

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ



**Μελέτη του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου  
*Pseudomonas sp.* pHDV1 με μεθόδους πρωτεομικής  
ανάλυσης**

**Νικολάκη Αντιγόνη**

Επιβλέπων καθηγητής κος Τσιώτης Γεώργιος

Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας  
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010

MASTER THESIS



**Stydy of the membrane fraction of the bacterium  
*Pseudomonas sp. phDV1* using proteomic analysis methods**

**Nikolaki Antigoni**

Supervisor Professor : Tsiotis Georgios

Division of Biochemistry, Department of Chemistry  
University of Crete

HERAKLIO 2010

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στον τομέα της Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επιστημονική επιμέλεια του καθηγητή *Τσιώτη Γεώργιου*, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για τη δυνατότητα αυτή που μου παρείχε, καθώς επίσης και για την επιστημονική του καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της εκτέλεσης των πειραμάτων, παράγοντες που αποτέλεσαν το σημαντικότερο βοήθημα για την πραγμάτωση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ τους καθηγητές *Γανωτάκη Δημήτριο* και *Μπουριώτη Βασίλειο* από τα τμήματα Χημείας και Βιολογίας αντίστοιχα του Πανεπιστημίου Κρήτης που δεχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα άτομα του εργαστηρίου στο οποίο πραγματοποίησα την παρούσα εργασία *Αρβανίτη Κατερίνα*, *Παπαδιώτη Αναστασία*, *Κουγιανού Κάλλια*, *Ακτουδιανάκη Κατερίνα* και *Μηλιώνη Σοφία* καθώς και τα άτομα του εργαστηρίου του κ. *Δημητρίου Γανωτάκη* για την πολύ καλή συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά τους όποτε τη χρειαζόμουν.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα του εργαστηρίου του κ. *Κουτσολέλου Αθανάσιου* για τη συνεργασία τους όσον αφορά τη χρήση της οργανολογίας MALDI-TOF/TOF.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένεια μου τόσο για την ηθική αλλά και οικονομική στήριξη που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολλά στελέχη που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* χρησιμοποιούνται ευρέως προκειμένου να μελετηθούν οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί που αναπτύσσονται, σε σχέση με την ανθεκτικότητά τους έναντι τοξικών συγκεντρώσεων οργανικών διαλυτών αρωματικής κυρίως σύστασης στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια όταν χρησιμοποιούν τις ενώσεις αυτές ως μοναδική πηγή άνθρακα. Το βακτηριακό στέλεχος rhDV1 του γένους *Pseudomonas* απομονώθηκε από λύματα διυλιστηρίων σε βιομηχανική περιοχή της Δανίας και το κύριο χαρακτηριστικό του είναι το γεγονός ότι αναπτύσσεται καταναλώνοντας αποτελεσματικά τη φαινόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η βιοαποικοδόμηση της φαινόλης πραγματοποιείται μέσω του *meta* μεταβολικού μονοπατιού όταν αυτή χρησιμοποιείται ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για το μεμβρανικό κλάσμα του βακτηριακού αυτού στελέχους, οι οποίες έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση των επαγόμενων πρωτεϊνών με πηγές άνθρακα τη φαινόλη, τη σουκρόζη είτε το LB, χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν παρέχουν πληροφορίες οι οποίες περιορίζονται κυρίως στο ποιες είναι οι εκάστοτε πρωτεΐνες που συνιστούν το υπό μελέτη κυτταρικό διαμέρισμα, ενώ μπορεί κανείς να πάρει ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι να μελετήσει κανείς τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών έτσι ώστε να γίνει κατανοητή η λειτουργία τους αλλά και ο μοριακός τους μηχανισμός. Πιο συγκεκριμένα, στις κυτταρικές μεμβράνες, πολλές καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μέσω συμπλόκων τα οποία επιτελούν σημαντικές λειτουργίες όπως είναι η παραγωγή ενέργειας και η μεταφορά των μορίων.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών είναι καθοριστικής σημασίας, αν όχι για όλες, για ένα μεγάλο αριθμό βιολογικών λειτουργιών, καθώς οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους τις περισσότερες φορές συνιστούν ένα σύμπλοκο. Η μελέτη των μεμβρανικών συμπλόκων του κυττάρου αποτελεί σημαντικό βήμα για την κατανόηση των κυτταρικών λειτουργιών. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το στέλεχος *Pseudomonas* rhDV1, ένα κατά Gram αρνητικό το οποίο επιλέχθηκε για την ικανότητά του να αποικοδομεί αρωματικές ενώσεις, όπως αναφέρθηκε. Χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές άνθρακα φαινόλη, σουκρόζη ή LB (lysogeny Broth), όπου και μελετήθηκαν τα μεμβρανικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα κάτω από αυτές τις τρεις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Τα διαδοχικά βήματα που ακολουθήθηκαν είναι: (α) δύο βήματα «πλυσίματος» των μεμβρανών με 5mM EDTA και 0,1% sodium-N-lauryl sarcosinate, διαδικασία η οποία απομακρύνει τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη, (β) διαχωρισμός των μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων χρησιμοποιώντας μία διάσταση ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (BN-PAGE) κατόπιν διαλυτοποίησης του μεμβρανικού κλάσματος με το απορρυπαντικό n-dodecyl- $\beta$ -maltoside (DDM), (γ) δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση - συνδυασμός του BN-PAGE με Tricine-SDS-PAGE, (δ) ταυτοποίηση πρωτεϊνικών στιγμάτων κατόπιν θρυψινοποίησης τους με φασματοσκοπία μάζας χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία MALDI TOF/TOF. Συμπερασματικά, ταυτοποιήθηκαν ορισμένα πρωτεϊνικά μεμβρανικά σύμπλοκα για τις τρεις διαφορετικές πηγές άνθρακα, ενώ εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των τριών διαφορετικών πηγών κυρίως για πρωτεΐνες που απαντώνται στην εξωτερική μεμβράνη του στελέχους *Pseudomonas* rhDV1.

**Λέξεις-κλειδιά:** *Pseudomonas* rhDV1, βιοαποικοδόμηση της φαινόλης, μεμβρανικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα, ταυτοποίηση πρωτεϊνών, MALDI TOF/TOF

## 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 sole carbon source. A strain with high phenol-removal efficiency is *Pseudomonas* sp. strain phDV1, which was isolated from enriched mixed culture from samples of petroleum contaminated soil in Denmark. Previous proteomic analysis considering this particular strain have shown that the phenol biodegradation is being via the *meta* cleavage pathway, when it is present as a sole source of carbon and energy. Furthermore, recent studies have been done considering the membrane fraction of this strain which allowed the identification of the phenol, sucrose and lysogeny broth medium (LB) inducible outer membrane proteins using two-dimensional electrophoresis under denaturing conditions, giving a two-dimensional map that indicates only name of the proteins of a cell compartment. Nevertheless, only little information concerning the protein function can be obtained. An interesting way is to be able to point out the interactions between the proteins in order to have access to their functions and to understand the molecular mechanisms. Particularly, in cellular membranes many well characterized proteins assemble into complexes that carry out important tasks in energy generation, protein trafficking, and small molecule transport.

The interactions between proteins are important for very numerous, if not all, biological functions, and the interacted proteins might form part of a protein complex. To understand the protein complexes of a cell, complexome, is essential for a better understanding of cell functions. *Pseudomonas* sp. strain phDV1, a Gram-negative bacterium selected for its ability to degrade aromatic compounds. In the present study, we have performed a systematic analysis of *Pseudomonas* sp. strain phDV1 membrane protein complexes under different growth substrate conditions, using lysogeny broth, sucrose, and phenol as sole carbon source. In order to study protein complexes, an approach allowing the extraction and the analysis in native conditions is needed. In this study the sequential steps that were followed were: (a) obtaining purified preparations of the membranes from *Pseudomonas* sp. strain phDV1 by two washing steps with 5 mM EDTA and 0.1% lauryl sarcosinate, which removed membrane associated soluble proteins; (b) separation of membrane protein complexes using 1-D Blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) after solubilization with n-dodecyl- $\beta$ -maltoside (DDM); (c) combination of the BN with Tricine-SDS-PAGE (d) protein identification of tryptic peptides by mass spectrometry using MALDI TOF/TOF. Conclusively, a number of complexes were identified for the three different carbon sources and differences between the three sources have been mostly detected for proteins that are localized at the outer membrane of the strain *Pseudomonas* phDV1.

**Keywords:** *Pseudomonas* phDV1, phenol biodegradation, membrane protein complexes, protein identification, MALDI TOF/TOF

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Περιβαλλοντικοί ρύποι και βιοαποικοδόμηση

Ένα μεγάλο εύρος οργανικών ενώσεων ανθρωπογενούς προέλευσης, που απαντώνται στο περιβάλλον, αποτελούν ένα μεγάλο οικολογικό πρόβλημα. Πρόκειται για ενώσεις που είναι τοξικές τόσο για τους ανώτερους, όσο και για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Έχουν απομονωθεί ωστόσο, διάφορα βακτηριακά στελέχη τα οποία έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν τέτοιου είδους ενώσεις. Ο λογάριθμος του συντελεστή κατανομής του εκάστοτε οργανικού διαλύτη στη η-οκτανόλη και το νερό,  $\log P_{ow}$ , σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με το βαθμό τοξικότητάς του. Οι οργανικοί διαλύτες με  $\log P_{ow}$  μεταξύ 1 και 5 είναι εξαιρετικά τοξικοί βλάπτοντας ζωτικές λειτουργίες για το κύτταρο, είτε αναφερόμαστε σε μονοκύτταρους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, είτε σε ευκαρυωτικά κύτταρα ανώτερων οργανισμών [1]. Η δράση των ενώσεων αυτών βασίζεται στη διάρρηξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, αποδιοργανώνοντας τη δομή της. 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 [2].

Στον Πίνακα 1.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται ορισμένοι αντιπροσωπευτικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες που απαντώνται στο περιβάλλον ως ρύποι.

Πίνακας 1.1

ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΔΑΚΤΥΛΙΟΙ	ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΟΙ ΡΥΠΟΙ
Μονοκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες	βενζόλιο, τολουόλιο, αιθυλοβενζόλιο και ξυλένιο (ΒΤΕΧ), φαινόλη, βενζοϊκό οξύ
Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs)	ναφθαλένιο, φαινανθρένιο, ανθρακένιο
Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες	Χλωροβενζόλιο, χλωριωμένα τολουόλια, χλωροφαινόλες
Πολυχλωριωμένα διφαινόλια (PCBs)	Arochlor, Phenochlor, Pyralene (κατηγορίες PCBs χωρίς ακριβή μετάφραση)

Βακτηριακά στελέχη που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε οργανικούς διαλύτες, διαθέτοντας μηχανισμούς αποικοδόμησης και χρησιμοποιώντας τους ως πηγή άνθρακα, είναι ιδανικοί οργανισμοί για τη βιοαποικοδόμηση περιβαλλοντικών ρύπων. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται διάφορα στελέχη που έχουν την ικανότητα αποικοδόμησης οργανικών ενώσεων.

Πίνακας 1.2, [3]

Βακτηριακό στέλεχος	Οργανικός διαλύτης	P <sub>ow</sub>	Πληροφορίες
<i>P. putida</i> IH-2000	κυκλοεξάνιο, ξυλένιο, στυρένιο, επτανόλη	2,5	Το πρώτο βακτήριο που αναφέρθηκε ότι παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε οργανικούς διαλύτες, δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών που δε μεταβολίζουν το τολουόλιο
<i>P. putida</i> DOT-T1E	90% τολουόλιο,	2,5	Αποικοδομεί τολουόλιο
<i>P. putida</i> S12	κυκλοεξάνιο, αιθυλοβενζόλιο, p-ξυλένιο, στυρένιο, οκτανόλη, τολουόλιο, επτανόλη, διμεθυλφθαικό	2,3	Αποικοδομεί στυρένιο, οκτανόλη και επτανόλη
<i>P. putida</i> Idaho	κυκλοεξάνιο, αιθυλοβενζόλιο, p-ξυλένιο, στυρένιο, οκτανόλη, τολουόλιο, επτανόλη, διμεθυλφθαικό	2,5	Αποικοδομεί p-ξυλένιο, m-ξυλένιο, τολουόλιο
<i>E. coli</i> JA300 <u>Mutants of JA 300</u> OST3408 OST3301 OST3121	κυκλοεξάνιο n-πεντάνιο n-πεντάνιο	3,2 3 3	Βακτηριακά στελέχη που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε οργανικούς διαλύτες και προέρχονται από στέλεχος που παρουσιάζει ευαισθησία σε οργανικούς διαλύτες
<i>P. putida</i> ST-200	p-ξυλένιο	3	Αποικοδομεί χοληστερόλη
<i>Bacillus</i> OS-1906	εξάνιο, κυκλοεξάνιο, βενζόλιο	2	Αποικοδομεί πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες που έχουν εντοπιστεί σε θαλασσινό νερό
<i>Bacillus</i> DS-994	p-ξυλένιο, τολουόλιο, βενζόλιο	2	θεικές ενώσεις, όπως το θειοφάνιο σε διφασικά συστήματα νερού-πετρελαίου
<i>Flavobacterium</i> DS-711	p-ξυλένιο, τολουόλιο, βενζόλιο	2	Αποικοδομεί μαζούτ
<i>Arthrobacter</i> ST-1	p-ξυλένιο, τολουόλιο, βενζόλιο	2	Αποικοδομεί χοληστερόλη, παράγει ανδροστα-1,4,6-τριο-3,17-διόνη (ATD)

Η βιοαποικοδόμηση μονοκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, όπως είναι το βενζόλιο, η φαινόλη και το βενζοϊκό οξύ έχει μελετηθεί εκτενώς από τα πρώτα στάδια της μελέτης της μικροβιακής αποικοδόμησης. Ορισμένοι από αυτούς τους υδρογονάνθρακες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως πηγές άνθρακα και ενέργειας για βακτηριακά στελέχη, σε διαδικασίες μετασχηματισμού κατά την αποικοδόμηση των υποστρωμάτων που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη, όπως είναι οι χλωροφαινόλες, εξαιτίας του γεγονότος ότι συχνά συνυπάρχουν με αυτά σε μολυσμένες περιοχές. Επίσης, οι ενώσεις αυτές επιλέγονται συχνά σαν πρότυποι ρύποι, προκειμένου να συμβάλλουν στην κατανόηση των διαδικασιών αποικοδόμησης, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν: (i) την κινητική της βιοαποικοδόμησης [4]-[6], (ii) τα μονοπάτια του καταβολισμού [7],[8], (iii) τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα σε

μικροοργανισμούς που έχουν απομονωθεί πρόσφατα [9],[10], (iv) την προσπάθεια ανάπτυξης νέων τεχνικών για βιολογικό καθαρισμό [11]-[14].

Μια ευρεία φυλογενετική ποικιλία βακτηρίων όπως είναι αυτά των γενών *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* είναι ικανά να αποικοδομούν αερόβια αρωματικές ενώσεις. Μεταξύ αυτών το είδος *Pseudomonas* και άμεσα σχετιζόμενοι με αυτό μικροοργανισμοί είναι εκείνα που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα εξαιτίας της μεγάλης απόδοσης τους στη βιοαποικοδόμηση ενός μεγάλου εύρους αρωματικών ενώσεων, από το βενζόλιο έως το βενζοπυρένιο. Επίσης, τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί η βιοαποικοδόμηση αρωματικών ρύπων για μια μεγάλη ομάδα αναερόβιων μικροοργανισμών [15]. Αν και μεγάλη ποικιλία βακτηρίων που απαντώνται στο περιβάλλον αποικοδομούν αποτελεσματικά πολλούς ρύπους, πρόκειται για χαμηλού ρυθμού διεργασίες, κάτι που οδηγεί αναπόφευκτα στη συσσώρευση τοξικών ρύπων στο περιβάλλον. Επιπλέον, οι χημικές δομές των κυριότερων ρύπων, ειδικά ορισμένων νέων ξеноβιοτικών, δεν είναι δυνατόν να βιοαποικοδομηθούν από τα βακτήρια, καθώς εκείνα δεν έχουν εξελιχθεί ώστε να αναπτύξουν τα κατάλληλα καταβολικά μονοπάτια, προκειμένου να τους αποσυνθέσουν. Στο πλαίσιο αυτό πολλά νέα στελέχη, τα οποία διαθέτουν τις επιθυμητές ιδιότητες βιοαποικοδόμησης, έχουν δημιουργηθεί μέσω της γονιδιακής τροποποίησης των επιδεκτικών σε μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων.

Η δυνατότητα των μικροοργανισμών να μεταβολίζουν ξеноβιοτικές ουσίες έχει αναγνωριστεί ως ένα εν δυνάμει αποτελεσματικό μέσο της εξουδετέρωσης των τοξικών και επικίνδυνων αποβλήτων. Η φαινόλη καθώς και τα παράγωγά της απαντώνται σε μεγάλο βαθμό σε απόβλητα που προέρχονται από μονάδες διυλιστηρίων πετρελαίου, παρουσιάζοντας υψηλή τοξικότητα ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η βιοαποικοδόμηση των ουσιών αυτών έχει αναγνωριστεί ως δυνατή λύση για τη εξουδετέρωσή τους λόγω του κόστους, της αποτελεσματικότητας και της απλότητας σαν διαδικασία. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν δύο είδη του γένους *Pseudomonas*, το *P. aeruginosa* και το *P. fluorescens*, τα οποία μελετήθηκαν 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 [16].

Η φαινόλη, με  $\log P_{ow}=1.47$ , που αποτελεί και το ρύπο που αποικοδομείται από το βακτηριακό στέλεχος που μελετάται στην παρούσα εργασία, είναι ένας οργανικός διαλύτης ο οποίος προέρχεται



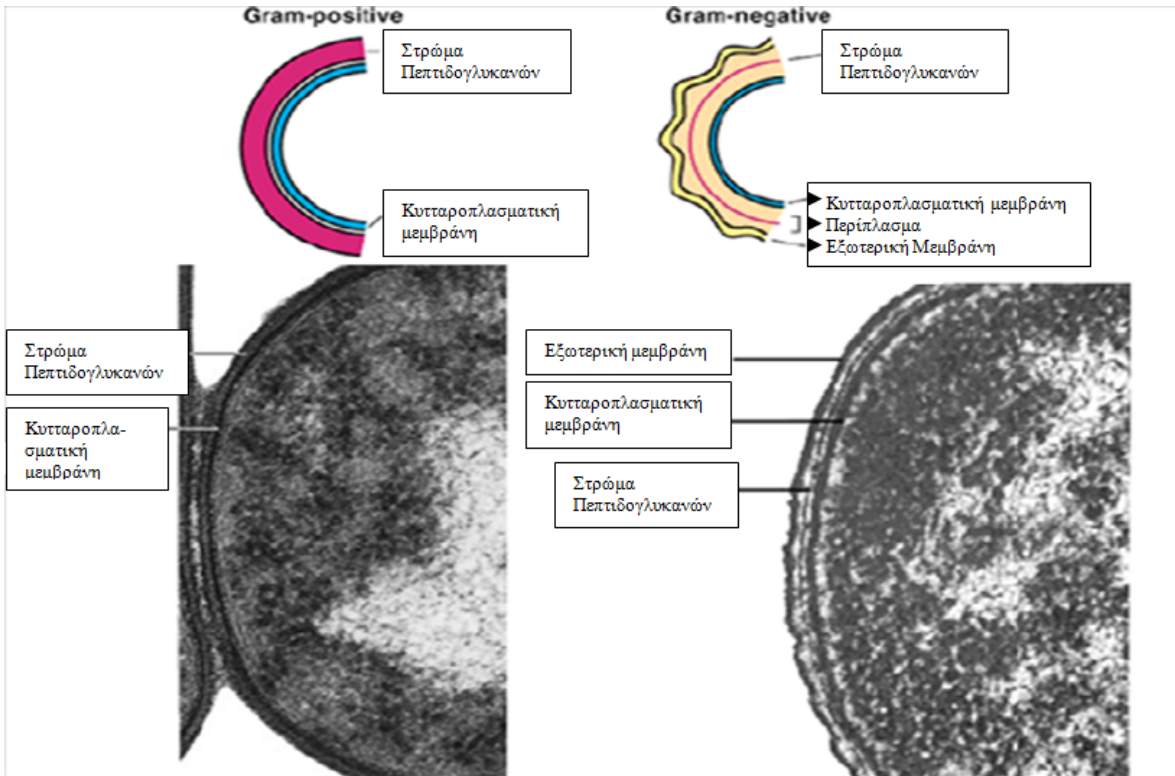
από βιομηχανικές εγκαταστάσεις, καθώς αποβάλλεται στο περιβάλλον μέσω διεργασιών παραγωγής και επεξεργασίας προϊόντων, όπως είναι τα εργοστάσια πολτοποίησης, τα ανθρακωρυχεία, τα διυλιστήρια, η βιομηχανία προϊόντων που χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση του ξύλου, η χημική βιομηχανία, η βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων [17]-[19], καθώς και τα βιομηχανικά απόβλητα που προκύπτουν από τις παραπάνω περιπτώσεις. Επίσης διάφορες ανθρωπογενείς δραστηριότητες που αυξάνουν την ποσότητα φαινόλης στο περιβάλλον, αποτελούν τα καυσαέρια των αυτοκινήτων (άμεση εκπομπή και φωτοχημική αποικοδόμηση του βενζολίου), ο μεταβολισμός του ανθρώπινου και ζωικών οργανισμών καθώς και διάφορες διεργασίες καύσης [19].

Το γεγονός ότι η φαινόλη αποτελεί τοξικό παραπροϊόν διαφόρων βιομηχανικών διεργασιών, έχει ως αποτέλεσμα να εισέρχεται στα υδατικά οικοσυστήματα, επιδρώντας επαγωγικά αρνητικά στο σύνολο των υδρόβιων οργανισμών συμπεριλαμβανομένων των φυκών, των πρωτοζώων, των ασπονδύλων και των σπονδυλωτών. Επιπρόσθετα, εκτός από τις εμφανείς επιπτώσεις της τοξικότητας της φαινόλης, πρόκειται για μία ένωση η οποία ευθύνεται για πολλές έμμεσες αρνητικές επιπτώσεις, επηρεάζοντας τη χλωρίδα και την πανίδα, όπως είναι η μείωση της γονιμότητας και η αναστολή της ανάπτυξης. Η τοξικότητα της φαινόλης σε ένα υδατικό οικοσύστημα μεταβάλλεται σε σχέση με διάφορους αβιοτικούς (π.χ. περιεκτικότητα σε οξυγόνο, αλατότητα, σκληρότητα νερού, θερμοκρασία) και βιοτικούς (π.χ. ηλικία, μέγεθος, θρεπτική κατάσταση) παράγοντες.

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 [20], [21].

## 1.2 Αρνητικά κατά Gram βακτήρια

Το στέλεχος *Pseudomonas* phDV1 είναι ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο. 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 κυτταροπλασματική. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη περιβάλλεται από μια περιοχή η οποία ονομάζεται περίπλασματικός χώρος, όπου υπάρχει μια στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης, ενώ εξωτερικά της πεπτιδογλυκάνης υπάρχει η εξωτερική μεμβράνη (Εικόνα 1.1).



**Εικόνα 1.1:** Σχηματική αναπαράσταση και ηλεκτρονική μικρογραφία που παρουσιάζει τη διαφοροποίηση της δομής του κυτταρικού τοιχώματος των μεταξύ των Gram-αρνητικών και των Gram-θετικών βακτηρίων [22].

### 1.2.1 Εξωτερική μεμβράνη

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. Η μεμβράνη αυτή έχει διακριτές πλευρές, με την πλευρά που περιέχει τους λιποσακχαρίτες να είναι προς τον εξωκυττάριο χώρο. Τα είδη των διαφορετικών πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης είναι πολύ λιγότερα σε σύγκριση με αυτά που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη λόγω της διαφορετικής λειτουργίας τους στο κύτταρο. Αποτελούν περίπου το 50% της συνολικής μάζας της εξωτερικής μεμβράνης [23]. Στην εξωτερική μεμβράνη βρίσκονται διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, αλλά, και λιποπρωτεΐνες που είναι ακινητοποιημένες στη μεμβράνη με λιπίδια προσδεδεμένα στο N-τερματικό τους άκρο. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι βασικές για τη διατήρηση της ακεραιότητας και της επιλεκτικής διαπερατότητας των βακτηριακών μεμβρανών [24]. 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 μία πολύ σημαντική κατηγορία πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Τα δομικά χαρακτηριστικά τους είναι ότι αποτελούνται από δομές β-βαρελιού 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 κυτταροπλασματικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου. Μεγαλύτερα ή υδρόφοβα μόρια δεν μπορούν να διαπεράσουν την εξωτερική μεμβράνη.

Ο ρόλος της εξωτερικής μεμβράνης περιλαμβάνει 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.

### 1.2.2 Περιπλασματικός χώρος

Ο περιπλασματικός χώρος είναι ο 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 το περιβάλλον και να μεταφέρουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά εντός του κυττάρου. Μερικά παραδείγματα περιπλασματικών ενζύμων αναφέρονται παρακάτω:

#### 1. Υδρολυτικά ένζυμα

- Φωσφατάσες
- Πρωτεάσες
- Ενδονουκλεάσες

2. Πρωτεΐνες πρόσδεσης αναγνωρίζουν και μεταφέρουν διαμέσου της μεμβράνης συγκεκριμένες ενώσεις, όπως:

- σάκχαρα
- αμινοξέα
- ανόργανα ιόντα
- βιταμίνες

3. Χημειούποδοχείς, βοηθούν την αναγνώριση της χημικής σύστασης του περιβάλλοντος από το κύτταρο.

