

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
{ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ}



ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΦΡΥΣΑΛΗ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ.ΤΣΙΩΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή κ. Τσιώτη Γεώργιου, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για τη βοήθεια και καθοδήγηση που προσέφερε όλο αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ επίσης τους καθηγητές: κ. Γανωτάκη Δημήτριο, που δέχτηκε να είναι μέλος της εξεταστικής επιτροπής μου, τον καθηγητή κ. Michael Karas από το εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Goethe στην Φρανκφούρτη της Γερμανίας για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τα πειράματα φασματοσκοπίας μάζας MALDI και τον καθηγητή κ. Σ. Περγαντή για την συνεργασία του ώστε να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις φασματοσκοπίας μάζας με ESI. Επίσης ευχαριστώ το εργαστήριο Μembrανικής Βιοχημείας του κ. Dieter Oesterhelt του Ινστιτούτου Max –Plank της Γερμανίας για τα δείγματα βακτηριοροδοψίνης που μας προσέφεραν.

Ευχαριστώ ακόμη, όλα τα άτομα που κατά καιρούς εργάστηκαν στο εργαστήριο του κ. Τσιώτη για την πολύτιμη βοήθεια και συνεργασία τους, τα άτομα του εργαστηρίου του κ. Γανωτάκη και του κ. Περγαντή για την συνεργασία τους καθώς και ολόκληρη την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Michael Karas για την φιλοξενία και την βοήθεια που μου παρείχαν κατά την διάρκεια παραμονής μου στην Φρανκφούρτη .

Ευχαριστώ επίσης, το διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών «Πρωτεϊνική Βιοτεχνολογία» για την ευκαιρία που μου δόθηκε ως μεταπτυχιακή του φοιτήτρια, καθώς και το πρόγραμμα ανταλλαγής φοιτητών ERASMUS για την χρηματοδότηση που μου παρείχε για την παραμονή μου και εργασία στο εργαστήριο Ενόργανης Αναλυτικής Χημείας του καθηγητή Michael Karas στο Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Goethe στην Φρανκφούρτη της Γερμανίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Γιώργο και Άννα για την συνεχή ενθάρρυνση και στήριξη τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	I
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	III
ABSTRACT	V
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο –ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Βιολογικές μεμβράνες	1
1.1.2 Εξωτερική μεμβράνη	1
1.1.3 Περιπλασματικός Χώρος	2
1.1.4 Κυτταροπλασματική μεμβράνη	2
1.2 Μεμβρανικές πρωτεΐνες	2
1.3 Halobium Halobacterium	3
1.3.2 Βακτηριοροδοσίνη	4
1.4 Πρωτεομική Ανάλυση	5
1.4.2 Μέθοδοι Ανάλυσης μεμβρανικών πρωτεϊνών	6
1.5 Φασματοσκοπία Μάζας	7
1.5.1 Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό	8
1.5.2 Ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας	10
1.5.3 Αναλυτές Μαζών	11
1.5.3.1 Αναλυτής Παγίδας Ιόντων	11
1.5.3.2 Αναλυτής μάζας ‘χρόνου πτήσης’	12
1.5.4 Αναλυτής Δεδομένων	13
1.6 Σκοπός	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο –ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	15
2.1 ΥΛΙΚΑ	15
2.1.1 Διαλύματα Πηκτής ελέγχου της πέψης μετά την in-solution digestion	15
2.1.2 Διαλύματα Πηκτής διαχωρισμού για πέψη in-gel	16

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	18
2.2.1 Σπάσιμο κυττάρων-απομόνωση μεμβρανών	18
2.2.2 Ηλεκτροφόρηση	18
2.2.3 Προετοιμασία βακτηριοροδοψίνης για LCQ Mass Spectrometer	19
2.2.4 Προετοιμασία βακτηριοροδοψίνης για Ultraflex TOF-TOF	19
2.2.5 Επεξεργασία αποτελεσμάτων με μεθόδους βιοπληροφορικής	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο –ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	22
3.1 Φάσμα Απορρόφησης βακτηριοροδοψίνης	22
3.2 Έλεγχος καθαρότητας της βακτηριοροδοψίνης	23
3.3 Αλληλουχία αμινοξέων της βακτηριοροδοψίνης και ποσοστό υδροφοβικότητας των ελίκων	24
3.4 Ταυτοποίηση Βακτηριοροδοψίνης με πέψη σε διάλυμα και LCQ Mass Spectrometer	25
3.5 Ταυτοποίηση Βακτηριοροδοψίνης με πέψη σε διάλυμα και Ultraflex TOF- TOF	27
3.5.2 Πρωτεόλυση Παρουσία Αμμωνίας	33
3.5.3 Μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος	40
3.5.4 Μεταβολή του Χρόνου Πρωτεόλυσης	44
3.5.5 Αλλαγή Πρωτεολυτικού ένζυμου	44
3.5.6 Αλλαγή αναλογίας ένζυμου/υπόστρωμα	44
3.6 Πρωτεόλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	48
3.6.1 Πρωτεόλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με Πρωτεϊναση K(12h)	48
3.6.2 Πρωτεόλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με Πρωτεϊναση K(2h)	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο - ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	61

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACN	: ακετονιτρίλιο
DHB	: δινδροξυβενζοϊκό οξύ
DTT	: 1,4 διθειοθρεϊτόλη
ESI	: ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
GRAVY	: ποσοστό υδροφοβικότητας
MALDI	: ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας και λέιζερ
SDS	: δωδεκυλ-θειικό νάτριο
TEMED	: N,N,N',N'- τετραμεθυλενοδιαμίνη
TFA	: Τρίφθορο-οξικό οξύ
TOF	: Αναλυτής χρόνου πτήσης των ιόντων
FA	: Φορμικό οξύ
BR	: Βακτηριοροδοψίνη
Pr.K	: Πρωτεΐναση- K

Abstract

Integral membrane proteins are important for the cell function. However, are notoriously difficult to analyze them. This is because of low abundance of these proteins, the inherent hydrophobicity of many of them and the poor solubility in water solutions. The objective of this work was to develop a method for characterization of hydrophobic integral membrane proteins. This method has been applied to bacteriorhodopsin (bR) from *Halobacterium halobium* purple membranes. We suggest that these membrane structures can serve as an effective model membrane system for developing an integral membranes' recognizing method based on hydrophobic peptides as bacteriorhodopsin has seven transmembrane α -helical rods. The method used the non-specific protease proteinase K in combination with mass spectrometry for the identification of hydrophobic peptides. Peptides that were extracted from the preparation method were analyzed in to a LCQ ion trap mass spectrometer and in to Ultraflex TOF-TOF Mass Spectrometer . With the methodology described identified with the LCQ two hydrophobic bacteriorhodopsin peptides that has been shown to either partially or completely span the lipid bilayer and with Ultraflex TOF-TOF we identified four different sections of the protein which consists partially to the lipid bilayer.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

