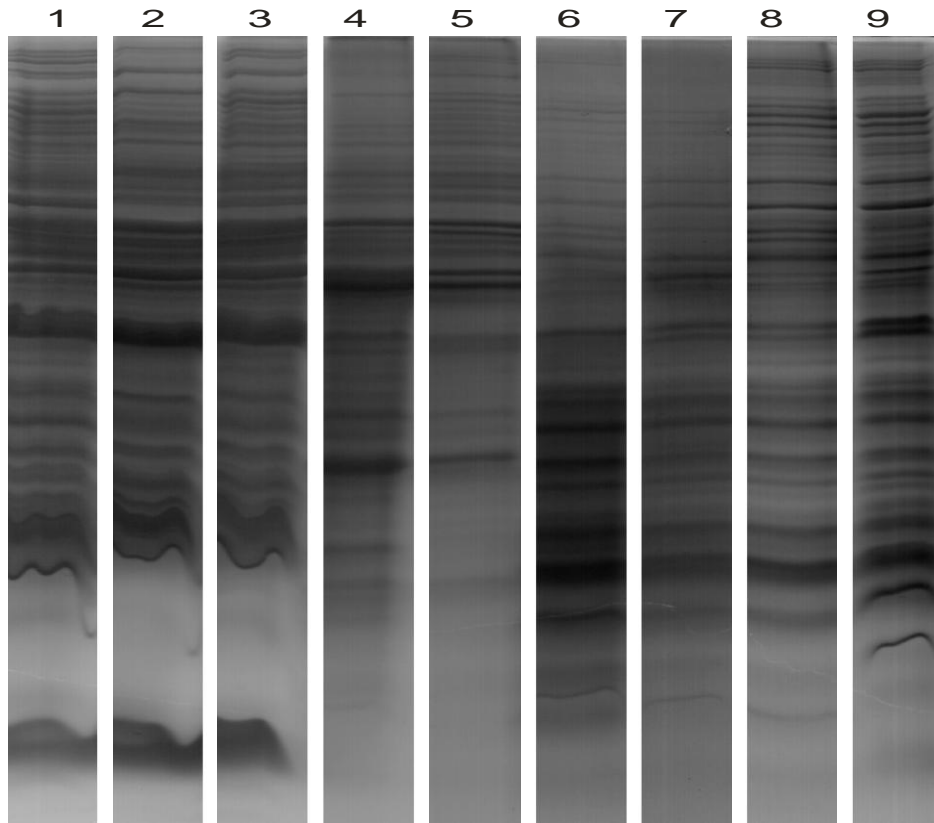


Εικόνα 28: Κατεργασία μεμβρανικού κλάσματος με ανθρακικό νάτριο (100mM). Μαρτυρας (1), κλάσμα των μεμβρανών βακτηρίου που έχει αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας σαν μοναδική πηγή άνθρακα (2) ηλεκτρικό, (3) τολουόλιο, (4) φαινόλη σε συγκέντρωση 200mg/lit, (5) φαινόλη σε συγκέντρωση 400mg/lit, (6) φαινόλη σε συγκέντρωση 800mg/lit.

Υπάρχουν ορισμένες διαφορές οι οποίες επισημαίνονται με ειδικά πλαίσια. Στα μεγάλα μοριακά βάρη παρατηρούνται δύο μπάντες οι οποίες στα 800mg/lit υπάρχουν σε μεγάλη ένταση σε σχέση με το τολουόλιο και το ηλεκτρικό ενώ στα 200mg/lit και 400mg/lit δεν υπάρχουν καθόλου. Στα 60kDa περίπου παρατηρείται ένα μοτίβο τριών μπαντών που σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχουν σε υψηλή ένταση εκτός από τη περίπτωση του ηλεκτρικού. Αντίθετα, στα 45kDa παρατηρείτε μια μπάντα όπου ενώ στο ηλεκτρικό εμφανίζεται σε υψηλή ένταση στις άλλες περιπτώσεις μειώνεται. Επιπλέον, στα 31kDa εμφανίζεται μια μπάντα σε όλες τις συνθήκες φαινόλης ενώ δεν υπάρχει στο ηλεκτρικό και το τολουόλιο. Τέλος στα 14,4 kDa ενώ υπάρχει μια μπάντα σε όλες τις συνθήκες καλλιέργειας στα 800mg/lit δεν υπάρχει.

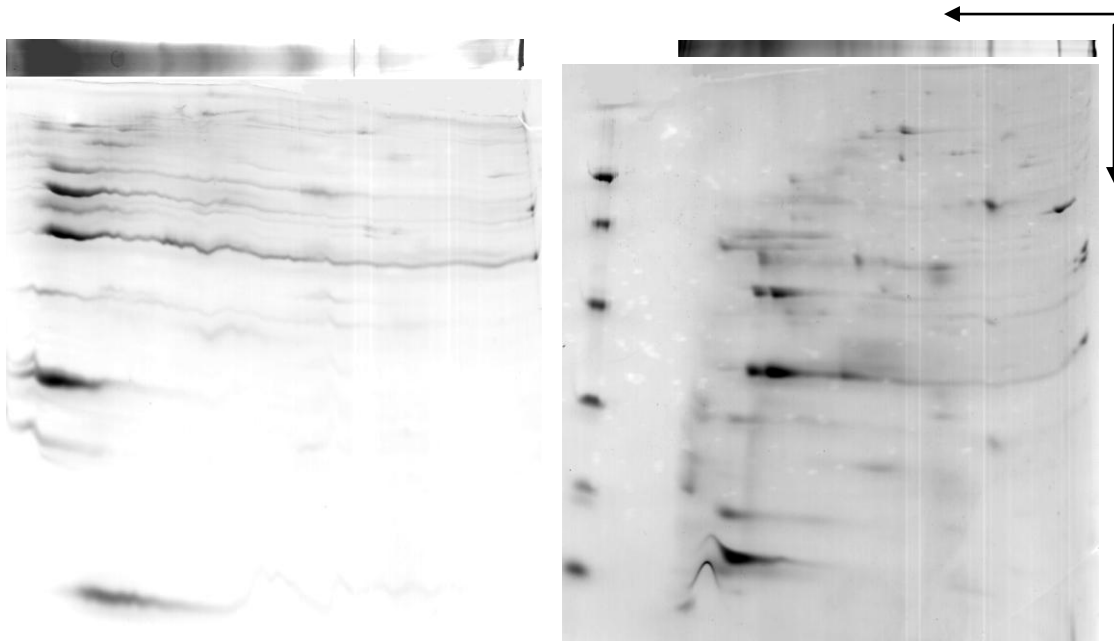
3.6 Διαλυτοποίηση μεμβρανών

Μετά από την κατεργασία του μεμβρανικού κλάσματος με Na_2CO_3 ή EDTA, έγινε η διαλυτοποίηση των μεμβρανών με το ήπιο μη ιοντικό απορρυπαντικό n-Dodecyl- β -D-Maltoside (DDM). Πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των διαλυτοποιημένων μεμβρανών μέσω αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης SDS-Tricine/PAGE, αλλά και μέσω μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης Blue Native-PAGE. Έπειτα ακολούθησε δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Blue Native-SDS PAGE. Το μεμβρανικό κλάσμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν από βακτήρια που έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό. Σκοπός της παραπάνω διαδικασίας ήταν να επιλεγεί η καλύτερη κατεργασία του μεμβρανικού κλάσματος. Στην εικόνα 29 παρουσιάζεται το μοτίβο των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με μονοδιάστατη SDS PAGE. Μεταξύ των δύο διαφορετικών τρόπων κατεργασίας δεν εμφανίζονται ιδιαίτερες διαφορές. Οι δύο διαφορετικοί τρόποι κατακρήμνισης των υπερκειμένων είχαν σκοπό να διερευνηθεί, από τη στιγμή που το δείγμα υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία, αν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο αυτών τρόπων. Όπως υποδεικνύει και η παρακάτω εικόνα με TCA απομακρύνονται πεπτίδια υψηλού μοριακού βάρους κάτι που δεν συμβαίνει με την ακετόνη.



Εικόνα 29: SDS-PAGE των διάφορων μεμβρανικών κλασμάτων βακτηρίων όπου έχουν αναπτυχθεί παρουσία ηλεκτρικού. Ολικό μεμβρανικό κλάσμα χωρίς να έχει υποστεί κάποια επεξεργασία (1), το ολικό μεμβρανικό κλάσμα που έχει υποστεί κατεργασία με Na_2CO_3 (2), EDTA (3), το διαλυτοποιημένο (με DDM) μεμβρανικό κλάσμα που έχει υποστεί κατεργασία με Na_2CO_3 (4), EDTA (5), τα υπερκείμενα από την κατεργασία με Na_2CO_3 (6), EDTA (7) που έχουν κατακρημνιστεί με TCA, τα υπερκείμενα από την κατεργασία με Na_2CO_3 (8), EDTA (9) που έχουν κατακρημνιστεί με ακετόνη.

Στη συνέχεια, τα κλάσματα με τους δύο διαφορετικούς τρόπους κατεργασίας και αφού διαλυτοποιήθηκαν διαχωρίστηκαν με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Blue Native-SDS PAGE (εικόνα 30). Παρατηρείται ότι το κλάσμα που έχει κατεργαστεί με EDTA έχει πιο ευδιάκριτα στίγματα από ότι αυτό με Na_2CO_3 όπου υπάρχουν περισσότερες οριζόντιες γραμμές με αποτέλεσμα να έχουμε χαμηλότερη διακριτική ικανότητα.



Εικόνα 30: Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση του κλάσματος που έχει υποστεί κατεργασία με α) Na_2CO_3 και β) EDTA.