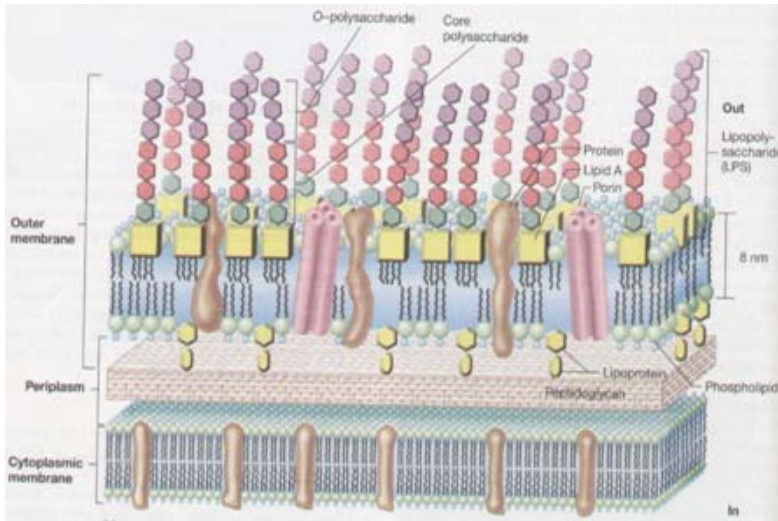
4. Ένζυμα αποτοξίνωσης, τροποποιούν τοξικές ενώσεις για το κύτταρο, π.χ. β- λακταμάση.

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 προσδέονται στην εξωτερική μεμβράνη, συμβάλλει στην ισχυρή πρόσδεση της πεπτιδογλυκάνης στην εξωτερική μεμβράνη (Εικόνα 1.2).

### 1.2.3 Κυτταροπλασματική μεμβράνη

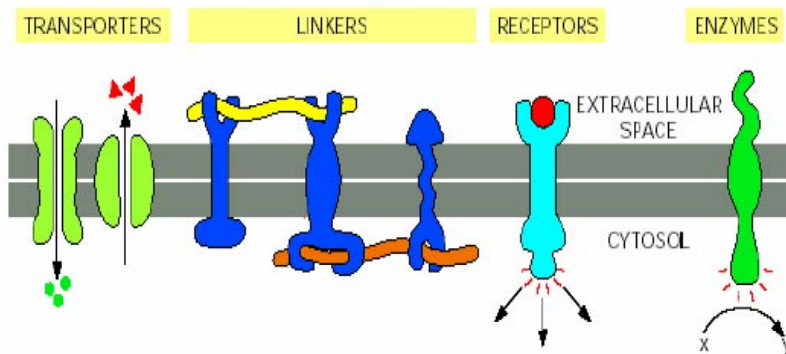
Η κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι ένα οργανωμένο συγκρότημα το οποίο αποτελείται από μια διπλοστοιβάδα λιπιδίων, κυρίως φωσφολίπια, και πρωτεΐνες βυθισμένες στην λιπιδική στοιβάδα. Παρέχει επιλεκτική διαπερατότητα, καθώς περιέχει εξειδικευμένες μοριακές αντλίες και μοριακά κανάλια. Ειδικοί υποδοχείς για εξωτερικά ερεθίσματα που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ελέγχουν την ροή πληροφοριών μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντος. Επίσης στην κυτταροπλασματική 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 διαμετακινούν βιομόρια με αλλαγή της διαμόρφωσής τους, αλλά και πρωτεΐνες-διαύλοι που δημιουργούν άνοιγμα διαμέσου της μεμβράνης. 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.



**Εικόνα 1.2:** Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού τοιχώματος ενός κατά Gram αρνητικού βακτηρίου

### 1.2.4 Μεμβρανικές Πρωτεΐνες

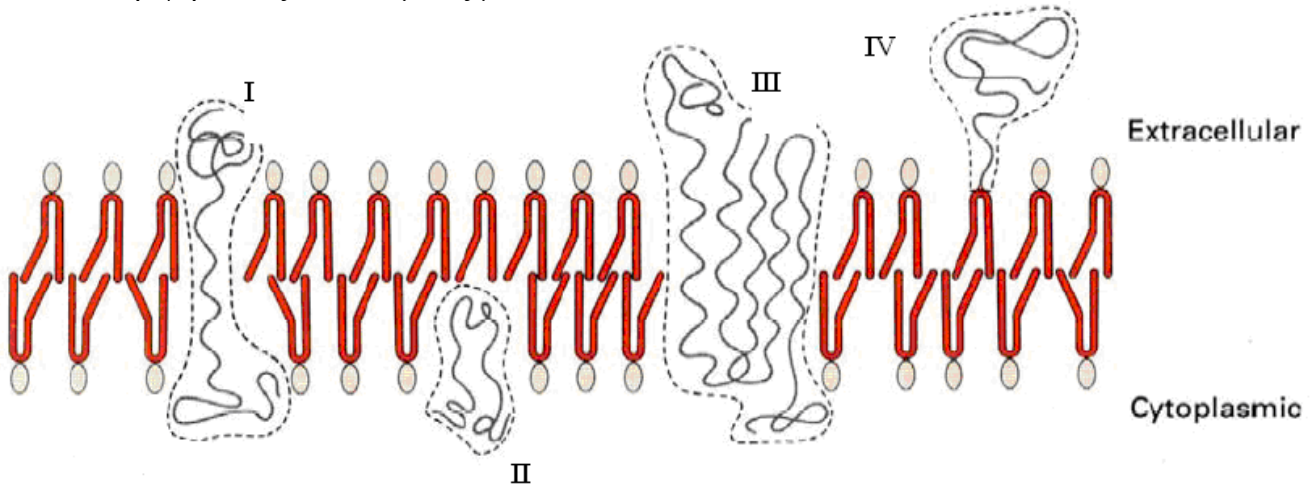
Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις διάφορες λειτουργίες του κυτταρικού κύκλου, είτε ως δομικό συστατικό είτε ως στοιχείο της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Αποτελούν θεμελιώδη συστατικά των βιολογικών μεμβρανών και συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες, όπως μετατροπή ενέργειας, μεταφορά μορίων, βιοσύνθεση λιπιδίων, μετάδοση μηνύματος και κυτταρική αναγνώριση. Αν και έχει προβλεφθεί ότι το 20-30% όλων των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) σε βακτήρια, αρχαία, και ευκαρυωτικούς οργανισμούς κωδικοποιούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, σχετικά λίγες είναι η υψηλής ανάλυσης δομές που έχουν δημοσιευθεί από αυτήν την κατηγορία πρωτεϊνών λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα τους. Στην Εικόνα 1.3 παρουσιάζονται οι κύριες λειτουργίες των πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης



**Εικόνα 1.3.** Σχηματική αναπαράσταση βασικών λειτουργιών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ανάλογα με τη θέση τους στη μεμβράνη χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες (Εικόνα 1.4).

- I. Μερικά εισερχόμενες στην μεμβράνη.
- II. Διαμπερείς της μεμβράνης με ένα μεμβρανικό τμήμα.
- III. Διαμπερείς της μεμβράνης με πολλά μεμβρανικά τμήματα.
- IV. Περιφερειακές συνδεδεμένες με λιπίδια.



Εικόνα 1.4. Κατηγορίες των μεμβρανικών πρωτεϊνών.

### 1.3 Προσαρμοστικοί μηχανισμοί των βακτηρίων

Για τα Gram αρνητικά βακτήρια έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί όσον αφορά την ανθεκτικότητά τους κατά την ανάπτυξή τους σε περιβάλλον που περιέχει κάποιο οργανικό διαλύτη ο οποίος χρησιμοποιείται είτε ως μοναδική πηγή άνθρακα, είτε ως επιπλέον πηγή άνθρακα «στρεσάροντας» τα ουσιαστικά. Εστιάζοντας στους μονοκυκλικούς και στους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες που αποτελούν ιδιαίτερα τοξικές ενώσεις οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν (α) προσαρμοστικές μεταβολές της σύστασης των μεμβρανικών λιπαρών οξέων και των φωσφολιπιδικών κεφαλών (β) το σχηματισμό κυστιδίων που προκύπτει κατά την είσοδο των τοξικών οργανικών ενώσεων στο κύτταρο, τα οποία ουσιαστικά συνεισφέρουν στην απομάκρυνση του διαλύτη από την κυτταρική επιφάνεια (γ) ενεργειακά εξαρτώμενες ενεργές αντλίες εκροής που ανήκουν στην οικογένεια RND (resistance-nodulation–cell division) και εξάγουν τους οργανικούς τοξικούς διαλύτες

στο περιβάλλον μέσο όταν συσσωρεύονται στο εσωτερικό του κυττάρου (**δ**) το μεταβολισμό των τοξικών ουσιών που συνεισφέρει στο μετασχηματισμό τους σε μη τοξικές ενώσεις [26]-[31],[32].

Από τους μηχανισμούς αυτούς, οι μεταβολές στη φωσφολιπιδική σύσταση και η εξώθηση των διαλυτών φαίνονται να είναι κοινοί μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών στελεχών. Οι σημαντικότερες μεταβολές όσον αφορά τα φωσφολιπίδια είναι η αύξηση του σημείου τήξης των μεμβρανών εξαιτίας του ραγδαίου ισομερισμού από *cis* σε *trans* των ακόρεστων λιπαρών οξέων και τροποποιήσεων των υδρόφιλων κεφαλών των φωσφολιπιδίων [33]. Επίσης σημαντικό μηχανισμό αποτελεί η ενεργητική μείωση των εισερχόμενων οργανικών διαλυτών στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω της δράσης των μεμβρανικών αντλιών εκροής, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των MDR (multidrug resistance) αντλιών. Πρόκειται για αντλίες πρωτεϊνικής σύστασης, οι οποίες συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα των κυττάρων λειτουργώντας ως φραγμός έναντι τοξικών φυσικών ή συνθετικών χημικών ενώσεων [25],[32]. Ορισμένα παραδείγματα για τις αντλίες εκροής είναι τα εξής: έχει βρεθεί ότι οι AcrAB-TolC και AcrEF-TolC αντλίες εκροής είναι σημαντικές για την ανθεκτικότητα του βακτηρίου *Escherichia coli* στον οργανικό διαλύτη *n*-εξάνιο. Έχουν απομονωθεί στελέχη του είδους *Pseudomonas putida* τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται παρουσία τοξικών υδρογονανθράκων όπως το τολουόλιο, το στυρένιο και το *p*-ξυλένιο. Τουλάχιστον τρεις αντλίες εκροής (TtgABC, TtgDEF, and TtgGHI) συναντώνται στο εκτενώς χαρακτηρισμένο, ανθεκτικό σε οργανικούς διαλύτες στέλεχος, *Pseudomonas putida* DOT-T1E, ενώ ο αριθμός των αντλιών αυτών έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με το βαθμό ανθεκτικότητας μεταξύ των διαφόρων στελεχών *Pseudomonas putida*. Επίσης έρευνες έχουν δείξει ότι η λειτουργία των αντλιών εκροής φαίνεται να συνδέεται άμεσα με τη διαδικασία βαθμίδωσης πρωτονίων, δια μέσου του συστήματος TonB, αν και ο ακριβής μηχανισμός μεταφοράς ενέργειας παραμένει αδιευκρίνιστος. Επιπλέον ειδικοί ή μη ρυθμιστικοί παράγοντες ελέγχουν την έκφραση των οπερονίων των αντλιών εκροής στα βακτήρια *E. coli* και *P. putida* στο επίπεδο της μεταγραφής [33]. Στον Πίνακα 1.3 συνοψίζονται οι μηχανισμοί που προαναφέρθηκαν.

Πίνακας 1.3 [3]

<b>Μηχανισμοί ανθεκτικότητας που αναπτύσσουν τα βακτήρια στους οργανικούς διαλύτες</b>	
<p>Κατά Gram αρνητικά βακτήρια: π.χ., στελέχη του γένους <i>Pseudomonas</i> και ορισμένα μεταλλαγμένα στελέχη του βακτηρίου <i>E. coli</i></p>	<p><u>Γνωστοί μηχανισμοί:</u>  <b>1)</b> τροποποιήσεις του κυτταρικού φακέλου που συμβάλλουν στην αύξηση της σταθερότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και μειώνουν τη μεμβρανική διαπερατότητα:            α) <i>cis-trans</i> ισομερισμός των λιπαρών οξέων μέσω της <i>cis-trans</i> ισομεράσης            β) μειωμένη υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας            γ) μεταβολές στη χημική σύσταση/αναλογίες των μεμβρανικών λιπιδίων και πρωτεϊνών  <b>2)</b> αυξημένος ρυθμός έκφρασης των επιδιορθωτικών ενζύμων της μεμβράνης  <b>3)</b> ενεργητική εκροή των διαλυτών μέσω των αντλιών εκροής (<i>tol C/mar/rob/sox S/acr AB</i> : αποτελούν παραδείγματα σχετιζόμενων γονιδίων  <b>4)</b> σχηματισμός μεμβρανικών κυστιδίων με τα μόρια των διαλυτών να προσκολλόνται σε αυτά.</p>
<p>Κατά Gram θετικά βακτήρια: π.χ., στελέχη των γενών <i>Bacillus</i>, <i>Rhodococcus</i>, <i>Arthrobacter</i></p>	<p><u>Προτεινόμενοι μηχανισμοί:</u>            1) παροχή προστασίας μέσω των ενδοσπορίων            2) επαγωγή της ομάδας γονιδίων που ρυθμίζουν τις λειτουργίες του κυττάρου σε συνθήκες «στρες», με επακόλουθο την παραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών            3) παραγωγή ενζύμων που απενεργοποιούν τα μόρια του διαλύτη ή τα εγκλωβίζουν με τη μορφή μικρογαλακτωμάτων</p>

## 1.4 Βακτήρια που βιοαποικοδομούν αρωματικές ενώσεις και εφαρμογές τους στη βιοτεχνολογία

Εκτός από τη χρήση των βακτηρίων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε διάφορες διεργασίες βιοαποικοδόμησης, όπως οι μονάδες βιολογικού καθαρισμού, υπάρχουν στελέχη τα οποία έχουν τροποποιηθεί γενετικά έτσι ώστε, είτε να συσσωρεύουν προϊόντα του μεταβολισμού τους τα οποία είναι χρήσιμα στη βιομηχανία, είτε να καταστούν επιδεκτικά μετασχηματισμού για τη μελέτη μονοπατιών βιοαποικοδόμησης σε ερευνητικό επίπεδο.

Υπάρχει αξιοσημείωτο ενδιαφέρον για τη χρήση βιοκαταλυτών με σκοπό την ανάπτυξη τεχνολογίας παραγωγής χημικών ενώσεων προστιθέμενης αξίας με βάση υδρόφοβα υποστρώματα όπως είναι οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες που προέρχονται από το πετρέλαιο. Η οξείδωση και η αναγωγή αρωματικών και αλειφατικών υδρογονανθράκων - αντιδράσεις που εμφανίζουν ειδικότητα ως προς την εναντιομέρεια - παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς πολλές σημαντικές χημικές ενώσεις

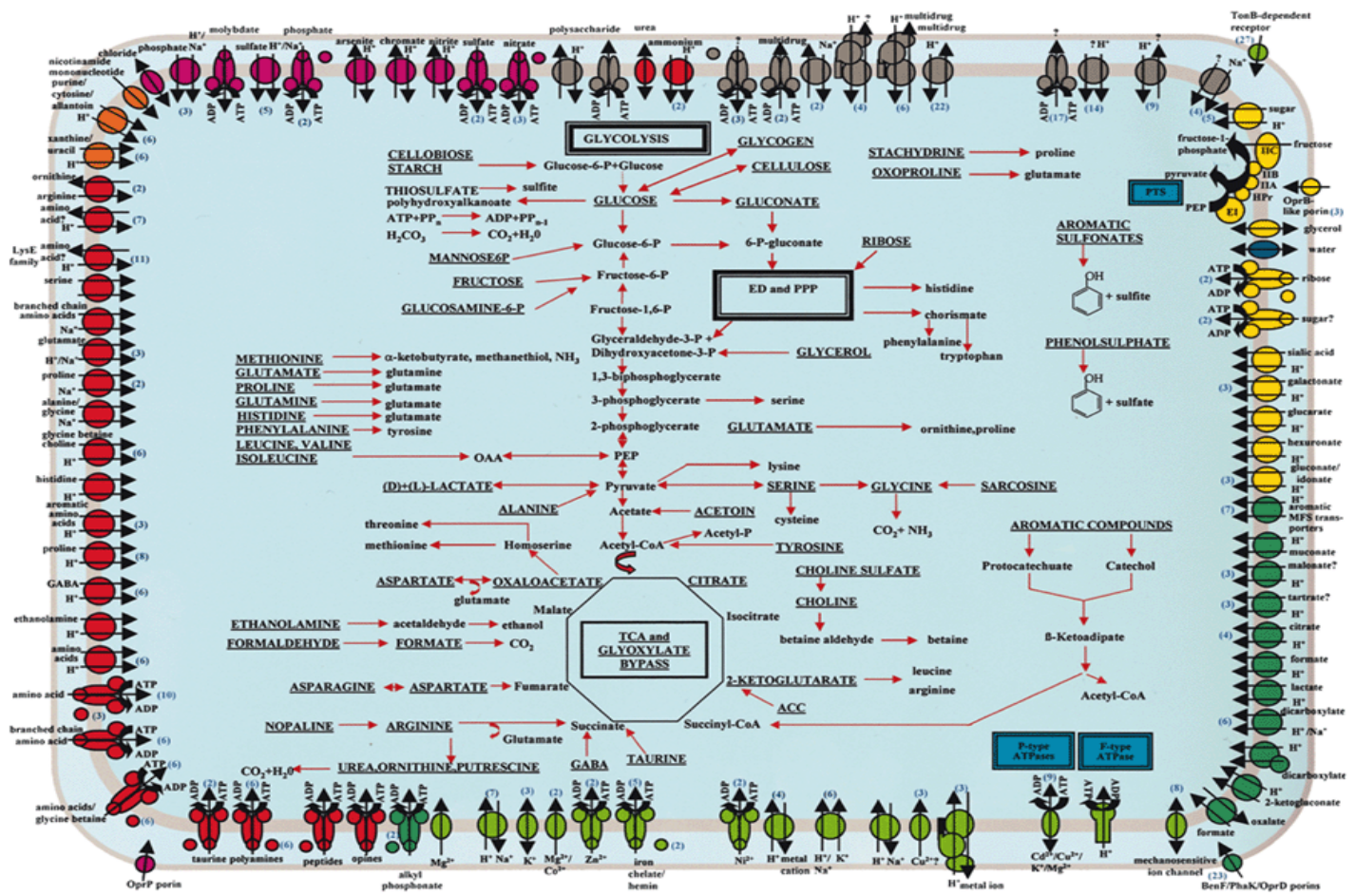


προκύπτουν από αυτές τις αντιδράσεις. Για τις αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής απαιτούνται συμπράγοντες και αναγέννηση αυτών οπότε για αυτό το λόγο και προτιμώνται ολόκληρα κύτταρα ως βιοκαταλύτες. Επομένως, βακτήρια ανθεκτικά σε υδρόφοβους διαλύτες και γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία καταλύουν τις εκάστοτε υπό μελέτη αντιδράσεις είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη διεργασιών βιομετατροπής για υδρόφοβα υποστρώματα [34]. Όπως προαναφέρθηκε έχουν απομονωθεί από μολυσμένα εδάφη και ύδατα μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν ένα μεγάλο εύρος αρωματικών υδρογονανθράκων ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Τα περισσότερα από τα βακτήρια αυτά ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*.

Για παράδειγμα το στέλεχος *Pseudomonas putida* T57 έχει βρεθεί ότι έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται παρουσία 90% (v/v) τολουολίου. Με κατάλληλη γενετική τροποποίηση το στέλεχος αυτό καθίσταται ικανό να παράγει *o*-κρεσόλη αποικοδομώντας τολουόλιο. Η *o*-κρεσόλη αποτελεί το σημαντικότερο χημικό προϊόν της βιομηχανίας πετροχημικών [35].

Άλλη μια περίπτωση αποτελεί το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas putida* DOT-T1E, που αναπτύσσεται παρουσία αρωματικών ενώσεων και το οποίο μετασηματίστηκε με γονίδια του *Pseudomonas mendocina* KR1. Το νέο στέλεχος που προέκυψε παρουσιάζει την ανθεκτικότητα του πρώτου, καθώς και συνδυασμένες ιδιότητες από τα μεταβολικά μονοπάτια των δύο μητρικών στελεχών. Τα χαρακτηριστικά του είναι ότι μπορεί να αναπτύσσεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις τολουολίου καθώς και να παράγει το σημαντικό για τη βιομηχανία μεταβολικό ενδιάμεσο 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (4-HBA). Η ένωση αυτή χρησιμοποιείται στη σύνθεση των ενώσεων paraben και methylparaben, που αποτελούν παράγωγα του αλκυλικού εστέρα του *p*-υδροξυβενζοϊκού οξέος και χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακοί παράγοντες καθώς και κατά τη σύνθεση υγρού γυαλιού [36].

Η πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματός του *Pseudomonas putida* KT2440 επιτρέπει το σχεδιασμό και δημιουργία νέων μεταβολικών μονοπατιών σε αυτό με τη χρήση βιοτεχνολογίας [37]. Στο σχήμα της Εικόνας 1.5 φαίνεται μια συνοπτική παρουσίαση του μεταβολισμού και των συστημάτων μεταφοράς του *Pseudomonas putida*. Παρουσιάζονται τα προβλεπόμενα μονοπάτια παραγωγής ενέργειας και μεταβολισμού των οργανικών συστατικών.



**Εικόνα 1.5.** Μεταβολισμός και μεταφορά στο *P. putida*. Προβλεπόμενα μονοπάτια για την παραγωγή ενέργειας και το μεταβολισμό οργανικών ενώσεων. Οι προβλεπόμενοι μεταφορείς ομαδοποιούνται σύμφωνα με την ειδικότητα στο υπόστρωμα. Ανόργανα κατιόντα (ανοιχτό πράσινο), ανόργανα ανιόντα (ροζ), υδατάνθρακες (κίτρινο), αμινοξέα/πεπτίδια/αμίνες/πουρίνες/πυριμιδίνες και άλλα αζωτούχα συστατικά (κόκκινο), καρβοξύλια, αρωματικές ενώσεις και άλλες πηγές άνθρακα (σκούρο πράσινο), νερό (μπλε), εκροή ουσιών κ.α (γκρι).

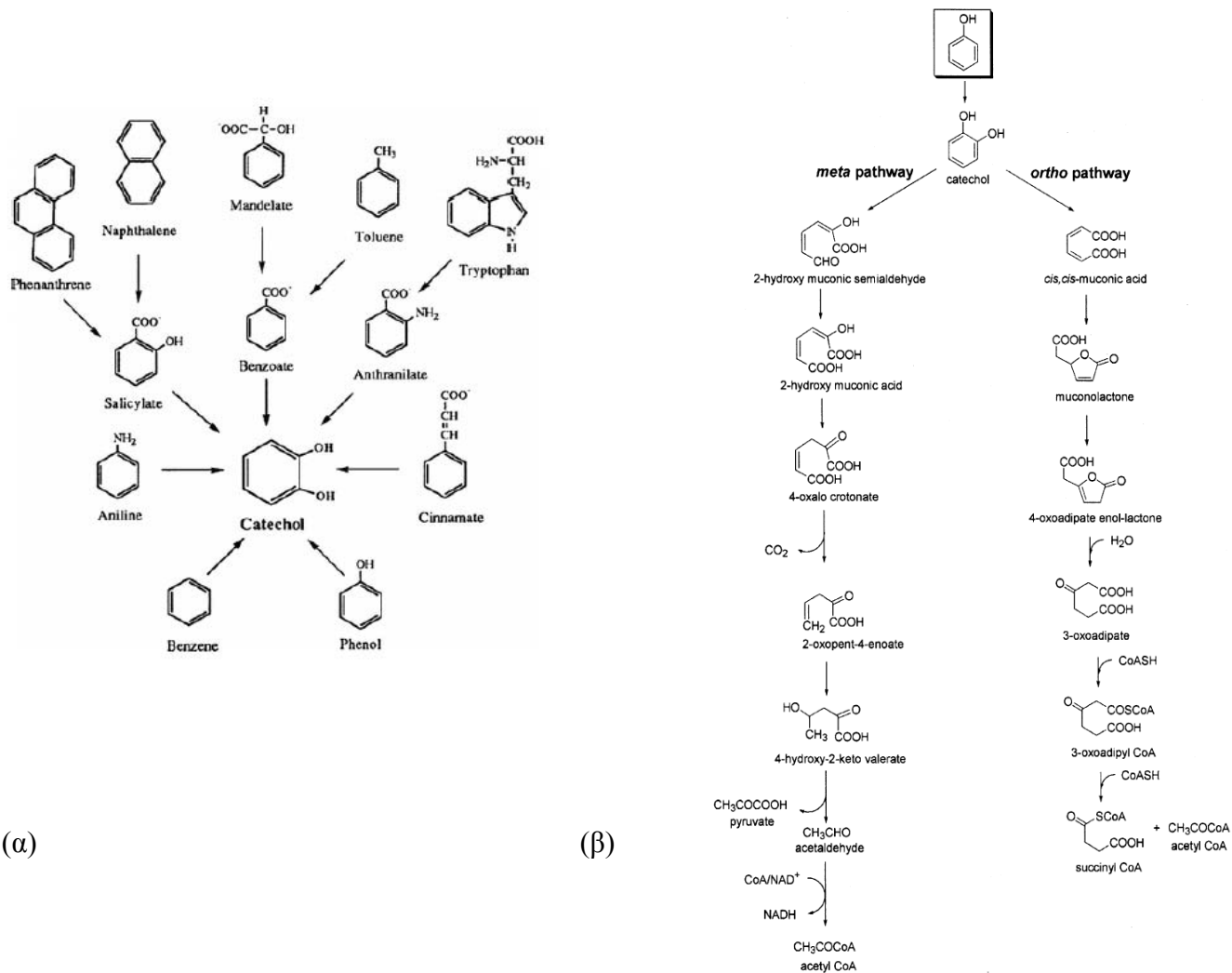
Επίσης το στέλεχος *Pseudomonas putida* KT2440, το οποίο έχει προέλθει από το στέλεχος *Pseudomonas putida* mt-2 απαλλαγμένο από πλασμίδια αποτελεί έναν καλό δέκτη για πειράματα γονιδιακής μεταφοράς ενώ διατηρεί παράλληλα ιδιότητες όπως ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αρωματικών ενώσεων και ικανότητα ανάπτυξης στη ριζόσφαιρα καλλιεργούμενων φυτών. Τα χαρακτηριστικά αυτά το καθιστούν επιδεικτικό για την κλωνοποίηση γονιδίων που προέρχονται από άλλους οργανισμούς που βρίσκονται στο έδαφος, με σκοπό την παραγωγή επιθυμητών πρωτεϊνών συμβάλλοντας στην ανίχνευση των εκάστοτε μεταβολικών μονοπατιών. Το στέλεχος

KT2440 καθώς και το αντίστοιχό του ανθεκτικό στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη KT2442, χρησιμοποιούνται ευρέως ως επιδεκτικά κύτταρα επιλογής για την ανάλυση, κλωνοποίηση, τροποποίηση γονιδίων που προέρχονται από βακτήρια που βρίσκονται στο έδαφος, και πιο συγκεκριμένα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση αρωματικών υδρογονανθράκων και γενικότερα ξενοβιοτικών ουσιών καθώς και γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμιση αυτών των ενζύμων [38].