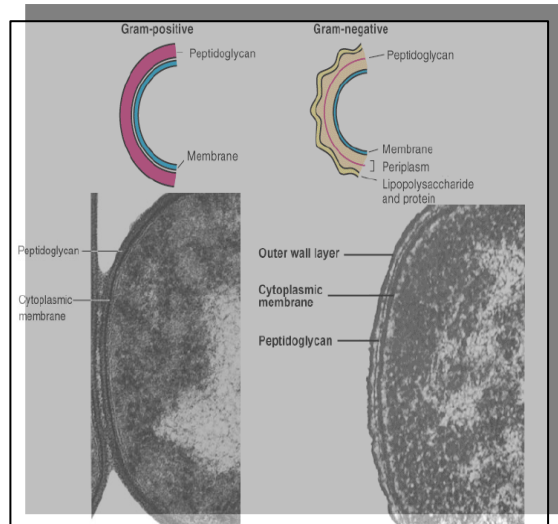
Οι πρωτεΐνες εσωτερικής μεμβράνης είναι σημαντικές για την λειτουργία του κυττάρου. Ωστόσο, είναι εξαιρετικά δύσκολη η ανάλυσή τους. Αυτό συμβαίνει λόγω της μικρής αφθονίας των πρωτεϊνών αυτών, της μεγάλης υδροφοβικότητας αρκετών εξ αυτών και της μικρής διαλυτότητας αυτών σε υδατικά διαλύματα. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας μεθόδου ανάλυσης και ταυτοποίησης πρωτεϊνών, εσωτερικής μεμβράνης. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στην βακτηριοροδοψίνη, την μονάδική πρωτεΐνη της πορφυρής μεμβράνης του βακτηρίου halobium Halobacterium. Πιστεύουμε ότι η συγκεκριμένη μεμβρανική δομή μπορεί να λειτουργήσει αποτελεσματικά ως μοντέλο για την μελέτη μεθόδου αναγνώρισης πρωτεϊνών που βασίζεται σε υδρόφοβα πεπτίδια, καθώς η βακτηριοροδοψίνη αποτελείται από επτά διαμεμβρανικές α-έλικες. Για την ανάλυση των υδρόφοβων πεπτιδίων κατά την ανάπτυξη της μεθοδολογίας αυτής χρησιμοποιείται η μη εξειδικευμένη πρωτεάση πρωτεΐναση K σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία μάζας. Τα πεπτίδια που λαμβάνονται από την μέθοδο επεξεργασίας αναλύονται με φασματόμετρο LCQ παγίδα ιόντων και Ultraflex TOF-TOF. Με την παρούσα μεθοδολογία αναγνωρίστηκαν με το LCQ δύο υδρόφοβα πεπτίδια που φαίνεται να διαπερνούν ολοκληρωτικά ή εν μέρει την διπλοστοιβάδα λιπιδίων και με το Ultraflex TOF-TOF τέσσερα διαφορετικά τμήματα της πρωτεΐνης που διαπερνούν εν μέρει την διπλοστοιβάδα λιπιδίων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1⁰-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιολογικές Μembrάνες

Τα Gram- αρνητικά βακτήρια είναι μια μεγάλη κατηγορία βακτηρίων των οποίων το βασικό χαρακτηριστικό είναι το κυτταρικό τους τοίχωμα. Το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων αυτών έχει διαφορετική δομή από το αντίστοιχο κυτταρικό τοίχωμα των Gram- θετικών βακτηρίων.

Εκτός από την κυτταρο-πλασματική μεμβράνη στο κυτταρικό τοίχωμα των Gram- αρνητικών βακτηρίων, υπάρχει μία επιπλέον εξωτερική μεμβράνη και μία στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης. Ο ενδιάμεσος χώρος μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης ονομάζεται περιπλασματικός χώρος.



Εικόνα 1.1 : Σχηματική αναπαράσταση της μεμβράνης ενός Gram –αρνητικού και ενός Gram –θετικού βακτηρίου

1.1.2 Εξωτερική Μembrάνη

Η εξωτερική μεμβράνη είναι μια διπλοστοιβάδα λιπιδίων που περιέχει λιπίδια, πρωτεΐνες και λιποσακχαρίδια. Τα είδη των διαφορετικών πρωτεϊνών της μεμβράνης αυτής, είναι πολύ λιγότερα από αυτά των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών λόγω της διαφορετικής λειτουργίας των μεμβρανών. Οι πρωτεΐνες, αποτελούν το 50% της συνολικής μάζας της εξωτερικής μεμβράνης [1]. Στις πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης περιλαμβάνονται οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την ακεραιότητα και την επιλεκτική διαπερατότητα της μεμβράνης [2], και οι λιποπρωτεΐνες που βρίσκονται ακινητοποιημένες στην εξωτερική μεμβράνη. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης που η έκφρασή τους ρυθμίζεται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα συμβάλουν σημαντικά στην βακτηριακή παθογένεση αυξάνοντας την προσαρμοστικότητα των βακτηρίων στις διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Γενικότερα κάποιες από οι ιδιότητες της εξωτερικής μεμβράνης είναι η επιλεκτική διαπερατότητα της εισόδου υδρόφιλων μορίων, η

συνεισφορά στην επικοινωνία των κυττάρων , το να προσδίδει αρνητικό φορτίο στο κύτταρο, το να περιέχει τους σημαντικούς για το κύτταρο υποδοχείς φάγων καθώς και το να διατηρεί τα ένζυμα, που συνεισφέρουν σε τόσες πολλές λειτουργίες του κυττάρου, στο περίπλασμα.

1.1.3 Περιπλασματικός χώρος

Ο περιπλασματικός χώρος είναι ο χώρος μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης. Στο χώρο αυτό βρίσκονται αρκετές διαφορετικές πρωτεΐνες και η πεπτιδογλυκάνη η οποία αποτελεί το κυτταρικό τείχος του βακτηρίου. Ο κυρίως ρόλος των πρωτεϊνών του περιπλάσματος είναι να ανιχνεύουν και να μεταφέρουν μόνο τα απαραίτητα θρεπτικά εντός του κυττάρου. Πρωτεΐνες του περιπλάσματος είναι διάφορα υδρολυτικά ένζυμα (ενδονουκλεάσες , φωσφατάσες, πρωτεάσες), ένζυμα αποτοξίνωσης που τροποποιούν επικίνδυνες ενώσεις πριν αυτές εισέλθουν στο κύτταρο, χημουποδοχείς που βοηθούν στην αναγνώριση της χημικής σύστασης του περιβάλλοντος από το κύτταρο, πρωτεΐνες πρόσδεσης που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες ενώσεις (σάκχαρα, ανόργανα ιόντα, βιταμίνες) και τις μεταφέρουν εντός του κυττάρου [3].

1.1.4 Κυτταροπλασματική μεμβράνη

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελείται από μία διπλοστοιβάδα λιπιδίων που αποτελείται κυρίως φωσφολιπίδια, και πρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα στην διπλοστοιβάδα αυτή. Οι σημαντικότερες ιδιότητες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι να διαχωρίζει το κάθε κύτταρο από το περιβάλλον του, να παρέχει στο κύτταρο επιλεκτική διαπερατότητα λόγω των εξειδικευμένων μοριακών αντλιών και καναλιών που περιέχονται σε αυτήν και να ελέγχει τις πληροφορίες μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντός του λόγω των ειδικών για εξωτερικά ερεθίσματα υποδοχέων που περιέχονται σε αυτήν [4].

1.2 Μεμβρανικές πρωτεΐνες

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις διάφορες λειτουργίες του κυτταρικού κύκλου, είτε ως δομικό συστατικό είτε ως κρίσιμο στοιχείο της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Είναι βασικό συστατικό των βιολογικών μεμβρανών και αποτελούν υποδοχείς δικτύων σηματοδότησης που ελέγχουν τους μηχανισμούς φυσιολογίας αλλά και τους αισθητήριους μηχανισμούς.