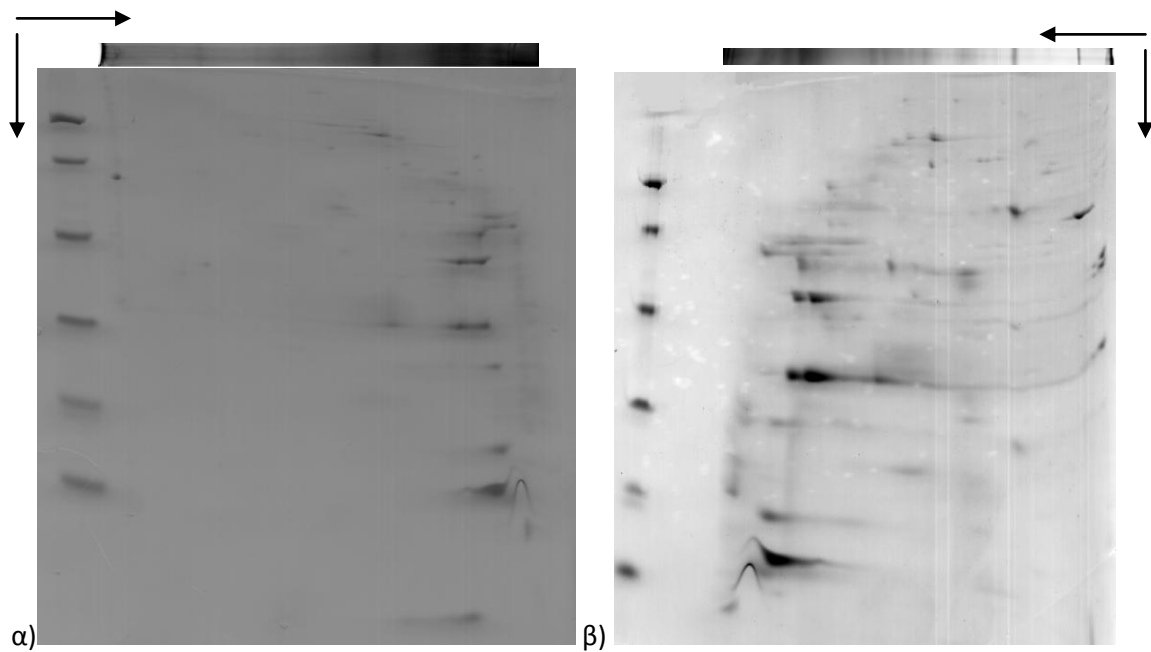
3.7 Διαλυτοποίηση μεμβρανικού κλάσματος με n-Dodecyl-β-D-Maltoside

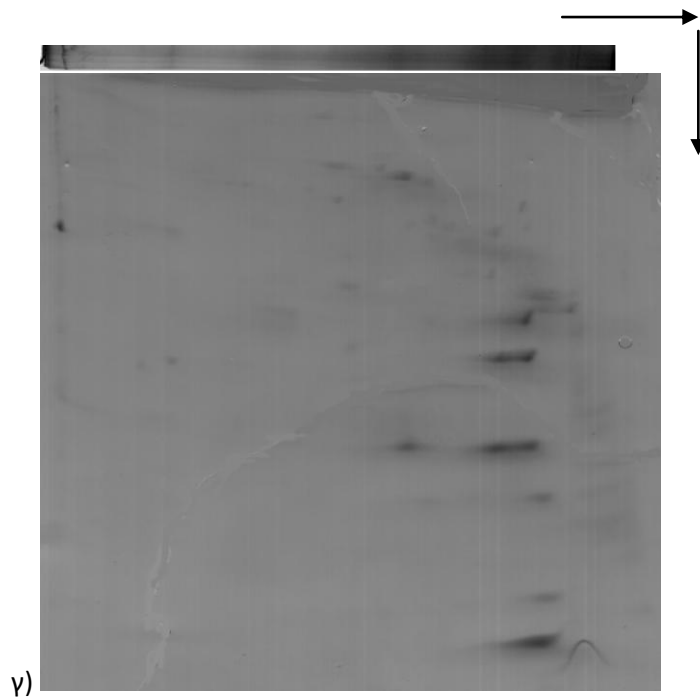
Το ίζημα που προέκυψε μετά από την κατεργασία με το EDTA διαλυτοποιήθηκε με το ήπιο μη ιοντικό απορρυπαντικό DDM σε συγκέντρωση 0,5%. Προκειμένου να γίνει η επιλογή για τον ιδανικότερο χρόνο επώασης του απορρυπαντικού με το μεμβρανικό κλάσμα μελετήθηκαν οι χρόνοι: 15 λεπτά, 30 λεπτά και 45 λεπτά. Η μέτρηση της πρωτεϊκής συγκέντρωσης των διαλυτοποιημένων μεμβρανικών κλασμάτων βρέθηκε ίδια για τα κλάσματα που επώαστηκαν για 30 και 45 λεπτά ενώ αυτό που επώαστηκε για 15 λεπτά είχε μικρότερη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των διαλυτοποιημένων μεμβρανών μέσω Blue Native-PAGE (εικόνα 31). Επίσης, το δείγμα αναλύθηκε με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Blue Native-SDS PAGE και τα πρωτεϊνικά μεμβρανικά σύμπλοκα διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος (εικόνα 32).

Όπως φαίνεται και από τις παρακάτω εικόνες για την περίπτωση του χρόνου επώασης για 30 λεπτά παρατηρούνται πιο ευδιάκριτα πρωτεϊνικά στίγματα στην πρώτη διάσταση (Blue Native- PAGE) και συνεπώς πιο ευδιάκριτα στίγματα στην δεύτερη διάσταση σε σχέση με τους υπόλοιπους χρόνους επώασης. Με βάση τα παραπάνω επιλέχτηκαν τα 30 λεπτά για την επώαση με το απορρυπαντικό.



Εικόνα 31: Blue Native-PAGE του διαλυτοποιημένου μεμβρανικού κλάσματος αφού έχει υποστεί κατεργασία με EDTA βακτηρίων όπου έχουν αναπτυχθεί παρουσία ηλεκτρικού όπου έχει γίνει επώαση με το DDM για: 15 λεπτά (1), 30 λεπτά (2), 45 λεπτά (3)

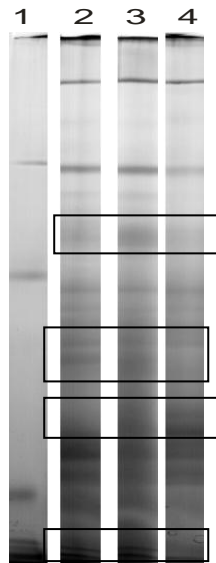




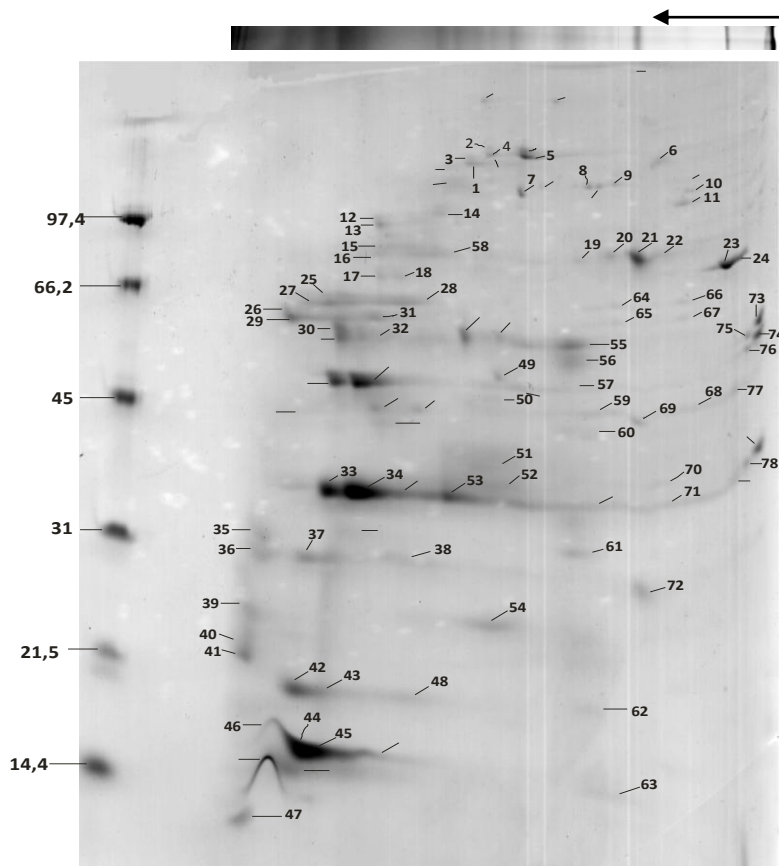
Εικόνα 32: Blue Native- SDS PAGE για το διαλυτοποιημένο μεμβρανικό κλάσμα που όπου έχει γίνει επώαση με το DDM για α) 15 λεπτά, β) 30 λεπτά και γ) 45 λεπτά

3.8 Πρωτεομική ανάλυση των μεμβρανικών κλασμάτων του βακτηρίου

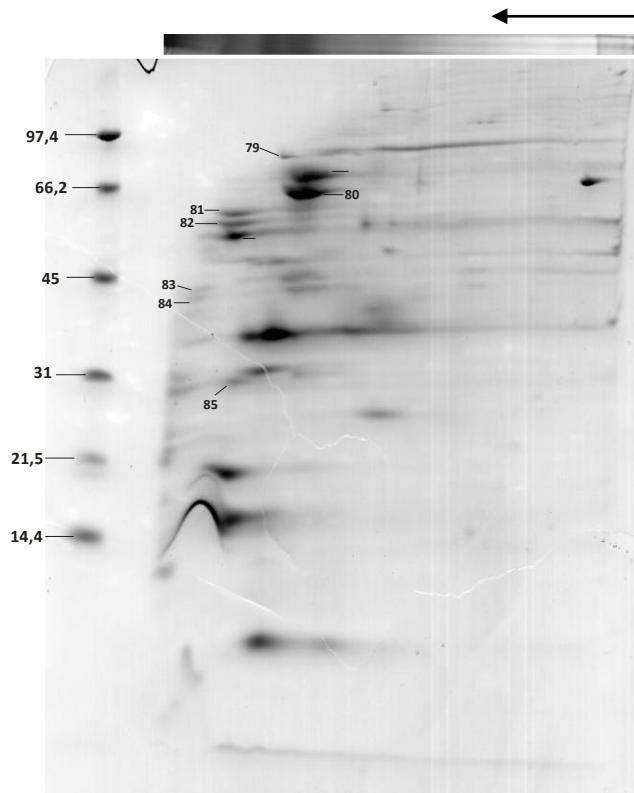
Για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων του μεμβρανικού κλάσματος που προέκυψε μετά από τη διαλυτοποίησή του με το DDM, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων Blue Native-SDS PAGE. Η μεθοδολογία αυτή ακολουθήθηκε για τις τρεις διαφορετικές πηγές άνθρακα: ηλεκτρικό, φαινόλη και τολουόλιο. Έπειτα, έγινε σύγκριση των οπτικών διαφορών στην έκφραση των πρωτεϊνών που υπήρχαν στις πηκτές από τα μεμβρανικά κλάσματα του βακτηρίου όταν αυτό αναπτυσσόταν σε διαφορετικές πηγές άνθρακα και οι διαφορές ταυτοποιήθηκαν. Από τη πηκτή που προέκυψε από το μεμβρανικό κλάσμα του βακτηρίου καλλιεργημένου σε ηλεκτρικό οδηγήθηκαν για ταυτοποίηση όλα τα στίγματα. Παρακάτω παρουσιάζονται: ο διαχωρισμός των μεμβρανικών συμπλόκων μέσω της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης καθώς και τα πρωτεϊνικά στίγματα που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου καλλιεργημένου στις τρεις διαφορετικές πηγές άνθρακα.