### 1.5 Μεταβολικά μονοπάτια της βιοαποικοδόμησης των αρωματικών ενώσεων

Όσον αφορά στην αερόβια αποικοδόμηση αρωματικών ενώσεων, έχει προσδιοριστεί η ύπαρξη καναλιών που συμμετέχουν στα μονοπάτια βιοαποικοδόμησης για τις πιο συχνά απαντώμενες από αυτές τις ενώσεις. Ρύποι που παρουσιάζουν διάφορες δομές, σε ένα πρώτο στάδιο μετατρέπονται σε ορισμένους ενδιάμεσους μεταβολίτες, δια μέσου πολλών διαφορετικών περιφερικών μονοπατιών, όπου ακολούθως με τη σειρά τους διοχετεύονται πλέον μέσω κεντρικών μονοπατιών στον κεντρικό κυτταρικό μεταβολισμό. Στα περισσότερα περιφερικά μονοπάτια λαμβάνουν μέρος αντιδράσεις οξειδωσης οι οποίες καταλύονται από μονο- και διοξυγενάσες μετατρέποντας τους αρωματικούς ρύπους σε “διυδροξυ-” αρωματικά ενδιάμεσα. Οι μονο- και διοξυγενάσες χρησιμοποιούν τα ενδιάμεσα αυτά ως υποστρώματα και διασπών τον αρωματικό δακτύλιο, εισάγοντας 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 ακολούθως στα κεντρικά μεταβολικά μονοπάτια, που οδηγούν στο σχηματισμό των ενδιάμεσων του κύκλου του Krebs [39].

Έχει βρεθεί ότι το πρώτο βήμα στην αποικοδόμηση της φαινόλης είναι η μετατροπή της σε κατεχόλη από μία NADPH-εξαρτώμενη υδροξυλάση [40] Τα μεταβολικά μονοπάτια μέσω των οποίων μπορεί να διασπαστεί η κατεχόλη είναι είτε το *ortho* είτε το *meta* μονοπάτι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.6(β).



**Εικόνα 1.6.** (α) αρωματικές ενώσεις που μετατρέπονται σε κατεχόλη , (β) *ortho*- και *meta*- πορείες κατά τη διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου.

## 1.6 Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* rhDV1

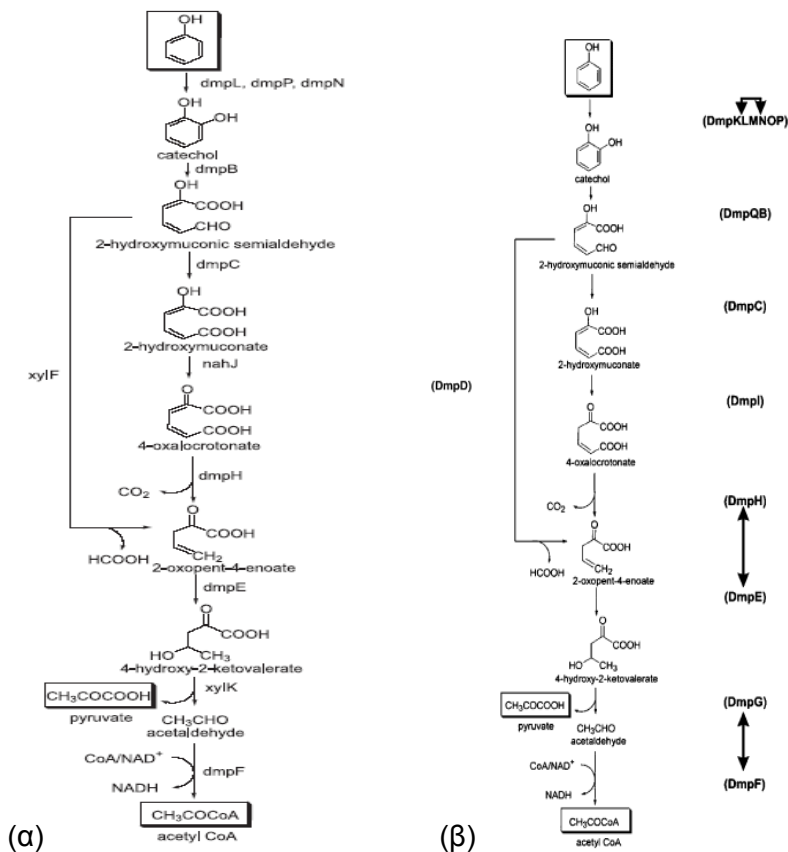
Το βακτηριακό στέλεχος rhDV1 του γένους *Pseudomonas* απομονώθηκε από λύματα διυλιστηρίων σε βιομηχανική περιοχή της Δανίας και το κύριο χαρακτηριστικό του είναι το γεγονός ότι αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας τη φαινόλη. Πρόκειται για ένα κατά Gram αρνητικό αερόβιο 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 [41].

Το ένζυμο που συμμετέχει στη *meta*- διάσπαση της κατεχόλης, η 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης έχει απομονωθεί και έχει χαρακτηριστεί κινητικά [42]. Επίσης έχουν αναγνωριστεί και όλα τα υπόλοιπα ένζυμα που συμμετέχουν στο *meta* μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης φαινόλης από το στέλεχος αυτό, μετά από κλασματοποίηση του κυτταροπλασματικού πρωτεόματος με διαβάθμιση σουκρόζης (Εικόνα 1.7α) [43]. Τέλος, 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 σύμπλοκα που λαμβάνουν μέρος στο μεταβολισμό της φαινόλης (Εικόνα 1.7β). Τέτοια παραδείγματα 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 [44].

Πρόσφατα, η μελέτη του μεμβρανικού κλάσματος του στελέχους rhDV1 κατά την ανάπτυξή του σε θρεπτικό υλικό LB, σουκρόζη 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\*)[45].

\*ο κωδικός που αντιπροσωπεύει τις πρωτεΐνες στη βάση δεδομένων Swissprot.



**Εικόνα 1.7.** Το *meta*-μεταβολικό μονοπάτι κατά την αποικοδόμηση της φαινόλης (α) φαίνονται το σύνολο των ενζύμων που συμμετέχουν στα επιμέρους βήματα (β) ενδεχόμενες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ταυτοποιημένων ενζύμων.

### 1.7 Πρωτεομική ανάλυση

Με τον όρο πρωτέομα καλούμε το σύνολο όλων των πρωτεϊνών που εκφράζονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού σε δεδομένες συνθήκες. Όλα τα κύτταρα, προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά διαθέτουν 1) γονίδια των οποίων τα προϊόντα έκφρασης είναι υπεύθυνα για σημαντικές λειτουργίες, καθώς και 2) γονίδια που εκφράζονται σε πρωτεΐνες οι οποίες παρέχουν μοναδικές λειτουργίες, ειδικές για κάθε κύτταρο. Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες, η αύξηση της πληροφορίας στο επίπεδο των γονιδίων, παρέχει το έναυσμα για την πρωτεομική ανάλυση, προσφέροντας σε αυτόν τον ερευνητικό τομέα ένα πλαίσιο εργασίας βασισμένο 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.

Επίσης, η διαπίστωση ότι η αλληλουχία του γονιδιώματος και η πρωτεϊνική λειτουργία δε σχετίζονται άμεσα, αύξησε το ενδιαφέρον για την πρωτεομική ανάλυση. Η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών κατά τη μεταγραφή και τη μετάφραση, αλλά και οι μΓέτα-μμεταφραστικές 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 [46].

Σημαντικό βήμα στην ανάπτυξη της πρωτεομικής ανάλυσης αποτέλεσε το γεγονός ότι, μέσω της μεθοδολογίας της φασματοσκοπίας μάζας, απλοποιήθηκε η ανάλυση και ο χαρακτηρισμός πρωτεϊνών με την εισαγωγή διαφόρων σημαντικών καινοτομιών [47, 48], μέσω των οποίων επεκτάθηκαν οι δυνατότητες της φασματοσκοπίας μάζας. Η πρωτεομική ανάλυση μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις βασικές περιοχές, χαρακτηριστικό των οποίων είναι ότι η μία συμπληρώνει την άλλη. Αυτές είναι: (α) η πρωτεομική ανάλυση έκφρασης, (β) η λειτουργική πρωτεομική ανάλυση και η (γ) ανάλυση με τη χρήση της βιοπληροφορικής.

### 1.7.1 Μέθοδοι πρωτεομικής ανάλυσης

#### A. Πρωτεομική ανάλυση έκφρασης

Ο κύριος στόχος της πρωτεομικής ανάλυσης έκφρασης είναι ο διαχωρισμός και η απεικόνιση όλων των προϊόντων των γονιδίων, που εκφράζονται σε μια συγκεκριμένη αναπτυξιακή φάση ενός κυττάρου και υπό δεδομένες συνθήκες. Κατά κύριο λόγο η μεθοδολογία που ακολουθείται είναι η υψηλής διακριτικής ικανότητας δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (2-DE), με τις δύο διαστάσεις να πραγματοποιούνται υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Δυστυχώς, η 2-DE δεν μπορεί να διαχωρίσει με την ίδια ικανότητα όλες τις κατηγορίες πρωτεϊνών, οπότε είναι αναγκαία η ανάπτυξη και χρήση συμπληρωματικών τεχνικών για τη μελέτη αυτών των κατηγοριών. Οι προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν με την ανάπτυξη νέων τεχνικών είναι οι εξής:

1. Μεγάλος αριθμός πρωτεϊνικών στιγμάτων στην πηκτή.

2. Βασικές πρωτεΐνες με  $pI$  μεγαλύτερο από 11.5 δεν μπορούν να διαχωρισθούν και να απεικονισθούν σε μια πηκτή.
3. Οι πρωτεΐνες με υψηλό μοριακό βάρος (πάνω από 250 kDa) δεν μπορούν να απεικονισθούν με την διαδικασία 2-DE.
4. Οι υδρόφοβες πρωτεΐνες δεν μπορούν να διαλυτοποιηθούν και συνήθως «χάνονται» κατά την προετοιμασία του δείγματος και της ισοηλεκτρικής εστίασης (που αποτελεί συνήθως την πρώτη διάσταση).
5. Αρκετές πρωτεΐνες εκφράζονται σε πολύ μικρό αριθμό αντιγράφων οπότε απαιτείται μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης για την ανίχνευση τους εάν δεν χρησιμοποιηθεί ραδιενεργή επισήμανση ή το κατάλληλο αντίσωμα.
6. Αύξηση της ποσότητας μιας πρωτεΐνης πιθανών να οδηγήσει στην αλληλεπικάλυψη πρωτεϊνικών στιγμάτων.
7. Η μέθοδος ανίχνευσης των πρωτεϊνών πρέπει να δίνει αξιόπιστες ποσοτικές πληροφορίες για την έκφραση των πρωτεϊνών.
8. Τα αποτελέσματα πρέπει να είναι επαναλήψιμα έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων.

Αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί, ότι το πρώτο αυτό στάδιο, στα πλαίσια της πρωτεομικής ανάλυσης, χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη της απόκρισης των κυττάρων (σε πρωτεϊνικό επίπεδο) στα διάφορα εξωκυτταρικά ερεθίσματα (π.χ. φάρμακα, ρύπους, μεταβολίτες, άλλα βακτήρια, ακτινοβολία, θερμοκρασία κ.α.).

## B. Λειτουργική πρωτεομική ανάλυση

Η λειτουργική πρωτεομική ανάλυση στοχεύει στην εύρεση πληροφοριών σχετικά με την λειτουργία των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο. Αποτελεί συμπλήρωμα της πρωτεομικής ανάλυσης έκφρασης και της γενετικής πληροφορίας που προκύπτει από την ανάλυση του γονιδιώματος. Αρχικά, οι πρωτεΐνες «στόχοι» ταυτοποιούνται, χαρακτηρίζονται και συσχετίζονται με πρωτεϊνικές «οικογένειες». Εάν είναι γνωστές οι δομικές πληροφορίες, αναλύονται μικρότερα υποσύνολα πρωτεϊνών με ηπιότερες διαδικασίες διαχωρισμού και μέτρησης. Οι πρωτεΐνες απομονώνονται στην φυσική τους μορφή με μεθοδολογίες όπως είναι η χρωματογραφία συγγένειας και η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Ορισμένες πρωτεΐνες μπορούν να απομονωθούν από το κύτταρο με χρωματογραφία συγγένειας με διατηρώντας την τεταρτοταγή τους δομή, ή ως σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες. Αυτά τα πρωτεϊνικά



σύμπλοκα μπορούν να αναλυθούν με φασματοσκοπία μάζας. Επιπλέον, με τη φασματοσκοπία μάζας μπορούν να προσδιοριστούν μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών (π.χ. φωσφορυλιώσεις) αλλά και μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Η μη αποδιατακτική δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (BN/Tricine-SDS PAGE) είναι μια διαδικασία η οποία δίνει πολύ σημαντικές πληροφορίες για τη λειτουργία των πρωτεϊνών καθώς και για τις αλληλεπιδράσεις τους, κι αυτό γιατί δε διασπά τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Πρόκειται λοιπόν για μια μέθοδο η οποία σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία μάζας για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, επιτρέπει τον εντοπισμό και τη μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

### Γ. Ανάλυση πρωτεϊνών με τη χρήση της βιοπληροφορικής

Η βιοπληροφορική είναι ένα νέο και ραγδαία αναπτυσσόμενο πεδίο το οποίο είναι απαραίτητο για την πρωτεομική ανάλυση. Δημιουργήθηκε για να αναπτύξει μία βάση δεδομένων χρησιμοποιώντας τον τεράστιο αριθμό δεδομένων που προκύπτουν από τις υψηλής απόδοσης αναλυτικές μεθόδους. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα της γονιδιακής ανάλυσης με τα πειραματικά αποτελέσματα και διαθέτοντας ως βασικό εργαλείο τη χρήση εξαιρετικών λογισμικών, μπορεί να δημιουργήσει βάσεις πειραματικών και θεωρητικών δεδομένων. Μόνο με την ανάπτυξη και τη χρήση της βιοπληροφορικής είναι δυνατή η αξιόπιστη αξιολόγηση του τεράστιου αριθμού των πειραματικών δεδομένων. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μεγάλος αριθμός λογισμικών για τη μελέτη των πειραματικών και θεωρητικών δεδομένων καθώς και διάφορα μοντέλα για την πρόβλεψη της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Έχουν αναπτυχθεί μοντέλα για την πρόβλεψη πιθανών διαμεμβρανικών τμημάτων όπως α-έλικες (TMtree [49]) και β-πτυχωτές επιφάνειες (PRED-TMBB [50]), καθώς και για την πρόβλεψη της θέσης των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο (SignalP [51] και PSORTB [52]). Τα προγράμματα αυτά καθώς και μία πληθώρα άλλων προγραμμάτων, είναι διαθέσιμα στο διαδίκτυο, καθιστώντας έτσι δυνατή την πρόσβαση σε αυτά από όλη την επιστημονική κοινότητα (<http://www.expasy.org>).

#### 1.7.2 Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας

Η φασματοσκοπία μάζας είναι μια εξελισσόμενη τεχνική που εμφανίστηκε στις αρχές του προηγούμενου αιώνα. Ανάμεσα στις αναλυτικές τεχνικές η φασματοσκοπία μάζας έχει ξεχωριστή θέση, λόγω του ότι μετράει μία φυσική ιδιότητα των μορίων, τη μάζα τους, με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Αρχικά

κατά τη δεκαετία του 1980 και σε μεγαλύτερο εύρος τη δεκαετία του 1990 έπαιξε σπουδαίο ρόλο στην εξέλιξη των βιολογικών επιστημών [53]. Η φασματοσκοπία μάζας άργησε να βρει εφαρμογή στα βιολογικά συστήματα, κυρίως λόγω της δυνατότητας ανάλυσης μόνο φορτισμένων και πτητικών μορίων. Τα βιομόρια είναι μεγάλα , πολικά μόρια και δε μεταφέρονται αλλά ούτε και ιονίζονται εύκολα στην αέρια φάση. Ο ηλεκτροψεκασμός (ESI) [54] και η απόπτωση με laser υποβοηθούμενη από υπόστρωμα (MALDI) [55], αποτελούν τις τεχνικές ιονισμού στις οποίες οφείλεται η επιτυχημένη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας σε βιολογικά μόρια, όπως είναι οι πρωτεΐνες. Ενώ η φασματοσκοπία μάζας εξελίσσεται, οι απαιτήσεις της μοριακής βιολογίας για μεγάλη ευαισθησία, οδηγεί στο συνδυασμό της φασματοσκοπίας μάζας με την πρωτεομική ανάλυση.

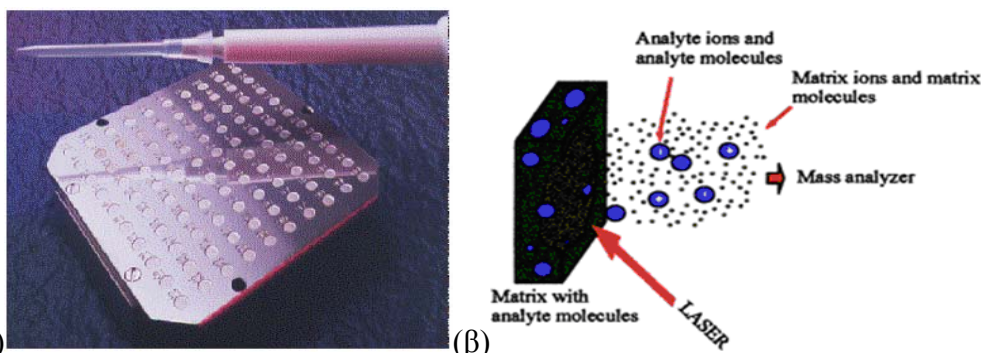
Η αρχή της χρήσης της πρωτεομικής ανάλυσης χρονολογείται στις αρχές της δεκαετίας του 1970 με την ανακάλυψη της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης, η οποία παρείχε για πρώτη φορά τη δυνατότητα αποτύπωσης εκατοντάδων ή ακόμα και χιλιάδων πρωτεϊνών σε μία απλή πηκτή [56],[57]. Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών στιγμάτων που διαχωρίζονταν στην πηκτή, περιορίζονταν μόνο στα πιο έντονα στίγματα έως τη δεκαετία του 1990 όπου η φασματοσκοπία μάζας σε βιολογικά συστήματα εξελίχθηκε σε μία τεχνική η οποία χαρακτηρίζεται από αξιοπιστία και ακρίβεια. Στις μέρες μας, η φασματοσκοπία μάζας αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του τομέα της πρωτεομικής ανάλυσης και χρησιμοποιείται κυρίως σε τρία πεδία. Στη μοριακή βιολογία για το χαρακτηρισμό και τον έλεγχο ποιότητας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων. Στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών σε απλά βιοχημικά πειράματα ή σε μεγάλης κλίμακας πρωτεομική ανάλυση. Τέλος, συχνά επιλέγεται για τον προσδιορισμό και το χαρακτηρισμό μετα- μεταφραστικών τροποποιήσεων, ενώ υπάρχει η δυνατότητα μέσω αυτής της μεθόδου, να προσδιοριστεί ένα μεγάλο εύρος ομοιοπολικών τροποποιήσεων που μεταβάλλουν τη μάζα μιας πρωτεΐνης.

### 1.7.3 MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)

Στην πρωτεομική ανάλυση χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές μέθοδοι ήπιου ιονισμού: 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 [47, 48]. Στη μέθοδο αυτή, για να δημιουργηθεί η απαραίτητη αέρια φάση, τα πρωτονιομένα βιομόρια και μεγάλη ποσότητα υποστρώματος (μήτρας) συνκρυσταλλώνονται με μόρια του αναλύτη πάνω σε μεταλλική επιφάνεια. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι ακτινοβολούνται από παλμό laser, συνήθως αζώτου με μήκος κύματος 337 nm (Εικόνα 1.8(β)). Το υπόστρωμα είναι συνήθως μικρό

οργανικό μόριο που εμφανίζει απορρόφηση στο μήκος κύματος του laser που χρησιμοποιείται. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα είναι το  $\alpha$ -κυάνο-4-κιναμινικό οξύ (HCCA), όταν αναλύονται μικρά μόρια (π.χ πεπτίδια) και το διυδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB), για την περίπτωση μεγάλων μορίων (π.χ πρωτεΐνες). 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 αναλύτη. Η διαδικασία ιονισμού που επιτυγχάνεται στο MALDI παραμένει ως ένα μεγάλο βαθμό ακόμα άγνωστη, ενώ η ένταση του σήματος που ανιχνεύεται, εξαρτάται π.χ. για την περίπτωση ανάλυσης πεπτιδίων, 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 γνωστών και άγνωστων. Για το λόγο αυτό είναι δύσκολη η αντιστοιχία της κορυφής του πεπτιδίου με την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται.

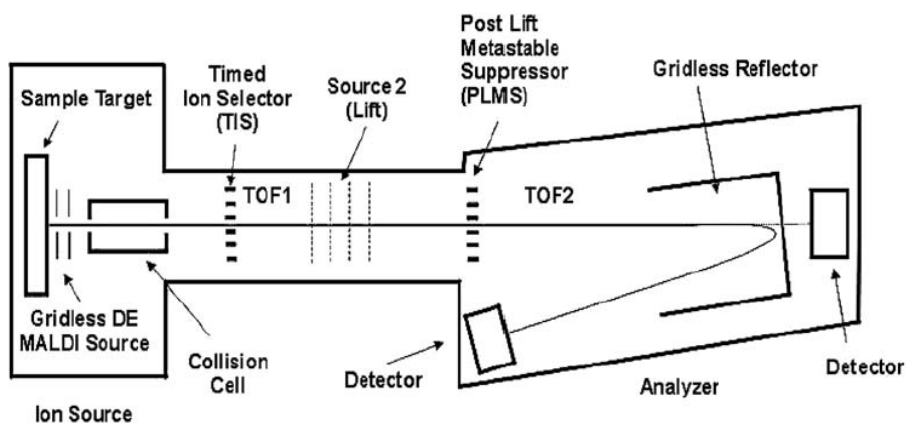
Τρεις είναι οι βασικές αρχές διαχωρισμού και ανάλυσης μαζών: διαχωρισμός στηριζόμενος στο χρόνο πτήσης των ιόντων (time of flight, TOF), διαχωρισμός από τετραπολικό ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από μεταλλικές ράβδους (quatropole MS), ή από επιλεκτική εισαγωγή ιόντων σε τρισδιάστατο πεδίο παγίδευσης (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 1.8.** (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 επιγχνάνεται η εξαγωγή και ο ιονισμός των πεπτιδίων

Στην Εικόνα 9 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

συνκρυσταλλώνονται με μόρια του αναλύτη πάνω σε μεταλλική επιφάνεια που μπορεί να χωρέσει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών στιγμάτων (Εικόνα 1.8(α)). 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 9). 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 [58]. 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 fmol εντός μερικών δευτερολέπτων.



**Εικόνα 9.** Η διάταξη ενός LIFT-TOF/TOF φασματογράφου μάζας.

## 1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της πρωτεϊνικής σύστασης των μεμβρανών του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. rhDV1 και πιο συγκεκριμένα η απομόνωση και ο εμπλουτισμός του μεμβρανικού κλάσματος [απαλλαγμένου από πρωτεΐνες άλλων κλασμάτων του κυττάρου (περίπλασμα/κυτταρόπλασμα)] και ακολούθως η ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων από τα οποία αποτελείται. Η σημαντικότητα της μελέτης των μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων έγκειται στο γεγονός ότι το στέλεχος *Pseudomonas* sp. rhDV1 έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται διαθέτοντας ως μοναδική πηγή άνθρακα στο περιβάλλον μέσω τη φαινόλη, μια μονοκυκλική αρωματική ένωση που αποτελεί περιβαλλοντικό ρύπο. Έτσι λοιπόν, ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσέγγιση της πρωτεομικής ανάλυσης του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου σαν αρχικό βήμα, με απώτερο σκοπό την ανάλυση των προσαρμοστικών μηχανισμών που αναπτύσσει το υπό μελέτη βακτηριακό στέλεχος προκειμένου να βιοαποικοδομήσει έναν οργανικό ρύπο, τη φαινόλη. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μια συγκριτική μελέτη του μεμβρανικού πρωτεόματος του βακτηρίου όταν αυτό αναπτύσσεται παρουσία φαινόλης, σουκρόζης και θρεπτικού μέσου LB (Luria-Bertani broth).