Αποτελούν αισθητήρια όργανα για ειδικούς μηχανισμούς επούλωσης, ελέγχου ανάπτυξης και επανόρθωσης πολυκύτταρων οργανισμών. Μεταφέρουν μεταβολίτες και σήματα ανάμεσα στα κύτταρα και στο περιβάλλον τους, ανάμεσα στα οργανίδια εντός των κυττάρων αλλά και μεταξύ των διαφόρων οργανικών συστημάτων. Λειτουργούν στον κεντρικό μεταβολισμό διευκολύνοντας την μεταφορά ηλεκτρονίων ή ενεργώντας στην εισροή και εκροή μικρών μοριακών συνδετών (ligands), και εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

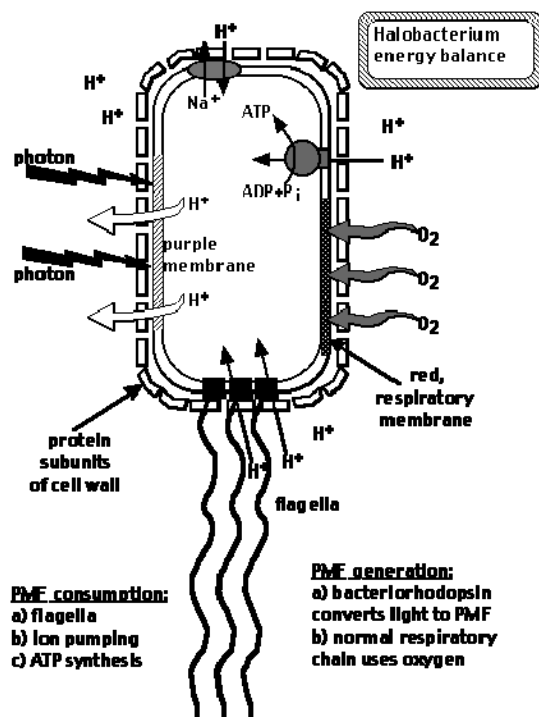
Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που εισέρχονται στην φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα μπορεί να είναι μορφής α-ελίκων ή μορφής β-πτυχωτών δομών[18, 19]. Οι β-πτυχωτές δομές βρίσκονται συνήθως στην εξωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη των Gram(-) βακτηρίων, χλωροπλαστών και μιτοχondρίων, περιέχοντας αρκετά πολικά αμινοξέα, η παρουσία των οποίων μειώνει αισθητά την υδροφοβικότητα της πρωτεΐνης. Αντίθετα οι πρωτεΐνες μορφής α-ελίκων, βρίσκονται στην εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη και περιέχουν κυρίως μη πολικά αμινοξέα που αυξάνουν την υδροφοβικότητα της πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν αρκετές δυσκολίες ταυτοποίησης και ανάλυσης, καθώς με την αυξημένη υδροφοβικότητά τους παρουσιάζουν προβλήματα διαλυτότητας σε υδατικούς διαλύτες, και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την διαλυτοποίηση και τον καθαρισμό τους συχνά είναι μη συμβατά με την φασματοσκοπία μάζας. Στις δυσκολίες των μεθόδων ανάλυσης των πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης, συμπεριλαμβάνονται και οι πολυάριθμες, πολύπλοκες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις οποίες υποβάλλονται οι πρωτεΐνες αυτές, αλλά και το γεγονός ότι αρκετές από αυτές τις πρωτεΐνες εκφράζονται εντός των κυττάρων σε σύνθετα μίγματα και σε ελάχιστες ποσότητες, με αποτέλεσμα να απαιτείται εκτεταμένος καθαρισμός για την μελέτη τους, αλλά και σημαντικές προσπάθειες διατήρησης των ιδιοτήτων τους κατά την προετοιμασία τους.

1.3 Halobacterium halobium

Το γένος halobium Halobacterium ανήκει στην κατηγορία των Archaea και αποτελεί ένα Gram αρνητικό βακτήριο. Η μορφολογία του είναι ραβδίο αμφιστροειδούς και κάθε κυτταρό του έχει διάμετρο



Εικόνα 1.2 : Σχηματική αναπαράσταση του βακτηρίου Halobium Halobacterium.



Εικόνα 1.3 : Σχηματική αναπαράσταση του βακτηρίου *Halobium Halobacterium*

φωτοευαίσθητη μεμβρανική πρωτεΐνη. Ο Walter Stoeckenius και ο Dieter Oesterhelt διαχώρισαν την κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου σε κίτρινο, κόκκινο και πορφυρό χρώμα. Το κίτρινο κλάσμα περιέχει κυρίως τα τοιχώματα των αεριούχων κενοτοπίων τα οποία καθιστούν τα βακτήρια ικανά να ρυθμίζουν το βάθος του νερού που ζουν. Το κόκκινο κλάσμα περιέχει την αναπνευστική αλυσίδα και άλλους ενζυμικούς μηχανισμούς για οξειδωτική φωσφορυλίωση και επιπλέον ένα χρωμοφόρο που απορροφά στο κόκκινο και προστατεύει τα βακτήρια από την θανατηφόρο επίδραση του κυανού φωτός. Το πορφυρό κλάσμα αποτελείται από την βακτηριοροδοψίνη και λιπίδια [5].

1.3.2 Βακτηριοροδοψίνη

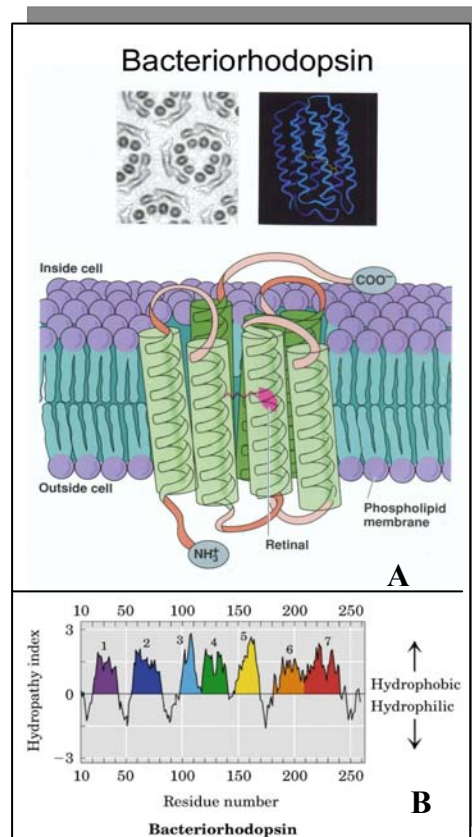
Η πιο συχνά μελετημένη πρωτεΐνη πρότυπο για εύρεση νέων μεθόδων αναγνώρισης και ταυτοποίησης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών είναι η βακτηριοροδοψίνη. Η βακτηριοροδοψίνη είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται στο βακτήριο *Halobacterium halobium*. Η βακτηριοροδοψίνη αποτελεί συστατικό της λεγόμενης πορφυρής μεμβράνης, μιας έντονα χρωματισμένης και

0.8μm. Έχει ένα χρωμόσωμα μεγέθους 2MB καθώς και ένα μεγάλο αριθμό πλασμιδίων.