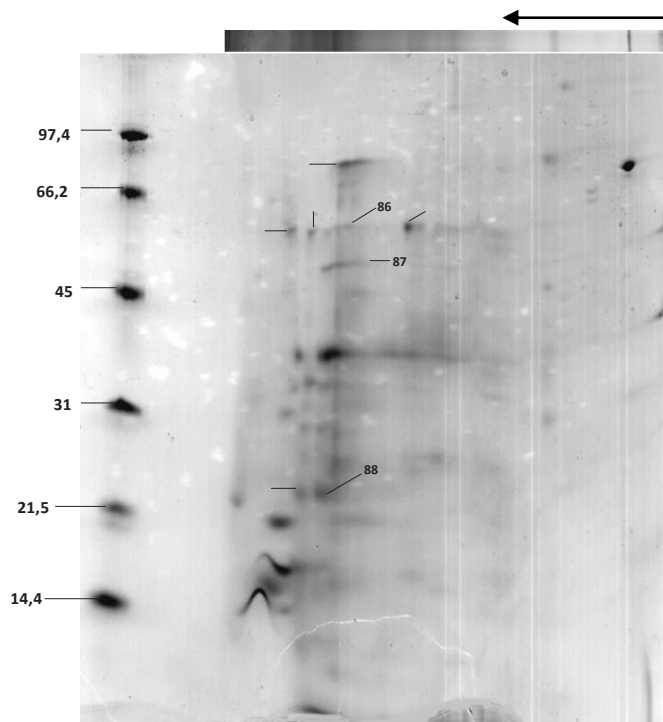
Εικόνα 33: Blue Native-PAGE των διάφορων διαλυτοποιημένων μεμβρανικών κλασμάτων, αφού έχουν υποστεί κατεργασία με EDTA. Μάρτυρας (1), μεμβρανικό κλάσμα βακτηρίων όπου έχουν αναπτυχθεί παρουσία ηλεκτρικού (2), φαινόλης συγκέντρωσης 200mg/l (3) και τολουολίου (4). Με ειδικά πλαίσια επισημαίνονται οι κύριες διαφορές μεταξύ των κλασμάτων.



Εικόνα 34: Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (BN/SDS-PAGE) του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου, καλλιεργημένο σε ηλεκτρικό. Με βέλη παρουσιάζονται τα στίγματα που μελετήθηκαν και με αριθμούς αυτά που ταυτοποιήθηκαν.



Εικόνα 35: Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (BN/SDS-PAGE) του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου, καλλιεργημένο σε φαινόλη (συγκέντρωσης 200mg/l). Με βέλη παρουσιάζονται τα στίγματα που μελετήθηκαν και με αριθμούς αυτά που ταυτοποιήθηκαν.



Εικόνα 36: Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (BN/SDS-PAGE) του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου, καλλιεργημένο σε τολουόλιο. Με βέλη παρουσιάζονται τα στίγματα που μελετήθηκαν και με αριθμούς αυτά που ταυτοποιήθηκαν.

Παρατηρούνται για το κλάσμα που προέρχεται από βακτήρια καλλιεργημένα σε ηλεκτρικό πιο ευδιάκριτα στίγματα, από ότι για τις άλλες δύο συνθήκες. Με βέλη και αριθμούς επισημαίνονται οι κύριες οπτικές διαφορές μεταξύ των κυτταροπλασματικών κλασμάτων από τα βακτήρια που είχαν καλλιεργηθεί σε φαινόλη και τολουόλιο. Αναλυτικότερα, στη φαινόλη παρατηρούνται τα στίγματα 81 και 82 και 83 και 84, τα οποία δεν υπάρχουν στο τολουόλιο, και βρέθηκε ότι είναι πεπτίδια από την ATP synthase subunit alpha (H0JAZ6) και η υπομονάδα DctP του TRAP dicarboxylate transporter (I7K491) αντίστοιχα. Η τελευταία βρίσκεται στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη και συμμετέχει στη μεταφορά ουσιών. Το 80 και 85 που και αυτά δεν υπάρχουν, οπτικά δηλαδή στο τολουόλιο, βρέθηκαν να είναι η Type V secretory pathway, adhesin AidA (I7JME8) και η OmpA/MotB domain-containing protein (F4DX80) αντίστοιχα. Όσο αφορά τη πηκτή από το τολουόλιο μόνο τρία στίγματα ταυτοποιήθηκαν (τα 86-88) τα οποία αποτελούν υπομονάδες μιας πρωτεΐνης, η οποία βρέθηκε και στη φαινόλη (στίγμα 80).

Για το κλάσμα που προέρχεται από βακτήρια καλλιεργημένα σε ηλεκτρικό, μελετήθηκαν όλα τα στίγματα. Βρέθηκαν δύο υπομονάδες της Succinate dehydrogenase (στίγματα 15 και 16), η Succinate dehydrogenase and fumarate reductase iron-sulfur (B0KNX2) και η flavoprotein subunit (B0KNX3), η υδρογεννάση αυτή βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και επιτελεί οξειδοαναγωγικές διεργασίες. Τρεις άλλες υπομονάδες που εντοπίστηκαν ήταν από την ATP synthase (στίγματα 25-31 και 62-66), η subunit alpha (A4Y189), η subunit beta (A4Y187) και η subunit b (J7UHX6), βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη και μέσω υδρόλυσης παράγει ATP. Εμφανίζονται, επιπλέον, μια υπομονάδα της Cytochrome c oxidase (στίγματα 39 και 41), η CcoH (I7JKI7), η οποία βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη και συμμετέχει στη μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Άλλες πρωτεΐνες που βρέθηκαν και εμπλέκονται στην αναπνευστική αλυσίδα είναι το Cytochrome c (A4XQQ7) και το Cytochrome b (I7IDD3). Ένα άλλο σύμπλοκο που βρέθηκε μέσω τριών υπομονάδων (subunit A (I7IEL9), subunit C (I7JON1) και subunit F (I7IEL8)) είναι το Na(+)-translocating NADH-quinone reductase (στίγματα 55,56 και 60). Το σύμπλοκο είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά ιόντων νατρίου και την αναγωγή της 1-ubiquinone σε ubiquinol.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες.

No. of spot	Identified protein	Organism	Protein MW	PI-Value	Swissprot no.	function
1	Pyruvate dehydrogenase E1 component	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	100011	5,5	A4XPTD	Oxidoreductase
2	LPS-assembly protein LptD	Pseudomonas mendocina DHK	96279	4,9	J7U7W9	Transporter activity
3	Pyruvate dehydrogenase E1 component	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	100011	5,5	A4XPTD	Oxidoreductase
4	LPS-assembly protein LptD	Pseudomonas mendocina DHK	96279	4,9	J7U7W9	Transporter activity
5	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	106282	6	I7JF8	Oxidoreductase
6	Hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAEl)	Pseudomonas mendocina (strain NK-01)	113691	5,4	F4DXK2	Transporter activity
7	Acyl-CoA dehydrogenase	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	89143	5,6	I7K392	Oxidoreductase
8	Outer membrane protein assembly factor Bama	Pseudomonas mendocina (strain NK-01)	87112	4,6	F4DPP1	Transporter activity
9	Outer membrane protein assembly factor Bama	Pseudomonas mendocina (strain NK-01)	87112.00	4,6	F4DPP1	Transporter activity
10	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	106282	6	I7JF8	Oxidoreductase
11	Pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	67386	5,2	A4XPS9	Transferase
12	PpIC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	67813	4,4	I7IYG2	Isomerase
13	PpIC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	67813	4,4	I7IYG2	Isomerase
14	Uncharacterized protein	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	78636	5	I7KAU7	Oxidoreductase
15	Succinate dehydrogenase subunit A	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	64108.00	6,1	A4XV95	Oxidoreductase
16	Succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	Pseudomonas putida (strain GB-1)	64058	5,8	B0KNX3	Oxidoreductase
17	Type V secretory pathway, adhesin AidA	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	64648	4,9	I7JME8	Secretion pathway
18	Type V secretory pathway, adhesin AidA	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	64648	4,9	I7JME8	Secretion pathway
19	Mammalian cell entry related domain protein	Pseudomonas putida (strain GB-1)	16956	4,8	B0KQI9	Signal peptide
20	Succinate dehydrogenase subunit A	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	64108	6,1	A4XV95	Oxidoreductase
21	Succinate dehydrogenase subunit A	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	64108	6,1	A4XV95	Oxidoreductase
22	Succinate dehydrogenase subunit A	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	64108	6,1	A4XV95	Oxidoreductase
23	Succinate dehydrogenase subunit A	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	56936	4,8	I7KAL4	Oxidoreductase
24	60 kDa chaperonin	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	56936	4,8	I7KAL4	Prevents misfolding
25	60 kDa chaperonin	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	56936	4,8	I7KAL4	Prevents misfolding
26	ATP synthase subunit alpha	Pseudomonas psychrotolerans L19	53354	5,4	H0JAZ6	Hydrolase
27	ATP synthase subunit beta	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	49641	4,8	A4Y187	Hydrolase
28	ATP synthase subunit alpha	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	55486	5,3	A4Y189	Hydrolase
29	ATP synthase subunit alpha	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	55486	5,3	A4Y189	Hydrolase
30	ATP synthase subunit beta	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	49641	4,8	A4Y187	Hydrolase
31	ATP synthase subunit beta	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	49641	4,8	A4Y187	Hydrolase
32	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding domain protein	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	53966.00	9,2	A4XVJ8	Iron-sulfur cluster binding
33	Cytochrome b	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	46219.00	8,6	I7IDD3	Electron carrier activity
34	50S ribosomal protein L1	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	23991.00	10	I7J2C5	Translation
35	Cytochrome c1-like protein	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	29304.00	7,7	A4XQQ7	Electron carrier activity
36	Cytochrome b	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	46219.00	8,6	I7IDD3	Electron carrier activity
37	OmpA/MotB domain-containing protein	Pseudomonas mendocina (strain NK-01)	22061.00	4,4	F4DX80	Transporter activity
38	OmpA/MotB domain-containing protein	Pseudomonas putida (strain GB-1)	24180	9,59	B0KK57	Translation
39	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	22618	6,31	I7IEB0	Electron carrier activity
40	Electron transport protein SCO1/SenC	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	22758	5,6	I7IZU9	Electron carrier activity
41	Cytochrome c oxidase accessory protein CcoH	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	18252.00	10,1	F4DLC7	Translation
			21761.00	5,9	I7JKI7	Electron carrier activity