Μια άλλη προσέγγιση κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας ήταν η επεξεργασία του διαλυτοποιημένου μεμβρανικού κλάσματος του στελέχους *Pseudomonas* sp. rhDV1 με τη διαδικασία της ισοηλεκτρικής εστίασης σε υγρή φάση και σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Ο στόχος, χρησιμοποιώντας αυτή τη μεθοδολογία, είναι η περαιτέρω κλασματοποίηση του μεμβρανικού κλάσματος με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών, ενώ αξιοσημείωτο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επιμέρους κλάσματα που προκύπτουν, βρίσκονται σε διαλυτή μορφή, κάτι που επιτρέπει την περαιτέρω επεξεργασία τους τόσο με gel-based, όσο και με gel free διεργασίες πρωτεομικής ανάλυσης.

Στην παρούσα μελέτη μετά την ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση ακολούθησε διαχωρισμός των μεμβρανικών πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-Tricine). Σύμφωνα με αυτό τον τρόπο οι πρωτεΐνες των επιμέρους κλασμάτων διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών βρίσκεται σε αρχικό στάδιο, καθώς η συγκεκριμένη μεθοδολογία αποτέλεσε ένα πρώτο βήμα στην κατάληξη για το ποιες θα είναι οι συνθήκες για τη διαλυτοποίηση του μεμβρανικού κλάσματος, ενώ ακολούθως το ενδιαφέρον στράφηκε στη μελέτη των μεμβρανικών συμπλόκων. Η ανάλυση λοιπόν αυτή, εξαιτίας των πλεονεκτημάτων που προσφέρει αυτή η μεθοδολογία όσον αφορά στο χειρισμό των κλασμάτων σε διαλυτή μορφή, πρόκειται να είναι ένα από τα επόμενα βήματα στην πορεία της συγκεκριμένης μελέτης.

## 2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που περιγράφονται στην εργασία αυτή, προέρχονται από τις εταιρίες Fluka, Sigma, *BIO-RAD*, Thermo SCIENTIFIC και Bruker Daltonics. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν απιονισμένο, με στήλη ιοντοανταλλακτικών ρητινών και nanopure από ειδικό σύστημα αντίστροφης όσμωσης.

### 2.1 Διαλύματα Καλλιέργειών

#### ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ LB

Peptone 5 g / L

NaCl 5 g / L

Yeast Extract 2 g / L

Beef Extract 1 g / L

Γίνεται ρύθμιση του pH = 7,4

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

#### ΘΡΕΠΤΙΚΟ M<sub>9</sub>R

5 x M9 άλατα\* 200 ml/L

Θειικά άλατα \*\* 7 ml/L

1M MgSO<sub>4</sub> 2 ml/L

1M CaCl<sub>2</sub> 0,1 ml/L

dH<sub>2</sub>O 800 ml/L

Όλα τα συστατικά του διαλύματος είναι αποστειρωμένα

#### \* Διάλυμα 5 x M9 άλατα

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 37,61 g/L

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

NaCl 2,5 g/L

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

Ρύθμιση του pH = 7,4 και αποστείρωση σε αυτόκαυστο (20 min, 120<sup>o</sup> C, 2 Atm)

#### \*\*Θειικά άλατα

10% w/v Mg SO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

1% w/v FeSO<sub>4</sub> x

## 2.2 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

### Διαλύματα παρασκευής αποδιατακτικής πηκτής (SDS – Tricine/ PAGE) [59]

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

48% w/v Ακρυλαμίδιο

1,5% w/v Δισακρυλαμίδιο

#### **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)

Mercaptoethanol 6%

Serva blue G 0,05%

Tris-HCl, pH 7 150mM

#### **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

#### **Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (BIO-RAD)**

Phosphorylase b 97400 Da

Serum albumin 66200 Da

Ovalbumin 45000 Da

Carbonic anhydrase 31000 Da

Trypsin inhibitor 21500 Da

Lysozyme 14400 Da

### Διαλύματα παρασκευής μη αποδιατακτικής πηκτής (BN/ PAGE) [60]

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

48% w/v Ακρυλαμίδιο

1,5% w/v Δισακρυλαμίδιο

**Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής (Gel Buffer 3x)**

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

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

**Ρυθμιστικό διάλυμα Ανόδου**

50 mM BisTris/HCl, pH=7

**Ρυθμιστικό διάλυμα Καθόδου**

50 mM Tricine/ HCl

15 mM Bis-Tris

0,02% (w/v) Serva Blue G-250

**Πρότυπες πρωτεΐνες για BN-PAGE (Amersham Biosciences)**

Θυροσφαιρίνη, θυρεοειδή χοίρου 669 kDa

Φερριτίνη, σπλήνα αλόγου 440 kDa

Καταλάση, συκώτι βοδιού 232 kDa

Γαλακτική δεϋδρογενάση, καρδιά βοδιού 140 kDa

Αλβουμίνη, ορός βοδιού 66 kDa

**Διαλύματα χρώσης/αποχρωματισμού πηκτών****Απλή Χρώση Coomassie Brilliant Blue G-250\***

0,03% w/v Coomassie brilliant Blue G-250

25% v/v Μεθανόλη

5% v/v Οξικό Οξύ

**Διάλυμα αποχρωματισμού**

5 % v/v Μεθανόλη

7% v/v Οξικό οξύ

**Κολλοειδής Χρώση Coomassie Brilliant Blue G-250 ( Blue Silver)\*\* [61]**

0,12% w/v Coomassie brilliant Blue G-250

10% v/v Θεικό αμμώνιο

10% v/v φωσφορικό οξύ, H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>

20% v/v Μεθανόλη

**Διάλυμα αποχρωματισμού**

1% v/v Οξικό οξύ

\* Συμπλήρωση έως τον επιθυμητό όγκο με απιονισμένο νερό

\*\* Συμπλήρωση έως τον επιθυμητό όγκο με nanopure νερό



### 2.3 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

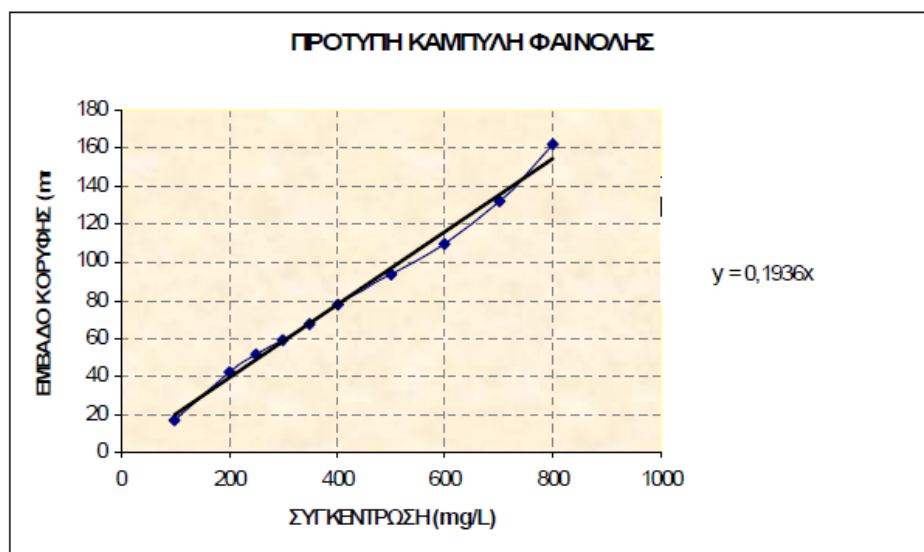
### 2.4 Καλλιέργεια του στελέχους

Αρχικά το βακτήριο αναπτύσσεται για 12 περίπου ώρες σε θρεπτικό υλικό LB, στους 37 °C υπό ανακίνηση και ακολουθεί εμβολιασμός, με 1:50 αραιώση αυτής της καλλιέργειας σε θρεπτικό M<sub>9R</sub> [62], όπου περιέχεται η φαινόλη ή η σουκρόζη ως πηγή άνθρακα σε συγκέντρωση 200mg/L. Η ποσότητα του ρύπου που δεν καταναλώνεται υπολογίζεται μετά από ανάλυση με χρωματογραφία HPLC. Ο ρύπος που καταναλώθηκε αναπληρώνεται ως την επιθυμητή τιμή. Όταν η OD<sub>600</sub> της καλλιέργειας φτάσει μεταξύ 0,6-1,0 τα κύτταρα συλλέγονται.

#### 2.4.1 Μετρήσεις συγκέντρωσης φαινόλης με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Χρησιμοποιείται στήλη Kromasil 100 C18 με μήκος 250 mm και εσωτερική διάμετρο 4,0 mm. Η κινητή φάση αποτελείται από 50% μεθανόλη και 1% οξικό οξύ. Το διάλυμα της κινητής φάσης φιλτράρεται, μέσω μεμβρανών (0,2μm διάμετρος πόρων, Whatman) υπό κενό και απαερώνεται. Για τη φόρτωση του δείγματος, το οποίο φιλτράρεται και αυτό μέσω μεμβρανών, χρησιμοποιείται σωληνάκι (loop) όγκου 20 μL. Η ροή της κινητής φάσης είναι σταθερή σε 1 ml/min. Η ανίχνευση των ρύπων γίνεται φωτομετρικά στα 254 nm (Variable Wavelength Monitor 2141, Pharmacia).

Σχηματίστηκε μια πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης της φαινόλης σε συνάρτηση με το σήμα που καταγράφεται μετά τη μέτρηση (Εικόνα 2.1). Το σήμα εκφράζεται ως το εμβαδό κορυφής, που εμφανίζεται στον αντίστοιχο χρόνο έκλουσης του ρύπου από τη στήλη που είναι τα 5,3 min για τη φαινόλη. Βάσει της πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται η συγκέντρωση της φαινόλης σε κάθε δείγμα.



**Εικόνα 2.1** : Πρότυπη καμπύλη φαινόλης

## 2.4.2 Συλλογή Κυττάρων

Εφόσον η εκάστοτε καλλιέργεια φτάσει σε  $OD=0,6-0,7$ , ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 6000g, για 20min, στους  $4^{\circ} C$ . Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris/  $H_2SO_4$ , pH = 8 (1,5 mL ανά 1g κυττάρων) πριν την αποθήκευσή τους στους  $-40^{\circ} C$ .

## 2.4.3 Μελέτη μεταβολικού μονοπατιού

### Διαλύματα

[A] 50% ακετόνη-50% τολουόλιο

[B] 50 mM  $K_2HPO_4 - KH_2PO_4$ , pH 7,5

Από το εναιώρημα κυττάρων λαμβάνονται 200 μl και αραιώνονται με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος [B]. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 6000 g, για 10 min, στους  $4^{\circ} C$  και επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 ml του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος. Μεταφέρεται σε erpendorf και προστίθενται 100 μL διαλύματος [A]. Με τη βοήθεια του τολουολίου, το οποίο έχει τη δυνατότητα να αποδιοργανώνει τις μεμβράνες όταν βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση [63], εκχυλίζονται τα συστατικά του κυτταροπλάσματος στο εξωτερικό διάλυμα. Η ακετόνη προστίθεται στο διάλυμα για

τη διατήρηση της ενεργότητας του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης. Όπως έχει παρατηρηθεί στο παρελθόν [42] η ακετόνη είναι ασθενής συναγωνιστικός αναστολέας εναντίον της κατεχόλης και γι' αυτό αποτελεί τον καταλληλότερο σταθεροποιητή για τα ένζυμα που τη δεσμεύουν. Το διάλυμα που σχηματίζεται ανακινείται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια διατηρείται σε πάγο, μέχρι να ολοκληρωθούν οι μετρήσεις. Το διάλυμα αυτό αποτελεί το κυτταρικό εκχύλισμα (Διάλυμα [Γ]).

Σε κυβελίδα χαλαζία, πλάτους 1cm, που περιέχει μαγνητάκι για ανάδευση εισάγονται 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος [B] και 10 μl εκχυλίσματος κυττάρων, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 1,2 mg βακτηριακής μάζας. Σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, PharmaSpec UV-1700, Shimadzu, λαμβάνεται φάσμα απορροφήσεων στο εύρος μηκών κύματος 240 nm – 450 nm, το οποίο αποτελεί το φάσμα μάρτυρα (control). Στη συνέχεια προστίθενται 20 μl διαλύματος κατεχόλης 10 mM (δηλ. 22 mg κατεχόλης) και λαμβάνονται φάσματα κάθε 2 min για την ίδια περιοχή μηκών κύματος.

#### 2.4.4 Τεστ κινητικής του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης

Λαμβάνονται 900μl αντιδραστηρίου [B] και 95μl αντιδραστηρίου [Γ] τα οποία αναδεύονται και αποτελούν το διάλυμα αναφοράς (τυφλό). Στη συνέχεια προστείνονται 5μl κατεχόλης, από stock κατεχόλης 10mM. Μετρούνται time-based φάσματα απορρόφησης στα 375nm, όπου απορροφά η 2-υδροξυμουκονική ημιαλδεΐδη.

### 2.5 Λύση κυττάρων – Συλλογή μεμβρανών

Στο κυτταρικό εναιώρημα που συλλέχθηκε (§2.4.2), προστίθενται 200 μl βενζαμιδίνης 50mM και 200 μl αμινοκαπροϊκού οξέος 50mM σε κάθε 10 ml κυτταρικού αιωρήματος (τελική συγκέντρωση 1mM). Ομογενοποίηση των κυττάρων και λύση τους με υπέρηχους (30 watt, για 20 min σε 20 κύκλους, 15 sec σε υπέρηχους και 45 sec σε ηρεμία για κάθε κύκλο) στους 4 °C. Έπειτα προστείνονται 50μg/ml λυσοζύμης και το κυτταρικό διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 20min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 4500g ,για 10 min, στους 4 °C, ενώ συλλέγεται το υπερκείμενο. Κατόπιν το υπερκείμενο φυγοκεντρείται σε υπερφυγόκεντρο για 1 h, 100000g σε ρότορα TFT 50.38, στους 4 °C. Το ίζημα (μεμβρανικό κλάσμα) συλλέγεται και επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8, γίνεται ομογενοποίηση του στον πάγο σε γυάλινο ομογενοποιητή, ενώ φυλάσσεται στους -40 °C.

## 2.6 Μέθοδος Bradford [64]

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ενός δείγματος. Αρχικά κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης αλβουμίνης που προέρχεται από ορό βοδιού (Bovine Serum Albumin, BSA) σε σχέση με 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.

### 2.6.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης Bradford

Αρχικά από το πρότυπο υδατικό διάλυμα BSA λαμβάνεται ένα εύρος όγκων 0, 10, 20, 30, 40 και 50  $\mu$ l, όπου προστίθεται  $dH_2O$  σε τελικό όγκο 50  $\mu$ l. Στη συνέχεια προστίθενται σε κάθε διάλυμα άλλα 50 $\mu$ l του ρυθμιστικού διαλύματος Tris/ $H_2SO_4$ , pH=8, που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα των πρωτεϊνικών δειγμάτων στην παρούσα εργασία, ενώ ακολούθως το κάθε διάλυμα συμπληρώνεται με 900 $\mu$ l αντιδραστηρίου Bradford (εμπορικά διαθέσιμο μείγμα το οποίο περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, φωσφορικό οξύ και μεθανόλη). Τα δείγματα ετοιμάζονται σε διπλέτες. Κατόπιν μετά από ισχυρή ανάδευση τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 6min περίπου και καταγράφεται ο μέσος όρος απορρόφησης, για τις συγκεντρώσεις που έχουν ετοιμαστεί εις διπλούν, στα 595nm, μήκος κύματος όπου απορροφά το σύμπλοκο χρωστική-πρωτεΐνη, ενώ το πρώτο δείγμα χρησιμοποιείται ως τυφλό. Αφού κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης σε συνάρτηση με τη μάζα σε  $\mu$ g της BSA, τα δείγματα άγνωστης πρωτεϊνικής συγκέντρωσης παρασκευάζονται με παρόμοιο τρόπο, και τέλος υπολογίζεται το ποσό της πρωτεΐνης μέσω της παραπάνω καμπύλης.

## 2.7 Κατεργασία μεμβρανών με EDTA και με το ανιοντικό απορρυπαντικό sodium N-laurylsarcosinate

Οι μεμβράνες απομονώνονται όπως περιγράφεται στην §2.5 και με βάση την ποσοτικοποίηση μέσω της μεθόδου Bradford λαμβάνεται 1mg πρωτεϊνικού διαλύματος μεμβρανών, το οποίο στη συνέχεια επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/ $H_2SO_4$ , pH=8, όγκου 5ml, που περιέχει 5mM EDTA (Ethylene-diamine-tetra-acetic acid). Τα δείγματα τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων (BANDELIN SONOREX, RK 255H), στους 4 $^{\circ}$  C, για 6min περίπου. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνται σε υπερφυγόκεντρο για 1 h, με 100000g σε ρότορα TFT 50.38, στους 4 $^{\circ}$  C. Το ίζημα, που αποτελεί το

μεμβρανικό κλάσμα θεωρητικά απαλλαγμένο από ένα ποσοστό υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών συλλέγεται, επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8 και γίνεται ομογενοποίησή του στον πάγο σε γυάλινο ομογενοποιητή. Ακολουθεί η μερική διαλυτοποίηση του κλάσματος αυτού με το ανιοντικό απορρυπαντικό sodium N-laurylsarcosinate σε ποσοστό 0,1%, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8, όγκου 5ml, με επώαση στον πάγο υπό ήπια ανάδευση για 20min, με στόχο να απομακρυνθούν οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες. Το ίζημα συλλέγεται, επαναιωρείται και ομογενοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8.

## **2.8 Διαλυτοποίηση μεμβρανικού κλάσματος με το μη ιονικό απορρυπαντικό n-Dodecyl-β-D-Maltoside**

Το μεμβρανικό κλάσμα που δεν έχει διαλυτοποιηθεί με τη χρήση του ανιοντικού απορρυπαντικού sodium N-laurylsarcosinate (I.S.F, insoluble sarcosinate fraction), διαλυτοποιείται, με αρχική πρωτεϊνική συγκέντρωση 1mg/ml, με το ήπιο μη ιονικό απορρυπαντικό n-Dodecyl-β-D-Maltoside (DDM), χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις 0,5%, 1%, 1,5% και 3%, που αντιστοιχούν σε αναλογίες απορρυπαντικού προς πρωτεϊνική συγκέντρωση 5:1, 10:1, 15:1 και 30:1 αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και παρακάτω, στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, επιλέχθηκε η αναλογία 15:1 ως αυτή που δίνει τα καλύτερα επιθυμητά αποτελέσματα. Η διαλυτοποίηση περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων στον πάγο υπό ήπια ανάδευση για 1h, ενώ ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση για 1h και 30min, σε 20000rpm, στους 4°C. Ακολούθως συλλέγεται το υπερκείμενο, που αποτελεί το τελικό διαλυτοποιημένο μεμβρανικό κλάσμα, το οποίο στη συνέχεια είτε κατακρημνίζεται με TCA (TriChloroacetic Acid) (§2.9) εφόσον πρόκειται να διαχωριστεί σε συνθήκες αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (SDS – Tricine/ PAGE), είτε προστείνεται σε αυτό 10% γλυκερόλη στην περίπτωση που ακολουθεί μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (Blue Native – PAGE).

## **2.9 Κατακρήμνιση με TCA [65]**

Στην ποσότητα του εκάστοτε πρωτεϊνικού διαλύματος προστίθενται 10% τριχλωροξικού οξέος TCA (100% w/v) και το διάλυμα παραμένει στους 4 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11500g, για 10 min και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το ίζημα πλένεται προσθέτοντας κρύα ακετόνη και γίνεται νέα φυγοκέντρηση 11500g στους 4 °C για 10 min. 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 επώάζεται σε λουτρό υπερήχων για 30min περίπου, προτού φορτωθεί στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

## 2.10 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 είναι η εξής:

### Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (10%)

60 ml AB-mix  
100 ml Gel-buffer (3X)  
30 g Glycerol  
300 ml τελικός όγκος με προσθήκη ddH<sub>2</sub>O  
1,5 ml APS 10% (w/v)  
150μl TEMED

### Διάλυμα πηκτής στοίβαξης (3%)

8 ml AB-mix  
32 ml Gel-buffer (3X)  
96 ml τελικός όγκος με προσθήκη ddH<sub>2</sub>O  
720 μl APS 10%(w/v)  
72 μl TEMED

Το διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού μεταφέρεται μεταξύ γυάλινων πλακών (διαστάσεις 20cm x 22 cm, 1 mm πάχος διαχωριστικού μεταξύ τους) 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 90 V για ~16h. Η χρώση και ο αποχρωματισμός γίνονται με τα διαλύματα για την απλή χρώση Coomassie, είτε για την κολλοειδή Coomassie (Blue Silver) στην περίπτωση που ακολουθεί ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας και με παραμονή της πηκτής στο καθένα για ~12h.

## 2.11 Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (Blue Native – PAGE)

Η μονοδιάστατη μη-αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (BN-PAGE) [60] 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 σημαντικά χαμηλή. Πρόκειται για μία μέθοδο διαχωρισμού που εξαρτάται από το φορτίο, καθώς η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών επηρεάζεται από την πρόσδεση του αρνητικά φορτισμένου μορίου της

χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου, για την μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, παρασκευάστηκαν σε πλάκες διαστάσεων 19,5cm x 16,5cm x 0,13cm. Η πηκτική συμπύκνωσης είχε συγκέντρωση 3% ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου και η πηκτική διαχωρισμού είχε συγκέντρωση 8% ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου. Τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν περιείχαν 10% γλυκερόλη. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 10°C, αρχικά σε χαμηλή τάση (~80 V) μέχρι τα δείγματα να συμπυκνωθούν στη πηκτική συμπύκνωσης και στη συνέχεια στα 160 V και είχε διάρκεια περίπου 12 ώρες. Η ακριβής σύσταση για την παρασκευή μίας πηκτής είναι η εξής:

**Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (8%)**

9.69 ml AB-mix  
 20 ml Gel-buffer (3X)  
 29.98 ml τελικός όγκος με προσθήκη ddH<sub>2</sub>O  
 250 μl APS 10% (w/v)  
 50 μl TEMED

**Διάλυμα πηκτής στοίβαξης (3%)**

1.87 ml AB-mix  
 10 ml Gel-buffer (3X)  
 18.13ml τελικός όγκος με προσθήκη ddH<sub>2</sub>O  
 100 μl APS 10%(w/v)  
 30 μl TEMED

**2.12 Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (Blue Native PAGE/SDS PAGE)**

**1<sup>η</sup> διάσταση : BN PAGE**

Η μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση Blue Native PAGE, πραγματοποιήθηκε σε πηκτική διαχωρισμού πολυακρυλαμιδίου διαβάθμισης 4% έως 13%. Η πηκτική παρασκευάστηκε σε γυάλινες πλάκες διαστάσεων 19,5cm x 16,5cm x 0,13cm. Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στον Πίνακα 2.1.

	Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού 4%	Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού 13%
(AB-mix- 49,5%T, 3% C)	1,72 ml	5,6 ml
Gel Buffer 3x	7,1 ml	7,1 ml
Γλυκερόλη	-	4,77 g/ 3,78 ml
Νερό (nanopure)	12,43 ml	4,77 ml
APS (10%)	200μl	94μl
TEMED	20μl	9,4μl
Τελικός όγκος	21,25 ml	21,25ml

**Πίνακας 2.1:** σύσταση των διαλυμάτων πηκτών διαχωρισμού 4% και 13% πολυακρυλαμιδίου

Τα παραπάνω διαλύματα μεταφέρθηκαν στη συσκευή ανάμιξης, όπου μετά την προσθήκη των APS και TEMED, τα διαλύματα ανακινούνταν ελαφρά, έτσι ώστε ο καταλύτης και ο εκκινητής να δράσουν σε όλο τον όγκο του διαλύματος με αποτέλεσμα ο πολυμερισμός να γίνει ομοιόμορφα. Παράλληλα γινόταν και η διαβάθμιση της πηκτής διαχωρισμού.

Τα δείγματα που φορτώθηκαν περιείχαν 10% γλυκερόλη, ενώ προστέθηκαν 0,02% (w/v) του απορρυπαντικού n-Dodecyl-β-D-Maltoside (DDM) στο διάλυμα καθόδου [66]. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε αρχικά σε χαμηλή τάση (~80 V), έως ότου το ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου να εισέλθει στα κανάλια φόρτωσης των δειγμάτων, στην πηκτή διαχωρισμού, οπότε και η τάση αυξήθηκε στα 180 V και είχε διάρκεια περίπου 12 ώρες. Καθ'όλη τη διάρκεια της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας παρέχόταν ψύξη, με τη χρήση ειδικών μεταλλικών πλακών μέσα στις οποίες κυκλοφορούσε νερό θερμοκρασίας στους 7° C.

## **2<sup>η</sup> 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% SDS και 1% β-μερκαπτοαιθανόλη και άλλα 30 λεπτά σε διάλυμα με 1% SDS, 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 .