Απαντάται σε περιοχές με μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος [άνω του 12%] η σε κορεσμένα διαλύματα άλατος και σε ανάλογους κρυστάλλους. Για να επιβιώσει σε αυτές τις ακραίες συνθήκες, το βακτήριο έχει αναπτύξει, στην πορεία της εξέλιξής του, ένα μοναδικό σύστημα μετατροπής, με υψηλή αποτελεσματικότητα, της φωτεινής ενέργειας σε χημική ενέργεια.

Πυρήνας αυτού του συστήματος είναι η βακτηριοροδοψίνη, μια

σαφώς οριοθετημένης περιοχής του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου. Είναι μια πρωτεΐνη 26,784Da που συντίθεται από 248 αμινοξέα, η οποία διαπερνά τη μεμβράνη υπό τη μορφή επτά α-ελικοειδών κυλίνδρων. Τα μόρια της βακτηριοροδοψίνης είναι ταξινομημένα ως τριμερή στη μεμβράνη και σχηματίζουν, εντός του διπλού στρώματος λιπιδίων, ένα δυσδιάστατο εξάγωνο πλέγμα. Κάθε μόριο βακτηριοροδοψίνης περιέχει ένα μοναδικό φωτοαπορροφητικό μη πρωτεϊνικό μόριο που ονομάζεται ρετινάλη το οποίο προσδίδει στην πρωτεΐνη ένα βαθύ πορφυρό χρώμα. Η ρετινάλη προσδένεται ομοιοπολικά σε μία από τις επτά διαμεμβρανικές έλικες και όταν απορροφήσει ένα φωτόνιο αλλάζει η δομή της με αποτέλεσμα να αναγκάσει την πρωτεΐνη που βρίσκεται ενσωματωμένη στην μεμβράνη να υποστεί αλλαγές στην διαμόρφωση της. Οι αλλαγές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την μεταφορά ενός H^+ από την ρετινάλη στον περιπλασματικό χώρο του κυττάρου και την μείωση της συγκέντρωσης των H^+ στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτή η βαθμίδωση των H^+ λειτουργεί ως αποθεματικό ενέργειας.



Εικόνα 1.4: Α) Σχηματική αναπαράσταση των επτά διαμεμβρανικών ελίκων της βακτηριοροδοψίνης στην διπλοστοιβάδα λιπιδίων. Β) Διάγραμμα υδροφοβικότητας της βακτηριοροδοψίνης

1.4 Πρωτεομική ανάλυση

Σε ένα ζωντανό κύτταρο, οι περισσότερες λειτουργίες πραγματοποιούνται από πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια η πρωτεομική ανάλυση αναπτύσσεται με ραγδαίους ρυθμούς. Στην αύξηση του ενδιαφέροντος για πρωτεομική ανάλυση, συνέβαλε ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός γονιδιωμάτων, που αποκωδικοποιούνται πλήρως, καθώς και η διαπίστωση ότι η αλληλουχία του γονιδιώματος και η πρωτεϊνική λειτουργία δεν μπορούν να συσχετισθούν άμεσα, λόγω της ρύθμισης της έκφρασης των πρωτεϊνών κατά την μεταγραφή και την μετάφραση καθώς και λόγω των μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών.

Σημαντικός παράγοντας στην ανάπτυξη της πρωτεομικής ανάλυσης υπήρξε η φασματοσκοπία μάζας, η οποία απλοποίησε την ανάλυση και τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών [6,7]. Παρά τις σημαντικές βελτιώσεις στην πρωτεομική ανάλυση

διάφορες σημαντικές υποκατηγορίες πρωτεϊνών, είναι δύσκολο να απεικονισθούν με τις τυπικές μεθόδους προετοιμασίας του δείγματος. Σε αυτές τις υποκατηγορίες, συμπεριλαμβάνονται οι πολύ υδρόφοβες πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες με πολλές διαμεμβρανικές περιοχές, οι πρωτεΐνες με ακραία ισοηλεκτρικά σημεία και γενικότερα οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε περιορισμένη αφθονία μέσα στο κύτταρο. Συνεπώς εξακολουθεί και υπάρχει η ανάγκη ύπαρξης μεθόδου απομόνωσης, διαχωρισμού και ταυτοποίησης των πρωτεϊνών που ανήκουν στις παραπάνω υποκατηγορίες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δίνεται στην μελέτη των μεμβρανικών πρωτεϊνών καθώς ως γνωστών αποτελούν το 30% του συνολικού πρωτεϊνόματος [14] και το 50% των φαρμάκων στόχων στην βιομηχανία φαρμάκων.

1.4.2 Μέθοδοι ανάλυσης μεμβρανικών πρωτεϊνών

Η φασματοσκοπία μάζας, έχει καθοριστικό ρόλο στην ταυτοποίηση των διάφορων πρωτεϊνών. Πρωτοεμφανίστηκε στις αρχές του προηγούμενου αιώνα και λόγω της ικανότητας της να μετρά με μεγάλη ακρίβεια την μάζα των μορίων. Δίνει την δυνατότητα χαρακτηρισμού των διαφόρων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και μακρομορίων, καθώς και τη δυνατότητα ταυτοποίησης και προσδιορισμού των πρωτεϊνών και διαφόρων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις πρωτεΐνες.

Για να επιτευχθεί μία καλή φασματοσκοπική ανάλυση, απαιτείται και μια καλή μέθοδος προετοιμασίας του προς ανάλυση δείγματος. Μία μέθοδος προετοιμασίας πρωτεϊνών για ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας πρέπει να επιτρέπει τον ακριβή χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης συμπεριλαμβανομένων και υδρόφοβων μεμβρανικών περιοχών. Επίσης μια μέθοδος προετοιμασίας δειγμάτων δεν πρέπει να συμπεριλαμβάνει αντιδραστήρια που να μην είναι συμβατά με την φασματοσκοπία μάζας. Διαλύματα με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και απορρυπαντικών επηρεάζουν την ανάλυση της μάζας

Οι ήδη υπάρχουσες μεθοδολογίες προετοιμασίας των προς ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας πρωτεϊνών, βασίζονται στην πλειοψηφία τους, στην μονοδιάστατη ή δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση [11,12]. Το μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι ότι η δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση δεν μπορεί να διαχωρίσει με την ίδια ικανότητα όλες τις πρωτεΐνες. Πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, καθώς και πρωτεΐνες με μεγάλο pI (βασικές πρωτεΐνες) δεν μπορούν να διαχωριστούν και αρκετές φορές ούτε να απεικονισθούν σε μία πηκτή.

Ιδιαίτερα προβλήματα κατά την διεξαγωγή των μεθόδων αυτών, παρουσιάζονται και στις πρωτεΐνες που εκφράζονται σε πολύ μικρό αριθμό αντιγράφων καθώς απαιτείται μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης για την ανίχνευσή τους. Στα προβλήματα των μεθόδων αυτών, συμπεριλαμβάνονται, η αλληλοεπικάλυψη πρωτεϊνικών δειγμάτων αλλά και η δυσκολία αναγνώρισης υδρόφοβων πρωτεϊνών που δεν μπορούν να διαλυτοποιηθούν και 'χάνονται' κατά την προετοιμασία του δείγματος και της ισοηλεκτρικής εστίασης.