42	Peptidoglycan-associated lipoprotein OprL (Fragment)	Pseudomonas alcaliphila	16475.00	4,8	11SXZ4	Lipoprotein
43	Peptidoglycan-associated lipoprotein OprL (Fragment)	Pseudomonas alcaliphila	16475.00	4,8	11SXZ4	Lipoprotein
44	OmpW family outer membrane protein	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	24485.00	5,6	17K6Q7	Transporter activity
45	OmpW family outer membrane protein	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	24485.00	5,6	17K6Q7	Transporter activity
46	Putative uncharacterized protein	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	21670.00	6,4	A4XWL6	
47	50S ribosomal protein L7/L12	Pseudomonas putida (strain GB-1)	12592.00	4,6	B0KK59	Translation
48	Peptidoglycan-associated lipoprotein OprL (Fragment)	Pseudomonas alcaliphila	16475.00	4,8	11SXZ4	Lipoprotein
49	Uroporphyrinogen-III synthetase	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	41169.00	4,7	17K021	Lyase
50	Sulfate ABC transporter, ATP-binding protein CysA	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	37036.00	5,9	17K7U5	Transporter activity
51	Secretion protein HlyD family protein	Pseudomonas mendocina (strain NK-01)	38388.00	7,7	F4DYU0	Transporter activity
52	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	33872.00	5,5	A4XVJ2	Electron carrier activity
53	OmpF family protein OS=Pseudomonas mendocina (strain ymp) GN	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	34795.00	4,7	A4XU37	Transporter activity
54	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	22618.00	6,4	17IEB0	Electron carrier activity
55	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	48433.00	6,5	17IEI9	Oxidoreductase
56	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit F	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	45953.00	4,9	17IEI8	Oxidoreductase
57	Putative uncharacterized protein	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	56668.00	8,7	A4XU22	
58	Putative lipoprotein	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	40558.00	4,7	17K2U6	Lipoprotein
59	Outer membrane protein assembly factor BamD	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	37504.00	5,1	17I171	Transporter activity
60	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit C	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	28038.00	5,6	17J0N1	Oxidoreductase
61	Cytochrome b	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	46219.00	8,6	17IDD3	Electron carrier activity
62	ATP synthase subunit b	Pseudomonas mendocina DLHK	17077.00	5,4	J7UHX6	Hydrolase
63	ATP synthase subunit alpha	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	55486.00	5,3	A4Y189	Hydrolase
64	ATP synthase subunit beta	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	49641.00	4,8	A4Y187	Hydrolase
65	ATP synthase subunit alpha	Pseudomonas psychrotolerans L19	55354.00	5,4	H0JAZ6	Hydrolase
66	ATP synthase subunit beta	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	49641.00	4,8	A4Y187	Hydrolase
67	Secretion protein HlyD family protein	Pseudomonas mendocina (strain NK-01)	38388.00	7,7	F4DYU0	Transporter activity
68	Ornithine carbamoyltransferase	Pseudomonas sp. (strain M1)	38050.00	5,9	L1HZU2	Transferase
69	Uncharacterized protein	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	33059.00	5,7	17IX12	
70	OprF (Fragment)	Pseudomonas oleovorans	31744.00	4,8	F6KQB8	Transporter activity
71	Succinate dehydrogenase and fumarate reductase iron-sulfur	Pseudomonas putida (strain GB-1)	26610.00	8,9	B0KNX2	Oxidoreductase
72	Dihydroliipoamide succinyltransferase	Pseudomonas mendocina (strain NK-01)	42243.00	5,3	F4DS93	Transferase
73	Protease FtsH subunit HfIK	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	43072.00	4,9	A4XPY9	Hydrolase
74	2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 subunit	Pseudomonas putida (strain GB-1)	42281.00	5,1	B0KNX0	Transferase
74	Protease FtsH subunit HfIK	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	43072.00	5,09	A4XPY9	Hydrolase
75	Protease FtsH subunit HfIK	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	43072.00	4,9	A4XPY9	Hydrolase
76	Uncharacterized protein ybdG	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	49103.00	9,6	17JIM63	
77	Protease FtsH subunit HfIC	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	33007.00	9,4	A4XPZ0	Hydrolase
78	OprF (Fragment)	Pseudomonas oleovorans	31744.00	4,8	F6KQB8	Transporter activity
79	PpiC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	67813.00	4,4	17IYG2	Isomerase
80	Type V secretory pathway, adhesin AidA	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	64648.00	4,9	17JME8	Secretion pathway
81	ATP synthase subunit alpha	Pseudomonas psychrotolerans L19	55354.00	5,4	H0JAZ6	Hydrolase
82	ATP synthase subunit beta	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	49641.00	4,8	A4Y187	Hydrolase
83	Putative uncharacterized protein	Pseudomonas mendocina (strain ymp)	38598.00	5,6	A4XQ76	
84	TRAP dicarboxylate transporter-DctP subunit	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	42790.00	5,3	17K491	Transporter activity
85	OmpA/MotB domain-containing protein	Pseudomonas mendocina (strain NK-01)	22061.00	4,4	F4DX80	Transporter activity
86	Type V secretory pathway, adhesin AidA	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	64648.00	4,9	17JME8	Secretion pathway
87	Type V secretory pathway, adhesin AidA	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	64648.00	4,9	17JME8	Secretion pathway
88	Type V secretory pathway, adhesin AidA	Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344	64648.00	4,9	17JME8	Secretion pathway

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Καλλιέργειες

Κατά τη διάρκεια των καλλιεργειών με M_{9R} θρεπτικό, παρατηρήθηκε ότι από τη στιγμή που η κυτταρική πυκνότητα αυξανόταν, το χρώμα της καλλιέργειας άλλαζε. Στις καλλιέργειες όπου προστέθηκε ηλεκτρικό, το χρώμα ήταν ανοιχτό κίτρινο. Παρουσία φαινόλης, το χρώμα ήταν σκούρο κίτρινο για τα 200 mgr/lit ενώ στο τολουόλιο το χρώμα ήταν ανοιχτό ροζ προς κίτρινο. Συγκρίνοντας τις καμπύλες ανάπτυξης προκύπτει ότι η βέλτιστη ταχύτητα ανάπτυξης παρατηρείται όταν το βακτήριο αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό, όπου σε 2,5 με 3 ώρες η οπτική πυκνότητα είναι 0,6. Αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, καθώς το ηλεκτρικό αποτελεί ενδιάμεσο του κύκλου του κιτρικού οξέως με αποτέλεσμα να μην ακολουθείται το αρωματικό μεταβολικό μονοπάτι αλλά να εισάγεται αμέσως στον κύκλο του κιτρικού. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ότι όταν το βακτήριο αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τη φαινόλη η ταχύτητα ανάπτυξης μειώνεται σε σχέση με το ηλεκτρικό, καθώς απαιτούνται 7- 8 ώρες έως ότου η οπτική πυκνότητα να γίνει 0,6. Με άλλα λόγια χρειάζεται το διπλάσιο χρόνο για να αναπτυχθεί σε σχέση με το ηλεκτρικό, πράγμα που εξηγείται αν λάβουμε υπό όψιν μας ότι η φαινόλη είναι μια αρωματική ένωση και το βακτήριο θα πρέπει να αναπτύξει ένζυμα για την αποικοδόμησή της, μηχανισμούς ανθεκτικότητας, πρωτεΐνες όπου θα την εισάγουν στο εσωτερικό του βακτηρίου κ.α.

Αν συγκρίνουμε τον ρυθμό ανάπτυξης του βακτηρίου όταν αναπτύσσεται παρουσία τολουολίου, παρατηρούμε ότι ο ρυθμός μειώνεται ακόμα περισσότερο καθώς για να φτάσει η οπτική πυκνότητα στο 0,6 χρειάζονται γύρω στις 70 με 80 ώρες, δηλαδή δεκαπλάσιο χρόνο σε σχέση με τη φαινόλη. Επιπλέον, παρατηρώντας τη καμπύλη ανάπτυξης βλέπουμε ότι δεν υπάρχει μια ξεκάθαρη εκθετική φάση αλλά υπάρχουν διαστήματα όπου η βιομάζα δεν αυξάνεται, αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι η διαλυτότητα του τολουολίου στο νερό είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή της φαινόλης, και ίσως να μην έχουν όλα τα βακτήρια πρόσβαση στο ρύπο.

4.2 Έλεγχος του μεταβολικού μονοπατιού

Έγινε έλεγχος του μεταβολικού μονοπατιού που ακολουθείται καθώς και κινητική του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση του κατεχολικού δακτυλίου για τις διαφορετικές πηγές άνθρακα στις οποίες αναπτύχθηκε το βακτήριο.

Όσον αφορά τα φάσματα, δείχνουν ότι η κορυφή της κατεχόλης στα 260nm μειώνεται, ενώ η κορυφή της 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης στα 375nm αυξάνεται και όπως έχει περιγραφεί η παραγωγή της καταδεικνύει το *meta* μεταβολικό μονοπάτι που ακολουθεί το βακτήριο για τον καταβολισμό των διάφορων συγκεντρώσεων της φαινόλης καθώς και του τολουολίου. Όταν το βακτήριο καλλιεργείται με ηλεκτρικό δεν έχουμε την δημιουργία της ημιαλδεΐδης καθώς, σαν ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου του κιτρικού οξέος, χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα. Επίσης, με αύξηση της συγκέντρωσης του ρύπου ή και αλλαγή αυτού δεν υπάρχει αλλαγή του μεταβολικού μονοπατιού. Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ ο σχηματισμός του μεταβολικού ενδιάμεσου γινόταν σχετικά γρήγορα, η εξαφάνιση του χρειαζόταν χρόνο για να ολοκληρωθεί. Αυτό πιθανόν να υποδηλώνει ότι το επόμενο ένζυμο του μεταβολικού μονοπατιού είτε είναι πολύ πιο αργό σε δράση, είτε αδρανοποιήθηκε κατά τη διαδικασία της εκχύλισης του κυτταροπλάσματος. Αυτό μας επιτρέπει να κάνουμε μια κατά προσέγγιση κινητική μελέτη των ενζύμων οξειδωσης της κατεχόλης.