### **2.13 Ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση**

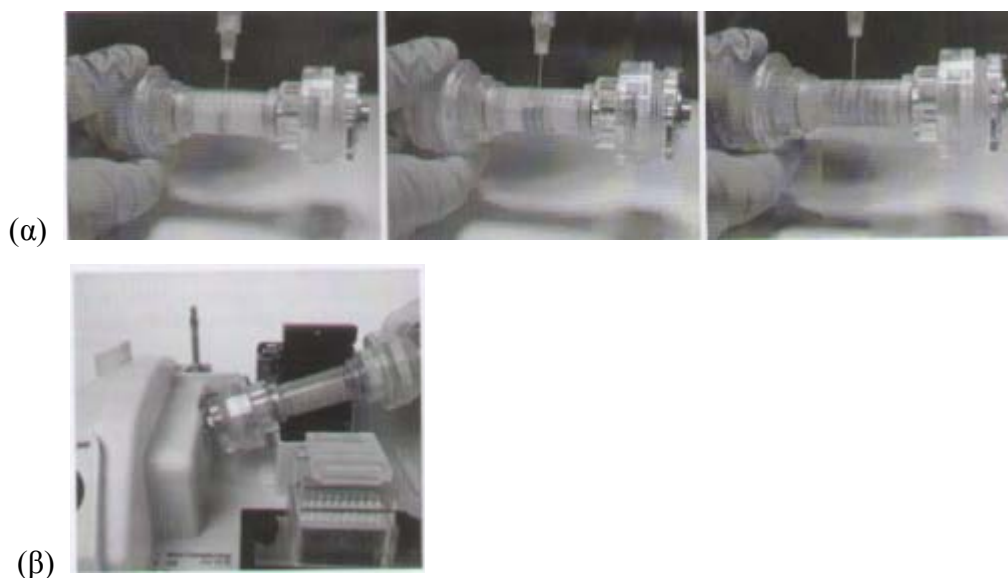
Πραγματοποιήθηκε ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση χρησιμοποιώντας τη συσκευή MicroRotofor (BIO-RAD), μέσω της οποίας δίνεται η δυνατότητα της κλασματοποίησης πολύπλοκων πρωτεϊνικών δειγμάτων σε διαλυτή μορφή.

Η κλασματοποίηση μέσω της ισοηλεκτρικής εστίασης σε υγρή φάση προσφέρει το πλεονέκτημα για την περίπτωση μη υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, είτε γενικότερα πρωτεϊνών που λόγω των ιδιοτήτων τους, όπως είναι η υδροφοβικότητα δεν μπορούν να διαχωριστούν καλά με μεθόδους που βασίζονται σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου(gel-based μεθόδους).Επιπλέον, η



ισοηλεκτρική εστίαση σε διάλυμα προσφέρει τη δυνατότητα κλασματοποίησης πρωτεϊνών στη λειτουργική μορφή τους με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI).

Η συγκεκριμένη συσκευή έχει χωρητικότητα για όγκο δείγματος 2,5ml, χρησιμοποιώντας ένα κυλινδρικό «θάλαμο» εστίασης, ο οποίος χωρίζεται σε 10 τμήματα (το καθένα από αυτά περιέχει ένα επιμέρους κλάσμα) με 9 παράλληλα, μονοστρωματικά «φράγματα» πολυεστερικής σύστασης (Εικόνα 2.2(α)). Καθώς η θερμοκρασία αποτελεί κρίσιμο παράγοντα ρύθμισης της διατήρησης της ακεραιότητας των πρωτεϊνών κατά την ισοηλεκτρική εστίαση, η συσκευή MicroRotofor διαθέτει ένα ολοκληρωμένο σύστημα το οποίο παρέχει εξωτερική ψύξη στο δείγμα που βρίσκεται στο θάλαμο εστίασης κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 2.2(β)).



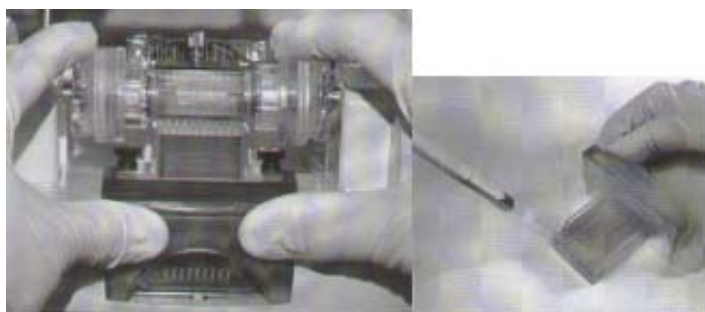
**Εικόνα 2.2 :** (α) φόρτωση του δείγματος στο «θάλαμο» εστίασης (β) τοποθέτηση στο πλαίσιο στήριξης όπου εφαρμόζεται το σύστημα εξωτερικής ψύξης, αλλά και το δυναμικό κατά την ηλεκτροφόρηση.

Στα πλαίσια των πειραμάτων της παρούσας εργασίας, τα μεμβρανικά πρωτεϊνικά δείγματα που προέρχονται από τη διαλυτοποίηση με το απορρυπαντικό DDM, τοποθετούνται στο «θάλαμο» εστίασης, ενώ εφαρμόζονται μη αποδιατακτικές συνθήκες που διατηρούν το πρωτεϊνικό δείγμα σε native μορφή, με ψύξη στους 10°C. Κατά την προετοιμασία του δείγματος πριν φορτωθεί στο «θάλαμο» εστίασης, προστίθεται σε αυτό 2% συγκέντρωση αμφολυτών προκειμένου να επιτευχθεί η διαβάθμιση pH και συγκεκριμένα προστίθεται μίγμα αμφολυτών με εύρος pH 4-6 κατά 90% και με εύρος 3-10 κατά 10% επί του συνολικού ποσοστού (2%) των αμφολυτών στο δείγμα. Επίσης στα άκρα του θαλάμου εστίασης τοποθετούνται ειδικές μεμβράνες ιοντοανταλλαγής, μία για την άνοδο

και μία για την κάθοδο, οι οποίες πριν από κάθε χρήση θα πρέπει να εξισορροπηθούν για ~12h, εμβαπτίζοντας τις σε κατάλληλους ηλεκτρολύτες (φωσφορικό οξύ 0,1M ή οξικό οξύ 0,5M για την άνοδο και υδροξείδιο του νατρίου 0,1M ή αιθανολαμίνη 0,5M για την κάθοδο). Οι ηλεκτρολύτες αυτοί προστίθενται επίσης μέσω κατάλληλων υποδοχών στα άκρα του «θαλάμου» εστίασης, οπότε και δημιουργούν το κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο, χωρίς ωστόσο να έρχονται σε άμεση επωασή με το δείγμα, αφού μεσολαβούν οι μεμβράνες αναταλλαγής ιόντων. Αφού η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιηθεί με τις συνθήκες και τα βήματα που φαίνονται στον Πίνακα 2.2, ακολουθεί συλλογή των 10 κλασμάτων, κατά την οποία αυτά τοποθετούνται σε μία θήκη που αποτελείται από 10 πηγάδια, χωρητικότητας 250μl το καθένα, χωρίς να αναμειχθούν μεταξύ τους, καθώς η συσκευή συνδέεται με μια αντλία δημιουργίας κενού (Εικόνα 2.3). Τα κλάσματα συλλέγονται τελικώς, μετράται το pH σε κάθε κλάσμα και ακολουθεί κατακρήμνιση με TCA για τον περαιτέρω διαχωρισμό τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-Tricine/ PAGE).

	Volts/Time	Current
1	150V/ 15min	10-5 mA
2	200V/ 15min	7-2 mA
3	300V/ 15min	3-2 mA
4	350V/ 15min	3 mA
5	400V/ 15min	3 mA

**Πίνακας 2.2:** Συνθήκες/βήματα ηλεκτροφόρησης κατά την ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες



**Εικόνα 2.3:** Συλλογή κλασμάτων

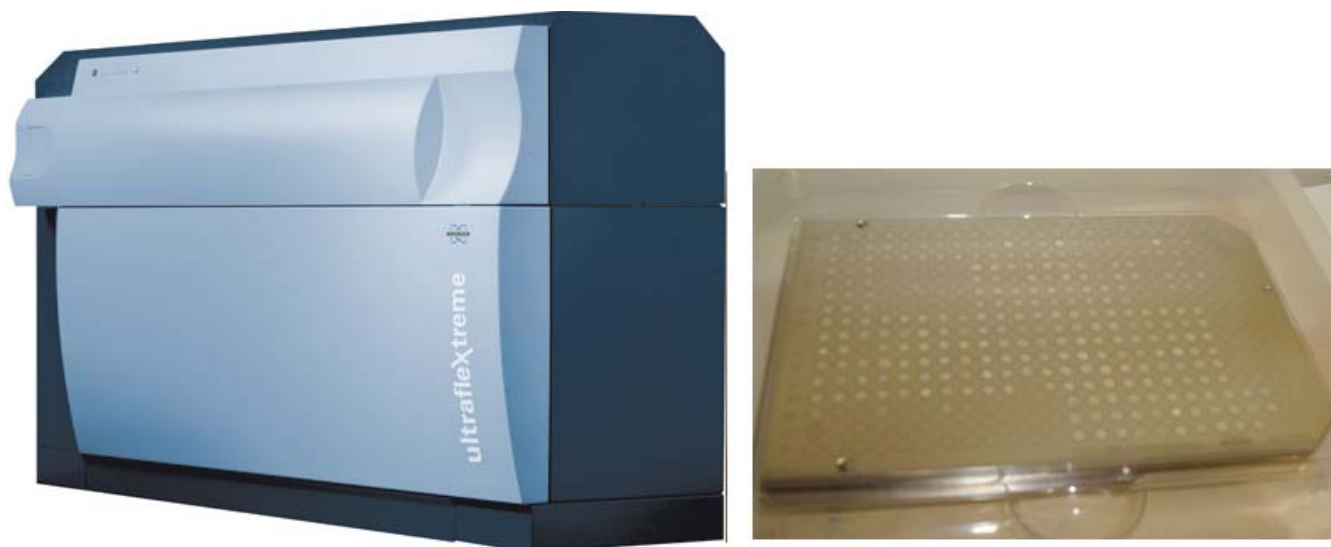
## 2.14 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Η θρυψίνη είναι το περισσότερο χρησιμοποιούμενο ένζυμο το οποίο διασπάει στο C-τερματικό των πεπτιδικών δεσμών αργινίνης ή λυσίνης. Οι πρωτεόλυσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν απευθείας στην πηκτή του πολυακρυλαμιδίου (*in situ*) έπειτα από αποδιατακτική (Tricine-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 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο, με τρεις πλύσεις εναλλάξ διάρκειας 15min η καθεμία. Ακολουθεί αναγωγή των ξηραμένων πηκτών με 10 mM DTT σε 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο και επώαση για ~1h στους 56°C. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αλκυλίωση με 55 mM ιοδοακεταμίδιο σε 50mM διττανθρακικό αμμώνιο για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Τα κομμάτια της πηκτής πλένονται με 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο και με 50% ACN, επαναλαμβάνοντας ουσιαστικά τη διαδικασία που ακολουθείται και στο αποχρωματισμό. Στα κομμάτια της πηκτής προστείνεται το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεόλυσης το οποίο περιέχει 125 ng θρυψίνης από πάγκρεας χοίρου και αφήνονται για ~45 min 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 τρεις διαδοχικές επώσεις διάρκειας 20min σε nanopure νερό, 50% ACN και τέλος σε διάλυμα 50% ACN, 0,1% TFA. Το συνολικό διάλυμα που προέκυψε ξηρώνεται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα.

## 2.15 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 nanopure νερό. Επάνω σε μεταλλικό πλακίδιο 384 θέσεων (Εικόνα 2.3 (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 2.3(α)). 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 .



**Εικόνα 2.3** : ο φασματογράφος μάζας Ultraflex Xtreme (Bruker Daltonics) και ο μεταλλικός στόχος πάνω στον οποίο τοποθετούνται τα δείγματα.

Τα φάσματα που ελήφθησαν βαθμονομήθηκαν εξωτερικά με το μίγμα εννέα πεπτιδίων Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik GmbH), όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.2, καθώς επίσης έγινε και εσωτερική βαθμονόμηση με δύο πεπτίδια (Bradykinin Fragment 1-7: 756,3997 Da και ACTH Fragment 18-39: 2454,1989 Da, Sigma) 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 μονο-ισοτοπικών 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. 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 οξείδωση των μεθειονινών.

Peptide	[M+H] <sup>+</sup> Mono isotopic	[M+H] <sup>+</sup> 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

**Πίνακας 2.2:** Μίγμα πεπτιδίων βαθμονόμησης MALDI TOF MS, με τα αντίστοιχα μοριακά βάρη των πεπτιδίων.

## 2.16 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 διαφόρων ιδιοτήτων τους. Η θέση και λειτουργία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών στο βακτήριο προβλέφθηκε με τα προγράμματα PSORT [51]. Η πρόβλεψη διαμεμβρανικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την χρήση των λογισμικών TMtrep [48] και PRED-TMBB [49] 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>).

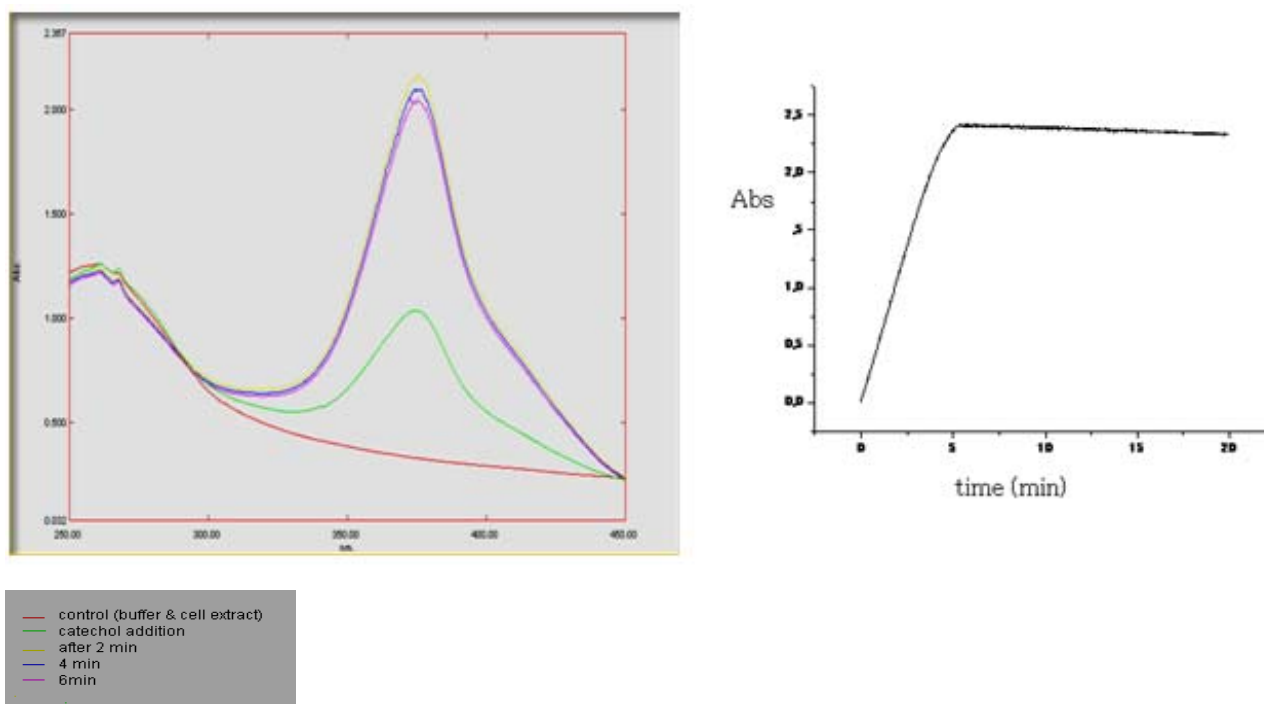
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Καλλιέργειες

Κατά τη διάρκεια των καλλιεργειών με M<sub>9R</sub> θρεπτικό, παρατηρήθηκε ότι από τη στιγμή που η κυτταρική πυκνότητα αυξανόταν, το χρώμα του διαλύματος άλλαζε. Στις καλλιέργειες όπου προστέθηκε σουκρόζη, το χρώμα ήταν λευκό προς σομόν. Στις καλλιέργειες της φαινόλης, το χρώμα ήταν κίτρινο. Όλες οι καλλιέργειες συλλέχθηκαν μετά από μέτρηση ορατού φάσματος στα 600nm, όταν η οπτική πυκνότητα του διαλύματος έφτασε σε απορρόφηση 0,6-0,7 OD (Optical Density).

#### 3.1.2 Έλεγχος μεταβολικού μονοπατιού

Ο έλεγχος του μεταβολικού μονοπατιού πραγματοποιήθηκε αφού πρώτα συλλέχθηκαν 10ml κυττάρων από την καλλιέργεια της φαινόλης (OD=0,6-0,7). Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία της ήπιας λύσης των κυττάρων και της φασματοσκοπικής ανάλυσης όπως περιγράφεται στην παράγραφο των μεθόδων §2.4.3.



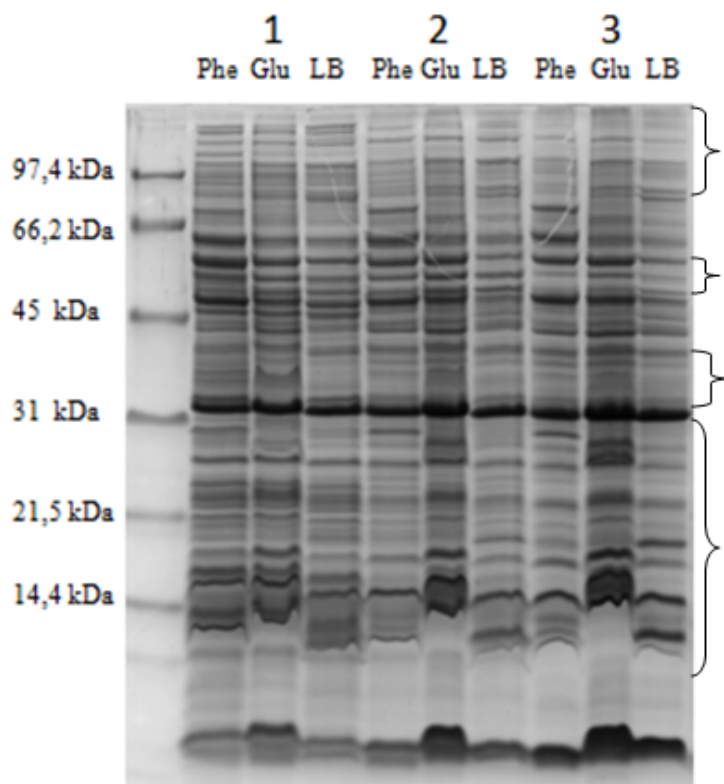
**Εικόνα 3.1 :** Έλεγχος μεταβολικού μονοπατιού και κινητική του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης με την παραγωγή της 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεΐδης στα 375nm.

Στην Εικόνα 3.1 φαίνεται το φάσμα απορρόφησης της 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεύδης, αρχικά απουσία της κατεχόλης, παρουσία κατεχόλης σε 2min, 4min και 6min αντίδρασης. Το φάσμα δείχνει ότι η κορυφή της κατεχόλης στα 274nm μειώνεται, ενώ η κορυφή της 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεύδης στα 375nm, αρχικά αυξάνεται ενώ για τα 4min και τα 6min παρατηρείται ελάχιστη μείωση που υποδεικνύει και το χρονικό σημείο κορεσμού για τη δράση του ενζύμου. Όπως περιγράφηκε και στην ενότητα 1.5 (Εικόνα 1.6(β)), η παραγωγή της 2-υδροξυμουκονικής ημιαλδεύδης καταδεικνύει το *meta* μεταβολικό μονοπάτι που ακολουθεί το βακτήριο για τον καταβολισμό της φαινόλης. Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται επίσης και η καμπύλη της κινητικής του ενζύμου 2,3-διοξυγενάση της κατεχόλης, καθώς έχουν ληφθεί time-based φάσματα απορρόφησης στα 375nm, όπου απορροφά η 2-υδροξυμουκονική ημιαλδεύδη. Το σημείο κορεσμού της δράσης του ενζύμου, κατά την πρόσδεσή του στο υπόστρωμα, παρουσιάζεται στα 6min περίπου, κάτι που επιβεβαιώνει την παραπάνω παρατήρηση.

### **3.2 Κατεργασία μεμβρανών με EDTA και με το ανιοντικό απορρυπαντικό sodium N-laurylsarcosinate**

Μετά από την κατεργασία του μεμβρανικού κλάσματος με EDTA, όπως αυτό προέκυψε κατόπιν της λύσης των κυττάρων, ακολούθησε υπερφυγοκέντρωση με σκοπό το διαχωρισμό των κατεργασμένων μεμβρανών από τις υδατοδιαλυτές και περιφερειακές πρωτεΐνες. Επόμενο βήμα ήταν η μερική διαλυτοποίηση του κλάσματος αυτού με το ανιοντικό απορρυπαντικό sodium N-laurylsarcosinate (LS) σε συγκέντρωση 0,1% (w/v), προκειμένου να απομακρυνθούν επιπλέον πρωτεΐνες που απαντώνται στο κυτταρόπλασμα ή τον περιπλασματικό χώρο και συνδέονται με τις μεμβράνες. Συλλέχθηκε το ίζημα μετά από υπερφυγοκέντρωση που πραγματοποιήθηκε, όπως αναφέρεται στην § 2.7, ενώ ακολούθησε ο διαχωρισμός αυτού του μεμβρανικού πρωτεϊνικού κλάσματος, για τις περιπτώσεις των τριών διαφορετικών πηγών άνθρακα (φαινόλη, σουκρόζη και LB) κατά την καλλιέργεια του βακτηρίου, σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-Tricine-PAGE). Στην Εικόνα 3.2 παρουσιάζονται τα επιμέρους κλάσματα που αντιπροσωπεύουν (1) το αρχικό κλάσμα των μεμβρανών, (2) το κλάσμα των μεμβρανών κατεργασμένων με EDTA και (3) το κλάσμα των κατεργασμένων μεμβρανών με 0,1% (w/v) ανιοντικού απορρυπαντικού sodium N-laurylsarcosinate. Είναι εμφανές ότι υπάρχουν διαφορές στο σύνολο των πρωτεϊνών που περιέχονται στα τρία διαφορετικά κλάσματα. Η αλλαγή στο μοτίβο των πρωτεϊνών κατά τις διαδοχικές διεργασίες της πλύσης με EDTA και της κατεργασίας με το sodium N-laurylsarcosinate,

επισημένεται με τα άγκιστρα που φαίνονται στην εικόνα, υποδεικνύοντας τις περιοχές όπου παρουσιάζονται οι διαφορές. Σε μια πρώτη προσέγγιση εμφανείς είναι και οι διαφορές που εντοπίζονται στο πρωτεϊνικό μοτίβο μεταξύ των τριών διαφορετικών πηγών άνθρακα.



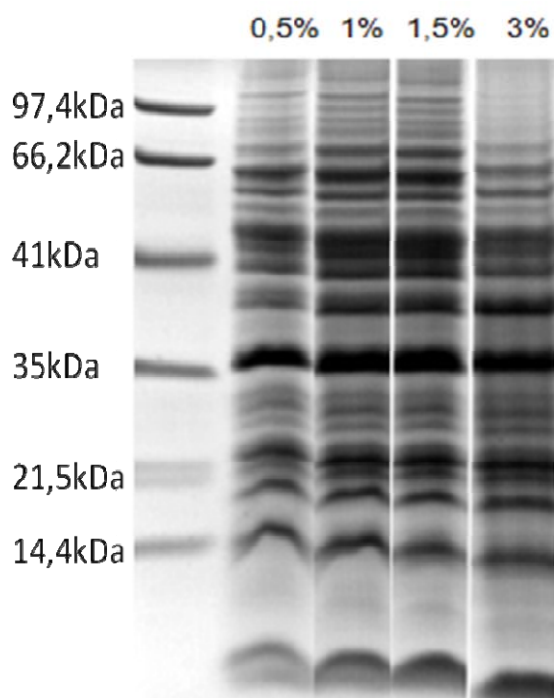
**Εικόνα3.2:** SDS-Tricine/PAGE (1) αρχικό μεμβρανικό κλάσμα, (2) κατεργασία με EDTA , (3) κατεργασία με LS , για τις τρεις διαφορετικές πηγές άνθρακα (φαινόλη (Phe), σουκρόζη (Glu) και LB).