Στις ήδη υπάρχουσες μεθόδους, συμπεριλαμβάνονται και οι λεγόμενες 'shotgun methods' οι οποίες κατά τον διαχωρισμό και την επεξεργασία των προς ανάλυση πρωτεϊνών χρησιμοποιούν απορρυπαντικά [15], οργανικούς διαλύτες [16], ή διαλύματα αλάτων [17] για να διαλυτοποιήσουν τις μεμβρανικές πρωτεΐνες. Συχνή κατά την πέψη, στις μεθοδολογίες αυτές, είναι και η χρήση τρυψίνης και βρωμιούχου κυανίου. Παρόλο που η χρήση τρυψίνης και βρωμιούχου κυανίου, είναι αρκετά συχνή, δεν είναι αρκετά ωφέλιμη στην περίπτωση υδρόφοβων περιοχών μεμβρανικών πρωτεϊνών καθώς η εμφάνιση των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη που είναι στόχοι του ενζύμου τρυψίνη, καθώς και η εμφάνιση του αμινοξέος μεθειονίνη που είναι στόχος του βρωμιούχου κυανίου είναι σχεδόν ανύπαρκτη σε διαμεμβρανικές έλικες.

1.5 Φασματοσκοπία μάζας

Η φασματοσκοπία μάζας (MS) είναι μία εξελισσόμενη τεχνική που πρωτοεμφανίστηκε στις αρχές του προηγούμενου αιώνα. Οι εφαρμογές της φασματοσκοπίας μάζας γνώρισαν δραματικές αλλαγές κατά την δεκαετία του 1980 που οφείλονταν στην ανάπτυξη τεχνικών παραγωγής ιόντων από μη πτητικά ή θερμικός ασταθή μόρια, όπως αυτά που αντιμετωπίζουν συχνά οι βιοχημικοί και οι βιολόγοι [8]. Τα κύρια τμήματα ενός φασματομέτρου μάζας, είναι το σύστημα εισαγωγής δείγματος, η πηγή ιόντων που μετατρέπει τα συστατικά του δείγματος σε ιόντα, ο αναλυτής μαζών που διαχωρίζει τα ιόντα βάση του λόγου μάζα προς φορτίο ιόντος και ο ανιχνευτής ιόντων που μετατρέπει την δέσμη των ιόντων σε ηλεκτρικό σήμα το οποίο στην συνέχεια μπορεί να υποβληθεί σε επεξεργασία, να αποθηκευτεί στην μνήμη του υπολογιστή και να παρουσιασθεί με ποικίλους τρόπους. Τα βιομόρια είναι μεγάλα και πολικά μόρια που δεν μεταφέρονται και δεν ιονίζονται εύκολα στην αέρια φάση. Ο ηλεκτροψεκασμός (ESI) [9,13] και η απόπτωση με laser υποβοηθούμενη από υπόστρωμα (MALDI) [10] είναι οι τεχνικές ιονισμού στις οποίες οφείλεται η επιτυχημένη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας σε βιολογικά μόρια.

Οι κρύσταλλοι που δημιουργούνται ακτινοβολούνται από παλμό laser, συνήθως αζώτου με μήκος κύματος 337nm με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ιόντα στην αέρια φάση. Ο μηχανισμός της διαδικασίας αυτής, δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Πλήρως κατανοητές δεν είναι και οι απαιτούμενες για μια ουσία ιδιότητες που την καθιστούν υλικό μήτρας. Εμπειρικές παρατηρήσεις υποστηρίζουν ότι υλικό της μήτρας πρέπει να απορροφάει ισχυρά την ακτινοβολία λέιζερ και να είναι αρκετά διαλυτό στον διαλύτη του δείγματος. Το υπόστρωμα που συνήθως χρησιμοποιείται είναι μικρό οργανικό μόριο που εμφανίζει απορρόφηση στο μήκος κύματος του laser. Κάποια από τα υποστρώματα είναι το νικοτινικό οξύ, παράγωγα βενζοϊκού οξέος όπως 2-άμινο-βενζοϊκό οξύ και βανιλικό οξύ και παράγωγα κινναμινικού οξέος. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα είναι το α-κυάνο-4-κινναμινικό οξύ και το διϋδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB). Τα υποστρώματα διαφέρουν ως προς την ενέργεια που μεταφέρουν στο βιομόριο κατά τον ιοντισμό και καθορίζουν την θραυσματοποίηση του αναλύτη. Η θραυσματοποίηση του αναλύτη πρέπει γενικά να αποφεύγεται καθώς εμποδίζει τον σχηματισμό του μοριακού ιόντος. Για τον λόγο αυτό ο αναλύτης δεν πρέπει να απορροφά σε σημαντικό βαθμό την ακτινοβολία λέιζερ.

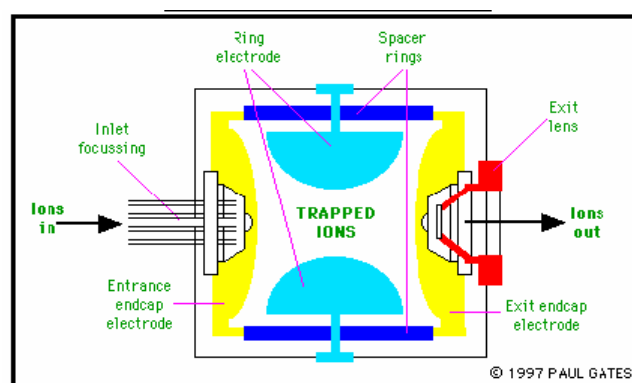
1.5.3 Αναλυτές μαζών

Για τον διαχωρισμό ιόντων με διαφορετικούς λόγους μάζας προς φορτίο διατίθενται διάφορες διατάξεις. Ο ιδανικός αναλυτής μαζών, πρέπει να διαχωρίζει μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους και να επιτρέπει την διέλευση αρκετών ιόντων ώστε να παραχθεί ένα άμεσα μετρήσιμο ρεύμα ιόντων. Κάποιοι από τους συχνότερα χρησιμοποιούμενους διαχωριστές μαζών είναι ο διαχωρισμός που στηρίζεται στον χρόνο πτήσης των ιόντων (time of flight, TOF), ο διαχωρισμός από τετραπολικό ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από μεταλλικούς ράβδους

(quadrupole MS) και ο διαχωρισμός από επιλεκτική εισαγωγή ιόντων σε τρισδιάστατο πεδίο παγίδευσης (ion trap).

1.5.3.1 Αναλυτής παγίδας ιόντων

Η ιοντική παγίδα αποτελείται από τρία ηλεκτρόδια, ένα κυκλικό και δύο ηλεκτρόδια κάλυπτρα, τοποθετημένα κατά αυτόν τον τρόπο ώστε να περικλείουν τον χώρο που θα παγιδευτούν τα ιόντα. [24]. Στο κυκλικό ηλεκτρόδιο εφαρμόζεται εναλλασσόμενη τάση με συχνότητα σταθερή και πλάτος που μπορεί να αλλάζει τιμές. Τα ηλεκτρόδια κάλυπτρα είναι γειωμένα με αποτέλεσμα να παράγεται ένα τρισδιάστατο ηλεκτρικό πεδίο στο οποίο μπορούν να παγιδευτούν ιόντα. Αυτό γίνεται ως εξής: το πλάτος της τάσης που εφαρμόζεται στο κυκλικό ηλεκτρόδιο εναλλάσσεται μεταξύ της μέγιστης και ελάχιστης τιμής του, οπότε αν θετικά ιόντα εισέρχονται στην παγίδα έλκονται από το κυκλικό ηλεκτρόδιο που έχει αρνητικό πλάτος τάσης εκείνη την χρονική στιγμή ενώ απωθούνται από τα ηλεκτρόδια κάλυπτρα που είναι γειωμένα, αλλά είναι ηλεκτρικά ενεργά ως προς το κυκλικό. Όταν το πλάτος πάρει την θετική μέγιστη τιμή του τα ιόντα απωθούνται από το κυκλικό ηλεκτρόδιο και ξεκινούν μία κίνηση προς το ένα ηλεκτρόδιο κάλυπτρο. Αυτή η κίνηση των ιόντων επαναλαμβάνεται, έχοντας ως αποτέλεσμα την παγίδευση των ιόντων μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο.