Με λήψη φασμάτων συναρτήσεσι του χρόνου για το μήκος κύματος 375nm γίνεται έλεγχος της ταχύτητας σχηματισμού της 2- υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης. Η σύγκριση της ταχύτητας μετατροπής της κατεχόλης σε 2- υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη για τις καλλιέργειες με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης (200, 400 και 800mg/lit) και για το τολουόλιο έδειξε ότι αρχικά η ταχύτητα μετατροπής της κατεχόλης είναι μέγιστη και για τις τέσσερις περιπτώσεις, αφού η κατεχόλη παρέχεται σε περίσσεια ενώ στη συνέχεια το ένζυμο φθάνει σε κορεσμό, με αποτέλεσμα η ταχύτητα να μην μεταβάλλεται. Από τη σύγκριση αυτή, το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η μέγιστη ταχύτητα μετατροπής εμφανίζεται όταν το βακτήριο αναπτύσσεται σε 200mg/lit φαινόλη. Για την καλλιέργεια με 400mg/lit φαινόλη στο θρεπτικό μέσο η ταχύτητα ελαττώνεται αλλά όχι σε μεγάλο βαθμό. Για την καλλιέργεια με 800mg/lit φαινόλη στο θρεπτικό μέσο η ταχύτητα ελαττώνεται δραστικά. Η χαμηλότερη ταχύτητα εμφανίζεται στη καλλιέργεια με το τολουόλιο. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η συνολική ποσότητα των πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματικού κλάσματος των βακτηρίων είναι ίδια, μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι η μεγάλη ποσότητα φαινόλης ή το τολουόλιο μπορεί να μειώνει την ενεργότητα ενζύμου στα δείγματα που αναλύονται με αποτέλεσμα να μειώνεται και η ανάπτυξη τους. Ένα γεγονός που συνηγορεί σε αυτό το συμπέρασμα είναι ότι η ενεργότητα του ενζύμου είναι ανάλογη με τον ρυθμό

ανάπτυξης των καλλιιεργειών. Να σημειωθεί ότι προηγούμενες μελέτες (Κασσωτάκη, Πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, 2012) είχε μελετηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης του βακτηρίου όταν αυτό αναπτυσσόταν στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης και είχε δειχθεί ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων όταν αυτά αναπτύσσονταν σε 200mg/lit φαινόλης ήταν μεγαλύτερος ενώ ακολουθούσε αυτός στα 400mg/lit και τέλος αυτός στα 800mg/lit. Ωστόσο, τα βακτήρια που χρησιμοποιούνταν φαινόλη 800mg/lit αναπτυσσόταν με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με αυτά με τολουόλιο.

Ένα επόμενο βήμα ήταν ο εμπλουτισμός του κυτταροπλασματικού πρωτεόματος που περιείχε τα ένζυμα του μεταβολισμού μέσω της διαβάθμισης ζάχαρης. Στόχος ήταν να απομονωθεί το κλάσμα στο οποίο εμφανίζεται η ενεργότητα στη μετατροπή της κατεχόλης. Μετά το πέρας της ολονύχτιας υπερφυγοκέντρωσης σε διαβάθμιση ζάχαρης παρατηρήθηκε στην περιοχή 10% σε πυκνότητα ζάχαρης μια ευρεία διαχυμένη κίτρινη ζώνη. Στη συνέχεια τα κλάσματα διαχωρίστηκαν και λήφθηκαν φάσματα συναρτήσεως του χρόνου για τα μήκη κύματος 375nm και 260nm, όπως και παραπάνω. Από όλα τα φάσματα τα μόνα που εμφάνισαν ενδείξεις απορρόφησης ήταν αυτά που προέρχονταν από τις καλλιέργειες με φαινόλη και τολουόλιο, όπως ήταν αναμενόμενο μόνο για τα 375nm καθώς ακολουθεί το meta μεταβολικό μονοπάτι.

Η σύγκριση της ταχύτητας μετατροπής της κατεχόλης σε 2- υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη (εικόνα 21) για τα κλάσματα από καλλιέργειες με τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης (200 και 800mg/lit) δείχνει ομοιότητες με αυτές τις εικόνες 20 με δύο βασικές διαφορές. Η μια διαφορά είναι ότι λόγω της αυξημένης ταχύτητας έγινε μεγαλύτερη αραίωση των δειγμάτων σε σχέση με αυτά της εικόνας 20. Αυτό δείχνει ότι η κλασματοποίηση του κυτταροπλασματικού πρωτεόματος με την διαβάθμιση ζάχαρης εμπλούτισε το πρωτεϊνικό δείγμα με τα ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού. Η δεύτερη διαφορά είναι ότι η ταχύτητα της καλλιέργειας με 800mg/lit φαινόλης είναι σχετικά όμοια με αυτή για τη καλλιέργεια με 200mg/lit φαινόλης σε αντίθεση με τα δείγματα πριν τη κλασματοποίηση. Επομένως, ένα πρόσθετο συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί είναι ότι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του ρύπου τα βακτήρια εκφράζουν λόγω του στρες περισσότερες πρωτεΐνες με αποτέλεσμα στην ίδια πρωτεϊνική συγκέντρωση να αντιστοιχεί λιγότερο ποσοστό ενζύμου σε σχέση με την καλλιέργεια των 200mg/lit φαινόλης. Για την καλλιέργεια με το τολουόλιο η ταχύτητα μειώνεται δραστικά.

4.3 Μελέτη του κυτταροπλασματικού κλάσματος

Από τη σύγκριση των κυτταροπλασματικών κλασμάτων όταν έχουν διαχωριστεί σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Εικόνα 22) προκύπτει ότι το τολουόλιο εμφανίζει ένα διαφορετικό μοτίβο πρωτεϊνών. Ωστόσο, όταν γίνεται σύγκριση μεταξύ των κυτταροπλασματικών κλασμάτων που έχουν προέλθει από τη διαβάθμιση ζάχαρης το μοτίβο είναι παρόμοιο για όλα τα κυτταροπλασματικά κλάσματα. Το παραπάνω δεν αναιρεί το γεγονός ότι μεταξύ των διάφορων πρωτεομάτων υπάρχουν διαφορές στις έκφραζομενες πρωτεΐνες (αναλύονται στο τμήμα 3.3). Ένα επόμενο βήμα, από τη στιγμή που υπήρχαν εμφανείς διαφορές μεταξύ των κλασμάτων, ήταν η περαιτέρω μελέτη των συμπλόκων των υποπρωτεομάτων που έχουν προέλθει από τη διαβάθμιση ζάχαρης και εμφανίζουν ενεργότητα.

Η μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση δείχνει διαφορές στα ψηλά μοριακά βάρη (εικόνα 23) αναλογα της πηγής ανθρακα που παρέχεται στο στέλεχος. Επίσης σε χαμηλότερα μοριακά βάρη υπήρχαν διαφορές αλλά λόγω της διάχυσης περιοριζόταν η διακριτική ικανότητα. Γενικότερα, παρατηρείται μια έλλειψη σε συμπλόκων όσο αφορά τα 800mg/l φαινόλης και το τολουόλιο σε αντίθεση με τα 200mg/l φαινόλης και το ηλεκτρικό. Με βάση αυτό θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινόλης ή το τολουόλιο μπορεί να επηρεάζουν την τεταρτογενή δομή των πρωτεϊνών είτε τα βακτήρια να εκφράζουν διαφορετικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες.

4.4 Πρωτεομική ανάλυση των κυτταροπλασματικών κλασμάτων

Στις Εικόνες 24 έως 27 παρουσιάζονται οι πηκτές που προέκυψαν από τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (BN-PAGE/SDS-PAGE). Παρατηρείται για το κλάσμα που προέρχεται από βακτήρια καλλιεργημένα σε τολουόλιο ένα διαφορετικό μοτίβο έκφρασης πρωτεϊνών. Με βελάκια και αριθμούς επισημαίνονται οι κύριες διαφορές μεταξύ των κυτταροπλασματικών κλασμάτων από τα βακτήρια που είχαν καλλιεργηθεί σε διαφορετικές πηγές άνθρακα. Εξάιρεση αποτελούν τα στίγματα 14-19 που βρέθηκαν σε όλα τα κλάσματα εκτός από το κλάσμα βακτηρίων σε ηλεκτρικό και υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός συμπλόκου το οποίο αποτελείται από δύο διαφορετικές πρωτεΐνες και καταλύει το τελευταίο βήμα στο meta μεταβολικό μονοπάτι (έχει αναλυθεί στο τμήμα 3.4).

Στο κλάσμα του ηλεκτρικό παρατηρούμε ότι τα στίγματα 1, 5, 6, 7 και 8 υπάρχουν μόνο σε αυτό. Από αυτά το 1 συμμετέχει στη σύνθεση του γλουταμινικού, το 5 είναι σαπερώνη, το 6 αποτελείται από δύο πρωτεΐνες όπου η μια συμμετέχει στη βιοσύνθεση των αμινοξέων (όπως και το 8) ενώ η άλλη είναι μια μεταφοράση (όπως και το 7). Τα στίγματα 2,3 και 4, τα οποία υπάρχουν και στο κλάσμα των 200mg/lit φαινόλης, συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων (στίγμα 2) είτε είναι μεταφορές.

Για το κλάσμα που προέρχεται από βακτήρια καλλιεργημένα σε 200mg/lit φαινόλης παρατηρούμε ότι το στίγμα 11 υπάρχει μόνο σε αυτό και συμμετέχει στη μεταγραφή. Το 9 που υπάρχει σε όλα εκτός από το τολουόλιο είναι μια περοξιδάση, ενώ το 10 που δεν υπάρχει στο τολουόλιο ή το ηλεκτρικό συμμετέχει στον μεταβολισμό των αρωματικών ενώσεων και είναι η 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (P19059). Τέλος, το στίγμα 12 που βρέθηκε μόνο σε αυτό το κλάσμα και στο τολουόλιο συμμετέχει και αυτό στο μεταβολισμό των αρωματικών ενώσεων και είναι μίγμα δύο πρωτεϊνών της 2-oxopent-4-enoate hydratase (D5MPG9) και της 4-oxalocrotonate decarboxylase (P49156). Τα δύο τελευταία στίγματα (10 και 12) εμφανίζονται σε μεγαλύτερη ένταση στα 200mg/lit, που αν το συνδυάσουμε με τις κινητικές που έχουν παρθεί, μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα ένζυμα που εμπλέκονται στο αρωματικό μεταβολικό μονοπάτι βρίσκονται σε μεγαλύτερη ένταση στα 200mg/lit.