### 3.3 Διαλυτοποίηση του μεμβρανικού κλάσματος με το μη ιονικό απορρυπαντικό n-Dodecyl-β-D-Maltoside

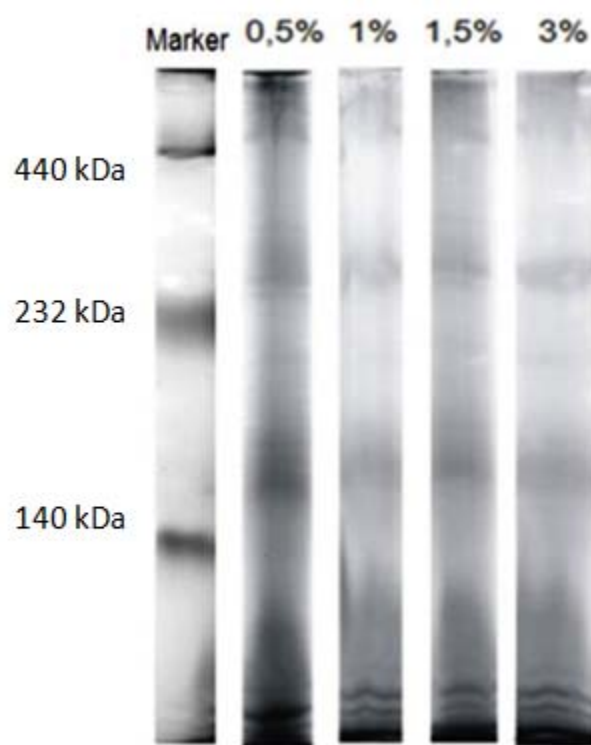
Το ίζημα που προέκυψε μετά από την κατεργασία με το sodium N-laurylsarcosinate διαλυτοποιήθηκε με το ήπιο μη ιοντικό απορρυπαντικό n-Dodecyl-β-D-Maltoside (DDM) και στη συνέχεια μελετήθηκε πλέον το διαλυτοποιημένο τελικό μεμβρανικό κλάσμα, δηλαδή το υπερκείμενο μετά από την υπερφυγοκέντρωση που πραγματοποιήθηκε, κατόπιν επώασης του μη διαλυτοποιημένου στο sodium N-laurylsarcosinate κλάσματος. Προκειμένου να γίνει η επιλογή για την ιδανικότερη αναλογία συγκέντρωσης απορρυπαντικού : πρωτεϊνικού δείγματος, μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,5%, 1%, 1,5% και 3%, που αντιστοιχούν σε αναλογίες απορρυπαντικού προς πρωτεϊνική συγκέντρωση 5:1, 10:1, 15:1 και 30:1 αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των διαλυτοποιημένων μεμβρανών



μέσω αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (SDS-Tricine/PAGE), αλλά και μέσω μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (BN-PAGE). Και στις δύο περιπτώσεις ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μοριακό βάρος των μεμβρανικών πρωτεϊνών ή των μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων για την περίπτωση της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης. Όπως φαίνεται και από τις παρακάτω εικόνες για την περίπτωση της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης παρατηρούμε ότι στη συγκέντρωση αυτή (καθώς και στη συγκέντρωση 1% (w/v)) έχουμε εντονότερες και περισσότερες πρωτεϊνικές μπάντες χωρίς να παρατηρούνται φαινόμενα διάχυσης σε αυτές, καταλήγοντας έτσι σε ένα περισσότερο εμπλουτισμένο διαλυτοποιημένο μεμβρανικό κλάσμα σε σχέση με τις δύο ακραίες περιπτώσεις των συγκεντρώσεων 0,5% και 3%. Συνδυάζοντας και τα αποτελέσματα που φαίνονται στην Εικόνα 3.4, όπου στην περίπτωση της συγκέντρωσης του απορρυπαντικού 1,5% (w/v), φαίνεται ότι πραγματοποιείται καλύτερα ο διαχωρισμός των μεμβρανικών συμπλόκων, καθώς παρατηρούνται πιο ευδιάκριτες μπάντες σε σχέση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, επιλέχθηκε τελικά ως ιδανικότερη η αναλογία 15:1 απορρυπαντικό : πρωτεΐνη, που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 1,5% (w/v).



**Εικόνα 3.3:** SDS-PAGE για το μεμβρανικό διαλυτοποιημένο κλάσμα σε DDM



**Εικόνα 3.4:** BN-PAGE για το μεμβρανικό διαλυτοποιημένο κλάσμα σε DDM

### 3.4 Λειτουργική πρωτεομική ανάλυση των μεμβρανών του βακτηρίου

Για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων του μεμβρανικού κλάσματος που προέκυψε μετά από τη διαλυτοποίησή του με το μη ιονικό απορρυπαντικό n-Dodecyl-β-D-Maltoside (DDM), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο §2.9, όπου η πρώτη διάσταση πραγματοποιήθηκε σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (BN-PAGE) και τα πρωτεϊνικά μεμβρανικά σύμπλοκα διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος. Ακολούθως, η δεύτερη διάσταση πραγματοποιήθηκε σε αποδιατακτικές συνθήκες SDS-Tricine/PAGE, οπότε και οι πρωτεΐνες των επιμέρους συμπλόκων, είτε εκείνες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, διαχωρίστηκαν περαιτέρω με βάση το μοριακό τους βάρος. Η μεθοδολογία αυτή ακολουθήθηκε για τις τρεις διαφορετικές πηγές άνθρακα : θρεπτικό L.B, σουκρόζη και φαινόλη. Ακολουθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα τρία διαφορετικά δείγματα.

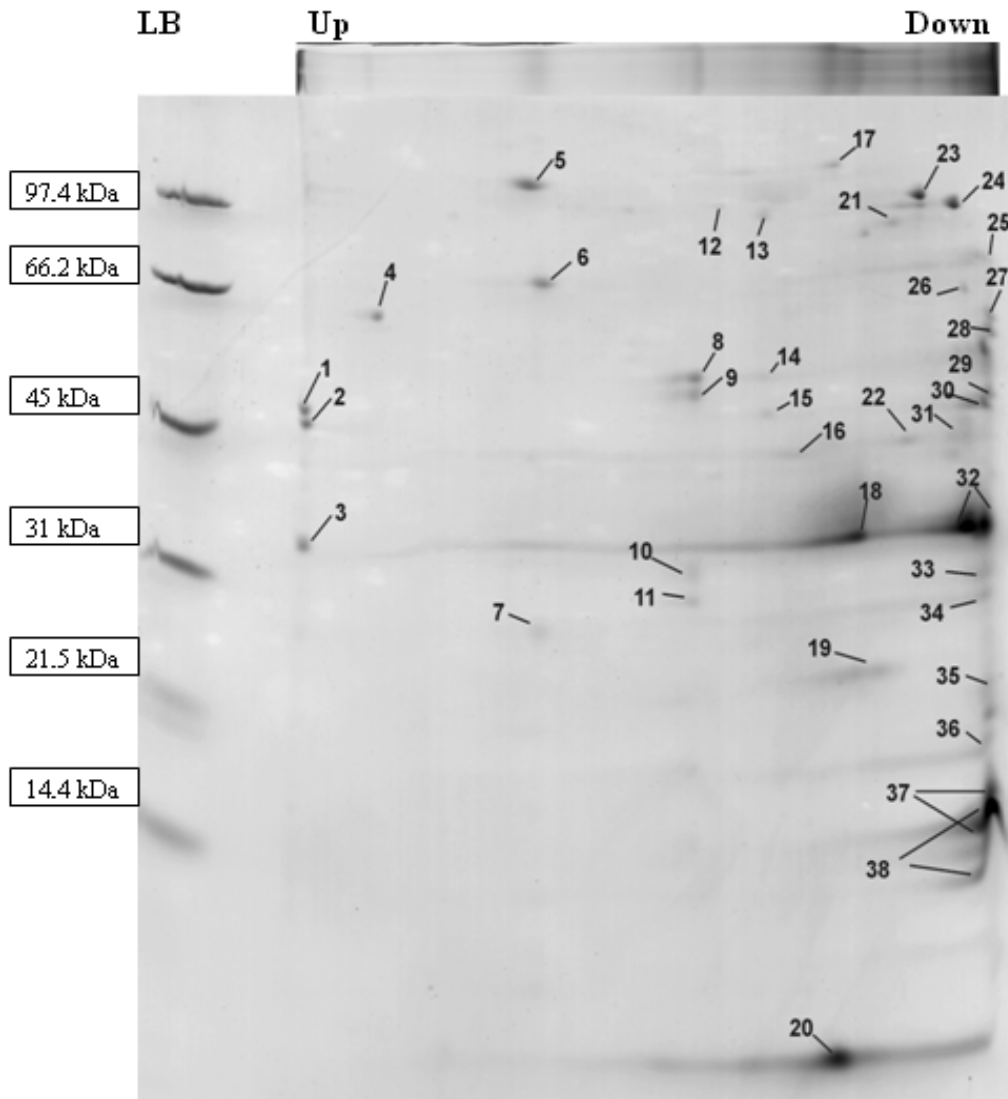
#### 3.4.1 Μεμβρανικό κλάσμα του βακτηρίου καλλιεργημένου σε θρεπτικό L.B

Στην Εικόνα 3.5 παρουσιάζονται τα πρωτεϊνικά στίγματα που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (BN/SDS-PAGE), του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου καλλιεργημένου σε θρεπτικό L.B. Προέκυψαν 41 πρωτεϊνικά στίγματα, εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 38 με MALDI-TOF/TOF (MS/MS) (Πίνακας 3.1).

Από την ταυτοποίηση προέκυψε ότι μετά από τις διαδοχικές διεργασίες: (α) της επεξεργασίας του κλάσματος των ολικών μεμβρανών με το EDTA σε πρώτο στάδιο, ακολούθως, (β) της συλλογής του μη διαλυτοποιημένου κλάσματος στο ανιοντικό απορρυπαντικό sodium N-laurylsarcosinate - (I.S.F, insoluble sarcosinate fraction) και τέλος (γ) της διαλυτοποίησης του κλάσματος αυτού με το μη ιονικό απορρυπαντικό n-Dodecyl-β-D-Maltoside (DDM), απομονώθηκαν πρωτεΐνες τόσο της εξωτερικής, όσο και της εσωτερικής μεμβράνης, καθώς και ελάχιστες πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος. Συγκεκριμένα πρόκειται για 21 πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, 14 πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης και 3 κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες με τα εξής στοιχεία: το score που προέκυψε από την αναζήτηση στο Mascot server, το μοριακό βάρος κάθε πρωτεΐνης (MW), το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI), τον κωδικό που τις αντιπροσωπεύει στη βάση δεδομένων Swissprot, την προβλεπόμενη τοπολογία τους με βάση το πρόγραμμα PSORTb v.3.0, καθώς και το GRAVY κάθε πρωτεΐνης που

αντιπροσωπεύει το βαθμό υδροφοβικότητάς της, με βάση το πρόγραμμα ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

Όσον αφορά στις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες συνοψίζοντας, μπορούν να γίνουν οι εξής παρατηρήσεις : (i) οι πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης παρουσιάζουν χαρακτηριστικές λειτουργίες, όπως 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, ενώ ταυτοποιήθηκαν και δύο πρωτεΐνες με άγνωστη μέχρι στιγμής λειτουργία, (ii) 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, τη μεταφορά ουσιών μέσω των πορινών αλλά και για μία περίπτωση μέσω ενός λιποπρωτεϊνικού μορίου (Ble, SwissProt#:Q4KJP2) (iii) οι τρεις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες συμμετέχουν η μία στην αναδίπλωση πρωτεϊνικών μορίων μετά από αποδιάταξή τους (GroEL, SwissProt#:Q88N55), η δεύτερη παρουσιάζει δράση ακυλοτρανσφεράσης συμμετέχοντας σε ένα σύμπλοκο αφυδρογενάσης του οξο-γλουταρικού που αποτελεί μεταβολικό ενδιάμεσο του κύκλου του Krebs (dihydroliapoamide succinyl transferase, SwissProt#: Q3KFU8), ενώ η τρίτη αποτελεί υπομονάδα ενός συμπλόκου, η οποία συνδέεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (HflC, SwissProt#: A4XPZ0).



**Εικόνα 3.5 :** Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (BN/SDS-PAGE) του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου, καλλιεργημένο σε θρεπτικό υλικό L.B.

No. of spot	Identified protein	Mascot score	Protein MW	pI-Value	Swissprot no.	Localization	GRAVY
1	dihydrolipoamide succinyltransferase [Pseudomonas fluorescens Pf0-1]	310	42251	5.30	Q3KFU8	cytoplasmic	0,155
2	HflK protein [Pseudomonas mendocina ymp]	453	43072	4.90	A4XPY9	cytoplasmic membrane	-0,643
3	HflC protein [Pseudomonas mendocina ymp]	232	33007	9.40	A4XPZ0	cytoplasmic	-0,422
4	chaperonin GroEL [Pseudomonas putida KT2440]	188	56765	4.80	Q88N55	cytoplasmic	0,018
5	hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family protein [Pseudomonas mendocina ymp]	513	113532	5.40	A4XYP8	cytoplasmic membrane	0,324
6	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	450	64062	6.00	Q9I3D5	cytoplasmic membrane	-0,180
7	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	281	26765	7.50	Q9I3D4	cytoplasmic membrane	-0,212
8	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A [Pseudomonas mendocina ymp]	394	48406	6.40	A4XSP3	cytoplasmic membrane	-0,006
9	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit F [Pseudomonas mendocina ymp]	159	46039	4.80	A4XSP8	cytoplasmic membrane	-0,242
10	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit B [Pseudomonas mendocina ymp]	77	44120	7.03	A4XSP4	cytoplasmic membrane	0,610
11	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit C [Pseudomonas stutzeri A1501]	79	28523	5.50	A4VMV2	cytoplasmic membrane	-0,124
12	surface antigen (D15) [Pseudomonas mendocina ymp]	99	87173	4.70	A4XWT3	outer membrane	-0,306
13	acyl-CoA dehydrogenase [Pseudomonas mendocina ymp]	247	89054	5.70	A4XTL3	cytoplasmic membrane	0,071
14	hypothetical protein Pmen_2077 [Pseudomonas mendocina ymp]	69	56668	8.70	A4XU22	cytoplasmic membrane	0,310
15	protein of unknown function DUF513, hemX [Pseudomonas mendocina ymp]	210	41217	4.80	A4XNZ0	cytoplasmic membrane	-0,460
16	secretion protein HlyD family protein [Pseudomonas mendocina ymp]	80	38349	7.80	A4XP25	cytoplasmic membrane	-0,216
17	organic solvent tolerance protein [Pseudomonas mendocina ymp]	164	106928	5.16	A4XZJ1	outer membrane	-0,677
18	OmpF family protein [Pseudomonas mendocina ymp]	148	34795	4.70	A4XU37	outer membrane	-0,391
19	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II [Pseudomonas mendocina ymp]	265	22852	6.70	A4XVJ5	cytoplasmic membrane	-0,329

20	outer membrane lipoprotein Oprl [Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000]	150	8865	9.30	Q883S8	outer membrane	-0,457
21	organic solvent tolerance protein [Pseudomonas mendocina ymp]	283	106928	5.00	A4XZJ1	outer membrane	-0,677
22	hypothetical protein PA5232 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	76	38586	9.50	Q9HTV8	cytoplasmic membrane	-0,108
23	TonB-dependent siderophore receptor [Pseudomonas mendocina ymp]	153	87450	4.90	A4XVR4	outer membrane	-0,374
24	putative outer membrane receptor [Pseudomonas stutzeri A1501]	171	80634	4.80	A4VI97	outer membrane	-0,457
25	ABC-type uncharacterized transport system involved in gliding motility auxiliary component-like protein [Pseudomonas mendocina ymp]	272	67924	4.80	A4XWV9	cytoplasmic membrane	-0,182
26	hypothetical protein PFL_3532 [Pseudomonas fluorescens Pf-5]	73	63925	5.10	Q4KAU8	outer membrane	-0,244
27	F0F1 ATP synthase subunit alpha [Pseudomonas mendocina ymp]	330	55486	5.30	Q9HT18	cytoplasmic membrane	-0,073
28	F0F1 ATP synthase subunit beta [Pseudomonas mendocina ymp]	690	49641	4.80	A4Y187	cytoplasmic membrane	-0,105
29	MotA/TolQ/ExbB proton channel [Pseudomonas mendocina ymp]	196	48289	5.50	A4XZ52	cytoplasmic membrane	0,066
30	GGDEF domain-containing protein [Pseudomonas fluorescens Pf-5]	31	58246	6.10	Q4KF29	cytoplasmic membrane	-0,071
31	amino acid carrier protein [Pseudomonas mendocina ymp]	46	53329	8.90	A4XPB8	cytoplasmic membrane	0,543
32	OmpF family protein [Pseudomonas mendocina ymp]	63	34795	4.70	A4XU37	outer membrane	-0,391
33	cytochrome c1-like protein [Pseudomonas mendocina ymp]	161	29304	7.70	A4XQQ7	cytoplasmic membrane	-0,146
34	OmpA/MotB domain-containing protein [Pseudomonas mendocina ymp]	245	22156	4.50	A4XS71	outer membrane	0,088
35	outer membrane lipoprotein Blc [Pseudomonas fluorescens Pf-5]	52	21974	9.80	Q4KJP2	outer membrane	-0,460
36	OmpA domain-containing protein [Pseudomonas mendocina ymp]	430	17804	5.20	A4XRS7	outer membrane	-0,340
37	outer membrane protein OprG [Pseudomonas stutzeri A1501]	58	23928	4.60	A4VHP3	outer membrane	0,104
38	hypothetical protein Pmen_2977 [Pseudomonas mendocina ymp]	168	21670	6.40	A4XWL6	outer membrane	-0,391

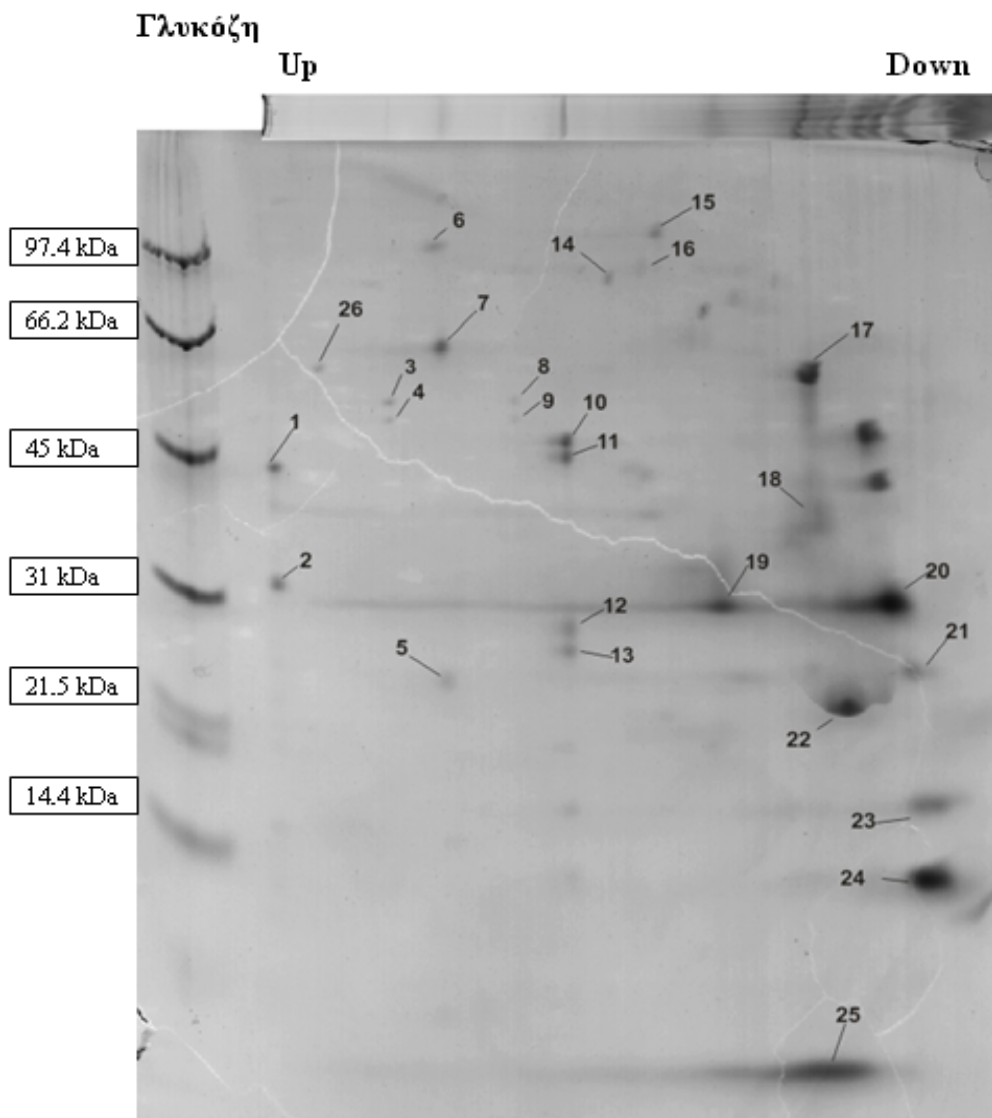
**Πίνακας 3.1 :** Ταυτοποιημένες πρωτεΐνες από την 2D - BN/SDS-PAGE του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου, καλλιιεργημένο σε θρεπτικό υλικό L.B

### 3.4.2 Μεμβρανικό κλάσμα του βακτηρίου καλλιεργημένου σε σουκρόζη

Στην Εικόνα 3.6 παρουσιάζονται τα πρωτεϊνικά στίγματα που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (BN/SDS-PAGE), του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου καλλιεργημένου σε σουκρόζη. Προέκυψαν 33 πρωτεϊνικά στίγματα, εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 26 με MALDI-TOF/TOF (MS/MS) (Πίνακας 3.2).

Από την ταυτοποίηση προέκυψε ότι μετά από τις διαδοχικές διεργασίες που περιγράφηκαν και παραπάνω (§ 3.3.2) απομονώθηκαν 15 πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, 10 πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης και 1 κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες με τα χαρακτηριστικά τους (Mascot score, MW, pI, Swissprot No., localization, GRAVY).

Όσον αφορά στις λειτουργίες των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών παρατηρείται ότι και στην περίπτωση της σουκρόζης οι πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης επιτελούν εν γένει τις λειτουργίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Συγκεκριμένα οι 14 από τις 15 πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης απαντώνται και στην περίπτωση της καλλιέργειας σε θρεπτικό L.B., ενώ η διαφορά που εντοπίζεται αφορά δύο διαφορετικές υπομονάδες του ίδιου συμπλόκου και συγκεκριμένα του συμπλόκου κυτοχρωμάτων b-c1 (ή σύμπλοκο III), με την υπομονάδα του κυτοχρώματος b να ταυτοποιείται στην περίπτωση της σουκρόζης, ενώ αυτή του κυτοχρώματος c1 στην περίπτωση του L.B. Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης και πάλι εμφανίζονται να είναι σε μεγάλο βαθμό οι ίδιες με την περίπτωση του θρεπτικού L.B, ωστόσο υπάρχει διαφορά σε τρεις από αυτές: μία λιποπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των RND (Resistance-Nodulation-cell Division) αντλιών εκροής, μία πρωτεΐνη που ανήκει στο σύστημα μεταφορέων TRAP με εξειδίκευση στη μεταφορά μαννιτόλης και χλωροαρωματικών ενώσεων καθώς και μία πορίνη που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της σουκρόζης (LamB, SwissProt#:A4XRF5). Η μοναδική κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε είναι μία σαπερόνη, η ίδια που απαντάται και στην περίπτωση της καλλιέργειας με θρεπτικό L.B.



**Εικόνα 3.6:** Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (BN/SDS-PAGE) του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου, καλλιεργημένο σε σουκρόζη.



No. of spot	Identified protein	Mascot score	Protein MW	pI-Value	Swissprot no.	Localization	GRAVY
1	HflK protein [Pseudomonas mendocina ymp]	252	43072	5.09	A4XPY9	cytoplasmic membrane	-0,643
2	HflC protein [Pseudomonas mendocina ymp]	114	33007	8.98	A4XPZ0	cytoplasmic	-0,422
3	F0F1 ATP synthase subunit alpha [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	103	55530	5.22	Q9HT18	cytoplasmic membrane	-0,073
4	F0F1 ATP synthase subunit beta [Pseudomonas mendocina ymp]	164	49641	4.94	A4Y187	cytoplasmic membrane	-0,105
5	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit [Pseudomonas mendocina ymp]	190	26662	6.59	A4XV94	cytoplasmic membrane	-0,155
6	hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family protein [Pseudomonas mendocina ymp]	245	113532	5.40	A4XYP8	cytoplasmic membrane	0,324
7	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit [Pseudomonas mendocina ymp]	280	64108	6.08	A4XV95	cytoplasmic membrane	-0,167
8	F0F1 ATP synthase subunit alpha [Pseudomonas mendocina ymp]	106	55486	5.40	Q9HT18	cytoplasmic membrane	-0,073
9	F0F1 ATP synthase subunit beta [Pseudomonas mendocina ymp]	123	49641	4.94	A4Y187	cytoplasmic membrane	-0,105
10	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A [Pseudomonas mendocina ymp]	434	48406	6.33	A4XSP3	cytoplasmic membrane	-0,006
11	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit F [Pseudomonas mendocina ymp]	308	46057	4.97	A4XSP8	cytoplasmic membrane	-0,242
12	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit B [Pseudomonas mendocina ymp]				A4XSP4	cytoplasmic membrane	0,610
13	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit C [Pseudomonas stutzeri A1501]	87	28523	5.50	A4VMV2	cytoplasmic membrane	-0,124
14	acyl-CoA dehydrogenase [Pseudomonas mendocina ymp]	115	89054	5.74	A4XTL3	cytoplasmic membrane	0,071
15	organic solvent tolerance protein [Pseudomonas mendocina ymp]	77	106928	5.16	A4X2J1	outer membrane	-0,677
16	RND efflux system outer membrane lipoprotein [Pseudomonas mendocina ymp]	127	52181	4.98	A4XYP9	outer membrane	-0,245
17	hypothetical protein PFL_3532 [Pseudomonas fluorescens Pf-5]	119	63925	5.22	Q4KAU8	outer membrane	-0,244
18	TRAP-type mannitol/chloroaromatic compound transport system, periplasmic component [Pseudomonas stutzeri A1501]	40	43760	5.77	A4VFX8	outer membrane	-0,277
19	OprF [Pseudomonas mendocina]	94	33857	4.87	Q9X4S2	outer membrane	-0,391

20	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b [Pseudomonas stutzeri A1501]	80	45767	8.22	A4VIG0	cytoplasmic membrane	0,648
21	OprF [Pseudomonas recinovorans]	76	36370	4.53	Q9X4S2	outer membrane	-0,391
22	porin, LamB type [Pseudomonas mendocina ymp]	134	45963	5.33	A4XRF5	outer membrane	-0,540
23	OmpA domain-containing protein [Pseudomonas mendocina ymp]	222	17804	5.30	A4XRS7	outer membrane	-0,340
24	outer membrane protein OprG [Pseudomonas stutzeri A1501]	75	23928	4.73	A4VHR3	outer membrane	0,104
25	outer membrane lipoprotein OprI [Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000]	179	8865	7.88	Q883S8	outer membrane	-0,457
26	chaperonin GroEL [Pseudomonas putida KT2440]	154	56765	4.80	Q88N55	cytoplasmic membrane	0,018

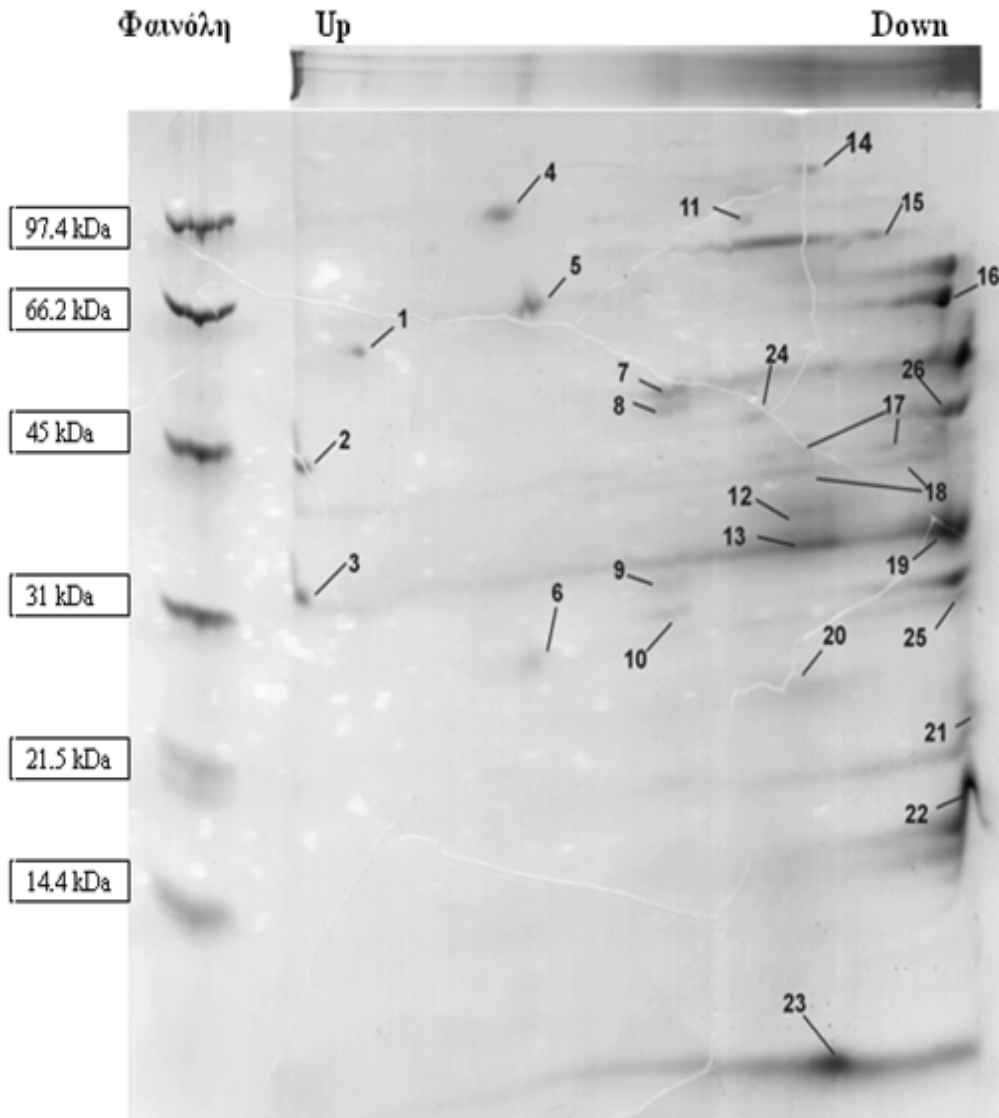
**Πίνακας 3.2 :** Ταυτοποιημένες πρωτεΐνες από την 2D - BN/SDS-PAGE του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου, καλλιεργημένο σε σουκρόζη.