Εικόνα 1.8 : Σχηματική αναπαράσταση αναλυτή μάζας “παγίδας ιόντων”

Ιόντα με μεγάλη μάζα και συνεπώς και με μεγάλη ορμή χάνονται ενώ ιόντα με μικρή μάζα παγιδεύονται ικανοποιητικά αλλά τα φάσματα μάζας τους

Τα μειονεκτήματα αυτού του τύπου οργάνων είναι η περιορισμένη ευαισθησία και η μικρή διακριτική ικανότητα ενώ τα πλεονεκτήματα αυτού του τύπου οργάνων είναι η απλότητα, η σταθερότητα, η ευκολία προσέγγισης της πηγής ιόντων και το μεγάλο εύρος μαζών που μπορεί να αναλυθεί.

1.5.4 Ανάλυση Δεδομένων

Ένας σημαντικός κλάδος επιστήμης που επηρεάζει άμεσα τα επιτεύγματα της πρωτεομικής ανάλυσης, είναι η βιοπληροφορική. Ανάμεσα στους κύριους σκοπούς της επιστήμης αυτής είναι η οργάνωση των δεδομένων σε Βάσεις Δεδομένων ώστε να επιτρέπεται από κάθε ερευνητή η πρόσβαση στα δεδομένα αυτά αλλά και η υποβολή νέων δεδομένων. Ένα σημαντικό στοιχείο που χρησιμοποιούν οι αλγόριθμοι αναζήτησης πρωτεϊνών σε Βάσεις Δεδομένων είναι η γνώση ότι συγκεκριμένα πρωτεολυτικά ένζυμα διασπών την πρωτεΐνη σε συγκεκριμένα σημεία. Το ιδανικό μήκος των πεπτιδίων για την MS ανάλυση είναι 6-20 αμινοξέα. Πεπτίδια μικρότερα από 6 αμινοξέα ή μεγαλύτερα από 20, δεν δίνουν αρκετή πληροφορία για ταίριασμα της ακολουθίας με την Βάση. Για τον λόγο αυτόν, ο αναλυτής χρειάζεται καλά ορισμένα και σταθερά ένζυμα με γνωστές ιδιότητες που διασπών σε συγκεκριμένα σημεία την πρωτεΐνη. Το περισσότερο διαδεδομένο ένζυμο στην πρωτεομική ανάλυση είναι η τρυψίνη η οποία βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στη φύση, συγκεκριμένα στο πάγκρεας χοίρου ή βοοειδούς. Τα σημεία στα οποία πρωτεολύει την πρωτεΐνη έχουν λυσίνη και αργινίνη εκτός και αν ακολουθεί προλίνη.

Η Peptide Mass Fingerprinting (PMF) είναι μια τεχνική για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών όπου χρησιμοποιείται η MS ανάλυση για την μέτρηση της μάζας των πεπτιδικών τμημάτων. Η πρωτεΐνη ταυτοποιείται ταιριάζοντας τις μετρούμενες μάζες των πεπτιδίων με τις μάζες των πεπτιδίων από πρωτεΐνες που υπάρχουν σε Βάσεις Δεδομένων. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, το πρωτέομα ενός οργανισμού χωρίζεται σε πεπτίδια με την χρήση κατάλληλων ενζύμων, όπως είναι η τρυψίνη. Τα ένζυμα είναι επιλεκτικά στην πρωτεόλυση της πρωτεΐνης. Επομένως από κάθε πρωτεΐνη προκύπτει συγκεκριμένος αριθμός πεπτιδίων με συγκεκριμένη ακολουθία και μάζα .

Στη συνέχεια τμηματοποιούνται υπολογιστικά σύμφωνα με την επιλεκτικότητα του ενζύμου που έχει χρησιμοποιηθεί και όλες οι γνωστές πρωτεΐνες από μια επιλεγμένη Βάση Δεδομένων και η κάθε μάζα πεπτιδίου που λαμβάνεται πειραματικά συγκρίνεται με την υπολογίσιμη μάζα των πεπτιδίων από την βάση. Αν οι μάζες είναι όμοιες, τότε το PMF της Βάσης μπορεί να προσδιορίσει την πρωτεΐνη από την οποία προήλθε το πεπτίδιο και με αυτόν τον τρόπο να ταυτοποιηθεί η άγνωστη πρωτεΐνη. Ένα πεπτίδιο συνήθως δε συναντάτε μόνο σε μια πρωτεΐνη, για το λόγο αυτό τα πολλαπλά ταιριάσματα από μια πρωτεΐνη είναι απαραίτητα για την ταυτοποίησή της.

Tandem MS ανάλυση είναι τμηματοποίηση των επιλεγμένων πεπτιδίων του πρώτου φάσματος μάζας και η ανάλυση των δημιουργούμενων θραυσμάτων, . Από την πληροφορία του δευτερού φάσματος μπορεί να αποκτηθεί πληροφορία για την ακολουθία του πεπτιδίου.

1.6 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου επεξεργασίας δειγμάτων μεμβρανικών πρωτεϊνών ώστε να είναι εφικτή η ταυτοποίηση και η αναγνώρισή τους με επιλεκτικό τρόπο στηριζόμενο στην ταυτοποίηση υδρόφοβων πεπτιδικών τμημάτων που ανήκουν σε α-έλικες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Διαλύματα

2.1.1 Διαλύματα Πηκτής ελέγχου της πέψης μετά την *in-solution digestion*

- 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

*Ακρυλαμίδιο-Δισακρυλαμίδιο
(AB-mix 16%, 49.5%T, 6%C)
46.5% w/v Ακρυλαμίδιο
3 % w/v Δισακρυλαμίδιο

• *Διαλύματα πηκτής Διαχωρισμού (30ml)*

*ABmix 16%	10ml
** Gel Buffer	10ml
Glycerol	3gr
Σε τελικό όγκο dd.H ₂ O	30ml
APS	100μl
TEMED	10μl

** (Gel Buffer) 3X	
Tris	3M
SDS	0,3% (w/v)
pH	8,45 (ρύθμιση με HCl)

• *Διαλύματα Πηκτής Ενδιάμεσου Διαστήματος (12ml)*

***ABmix 10%	3ml
** Gel Buffer	5ml
Σε τελικό όγκο dd.H ₂ O	15ml
APS	80μl
TEMED	8μl

*Ακρυλαμίδιο-Δισακρυλαμίδιο	
(AB-mix 10% 49.5%T, 3%C)	
48%	w/v Ακρυλαμίδιο
1.5 %	w/v Δισακρυλαμίδιο

• *Διαλύματα πηκτής Στοιβαξής*

***ABmix 10%	1ml
** Gel Buffer	3ml
Σε τελικό όγκο dd.H ₂ O	12ml
APS	90μl
TEMED	9μl

• *Ρυθμιστικά Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση*

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	

• *Διαλύματα Κολλοειδής χρώσης Coomassie blue:*

Διάλυμα για σταθεροποίηση πρωτεϊνών (Gel Fixation) (1 L)