Όσο αφορά το κλάσμα που προέρχεται από βακτήρια καλλιεργημένα σε 800mg/lit φαινόλης παρατηρούμε ότι το 13 στίγμα που υπάρχει και στο τολουόλιο είναι μια οξειδοαναγωγή. Στο κλάσμα του τολουολίου ταυτοποιήθηκαν δύο στίγματα όπου το 20 που υπήρχε μόνο εδώ είναι μια οξειδοαναγωγή, ενώ για το 21 επιβεβαιώθηκε ότι υπάρχει και στα 200mg/lit (στίγμα 12).

Συγκεντρωτικά, από τα 21 στίγματα ταυτοποιήθηκαν 29 πρωτεΐνες καθώς σε ορισμένα υπήρχαν περισσότερες από μια πρωτεΐνες. Από αυτές οι 11 συμμετέχουν μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης αρωματικών ενώσεων, οι 4 είναι μεταφορές ή οξειδοαναγωγές, οι 3 συμμετέχουν στην αμινοσύνθεση, οι 2 είναι σαπερώνες ενώ οι υπόλοιπες επιτελούν άλλες διεργασίες στο κυτταρόπλασμα.

4.5 Κατεργασία μεμβρανικού κλάσματος με Na₂CO₃ ή EDTA

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη του μεμβρανικού πρωτεώματος του *Pseudomonas* rhDV1 είναι η απομόνωση μεμβρανών χωρίς προσμίξεις από υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Σε προηγούμενες μελέτες έχει δείχθει ότι τα αποτελέσματα από τη χρήση διαφόρων απορρυπαντικών, δείχνουν ότι ένας μεγάλος αριθμός υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών παραμένει στις μεμβράνες. Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών αυτών είναι ριβοσωμικές πρωτεΐνες λόγω κυρίως της πρόσδεσης του ριβοσώματος στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω μεμβρανικών πρωτεϊνών και λιπιδίων κατά την διαδικασία της έκφρασης των μεμβρανικών, περιπλασματικών και εκκρινόμενων πρωτεϊνών [62].

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το Na₂CO₃ και το EDTA, προκειμένου να απομακρυνθεί ένα μέρος των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος, αλλά και του περιπλάσματος που απαντώνται στο αρχικό μεμβρανικό κλάσμα που προέκυψε αμέσως μετά τη λύση των κυττάρων. Είναι χαρακτηριστικό ότι πολλές περιφερειακές πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν από τη μεμβράνη είτε μέσω της μεταβολής της ιοντικής ισχύος του διαλύτη, κάτι που επιτυγχάνεται με τη χρήση του EDTA, είτε μέσω της μεταβολής του pH του διαλύματος, κάτι που επιτυγχάνεται με τη χρήση του Na₂CO₃. Από το αποτέλεσμα που προκύπτει από την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακυλαμιδίου (Εικόνα 29), παρατηρείται ότι ένα ποσοστό πρωτεϊνών απομακρύνεται έπειτα από την κατεργασία του μεμβρανικού κλάσματος με Na₂CO₃ και EDTA, οι οποίες θεωρητικά και με βάση προηγούμενες μελέτες είναι πιθανότατα ένα μεγάλο κομμάτι ριβοσωμικών πρωτεϊνών.

Μελετήθηκε η ιδανική μέθοδος κατεργασίας του μεμβρανικού κλάσματος για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα, ενώ εκτίμηση έγινε ιδιαίτερα με βάση τη διαλυτοποίηση των μεμβρανικών συμπλόκων, που αποτελεί έναν από τους κύριους στόχους της παρούσας εργασίας. Επιλέχθηκε ως καλύτερη μέθοδος κατεργασίας το EDTA, κάτι που προέκυψε από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων από την δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Blue Native/SDS PAGE (Εικόνα 30). Με το Na₂CO₃ τα στίγματα δεν είναι ξεκάθαρα, με αποτέλεσμα να μειώνεται η διακριτική ικανότητα σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με το EDTA. Αυτό ίσως να οφείλεται στο υψηλό pH που δημιουργείτε λόγω του ανθρακικού. Με το υψηλό pH μεταβάλλεται το φορτίο των πρωτεϊνών και κατ'επέκταση των συμπλοκών με αποτέλεσμα να επηρεάζεται το μοτίβο, όπου εν τέλει να είναι δύσκολος ο διαχωρισμός τους καθώς δεν υπάρχουν διακριτά σύμπλοκα.

4.6 Διαλυτοποίηση μεμβρανών με n-Dodecyl-β-D-Maltoside

Με τη διαλυτοποίηση του μεμβρανικού κλάσματος με το DDM επιτυγχάνεται η απομόνωση του τελικού μεμβρανικού κλάσματος απαλλαγμένου από προσμίξεις. Μελετήθηκε ο ιδανικός χρόνος επώασης του απορρυπαντικού με το μεμβρανικό κλάσμα για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα διαλυτοποίησης, ενώ η εκτίμηση έγινε ιδιαίτερα με βάση τη διαλυτοποίηση των μεμβρανικών συμπλόκων. Επιλέχθηκε ως καλύτερος χρόνος τα 30 λεπτά, κάτι που προέκυψε από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων από τη μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, αλλά και από τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Blue Native- SDS PAGE (Εικόνα 32).

Η μελέτη του ιδανικού χρόνου επώασης των μεμβρανικών κλασμάτων με το απορρυπαντικό για τη διαλυτοποίηση των μεμβρανών είναι ένα σημαντικό βήμα, καθώς συνίσταται πλήρης διαλυτοποίηση για τη μελέτη του συνόλου των μεμβρανικών συμπλόκων. Επίσης, μεγάλο ρόλο παίζει και η επιλογή του απορρυπαντικού, που θα πρέπει να είναι ήπιο στην περίπτωση μελέτης μεμβρανικών συμπλόκων.

4.7 Πρωτεομική ανάλυση των μεμβρανικών κλασμάτων του βακτηρίου

Στις Εικόνες 34 έως 36 παρουσιάζονται οι πηκτές που προέκυψαν από τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. Παρατηρείται για το κλάσμα που προέρχεται από βακτήρια καλλιεργημένα σε τολουόλιο ένα διαφορετικό μοτίβο έκφρασης πρωτεϊνών. Από τα 128 στίγματα τα 91 ταυτοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα των ταυτοποιήσεων, σε σχέση με την τοπολογία των πρωτεϊνών, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πρωτεϊνικά στίγματα που αναλύθηκαν	128
Πρωτεϊνικά στίγματα που ταυτοποιήθηκαν	91
Πρωτεΐνες Εξωτερικής Μεμβράνης	26
Πρωτεΐνες Εσωτερικής Μεμβράνης	44
Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες	11
Ριβοσωμικές	5
Άγνωστες πρωτεΐνες	5

Με βάση τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το μεμβρανικό πρωτεόμα δεν είναι τελείως απαλλαγμένο από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, αυτές που βρέθηκαν συμμετέχουν κυρίως στο μονοπάτι έκκρισης. Ωστόσο, το ποσοστό των ριβοσωμικών πρωτεϊνών που βρέθηκε είναι πολύ μικρό. Στο σύνολο τους οι πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης παρουσιάζουν χαρακτηριστικές λειτουργίες, όπως είναι η μεταφορά αμινοξέων, η οξείδωση λιπαρών οξέων, η μεταφορά ηλεκτρονίων και η συμμετοχή σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την παραγωγή ενέργειας, η μεταφορά πρωτονίων με σκοπό τη δημιουργία της βαθμίδωσης πρωτονίων, η μεταφορά πρωτεϊνικών μορίων με σκοπό την έκκρισή τους στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης παρουσιάζουν λειτουργίες που σχετίζονται με τη διατήρηση της δομής του κυττάρου, την επαφή του κυττάρου με το περιβάλλον μέσω για την πρόσληψη ουσιών και τη μεταφορά ουσιών μέσω των πορινών. Επιπλέον, βρέθηκαν 5 άγνωστες πρωτεΐνες για τις οποίες δε μπορούμε να ξέρουμε τη λειτουργία ή τη τοπολογία τους.

Αν και στο τμήμα 3.8 αναφέρονται τα διάφορα μεμβρανικά σύμπλοκα που ταυτοποιήθηκαν καθώς και οι κυριότερες διαφορές μεταξύ των μεμβρανικών πρωτεομάτων που μελετήθηκαν, κρίνεται σκόπιμο να σημειωθούν κάποιες επιπλέον παρατηρήσεις, οι οποίες αφορούν κυρίως τα μεμβρανικά σύμπλοκα της εσωτερικής μεμβράνης καθώς και συγκεκριμένες μεμονωμένες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με μεμβρανικά σύμπλοκα.

Η Succinate dehydrogenase προκύπτει από το γονίδιο SdhA-D και σχηματίζει τριμερή με μία προβλεπόμενη μοριακή μάζα 355 kDa. Είναι κυρίως υπεύθυνη για την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό και το σχηματισμό της ουβικινόλης από ουβικινόνη. Αποτελείται από δύο υδρόφιλες και δύο υδρόφοβες υπομονάδες [63]. Από τη πηκτή, εντοπίσαμε τις δύο υδρόφιλες, την 64,1 kDa υπομονάδα, που είναι η φλαβοπρωτεΐνη ή υπομονάδα α (B0KNX3) και την 26,6 kDa υπομονάδα σιδήρου-θείου (B0KNX2). Οι δύο άλλες υπομονάδες, SDHC (14 kDa) και SDHD (15 kDa) δεν ανιχνεύθηκαν. Με βάση το μέγεθος του συμπλόκου της Succinate dehydrogenase στο Blue Native, το οποίο υποδεικνύει την παρουσία ενός συμπλόκου από περίπου 440 kDa, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το (SdhABCD) σύμπλοκο είναι άθικτο.