### 3.4.3 Μεμβρανικό κλάσμα του βακτηρίου καλλιεργημένου σε φαινόλη

Στην Εικόνα 3.7 παρουσιάζονται τα πρωτεϊνικά στίγματα που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (BN/SDS-PAGE), του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου καλλιεργημένου σε φαινόλη. Προέκυψαν 32 πρωτεϊνικά στίγματα, εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 27 με MALDI-TOF/TOF (MS/MS) (Πίνακας 3.3).

Από την ταυτοποίηση προέκυψε ότι μετά από τις διαδοχικές διεργασίες που περιγράφηκαν και παραπάνω (§ 3.3.2) απομονώθηκαν 14 πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, 10 πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης και 2 κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, καθώς και μία υποθετική πρωτεΐνη που είναι πιθανότατα πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης, αφού μέσω του προγράμματος TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>), βρέθηκε ότι διαθέτει μία διαμεμβρανική  $\alpha$ -έλικα. Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες με τα χαρακτηριστικά τους (Mascot score, MW, pI, Swissprot No., localization, GRAVY).

Όσον αφορά στις λειτουργίες των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών παρατηρείται ότι και στην περίπτωση της φαινόλης οι πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης επιτελούν εν γένει τις λειτουργίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Συγκεκριμένα οι 10 από τις 14 πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης απαντώνται και στις περιπτώσεις της καλλιέργειας σε θρεπτικό L.B. και σε σουκρόζη. Υπάρχουν 3 κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες οι οποίες απαντώνται από κοινού στην περίπτωση της καλλιέργειας σε φαινόλη και θρεπτικό L.B και μία, που απαντάται από κοινού στην περίπτωση της καλλιέργειας σε φαινόλη και σουκρόζη. Επίσης από τις 10 πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης, οι 8 εμφανίζονται και στις τρεις περιπτώσεις, ενώ μία είναι η πρωτεΐνη που ανήκει στο σύστημα μεταφορέων TRAP (SwissProt#: A4VFX8), με εξειδίκευση στη μεταφορά μαννιτόλης και χλωροαρωματικών ενώσεων και βρίσκεται επίσης στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων που αναπτύσσονται με πηγή άνθρακα τη σουκρόζη και άλλη μία πορίνη η οποία εμφανίζεται μόνο στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων που αναπτύσσονται με πηγή άνθρακα τη φαινόλη.



**Εικόνα 3.7 :** Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (BN/SDS-PAGE) του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου, καλλιεργημένο σε φαινόλη.

No. of spot	Identified protein	Mascot score	Protein MW	pI-Value	Swissprot no.	Localization	GRAVY
1	chaperonin GroEL [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	76	57107	4.90	P30718	Cytoplasmic	0,034
2	HflK protein [Pseudomonas mendocina ymp]	328	43072	4.90	A4XPY9	Cytoplasmic membrane	-0,643
3	HflC protein [Pseudomonas mendocina ymp]	141	33007	8.98	A4XPZ0	Cytoplasmic	-0,422
4	hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family protein [Pseudomonas mendocina ymp]	394	113532	5.40	A4XYP8	Cytoplasmic membrane	0,324
5	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit [Pseudomonas mendocina ymp]	574	64108	6.10	A4XV95	Cytoplasmic membrane	-0,167
6	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	171	26765	7.50	Q9I3D4	Cytoplasmic membrane	-0,212
7	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A [Pseudomonas mendocina ymp]	384	48406	6.40	A4XSP3	Cytoplasmic membrane	-0,006
8	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit F [Pseudomonas mendocina ymp]	285	46039	4.80	A4XSP8	periplasm	-0,242
9	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit B [Pseudomonas mendocina ymp]	65	44120	7.03	A4XSP4	Cytoplasmic membrane	0,610
10	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit C [Pseudomonas stutzeri A1501]	79	28523	5.50	A4VMV2	Cytoplasmic membrane	-0,124
11	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	171	26765	7.50	Q9I3D4	Cytoplasmic membrane	-0,212
12	OmpF family protein [Pseudomonas mendocina ymp]	84	34795	4.70	A4XU37	Outer membrane	-0,391
13	OmpF family protein [Pseudomonas mendocina ymp]	92	34795	4.70	A4XU37	Outer membrane	-0,391
14	organic solvent tolerance protein [Pseudomonas mendocina ymp]	301	106928	5.00	A4XZJ1	Outer membrane	-0,677
15	hypothetical protein Pmen_0789 [Pseudomonas mendocina ymp]	162	78483	4.90	A4XQE1	Cytoplasmic membrane	0,162
16	hypothetical protein PFL_3532 [Pseudomonas fluorescens Pf-5]	107	63925	5.10	Q4KAU8	Outer membrane	-0,244
17	secretion protein HlyD family protein [Pseudomonas mendocina ymp]	97	38349	7.80	A4XP25	Cytoplasmic membrane	-0,216
18	TRAP-type mannitol/chloroaromatic compound transport system, periplasmic component [Pseudomonas stutzeri A1501]	104	43760	5.70	A4VFX8	Outer membrane	-0,277
19	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b [Pseudomonas stutzeri A1501]	115	45767	8.90	A4VIG0	Cytoplasmic membrane	0,648

20	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II [Pseudomonas mendocina ymp]	244	22852	6.70	A4XVJ5	Cytoplasmic membrane	-0,329
21	OmpA domain-containing protein [Pseudomonas mendocina ymp]	201	17804	5.20	A4XRS7	Outer membrane	-0,340
22	outer membrane protein OprG [Pseudomonas stutzeri A1501]	51	23928	4.60	A4VHR3	Outer membrane	0,104
23	outer membrane lipoprotein OprI [Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000]	146	8865	7.88	Q883S8	Outer membrane	-0,457
24	protein of unknown function DUF513, hemX [Pseudomonas mendocina ymp]	82	41217	4.80	A4XNZD	Cytoplasmic membrane	-0,460
25	Hypothetical protein MDG893_16757 [Marinobacter algicola DG893]	100	50108	5.80	A6EXX6	Unknown (non cytoplasmic)	-0,520
26	OmpA/MotB domain-containing protein [Pseudomonas mendocina ymp]	161	22156	4.65	A4X571	Outer membrane	0,088
27	porin [Pseudomonas stutzeri A1501]	128	46953	5.53	A4VM31	Outer membrane	-0,463

**Πίνακας 3.3 :** Ταυτοποιημένες πρωτεΐνες από την 2D - BN/SDS-PAGE του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηρίου, καλλιεργημένο σε φαινόλη.

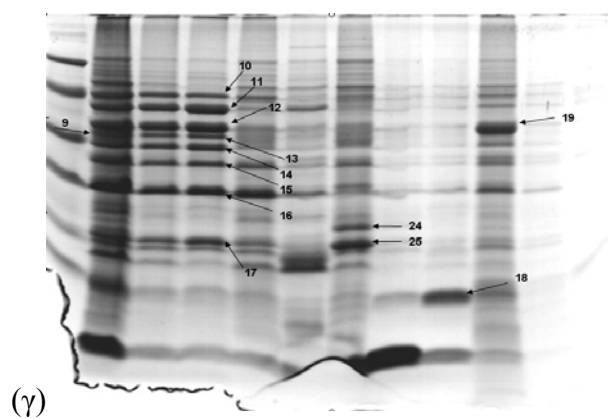
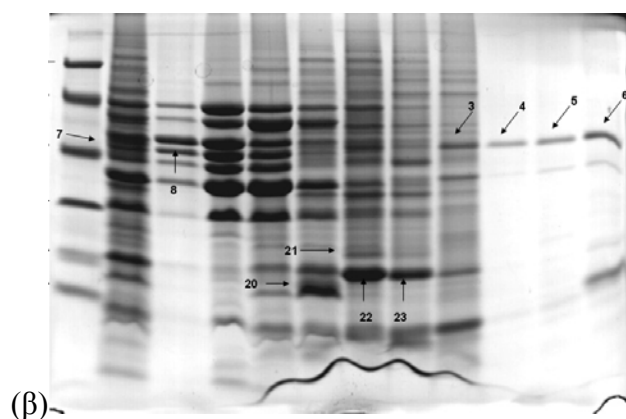
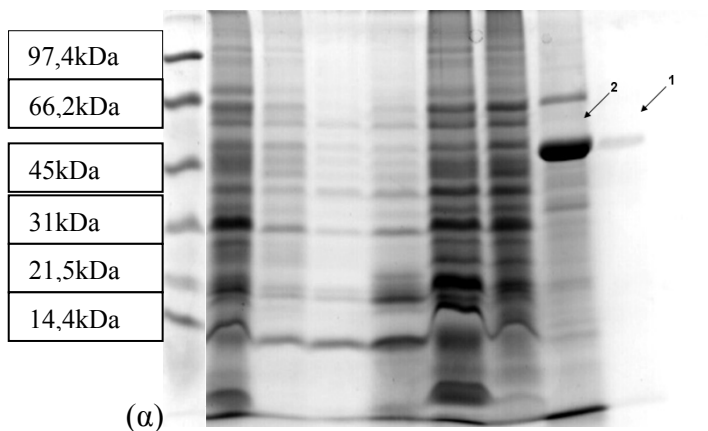
### 3.5 Ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση

Η μεθοδολογία της ισοηλεκτρικής εστίασης σε υγρή φάση που περιγράφηκε στην παράγραφο §2.12 αποτελεί μια διαφορετική προσέγγιση με σκοπό την ανάλυση του μεμβρανικού πρωτεόματος σε σχέση με τη λειτουργική πρωτεομική ανάλυση που περιγράφηκε παραπάνω. Πρόκειται για ένα σύνολο πειραμάτων στο οποίο εκτός από τη μεθοδολογία αυτή καθ'εαυτή μελετήθηκαν και διάφοροι παράγοντες που σχετίζονται τόσο με την επεξεργασία του δείγματος, όσο και με τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η ισοηλεκτρική εστίαση.

Συγκεκριμένα, αρχικά πραγματοποιήθηκε διαλυτοποίηση του μεμβρανικού κλάσματος μετά από την επεξεργασία του με το sodium N-laurylsarcosinate, με το μη ιοντικό απορρυπαντικό Triton X-100 σε συγκέντρωση 2%(w/v) και χρησιμοποιώντας για τη διαλυτοποίηση ρυθμιστικό διάλυμα Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8 συγκέντρωσης 50mM, ενώ χρησιμοποιήθηκαν οι ηλεκτρολύτες 0.1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> για την άνοδο και 0.1M NaOH για την κάθοδο (Εικόνα 3.8(α)). Μια άλλη περίπτωση ήταν η διαλυτοποίηση με το μη ιοντικό απορρυπαντικό n- Dodecyl-β-D-Maltoside σε συγκέντρωση 3% (w/v), με Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8 συγκέντρωσης 10mM και με ηλεκτρολύτες 0.1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> για την άνοδο και 0.1M NaOH για την κάθοδο(Εικόνα 3.8(β)). Τέλος, μια τρίτη προσέγγιση έγινε με το απορρυπαντικό n- Dodecyl-β-D-Maltoside σε συγκέντρωση 3% (w/v), με Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8 συγκέντρωσης 10mM και με ηλεκτρολύτες 0.5M οξικό οξύ για την άνοδο και 0.5M αιθανολαμίνη για την κάθοδο(Εικόνα 3.8(γ)).

Η επιλογή για τη μείωση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος κατά τη διαλυτοποίηση έγινε καθώς η ισοηλεκτρική εστίαση επηρεάζεται αρνητικά σε υψηλή συγκέντρωση αλάτων, οπότε και δεν επιτυγχάνεται η κλασματοποίηση του δείγματος, όπως φαίνεται στην πρώτη περίπτωση (Εικόνα 3.8(α)). Η δεύτερη περίπτωση περιλαμβάνει τη χρήση διαφορετικού απορρυπαντικού που χρησιμοποιείται ευρέως για τη διαλυτοποίηση μεμβρανικών κλασμάτων που προέρχονται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια, αλλά και τη μείωση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος διαλυτοποίησης, που οδηγεί τελικώς σε καλύτερη κλασματοποίηση του δείγματος (Εικόνα 3.8(β)). Σε μια τρίτη περίπτωση η αλλαγή αφορά τους ηλεκτρολύτες, οι οποίοι επιλέχθηκαν τελικώς καθώς προτείνονται ως καταλληλότεροι για την ισοηλεκτρική εστίαση με εύρος pH 4-6, οπότε και τελικώς παρατηρείται καλύτερη διακύμανση του pH μεταξύ των επιμέρους κλασμάτων (Πίνακας 3.4). Στις αποδιατακτικές πηκτές πολυακρυλαμιδίου (SDS-Tricine/PAGE) που φαίνονται παρακάτω, στην περίπτωση της διαλυτοποίησης με Triton-X100, έχουν φορτωθεί τα 10 κλάσματα που συλλέχθηκαν μετά το πέρας της ισοηλεκτρικής εστίασης στη συσκευή MicroRotofor, ενώ στις άλλες δύο περιπτώσεις

έχει φορτωθεί επιπλέον και το αρχικό διαλυτοποιημένο μεμβρανικό κλάσμα αμέσως μετά από το πρωτεϊνικό διάλυμα αναφοράς.



Sample	Protein Name	Organism	MW	pI	Mascot score
1	hypothetical protein MDG893_16757	Marinobacter algicola DG893	50108	5,8	96
2	hypothetical protein MDG893_16757	Marinobacter algicola DG893	50108	5,8	167
3	hypothetical protein MDG893_16757	Marinobacter algicola DG893	50108	5,8	153
4	hypothetical protein MDG893_16757	Marinobacter algicola DG893	50108	5,8	91
6	hypothetical protein MDG893_16757	Marinobacter algicola DG893	50108	5,8	143
7	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A aromatic hydrocarbon degradation protein	Pseudomonas mendocina ymp	48406	6,33	214
8	aromatic hydrocarbon degradation protein	Dechloromonas aromatica RCB	48918	6,67	78
9	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A aromatic hydrocarbon degradation protein	Dechloromonas aromatica RCB	48918	6,67	88
		Pseudomonas mendocina ymp	48406	6,33	187
		Dechloromonas aromatica RCB	48918	6,67	86
11	hypothetical protein Pmen_1134	Pseudomonas mendocina ymp	64649	5,08	188
13	aromatic hydrocarbon degradation protein	Dechloromonas aromatica RCB	48918	6,67	100
14	porin	Pseudomonas stutzeri A1501	46953	5,53	127
15	OprF	Pseudomonas mendocina	33857	4,92	164
16	OprF	Pseudomonas mendocina	33857	4,92	146
17	outer membrane protein OprG	Pseudomonas stutzeri A1501	23928	4,73	62
19	hypothetical protein MDG893_16757	Marinobacter algicola DG893	50108	5,8	103
20	OmpA domain-containing protein	Pseudomonas mendocina ymp	17804	5,3	343
21	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	Pseudomonas mendocina ymp	26662	6,59	171
	50S ribosomal protein L3	Pseudomonas mendocina ymp	22536	9,77	90
	ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit	Pseudomonas mendocina ymp	21065	5,93	86
22	outer membrane protein OprG	Pseudomonas stutzeri A1501	23928	4,73	62
23	hypothetical protein Pmen_2977	Pseudomonas mendocina ymp	21670	6,28	136
	outer membrane protein OprG	Pseudomonas stutzeri A1501	23928	4,73	41

**Εικόνα 3.8:** SDS-Tricine-PAGE μετά από ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση και ταυτοποιήσεις πρωτεϊνών με MALDI-TOF/TOF

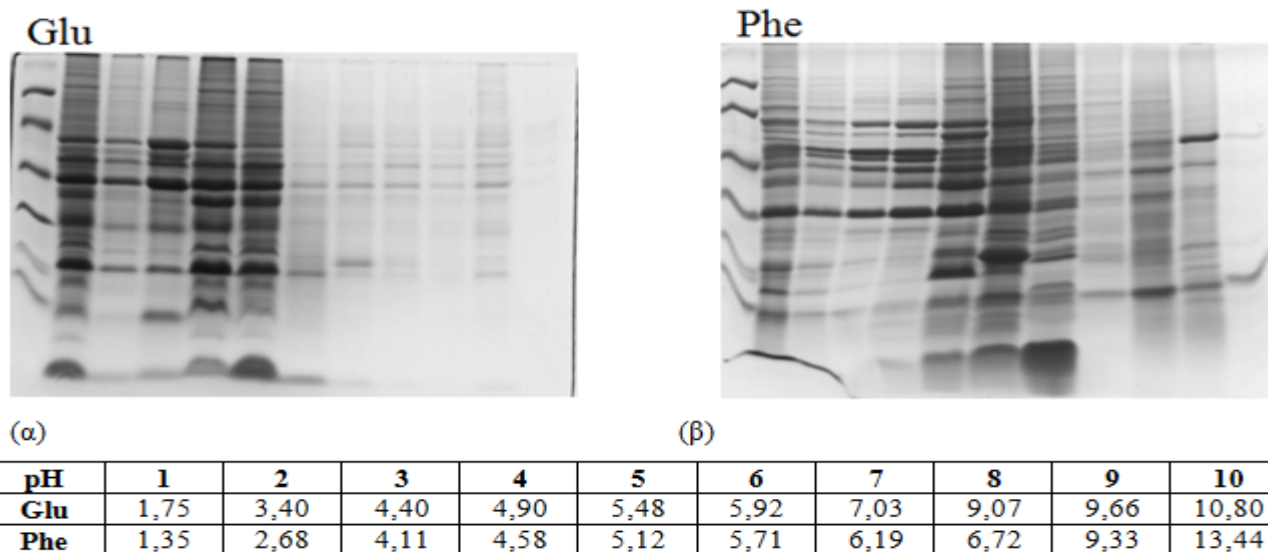


<i>pH</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>
( $\alpha$ )	1,28	3,23	4,60	5,07	5,53	6,26	8,55	10,00	11,78	13,40
( $\beta$ )	1,96	4,15	4,51	4,91	5,70	6,20	6,85	8,89	9,22	11,38
( $\gamma$ )	1,70	3,24	4,47	4,79	5,38	5,9	6,64	9,47	10,50	12,60

**Πίνακας 3.4:** Μέτρηση pH των 10 επιμέρους κλασμάτων που συλλέχθηκαν για τις τρεις διαφορετικές περιπτώσεις που φαίνονται και στην Εικόνα 3.8.

Στην Εικόνα 3.8 παρουσιάζονται ορισμένες ταυτοποιήσεις που έγιναν με φασματοσκοπία μάζας MALDI/TOF-TOF. Στον πίνακα που παρατίθεται στην εικόνα φαίνονται οι 19 από τις 25 πρωτεϊνικές μπάντες που επιλέχθηκαν και τελικώς ταυτοποιήθηκαν. Με κίτρινο χρώμα φαίνονται πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν με έγκυρο, οριακό ωστόσο score.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αφορούν το διαλυτοποιημένο μεμβρανικό κλάσμα που προέρχεται από την περίπτωση όπου το βακτήριο καλλιεργείται με πηγή άνθρακα τη φαινόλη. Τέλος στην Εικόνα 3.9 παρουσιάζεται η ισοηλεκτρική εστίαση που πραγματοποιήθηκε για τα διαλυτοποιημένα μεμβρανικά κλάσματα που προέρχονται από καλλιέργειες φαινόλης (Εικόνα 3.9(α)) και σουκρόζης (Εικόνα 3.9(β)), χρησιμοποιώντας 1,5% (w/v) n- Dodecyl- $\beta$ -D-Maltoside, με βάση τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν στην παράγραφο § 3.3, ενώ οι επιλέχθηκαν οι συνθήκες που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα με βάση τα παραπάνω πειράματα, δηλαδή διαλυτοποίηση με Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8 συγκέντρωσης 10mM και τη χρήση των ηλεκτρολυτών 0.5M οξικό οξύ για την άνοδο και 0.5M αιθανολαμίνη για την κάθοδο.



**Εικόνα 3.9:** Ισοηλεκτρική εστίαση σε συσκευή MicroRotor για τα μεμβρανικά κλάσματα που προέρχονται από καλλιέργειες (α) σουκρόζης (Glu) και (β) φαινόλης (Phe).

Έχει παρατηρηθεί ότι για την περίπτωση της φαινόλης υπάρχει επαναληψιμότητα στο τελικό μοτίβο της κλασματοποίησης που επιτυγχάνεται μέσω της ισοηλεκτρικής εστίασης σε υγρή φάση, υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν, κάτι το οποίο δεν έχει ελεγχθεί και για την περίπτωση της σουκρόζης.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.9, παρατηρούνται αλλαγές τόσο στο τελικό μοτίβο κλασματοποίησης, όσο και στις τιμές του pH κυρίως για τα κλάσματα 1, 2 και 8-10, μεταξύ των δύο διαφορετικών πηγών άνθρακα, γεγονός που θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 4.1 Πρωτεομική ανάλυση των μεμβρανών του βακτηρίου *Pseudomonas* rhDV1

#### 4.1.1 Κατεργασία των απομονωμένων μεμβρανών με EDTA

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη του μεμβρανικού πρωτεώματος του *Pseudomonas* rhDV1 είναι η απομόνωση καθαρών μεμβρανών χωρίς προσμίξεις από υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα από τη χρήση διαφόρων απορρυπαντικών, δείχνουν ότι ένας μεγάλος αριθμός υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών παραμένει στις μεμβράνες [67]. 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 [68].

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε 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 απελευθερώνονται από τη μεμβράνη μέσω της μεταβολής της ιοντικής ισχύος του διαλύτη, κάτι που επιτυγχάνεται με τη χρήση του EDTA. Από το αποτέλεσμα που προκύπτει από την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακυλαμιδίου (Εικόνα 3.2), παρατηρείται ότι ένα ποσοστό πρωτεϊνών απομακρύνεται με την πλύση του μεμβρανικού κλάσματος με το EDTA, οι οποίες θεωρητικά και με βάση προηγούμενες μελέτες [67] είναι πιθανότατα ένα μεγάλο κομμάτι ριβοσωμικών πρωτεϊνών.