450 mL	Μεθανόλη
10 mL	Οξικό Οξύ
540 mL	ddH ₂ O

Διάλυμα χρώσης (500 mL)

0,5 g	Coomassie Brilliant blue G-250
170 mL	Μεθανόλη
2,5 mL	Οξικό οξύ
85 g	Θειικό αμμώνιο
Τελικός όγκος με προσθήκη ddH ₂ O	

• *Διάλυμα αποχρωματισμού (1 L)*

10 mL	Οξικό Οξύ
990 mL	ddH ₂ O

2.1.2 Διαλύματα Πηκτής Διαχωρισμού που χρησιμοποιείται για πέψη *in-gel* digestion

• *Διαλύματα πηκτής Διαχωρισμού (30ml)*

ABmix 10%	6ml
Gel Buffer	10ml
Glycerol	3gr
Σε τελικό όγκο dd.H ₂ O	30ml
APS	150μl
TEMED	15μl

• *Διαλύματα πηκτής Στοίβαξης*

ABmix 10%	0.8ml
Gel Buffer	3.2ml
Σε τελικό όγκο dd.H ₂ O	9.6ml
APS	72μl

TEMED

7.2μl

Μίγμα Βαθμονόμησης MALDI TOF MS

Arg ¹ -bradykinin	904.47Da
Angiotensin I	1296.69Da
Glu ¹ -fibrinopeptide B	1570.68Da
ACTH(1-17clip)	2093.00Da
ACTH(18-39clip)	2465.20Da
ACTH(7-38clip)	3657.93Da

Όργανα- συσκευές

1. Συσκευή υπερήχων
2. Επιτραπέζια φυγόκεντρος για erpendorf
3. Πεχάμετρο
4. Συσκευή ηλεκτροφόρησης
5. Τροφοδοτικό για ηλεκτροφόρηση
6. Φασματογράφος Μάζας LCQ
(Thermo Finnigan)
7. Φασματογράφος Μάζας Ultraflex
(Bruker)
8. Μεταλλικό πλακίδιο MALDI
9. Θερμαινόμενο υδρόλουτρο
10. Αναδευτήρας για erpendorf
μεταβλητής θερμοκρασίας

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Σπασισμο κυττάρων-απομόνωση μεμβρανών.

(Dieter Oesterhelt & Walter Stoeckenius Proc. Nat. Acad 1973)

Τα κύτταρα του *Halobacterium halobium* απαιτούν κατά την ανάπτυξή τους, μεγάλες συγκεντρώσεις NaCl. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται κατά την εκθεσή τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλάτων ή απιονισμένου νερού. Η συλλογή των κυττάρων (10lt) πραγματοποιείται στους 4⁰C με φυγοκέντριση στα 13000g για 15min ενώ η λύση των κυττάρων πραγματοποιείτε παρουσία διαλύματος που περιέχει 250ml βασικού άλατος , 5ml DNase και 2lt NaCl 0.1M. Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 40000g για 40min μετά το τέλος της οποίας απομακρύνεται το κόκκινο υπερκείμενο ενώ το ίζημα επαναδιαλύεται σε 300ml 0.1M NaCl και φυγοκεντρίται .Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι το υπερκείμενο που προκύπτει να είναι σχεδόν άχρωμο. Ακολουθούν 2-3 πλύσεις του ιζήματος με απιονισμένο νερό και συλλογή αυτού σε 6-10ml νερού. Στην συνέχεια πραγματοποιείται υπερφυγοκέντριση στα 100000g σε διαβάθμιση πυκνότητας σουκρόζης 30-50% στους 15⁰C για 17h. Η υπερφυγοκέντριση είναι μία από τις κύριες μεθόδους διαχωρισμού των μεμβρανών.

2.2.2 Ηλεκτροφόρηση

Το διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού μεταφέρεται μεταξύ γυάλινων πλακών (διαστάσεις 10cm x 8cm x 2mm 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 50 µg δείγματος και η ηλεκτροφόρηση γίνεται με 25mA για 2.5h. Η χρώση και ο αποχρωματισμός γίνονται με τα διαλύματα για κολλοειδή Coomassie και με παραμονή της πηκτής στο καθένα περίπου 12h.

2.2.3 Προετοιμασία βακτηριοροδοψίνης για LCQ Mass Spectrometer

Κατά την προετοιμασία της βακτηριοροδοψίνης με πέψη σε διάλυμα, το δείγμα της βακτηριοροδοψίνης που έχει απομονωθεί από τις πορφυρές μεμβράνες αραιώνεται σε 50mM NH_4HCO_3 μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1mg/ml. Ακολουθεί πέψη της πρωτεΐνης (50μg) με πρωτεϊνάση K(αναλογία BR/Pr.K 20/1)για 2 ώρες στους 37⁰C με διαφοροποίηση της αναλογίας πρωτεΐνης/ πρωτεϊνάση K. Στην συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρίται για 30min στα 14000g και διαχωρίζεται το υπερκείμενο (κομμένα διαλυτά πεπτίδια) από το ίζημα (διαμεμβρανικές έλικες) το οποίο εκπλύνεται με 50M NH_4HCO_3 .Στην συνέχεια το ίζημα διαλυτοποιείται σε 95% αιθανόλης (προκειμένου να απομακρυνθούν τα λιπίδια [32]) στους -20⁰C για 12h. Στην συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρίται για 30min στα 14000g, συλλέγετε το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 50% ACN και διατηρείται στον πάγο για 1h. Κατόπιν το δείγμα φυγοκεντρίται για 30min στα 14000g, συλλέγετε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε CH_2Cl_2 .Τέλος μετά από φυγοκέντριση για 30min στα 14000g, συλλέγετε το υπερκείμενο και το ίζημα και επεξεργάζονται για ανάλυση με φασματομετρία μάζας. Το ίδιο συμβαίνει και με τα υπερκείμενα που συλλέχθηκαν κατά τα διάφορα στάδια της διαδικασίας.

Η αύξηση της συγκέντρωσης του δείγματος πραγματοποιείται με φυγοκεντρικό ξηραντήρα με τελικό όγκο διαλύματος 5μl και περαιτέρω διαλυτοποίηση αυτού με 25μl 50%ACN / 0.1%FA .Ο διαλύτης αυτός είναι συμβατός με το όργανο (LCQ Advantage MS, THERMO FINNIGAN) , έχοντας ως αποτέλεσμα το σήμα που προκύπτει να είναι αρκετά ισχυρό.