Η Na(+)-translocating NADH-quinone reductase (Na⁺-NQR), η αντίστοιχη του μιτοχονδριακού συμπλόκου I, εμπλέκεται στην αναπνευστική αλυσίδα των διαφόρων βακτηρίων. Η Na⁺-NQR αποτελείται από έξι δομικά γονίδια (nqrA έως nqrF) και είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά ιόντων νατρίου και για την αναγωγή της 1-ουβικινόνης σε ουβικινόλη [64]. Τρεις υπομονάδες εντοπίστηκαν, η nqrA (I71EL9, 48,4 kDa), η nqrC (I7JON1, 28,0 kDa) και η nqrF (I71EL8, 45,9 kDa). Δύο πρωτεΐνες στην ίδια λωρίδα με μοριακό βάρος στην περιοχή από 20 kDa ανιχνεύθηκαν αλλά

δεν ταυτοποιήθηκαν. Με βάση το μέγεθος του στο Blue Native (περίπου 240 kDa) συμπεραίνουμε ότι το σύμπλοκο είναι ένα άθικτο μονομερές.

Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν δύο υπομονάδες του συμπλόκου HflKC, η HflC (A4XPZ0 33,0kDa) και η HflK (A4XPY9 43,0kDa). Και οι δύο έχουν ένα μεγάλο Ο-τερματικό άκρο που εκτίθενται στον περιπλαστικό χώρο και ένα Ν-τερματικό τοποθετημένο στο διαμεμβρανικό τμήμα. Το εξαμερές σχηματιζόμενο σύμπλοκο, HflKC, ενεργεί ως ρυθμιστής της HflB. Η HflB, είναι μια ATP-εξαρτώμενη μεταλλοπρωτεάση, που προσδένεται στη μεμβράνη και σχετίζεται με τον έλεγχο της ποιότητας των μεμβρανικών πρωτεϊνών, όντας υπεύθυνο για την αποικοδόμηση μεμβρανικών αλλά και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Οι έξι υπομονάδες της HflKC πιθανώς να συνδέονται με την HflB σε 1: 1 γραμμομοριακή αναλογία, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα σύμπλοκο με μοριακό βάρος περίπου 1.000 kDa [65]. Παρόλο που η HflB δεν εντοπίστηκε, με βάση το μέγεθος του συμπλόκου HflKC στο Blue Native, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι σχηματίζεται το σύμπλοκο (HflKC)₆-HflB₆.

Η ATP συνθάση περιέχει οκτώ υπομονάδες που χωρίζονται σε δύο υποσύμπλοκα: το υδατοδιαλυτό F1 μέρος (περιέχει τις υπομονάδες α, β, γ, δ, ε) και το μεμβρανικό F0 μέρος (περιέχει τις υπομονάδες a, b, c) [66]. Ανιχνεύτηκαν δύο υπομονάδες του F1 συμπλόκου, οι υπομονάδες α (A4Y189, 55,4kDa) και β (A4Y187, 49,6kDa), και μία υπομονάδα του F0 συμπλόκου, υπομονάδα b (J7UHX6, 17,0kDa). Με βάση το μέγεθος του συμπλόκου στο Blue Native (περίπου 315kDa), υποθέτουμε ότι σχηματίζεται το σύμπλοκο α₃β₃. Η υπομονάδα b βρέθηκε σε χαμηλότερα μοριακά βάρη στο Blue Native, ίσως λόγω των συνθηκών διαλυτοποίησης να έχει διαχωριστεί από το υπόλοιπο σύμπλοκο.

Το Pyruvate dehydrogenase complex (PDC) είναι ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τρία ένζυμα (E1, E2 και E3) τα οποία μετατρέπουν το πυρουβικό σε ακετυλο-CoA μέσω μιας διεργασίας που ονομάζεται αποκαρβοξυλίωση του πυρουβικού (pyruvate decarboxylation). Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από 60 υπομονάδες των τριών λειτουργικών πρωτεϊνών (24 E1, 24 E2, 12 E3). Το E1 είναι υπεύθυνο για την αποκαρβοξυλίωση του πυρουβικού και την ακετυλίωση του λιποϊκού οξέος που είναι ενωμένο με το E2, το E2 μεταφέρει την ακετυλο ομάδα στο CoA και το E3 αναγεννά το λιποϊκό οξύ [67]. Από τη πηκτή, εντοπίστηκαν η Pyruvate dehydrogenase E1 (A4XPT0, 100,0kDa) και η E2 ή dihydrolipoamide acetyltransferase (A4XPS9, 67,4kDa), ενώ η E3 δεν βρέθηκε.

Οι cytochrome *cbb3* oxidases αντιπροσωπεύουν μια ξεχωριστή κατηγορία των οξειδασών αίμης-σιδήρου (heme-copper oxidases (HCO)) και βρίσκονται σε Πρωτεοβακτήρια. Παρά το γεγονός ότι η *cbb3*-type cytochrome c oxidase αποτελείται από τις υπομονάδες CcoN, CcoO, CcoQ και CcoP, εντοπίστηκε μόνο η CcoO (A4XVJ5) υπομονάδα (subunit II). Αυτό ίσως να οφείλεται στην αστάθεια του συμπλόκου λόγω των συνθηκών διαλυτοποίησης [68], [69].

Μια από τις περισσότερο σε αφθονία πρωτεΐνες στην εξωτερική μεμβράνη είναι η OmpA (A4XRS7), η οποία υπάρχει σε πάνω από 105 αντίγραφα για κάθε κύτταρο. Η κύρια λειτουργία της είναι να διατηρεί την δομική ακεραιότητα της επιφάνειας του κυττάρου [70]. Επιπρόσθετα, βρέθηκε η OmpA/MotB domain protein (F4DX80) στη μονομερή της κατάσταση. Τέλος, μια άλλη πρωτεΐνη, που βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία στην εξωτερική μεμβράνη και εμφανίζει ομοιότητες με την OmpA είναι η OmpF (F6KQB8). Μπορεί να δράσει ως μη ειδική πορίνη και συμμετέχει στη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος [71].

4.8 Μελλοντικοί στόχοι

Ένα επόμενο βήμα στα πλαίσια της συνέχειας της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του βακτηρίου όταν αυτό αναπτύσσεται σε διαφορετικούς ρύπους (όπως βενζόλιο, αιθυλοβενζόλιο, ξυλόλιο, χλωροφαινόλες) καθώς και ταυτοποίηση των μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, με μια διαφορετική προσέγγιση όπως η υγρή χρωματογραφία (nano-LC) για τον διαχωρισμό των πεπτιδίων. Το πλεονέκτημα της μεθοδολογίας αυτής σε συνδυασμό με φασματογράφους μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας, δίνει την δυνατότητα ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών των διαφόρων πρωτεομάτων.

Ένας τελευταίος απώτερος στόχος είναι επίσης ο εντοπισμός και χαρακτηρισμός πρωτεϊνών ή/και πρωτεϊνικών συμπλόκων που επάγονται παρουσία του τολουολίου, καθώς και άλλων αρωματικών ρύπων και κατόπιν απομόνωσής τους η δομική τους ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία ή με κρυσταλλογραφία (όπως τα XFELs).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Zileena Z., Seed K. , Dennis J., 'Isolation and characterization of novel organic solvent-tolerant bacteria Extremophiles', Springer Link, Vol. 10, Issue 2, pp 129-138, 2006
- [2] Ramos J., Duque E., Gallegos M., Godoy P., Ramos-González M., Rojas A., Terán W., Segura A., 'Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria', Annual Review of Microbiology, Vol. 56, pp 743-768, 2002
- [3] Isken S., Bont J., 'Bacteria tolerant to organic solvents', Springer Link, Vol. 2, Issue 3, pp 229-238, 1998
- [4] Bin C., Karthiga N., Kai-Chee L., 'Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches', Applied and Environmental Microbiology, Vol. 85, pp 207-228, 2009
- [5] Sergio B., Munoz R., Diaz L., Villaverde S., 'New insights on toluene biodegradation by *Pseudomonas putida* F1: influence of pollutant concentration and excreted metabolites' Applied and Environmental Microbiology, Vol. 74, Issue 4, pp 857-866, 2007
- [6] Indu N., Shankar J., Shankar S., 'Biodegradation of phenol' African Journal of Biotechnology, Vol. 7 (25), pp. 4951-4958, 2008
- [7] Van Schei P., Young L., 'Isolation and characterization of phenol degrading denitrifying bacteria', Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64(7), pp 2432-2438, 1998
- [8] Draft of the comprehensive risk assessment report for 'Phenol', a substance chosen from the EU 1st priority list in 1994, CAS 2 DRAFT of 12.11.2002, CAS No 108-95-2, EINECS-No: 203-632-7
- [9] Zhao F., Mayura K., Hutchinson R., Lewis R., Burghardt R., Phillops T., 'Developmental toxicity and structure-activity relationships of chlorophenols using human embryonic palatal mesenchymal cells' Toxicology Letters, Vol. 78, Issue 1, pp 35-42, 1995
- [10] Babich H., Davis D., 'Phenol: A review of environmental and health risks', Regulatory Toxicology and Pharmacology, Vol.1, Issue1, pp 90-109, 1981
- [11] Beller HR, Reinhard M, Grbic-Galic D., 'Metabolic by-products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures', Applied and Environmental Microbiology, Vol.58(9), pp 3192-3195, 1992