#### 4.1.2 Επεξεργασία των «πλυμένων» μεμβρανών με το N-Sodiumlaurylsarcosinate.

Με τη χρήση του ιοντικού απορρυπαντικού N-Sodiumlaurylsarcosinate έγινε μια προσπάθεια περαιτέρω καθαρισμού του απομονωμένου μεμβρανικού κλάσματος. Το απορρυπαντικό αυτό χρησιμοποιείται για την επιλεκτική διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών της εσωτερικής/κυτταροπλασματικής μεμβράνης των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων σε συγκεντρώσεις που είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (2% έναντι 0,1%) [45],[69]. Συνεπώς το ίζημα που συλλέγεται μετά την υπερφυγοκέντρωση περιλαμβάνει θεωρητικά ένα μίγμα πρωτεϊνών της εξωτερικής αλλά και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του βακτηρίου καθώς εξαιτίας της μικρής συγκέντρωσης του απορρυπαντικού (βρίσκεται οριακά πιο πάνω από τον παράγοντα CMC (Critical Micelle Concentration) για το απορρυπαντικό) οι πρωτεΐνες της τελευταίας έχουν τη δυνατότητα να διαλυτοποιηθούν σε μικρό βαθμό. Από την

άλλη ωστόσο, με το επιπλέον αυτό βήμα επιτυγχάνεται η απομάκρυνση από το μεμβρανικό αυτό κλάσμα ενός πολυ μεγάλου ποσοστού των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών που Έχουν παραμείνει στο κλάσμα μετά από την πλύση του με το EDTA. Πράγματι, από το αποτέλεσμα που προκύπτει από την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακυλαμιδίου (Εικόνα 3.2), παρατηρείται ότι μεγάλο ένα ποσοστό πρωτεϊνών απομακρύνεται, κάτι που έχει αποδειχθεί και με τη φόρτωση των υπερκειμένων στην αντίστοιχη πηκτή (στοιχεία που δεν παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία), οι οποίες θεωρητικά είναι πρωτεΐνες του περιπλασματικού χώρου, καθώς και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες η λειτουργία των οποίων συνδέεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη.

#### 4.1.3 Διαλυτοποίηση των μεμβρανών με το μη ιοντικό απορρυπαντικό n- Dodecyl-β-D-Maltoside

Με τη διαλυτοποίηση του μεμβρανικού κλάσματος με το n- Dodecyl-β-D-Maltoside επιτυγχάνεται η απομόνωση του τελικού μεμβρανικού κλάσματος απαλλαγμένου από προσμίξεις που προέρχονται από τα υπόλοιπα κυτταρικά διαμερίσματα. Μελετήθηκε η ιδανική συγκέντρωση του απορρυπαντικού για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα διαλυτοποίησης, ενώ η εκτίμηση έγινε ιδιαίτερα με βάση τη διαλυτοποίηση των μεμβρανικών συμπλόκων, η προσέγγιση και ανάλυση των οποίων αποτελεί έναν από τους κύριους στόχους της παρούσας εργασίας. Επιλέχθηκε ως καλύτερη η συγκέντρωση 1,5% w/v, κάτι που προέκυψε από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων από την αποδιατακτική, αλλά και από τη μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Η μελέτη της ιδανικής συγκέντρωσης απορρυπαντικού για τη διαλυτοποίηση των μεμβρανών είναι ένα σημαντικό βήμα, καθώς εκτός του ότι η διαλυτοποίηση θα πρέπει να πραγματοποιείται σε συγκεντρώσεις απορρυπαντικού που αντιστοιχούν σε τιμές πάνω από την τιμή CMC (Critical Micelle Concentration), μεγάλο ρόλο παίζει και η επιλογή του απορρυπαντικού, που θα πρέπει να είναι ήπιο στην περίπτωση μελέτης μεμβρανικών συμπλόκων, ενώ η επιλογή της συγκέντρωσης σε αυτή την περίπτωση εξαρτάται από το εύρος των συμπλόκων που πρόκειται να μελετηθεί. Έτσι συνίσταται πλήρης διαλυτοποίηση για τη μελέτη του συνόλου των μεμβρανικών συμπλόκων με τη χρήση αυξημένης συγκέντρωσης απορρυπαντικού, ενώ μειωμένη συγκέντρωση απορρυπαντικού συνίσταται για τη μελέτη μεγάλων συμπλόκων, που αποτελούνται από επιμέρους πρωτεϊνικά σύμπλοκα, επιλέγοντας ένα απορρυπαντικό που δεν επηρεάζει τις διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ των επιμέρους συμπλόκων [70].

#### 4.1.4 Λειτουργική ανάλυση του μεμβρανικού κλάσματος με 2-D BN/SDS-Tricine-PAGE

Οι ταυτοποιήσεις που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων με σκοπό το διαχωρισμό των επιμέρους συμπλόκων που συνιστούν το τελικό διαλυτοποιημένο σε DDM μεμβρανικό κλάσμα, έδειξαν ότι το τελικώς απομονωμένο μεμβρανικό κλάσμα είναι σχεδόν απαλλαγμένο από υδατοδιαλυτές, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα των ταυτοποιήσεων, σε σχέση με την τοπολογία των πρωτεϊνών, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

	<b>φαινόλη</b>	<b>σουκρόζη</b>	<b>LB</b>
Πρωτεϊνικά στίγματα που αναλύθηκαν	32	33	41
Πρωτεϊνικά στίγματα που ταυτοποιήθηκαν	27	26	38
Πρωτεΐνες Εξωτερικής Μεμβράνης	10	10	14
Πρωτεΐνες Κυτταροπλασματικής Μεμβράνης	15	15	21
Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες	2	1	3

Τα γενικότερα σχόλια που αφορούν τις διαφορές που εντοπίζονται στο πρωτεϊνικό προφίλ του μεμβρανικού κλάσματος του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas* rhDV1 κατά την καλλιέργειά του με τις τρεις διαφορετικές πηγές άνθρακα, γίνονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Ωστόσο αξίζει να σημειωθούν κάποιες επιπλέον παρατηρήσεις, οι οποίες αφορούν τόσο μεμονομένες πρωτεΐνες που ενδεχομένως αλληλεπιδρούν με τα μεμβρανικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα, είτε απαντώνται ως τριμερή σε native συνθήκες, όσο και ορισμένα μεμβρανικά σύμπλοκα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που απαντώνται.

Στην πλειοψηφία τους οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν απαντώνται και στις τρεις πηγές άνθρακα, ενώ βρίσκονται κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του βακτηρίου. Στην περίπτωση της καλλιέργειας με L.B εντοπίστηκε και ταυτοποιήθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός πρωτεϊνικών στίγμάτων, όπου οι κύριες διαφορές εντοπίζονται σε δύο πρωτεΐνες-υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης, η μία εκ των οποίων είναι ένας TonB-εξαρτώμενος υποδοχέας, που έχει τη

δομή β-βαρελιού και είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά μεγάλων υδρόφιλων μορίων όπως είναι οι βιταμίνη B12, ενώ για τη δράση της απαιτείται η αλληλεπίδρασή της με την TonB πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης [71] και η άλλη είναι μια putative πρωτεΐνη-υποδοχέας, η οποία δεν έχει χαρακτηριστεί. Επίσης εντοπίζεται και μία λιποπρωτεΐνη στην εξωτερική μεμβράνη η οποία συμβάλλει στην προσαρμογή του κυττάρου σε συνθήκες οσμωτικού stress [72]. Στην περίπτωση της σουκρόζης, στην εξωτερική μεμβράνη εντοπίζεται η ειδική προς το υπόστρωμα πορίνη LamB, η οποία σχηματίζει τριμερές κάτι που επιβεβαιώνεται από την εικόνα της πηκτής και το σημείο στο οποίο εντοπίζεται η συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Η πορίνη αυτή εκφράζεται σε περιπτώσεις επαγωγής από μαλτόζη ή μαλτοδεξτρίνες και όχι από τη σουκρόζη [73], οπότε μπορούμε να υποθέσουμε ότι στο συγκεκριμένο στέλεχος όταν καλλιεργείται με μοναδική πηγή άνθρακα τη σουκρόζη, επάγεται η έκφραση μιας πρωτεΐνης η οποία παρουσιάζει υψηλή ομολογία με τη LamB πορίνη.

Επιπλέον, τα σύμπλοκα της εσωτερικής μεμβράνης που εντοπίζονται και στις τρεις περιπτώσεις όπως φαίνεται και από τους Πίνακες 3.1, 3.2 και 3.3, είναι τα εξής: το HflKC μεμβρανικό σύμπλοκο το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρωτεολυτική δραστηριότητα της ATPάσης FtsH που προσδένεται στη μεμβράνη και σχετίζεται με τον έλεγχο της ποιότητας των μεμβρανικών πρωτεϊνών, όντας υπεύθυνο για την αποικοδόμηση μεμβρανικών, αλλά και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών [74], τις A,F,B και C υπομονάδες του συμπλόκου της NADH-quinone reductase που είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά ιόντων Na και απαντάται κυρίως στις μεμβράνες ακραιόφιλων βακτηρίων, ενώ οι υπομονάδες D και E φαίνεται να εμφανίζονται στην πηκτή σε χαμηλότερα μοριακά βάρη σε σχέση με τις υπόλοιπες υπομονάδες, όπως είναι και το αναμενόμενο με βάση βιβλιογραφικές αναφορές, ωστόσο δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Εμφανίζεται επίσης και το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (flavoprotein και iron-sulfur υπομονάδες) που έχοντας οξειδοαναγωγική δραστηριότητα, συμμετέχει στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τέλος εμφανίζονται και οι υπομονάδες a και b του συμπλόκου της F0F1 ATP συνθάσης, στην περίπτωση της σουκρόζης ενδεχομένως ως τριμερές και στην περίπτωση του LB ως μονομερές.

Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι πρωτεϊνικά στίγματα τα οποία διαφοροποιούνται, εμφανώς με βάση την εικόνα της πηκτής στην περίπτωση της φαινόλης σε σχέση με τις άλλες δύο πηγές άνθρακα δεν ταυτοποιήθηκαν, κάτι που αναμένεται να μελετηθεί περαιτέρω.

## 4.2 Μελλοντικοί στόχοι

Ένα επόμενο βήμα στα πλαίσια της συνέχειας της παρούσας εργασίας είναι η ταυτοποίηση των μεμβρανικών συμπλόκων όπως αυτά διαχωρίζονται με βάση τη διαδικασία της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis, BN-PAGE), με μια διαφορετική

προσέγγιση, πέραν της ηλεκτροφόρησης δεύτερης διάστασης που ακολουθήθηκε. Αυτή είναι η υγρή χρωματογραφία (nano-LC) για τον περαιτέρω διαχωρισμό των πεπτιδίων με βάση τις χημικές τους ιδιότητες, μεθοδολογία που οδηγεί σε μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα όσον αφορά την ανάλυση των φασμάτων

που προκύπτουν από το επόμενο βήμα που είναι η φασματομετρία μάζας με την οργανολογία MALDI-TOF/TOF. Επιπλέον συμπληρωματικά θα ήταν ενδιαφέρουσα και η μελέτη του διαλυτοποιημένου στο N-laurylsarcosinate κλάσματος με την ίδια μεθοδολογία.

Θα πρέπει επίσης να δοθεί έμφαση στη διαδικασία της ισοηλεκτρικής εστίασης σε υγρή φάση, καθώς έχει αποδειχθεί σε ένα πρώτο στάδιο, από την παρούσα μελέτη, ότι τα δείγματα που προκύπτουν μετά από τη διαλυτοποίηση των μεμβρανών με το μη ιοντικό απορρυπαντικό DDM, κλασματοποιούνται επιτυχώς με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο, κάτι που φαίνεται και από τον περαιτέρω διαχωρισμό τους με 1D-SDS-Tricine/PAGE. Μέσω της ισοηλεκτρικής εστίασης σε υγρή φάση είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι παίρνουμε τα επιμέρους κλάσματα που προκύπτουν σε διαλυτή μορφή. Το εναλλακτικό επόμενο βήμα, πέραν του διαχωρισμού τους με πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, είναι η πρωτεόλυση των κλασμάτων σε διάλυμα (in-solution digestion) και η ανάλυση με nano-LC και MALDI-TOF/TOF στη συνέχεια, προκειμένου να πάρουμε αποτελέσματα σχετικά με την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών που περιέχονται στα διάφορα κλάσματα, καθώς η διαδικασία της ισοηλεκτρικής εστίασης πραγματοποιείται σε native συνθήκες, όπου τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα δεν επηρεάζονται όσο το δυνατόν από αποδιατακτικούς παράγοντες.

Ένας τελευταίος απώτερος στόχος είναι επίσης ο εντοπισμός και χαρακτηρισμός μεμβρανικών πρωτεϊνών ή/και πρωτεϊνικών συμπλόκων που επάγονται παρουσία της φαινόλης, καθώς και άλλων αρωματικών ρύπων και η δομική τους ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία, κατόπιν απομόνωσής τους.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Kieboom Jasper and De Bont Jan A.M., “Mechanisms of organic solvent tolerance bacteria”, *Bacterial Stress Responses*, chapter 25, pp 393-399, 2000.
- [2] Cao Bin, Nagarajan Karthiga & Loh Kai-Chee, “Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches”, *Appl Microbiol Biotechnol* 85:207–228, 2009.
- [3] Sardesai Y, Bhosle S. “Tolerance of bacteria to organic solvents”. *Res Microbiol* ;153:263–268, 2002.
- [4] Reardon, K. F., D. C. Mosteller and J. D. B. Rogers, “Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1”. *Biotechnol. Bioeng.* 69(4), 385-400, 2000.
- [5] Rogers, J. B. and K. F. Reardon, “Modeling substrate interactions during the biodegradation of mixtures of toluene and phenol by *Burkholderia species* JS150”. *Biotechnol. Bioeng.* 70(4), 428-435, 2000.
- [6] Wang, S. J. and K. C. Loh , “ New cell growth pattern on mixed substrates and substrate utilization in cometabolic transformation of 4-chlorophenol”. *Water Res.* 34(15), 3786-3794, 2000.
- [7] Patrauchan, M. A., C. Florizone, M. Dosanjh, W. W. Molm, J. Davies and L. D. Eltis, “Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp strain RHA1:redundancies and convergence”. *J. Bacteriol.* 187(12), 4050-4063, 2005.
- [8] Loh, K. C. and S. S. Chua, “*Ortho* pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of *meta* pathway at high substrate concentrations”. *Enzyme Microb. Technol.* 30(5), 620-626,2002.
- [9] Zaar, A., J. Gescher, W. Eisenreich, A. Bacher and G. Fuchs, “ New enzymes involved in aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*”. *Mol. Microbiol.* 54(1), 223-238, 2004.
- [10] Coates, J. D., R. Chakraborty, J. G. Lack, S. M. O'Connor, K. A. Cole, K. S. Bender and L. A. Achenbach, “Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*”. *Nature* 411(6841), 1039-1043, 2001.
- [11] Li, Y. and K. C. Loh “Activated carbon impregnated polysulfone hollow fiber membrane for cell immobilization and cometabolic biotransformation of 4- chlorophenol in the presence of phenol”. *J. Membr. Sci.* 276(1-2), 81-90,2006
- [12] Li, Y. and K. C. Loh “Continuous cometabolic transformation of 4- chlorophenol in the presence of phenol in a hollow fiber membrane bioreactor. *J. Environ. Eng. - ASCE* 132(3), 309-314, 2006.
- [13] Loh, K. C. and S. Ranganath , “External-loop fluidized bed airlift bioreactor (EFBAB) for the cometabolic biotransformation of 4-chlorophenol (4-cp) in the presence of phenol”. *Chem. Eng. Sci.* 60(22), 6313-6319,2005.



- [14] Carvalho, M. F., I. Vasconcelos, A. T. Bull and P. M. L. Castro “A GAC biofilm reactor for the continuous degradation of 4-chlorophenol: treatment efficiency and microbial analysis”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57(3), 419-426,2001.
- [15]Zhang, C. L. and G. N. Bennett , “Biodegradation of xenobiotics by anaerobic Bacteria”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(5), 600-618, 2005.
- [16] 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* NCIB 950 and *Pseudomonas fluorescence* NCIB 3756”, *International Journal of Environment and Pollution*, Volume 32, pp. 3-11,2008.
- [17] Nair C. Indu, Jayachandran & Shashidhar Shankar, “Biodegradation of phenol”, *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (25), pp. 4951-4958, 2008.
- [18] Paula M. van Schei, Young LY. “ Isolation and Characterization of phenol degrading denitrifying bacteria”. *Appl. Environ. Microbiol* 64(7):2432-2438,1998.
- [19] 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
- [20] Feng Zhao, Kittane Mayura, Richard W. Hutchinson, Richard P. Lewis, Robert C. Burghardt and Timothy D. Phillips, “Developmental toxicity and structure-activity relationships of chlorophenols using human embryonic palatal mesenchymal cells”*Toxicology Letters*,Volume 78, Issue 1, Pages 35-42, 1995
- [21] Babich H. and Davis D. L., “Phenol: A review of environmental and health risks” , Abstract, Volume 1, Issue 1, Pages 90-109, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*,1981.
- [22] Brock Biology of Microorganisms, Madigan M.T, Martinko J.M., Parker J., Tenth edition
- [23] J. Sikkema, J. A. M. de Bont, and B. Poolman, “Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons,” *Microbiol. Rev.*, vol. 59, pp. 201– 222, 1995.
- [24] Buchanan SK, S.B., Venkatramani L, Xia D, Esser L, Palnitkar M, Chakraborty R, van der Helm D, Deisenhofer J., “Crystal structure of the outer membrane active transporter *FepA* from *Escherichia coli*”. *Nat Struct Biol.*,6(1): p. 56-63,1999.
- [25] S. Isken, and J. A. M. de Bont, “Bacteria tolerant to organic solvents,” *Extremophiles*, vol. 2, pp. 229–238, 1998.
- [26] Koebnik R, L.K., Van Gelder P., “Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell”. *Mol Microbiol.*, 37(2): p. 239-253,2000.

- [27] H. J. Heipieper, G. Neumann, S. Cornelissen, and F. Meinhardt, "Solvent tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 74, pp. 961–973, 2007.
- [28] A. Segura, E. Duque, G. Mosqueda, J. L. Ramos, and F. Junker, "Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents," *Environ. Microbiol.*, vol. 1, pp. 191–198, 1999.
- [29] A. Segura, P. Godoy, P. van Dillewijn, A. Hurtado, N. Arroyo, S. Santacruz, and J. L. Ramos, "Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene," *J. Bacteriol.*, vol. 187, pp. 5937–5945, 2005.
- [30] H. C. Pinkart, and D.C. White, "Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains," *J. Bacteriol.*, vol. 179, pp. 4219–4226, 1997.
- [31] E. Duque, J. J. Rodriguez-Herva, J. de la Torre, P. Dominguez-Cuevas, J. Munoz-Rojas, and J. L. Ramos, "The RpoT regulon of *Pseudomonas putida* DOT-T1E and its role in stress endurance against solvents," *J. Bacteriol.*, vol. 189, pp. 207–219, 2007.
- [32] Lăzăroaie M. M., "Mechanisms Involved In Organic Solvent Resistance in Gram-Negative Bacteria", World Academy of Science, *Engineering and Technology*, 54,pp. 648-658, 2009.
- [33] Ramos JL, Duque E, Gallegos MT, Godoy P, Ramos-Gonzalez MI, Rojas A, et al. "Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria". *Annu Rev Microbiol.* 56:743–768,2002
- [34] William PA, Sayers JR , "The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*". *Biodegradation* 5:195–217, 1994.
- [35] Faizal Irvan, Kana Dozen, Chang Soo Hong Akio Kuroda, Noboru Takiguchi, Hisao Ohtake, Koji Takeda, Hiroshi Tsunekawa, Junichi Kato "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* , 32: 542–547, 2005.
- [36] Ramos-Gonzalez Maria-Isabel, Ben-Bassat A. , Campos Maria-Jesus, and Ramos J. L., "Genetic Engineering of a Highly Solvent-Tolerant *Pseudomonas putida* Strain for Biotransformation of Toluene to *p*-Hydroxybenzoate", *Applied and Environmental Microbiology*, p. 5120–5127, 2003.
- [37] Nelson E. K., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. P. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill et al. "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440", *Environmental Microbiology* , 4 (12), 799–808, 2002.
- [38] Kenneth N. Timmis, " *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist *par excellence*", *Environmental Microbiology* , 4(12), 779–781,2002.

- [39] Harwood C. S. and Parales R. E., "The *beta*-ketoacid pathway and the biology of self-identity". *Annu.Rev. Microbiol.* 50, 553-590, 1996.
- [40] Yang RD & Humphrey AE, Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures, *Biotechnol. Bioeng.* 17:1211- 1235, 1975.
- [41] Polymenakou P. N. , Stephanou E.G., Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil Pseudomonad, *Biodegradation* ,16: 403–413, 2005.
- [42] Tsirogianni Eirini, Aivaliotis Michalis, Michael Karas & Georgios Tsiotis, "Detection and characterisation of catechol 2,3-dioxygenase in an indigenous soil Pseudomonad by MALDI-TOF MS using a column separation", *Biodegradation* , 16: 181–186, 2005.
- [43] Tsirogianni Irene, Aivaliotis Michalis, Michael Karas, Georgios Tsiotis, "Mass spectrometric mapping of the enzymes involved in the phenol degradation of an indigenous soil pseudomonad", *Biochimica et Biophysica Acta* 1700 , 117–123, 2004.
- [44] Tsirogianni E. , Aivaliotis M., Papatiriu G.D., Karas M., and 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*, 30: 63–72, 2006.
- [45] Papatiriu 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.7,4278-4288, 2008.
- [46] Liebler Daniel C., "Introduction to Proteomics, Tools for the New Biology", Humana Press, Totowa, 2002.
- [47] Karas M., Hillenkamp F., "*Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*". *Anal Chem.*, 60(20): p. 2299-2301, 1988
- [48] Tanaka K., Waki H. , Ido Y., Akita S., Yoshida Y. and Yoshida T., "*Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry*". *Rapid Communications in Mass Spectrometry : Rcm*, 1988. 2(8): p. 151-153.
- [49] Hofmann, K. and W. Stoffel, "TMbase – A database of membrane spanning proteins segments". *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 374: p. 166, 1993.
- [50] Bagos, P.G., et al., "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.
- [51] Bendtsen, J.D., et al., "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." *J Mol Biol*, 340(4): p. 783-795, 2004.
- [52] Gardy, J.L., et al., "PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis". *Bioinformatics*, 2004.
- [53] Mann, M., R.C. Hendrickson, and A. Pandey, *Annual Rev Biochemistry*, 70: p. 437-473, 2001.

- [54] Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M., “Electrospray ionization mass spectrometry of large biomolecules”, *Science*, 246: p. 64-71, 1989.
- [55] Karas, M. and F. Hillenkamp, *Analytical chemistry*, 60: p. 2299-2301, 1988. → [47]
- [56] Klose, J. “Protein mapping by combined isoelectric focusing and electroforesis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals”, *Humangenetik*, 26: p. 231-243, 1975.
- [57] O'Farrell P., High resolution two-dimensional electroforesis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250: p. 4007-4021, 1975.
- [58] Suckau D., Resemann A., Schuerenberg M., Hufnagel P., Franzen J., Holle A., “A novel MALDI LIFT TOF/TOF mass spectrometer for proteomics”, *Anal.Bianal.Chem*, 376: 952-965, 2003.
- [59] Schägger H. and von Jagow G, “Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electroforesis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.”, *Anal. Biochem.* , 166 (2), 368-379,1987.
- [60] Schägger H. and von Jagow G., “Blue native electroforesis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form.”, *Anal. Biochem.* , 199 (2), 223-231,1991.
- [61] Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. “Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis”, *Electrophoresis*.25(9):1327-33, 2004.
- [62] Sokol A. Pamela and Donald E . Woods, “Effect of pyochelin on Pseudomonas respiratory infections”, *Microbial Pathogenesis*, 5 : 197-205, 1988.
- [63] Bordel Sergio, Raúl Muñoz, Luis Felipe Díaz, Santiago Villaverde, “New insights on toluene biodegradation by *Pseudomonas putida* F1: influence of pollutant concentration and excreted metabolites”, *Appl Microbiol Biotechnol*, Springer-Verlag , 2006.
- [64] Bradford MM, A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-due binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254, 1976.
- [65] Jiang Lei, Lin He, Michael Fountoulakis, Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis, *Journal of Chromatography A*, 1023, 317–320, 2004.
- [66] Marzoa J., Sanchez S., Ferreiros C.M. and Criado M.T., “Identifiacation of Neisseria meningitides outer membrane vesicle complexes using 2-D high resolution clear native/SDS-PAGE”, *Journal of Proteome Research*, 9, 611-619, 2010.
- [67] Aivaliotis, M.,Corvey C, Tsirogianni I, Karas M, Tsiotis G. “Membrane proteome analysis of the green-sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*”. *Electrophoresis*, 25(20): p. 3468-3474, 2004.

- [68] Bernstein, H.D., “*The biogenesis and assembly of bacterial membrane protein*”. *Current opinion in Microbiology*, 3: p. 203-209, 2000.
- [69] Ravainoro M., Ciurli C., Toma E., Morisset R., “Rapid method for isolating detergent – insoluble outer membrane proteins from *Pseudomonas aeruginosa*”, *Electroforesis* , 15, 594-596, 1994.
- [70] Reisinger V. and Eichacker L.A. “How to analyze protein complexes by 2D Blue-Native SDS-PAGE”, *Practical Proteomics*/1, 2007.
- [71] Hearn E.M., Patel D.R., Bert van den Berg, “Outer – membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation.”, *PNAS*,vol.105, 25,pp 8601-8606,2008.
- [72] Gutierrez C., Gordia S., Bonassie S., “Charectirization of the osmotically inducible gene *osmE* of *E.coli* K-12”, *Mol. Micribiol.*,16, 553-563, 1995.
- [73] Gering K., Cheng C.H., Nikaido H., Jap B. K., “Stoichiometry of maltodextrin-binding sites in LamB, an outer membrane protein from *E.coli* .”, *J.Bacteriol.*, 173 (6), 1873-1878, 1991.
- [74] Kihara A., Akiyama Y., Ito K. “A protease complex in the *E.coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against |SecY. *EMBO J*, 15: 6122-6131, 1996.