- [12] Chakraborty R., O'Connor S., Chan E., Coates J., 'Anaerobic Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene Compounds by Dechloromonas Strain RCB', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, pp. 8649–8655, 2005
- [13] Beller H., Ding W., Reinhard M., 'Byproducts of anaerobic alkylbenzene metabolism useful as indicators of in situ biomediation', *Environmental Science & Technology*, Vol. 29(11), pp. 2864-2870, 1995
- [14] Beller H., Reinhard M., 'The role of iron in enhancing anaerobic toluene degradation in sulfate-reducing enrichment cultures', *Microbial Ecology*, Vol.30(1), pp.105-114, 1995
- [15] Beller H., Spormann A., Sharma P., Cole J., Reinhard M., 'Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sufer-reducing bacterium', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62(4), pp. 1188-1196, 1996
- [16] Freeman H., 'Standard Handbook of Hazardous Waste Treatment and Disposal', McGraw-Hill, 1997
- [17] Boopathy R., 'Factors limiting bioremediation technologies', Review paper *Bioresource Technology*, Vol.74, pp. 63-67, 2000
- [18] Wackett L., Hershberger D., 'Biocatalysis and Biodegradation: Microbial Transformation of Organic Compounds', ASM Press, 2001
- [19] Vidali M., 'Bioremediation. An overview', *Pure Appl. Chem*, Vol.73 (7), pp. 1163-1172, 2001
- [20] Agarry S.E., Durojaiye A.O., Yusuf R.O., Aremu M.O., Solomon B.O., Mojeed O., 'Biodegradation of phenol in refinery wastewater by pure cultures of *Pseudomonas aeruginosa* NCIB950 and *Pseudomonas fluorescence* NCIB 3756', *International Journal of Environment and Pollution*, Vol 32, pp.3-11, 2008
- [21] Babich H.' Davis D. L., 'Phenol: A review of environmental and health risks', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 1, Issue 1, pp.90-109, 1981
- [22] Madigan M.T, Martinko J.M., Parker J., 'Brock Biology of Microorganisms', Tenth edition
- [23] Sikkema J., De Bont J., Poolman B., 'Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons', *Microbiol.* Vol. 59, pp. 201– 222, 1995.
- [24] Karunaratne D., 'The Complex World of Polysaccharides', *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, ISBN 978-953-51-0819-1, DOI: 10.5772/50069, chapter 11, 2012

- [25] Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., *Figures from Essential Cell Biology*, Garland Science, Second Edition, 2004
- [26] Shimp R.J., Pfaender F.K., 'Influence of easily degradable naturally occurring carbon substrates on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic bacteria', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 49, pp. 394-401, 1985
- [27] Sinton G.L., Fan L.T., Erikson L.E., Lee S.M., 'Biodegradation of 2,4-D and related xenobiotic compounds', *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 8, pp. 395-403, 1986
- [28] Top E.M., Springael D., 'The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds', *Curr. Opin. Biotechnol.*, Vol. 14, pp. 262-269, 2003
- [29] Top E.M., Springael D., Boon N., 'Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters', *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 42, pp. 199-208, 2002
- [30] Karthikeyan S., Korber D.R., Wolfaardt G.M., Caldwell D.E., 'Adaptation of bacterial communities to environmental transitions from labile to refractory substrates', *Int. Microbiol.* Vol. 4, pp. 73-80, 2001
- [31] Segura A., Molina L., Fillet S., Krell T., Bernal P., 'Solvent tolerance in Gram-negative bacteria', *Biotechnology*, Vol.23, pp.415-421, 2012
- [32] Sardesai Y., Bhosle S., 'Tolerance of bacteria to organic solvents', Mini-review, *Research in Microbiology*, Vol.153, pp. 263-268, 2002
- [33] De Bont J., 'Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis', *Trends in Biotechnology*, Vol.16, Issue12, pp. 493-499, 1998
- [34] Nicolaou S., Gaida S., Papoutsakis E., 'A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation', *Metabolic Engineering*, Vol.12, pp.307-331, 2010
- [35] William P., Sayers J., 'The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*', *Biodegradation*, Vol.5, pp. 195-217, 1994.
- [36] Jindrová E., Chocová M., Demnerová K., Brenner V., 'Bacterial aerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene', *Folia Microbiol*, Vol. 47(2),pp. 83-93, 2002
- [37] Cruden D., Wolfram J., Rogers R., Gibson D., 'Physiological Properties of a *Pseudomonas* Strain which grows with p-Xylene in a Two-Phase (Organic-Aqueous)

Medium', Applied and Environmental Microbiology, Vol. 58, No. 9, pp. 2723-2729, 1992

[38] Van Agteren M., Keuning S., Janssen D., 'Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds', Springer, 1998

[39] Yen K., Karl M., Blatt L., Simon M., Winter R., Fausset P., Lu H., Harcourt A., Chen K., 'Cloning and characterization of a Pseudomonas mendocina KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase', J Bacteriol, Vol. 173(17), pp. 5315-27, 1991

[40] Koebnik R., Van Gelder P., 'Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell'. Mol Microbiol., Vol. 37(2): pp. 239-253, 2000

[41] Irvan F., Dozen K., 'Isolation and characterization of solvent-tolerant Pseudomonas putida strain T-57, and its application to biotransformation of toluene to cresol in a two-phase (organic-aqueous) system', J Ind Microbiol Biotechnol , Vol. 32, pp. 542–547, 2005

[42] Ramos-Gonzalez M., Ben-Bassat A., Campos M.J., Ramos J., 'Genetic Engineering of a Highly Solvent-Tolerant Pseudomonas putida Strain for Biotransformation of Toluene to p-Hydroxybenzoate', Applied and Environmental Microbiology, pp. 5120–5127, 2003

[43] Yang R., Humphrey A., 'Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures', Biotechnol. Bioeng. Vol. 17, pp. 1211-1235, 1975.

[44] Tsirogianni E., Aivaliotis M., Karas M., Tsiotis G., 'Detection and characterisation of catechol 2,3-dioxygenase in an indigenous soil Pseudomonad by MALDI-TOF MS using a column separation', Biodegradation , Vol. 16, pp. 181–186, 2005.

[45] Tsirogianni I., Aivaliotis M., Karas M., Tsiotis G., 'Mass spectrometric mapping of the enzymes involved in the phenol degradation of an indigenous soil pseudomonad', Biochimica et Biophysica Acta 1700 , pp. 117–123, 2004.

[46] Tsirogianni E., Aivaliotis M., Papatotiriou G.D., Karas M., Tsiotis G., 'Identification of inducible protein complexes in the phenol degrader Pseudomonas sp. strain phDV1 by blue native gel electrophoresis and mass spectrometry', Amino Acids, Vol. 30, pp. 63–72, 2006.

[47] Papatotiriou D. G., Markoutsas S., Meyer B., Papadioti A., Karas M. and Tsiotis G., 'Comparison of the membrane subproteomes during growth of a new Pseudomonas strain on lysogeny broth medium, glucose and phenol', Journal of Proteome Research, Vol. 7, pp. 4278-4288, 2008.

- [48] Schägger H., Von Jagow G., 'Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.', *Anal. Biochem.*, Vol. 166 (2), pp. 368-379, 1987.
- [49] Yun S., Park G., Kim Y., Kwon S., 'Proteomic characterization of the *Pseudomonas putida* KT2440 global response to a monocyclic aromatic compound by iTRAQ analysis and 1DE-MudPIT', *Journal of proteomics*, Vol. 74, pp 620-628, 2011
- [50] Schägger H., Jagow G., 'Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form', *Anal. Biochem.*, Vol. 199 (2), pp. 223-231, 1991.
- [51] Schägger H., Jagow G., 'Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa', *Anal. Biochem.*, Vol. 166 (2), pp. 368-379, 1987.
- [52] Candiano G., Bruschi M., Musante L. 'Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis', *Electrophoresis*, Vol. 25(9), pp. 1327-33, 2004.
- [53] Sokol A., Woods D., 'Effect of pyochelin on *Pseudomonas* respiratory infections', *Microbial Pathogenesis*, Vol. 5, pp. 197-205, 1988
- [54] Prokhorova T., Rigbolt K., Johansen P., Henningsen J., 'Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC) and Quantitative Comparison of the Membrane Proteomes of Self-renewing and Differentiating Human Embryonic Stem Cells', *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.*, pp 959-970, 2009
- [55] Bradford M., 'A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-due binding'. *Anal. Biochem.*, Vol. 72, pp. 248-254, 1976
- [56] Lei J., He L., Fountoulakis M., 'Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis', *Journal of Chromatography A*, 1023, pp. 317-320, 2004.
- [57] Schägger H., Von Jagow G., 'Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form', *Anal. Biochem.*, Vol. 199 (2), pp. 223-231, 1991.
- [58] Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J., Mann M., 'In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes', *Nature Protocols*, Vol. 1, No.6, doi:10.1038/nprot.2006.468, 2006

- [59] Bagos, P.G., 'PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of beta barrel outer membrane proteins', *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue): p.W400-4, 2004
- [60] Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., 'Protein and Polymer Analysis up to m/z 100,00 by Lazer Ionization Time-of flight Mass Spectrometry', *Rapid Communications in Mass Spectrometry: Rcm*, Vol. 2(8), pp. 151-153, 1988
- [61] Hofman K., Stoffel W., 'TMbase-A database of membrane spanning proteins segments', *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, Vol. 374, pp. 166, 1993
- [62] Aivaliotis M, Karas M, Tsiotis G., 'An alternative strategy for the membrane proteome analysis of the green sulfurbacterium *Chlorobium tepidum* using blue native PAGE and 2-D PAGE on purified membranes', *J Proteome*, Vol. 6, pp. 1048-58, 2007
- [63] Yankovskaya V., Horsefield R., 'Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation', *Science*, Vol. 299, pp. 700-4, 2003
- [64] Verkhovsky MI, Bogachev AV., 'Sodium-translocating NADH: quinone oxidoreductase as a redox-driven ion pump', *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1797, pp. 738-46, 2010
- [65] Saikawa N., Akiyama Y., Ito K., 'FtsH exists as an exceptionally large complex containing HflKC in the plasmamembrane of *Escherichia coli*', *J Struct. Biol.*, Vol. 146, pp. 123-9, 2004
- [66] Capaldi RA, Aggeler R., 'Mechanism of the F1F0-type ATPsynthase, a biological rotary motor', *Trends Biochem Sci*, Vol. 27, pp. 154-60, 2002
- [67] Izard T, Aevarsson A, Allen MD, 'Principles of quasi-equivalence and Euclidean geometry govern the assembly of cubic and dodecahedral cores of pyruvate dehydrogenase complexes', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, Vol. 4, pp.1240-1245, 1999
- [68] Pitcher RS, Watmough NJ., 'The bacterial cytochrome *cbb3*oxidases', *Biochim Biophys Acta*, Vol.1655, pp.388-99, 2004
- [69] Urbani A, Gemeinhardt S, 'Properties of the detergent solubilised cytochrome c oxidase (cytochromecbb3) purified from *Pseudomonas stutzeri*', *FEBS Lett*, Vol.508, pp.29-35, 2001
- [70] Sugawara E, Nikaido H., 'Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*', *J Biol Chem*, Vol.262, pp.2507-11, 1992

[71] Rawling E., Brinkman F., 'Roles of the Carboxy-Terminal Half of *Pseudomonas aeruginosa* Major Outer Membrane Protein OprF in Cell Shape, Growth in Low-Osmolarity Medium, and Peptidoglycan Association', J of Bacteriology, Vol. 180, no. 14, pp. 3556-3562, 1998