2.2.4 Προετοιμασία βακτηριοροδοψίνης για Ultraflex TOF-TOF Mass Spectrometer

- **Προετοιμασία βακτηριοροδοψίνη με πέψη σε διάλυμα**

Η διαδικασία πέψης της βακτηριοροδοψίνης είναι όμοια με την διαδικασία που παρουσιάστηκε παραπάνω. Η διαφορά κατά την περίπτωση της ανάλυσης με MALDI είναι η επεξεργασία των δειγμάτων κατά την είσοδό τους στον φασματογράφο μάζας. Αναλυτικότερα, τα υπερκείμενα που προκύπτουν από την διαδικασία της πέψης και των εκχυλίσεων τοποθετούνται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα μέχρι ξηρού. Τα ξηρά δείγματα υπερκειμένων και ιζημάτων,

επαναδιαλύονται σε 20μl 70% ACN / 0.5%TFA . 0.5μl από κάθε δείγμα τοποθετούνται σε μεταλλικό πλακίδιο MALDI και αναμειγνύονται με 0.5μl διαλύματος 3mg/ml w/v α-κυανο-4-υδροξυκινναμικό οξύ σε 70% ACN / 0.5% v/v TFA. Τα δείγματα αφήνονται προς ξηρανση σε θερμοκρασία δωματίου και το πλακίδιο τοποθετείται στο φασματογράφο μάζας Ultraflex TOF-TOF (Bruker).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ
ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ	ΑΛΛΑΓΗ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΕΝΖΥΜΟΥ / ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ
ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ	ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΜΜΩΝΙΑΣ
ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ	ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΜΕ ΤΡΥΨΙΝΗ
ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ	ΑΛΛΑΓΗ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ (2 ΩΡΕΣ, 4 ΩΡΕΣ, 6 ΩΡΕΣ, 45 ΛΕΠΤΑ)

- **Προετοιμασία βακτηριοροδοψίνη με πέψη σε πηκτή**

Κατά την προετοιμασία βακτηριοροδοψίνης για πέψη σε πηκτή, η πρωτεόλυση της βακτηριοροδοψίνης πραγματοποιείται με θρυψίνη, απευθείας στη πηκτή του πολυακρυλαμιδίου έπειτα από αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και χρώση με Coomassie. Αρχικά η μπάντα της βακτηριοροδοψίνης, αποκόπτεται από την βαμμένη με μπλε Coomassie πηκτή και αποχρωματίζεται με διάλυμα 40%v/v μεθανόλη και 10%v/v οξικό οξύ. Στην συνέχεια η μπάντα απομονώνεται, αφυδατώνεται με ακετονιτρίλιο και ξηρένεται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα. Αναγωγή της ξηραμένης πηκτής πραγματοποιείται με 10mM DTT σε 50mM διττανθρακικό αμμώνιο για 1h στους 57⁰C. Αλκυλίωση της πηκτής πραγματοποιείται με 55mM ιοδοακεταμίδιου σε 50mM διττανθρακικό αμμώνιο για 1h σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Το κομμάτι της πηκτής κατόπιν πλύνεται με 50mM διττανθρακικό αμμώνιο, αφυδατώνεται με ακετονιτρίλιο και ξηρένεται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα. Μετά την ξήρανση ακολουθεί πρωτεόλυση με προσθήκη 20μl διαλύματος πρωτεόλυσης (0.125μgr θρυψίνη ,1μl HCl(1mM), 19μl διττανθρακικό αμμώνιο 40mM / 9%ACN) για 12h στους 40⁰C. Στην συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα πρωτεόλυσης από τα τμήματα της πηκτής , τα οποία διαλυτοποιούνται σε 100μl διαλύματος

50%ACN /50%H₂O /1%FA και αφήνονται για ανάδευση 1h.Ο σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι να απομακρυνθεί οτιδήποτε υδατικό από τα τμήματα της πηκτής και να συλλεχθούν τα υδρόφιλα πεπτίδια Το υπερκείμενο που συλλέγετε μετά την ανάδευση ενώνεται με το αρχικό διάλυμα πρωτεόλυσης. Στην συνέχεια τα τμήματα της πηκτής επωάζονται υπό ανάδευση για 1h σε 100μl διαλύματος 100%ACN. Το υπερκείμενο που συλλέγετε μετά την ανάδευση ενώνεται με το αρχικό διάλυμα πρωτεόλυσης . Με τον οργανικό διαλύτη ACN συλλέγονται τα υδρόφοβα πεπτίδια. Το διάλυμα πρωτεόλυσης με τα συλλεγμένα πεπτίδια τοποθετούνται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα για 12h. Τα ξηρά δείγματα που προέκυψαν μετά από 12h, επαναδιαλύθηκαν σε 20μl 70% ACN / 0.5%TFA. 0.5μl από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε μεταλλικό πλακίδιο MALDI και προστέθηκαν 0.5μl διαλύματος 3mg/ml w/v α-κυανο-4-υδροξυκινναμικό οξύ σε 70% ACN και 0.5% v/v TFA.Τα δείγματα αφήνονται για ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου και το πλακίδιο τοποθετείτε στο φασματογράφο μάζας Ultraflex TOF-TOF (Bruker).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ (ΧΡΟΝΟΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ)
ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ	2 ΩΡΕΣ
ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ	12 ΩΡΕΣ

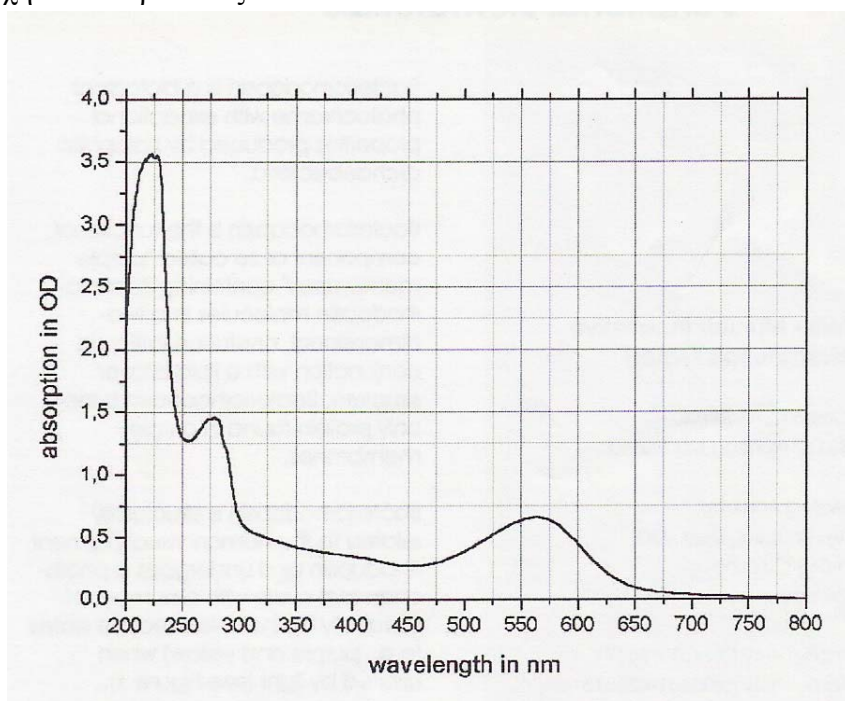
2.2.5 Επεξεργασία αποτελεσμάτων με μεθόδους βιοπληροφορικής

Τα φάσματα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με λογισμικό X-calibur V1.3 (Thermo Finnigan) στην περίπτωση του LCQ και με το λογισμικό flexAnalysis (Bruker) στην περίπτωση του Ultraflex TOF-TOF. Η αναγνώριση και ταυτοποίηση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων NCBI στην περίπτωση του LCQ με τον αλγόριθμο OMSSA Browser [25] (Open Mass Spectrometry Search Algorithm) ενώ στην περίπτωση του Ultraflex TOF-TOF με Sequest Editor/Biotools [26] ή Mascot [27]. Η αλληλουχία των πεπτιδίων και η ιδιότητες της βακτηριοδοψίνης είναι διαθέσιμα στο δίκτυο (<http://expasy.org>). Η τιμή GRAVY κάθε πεπτιδίου προσδιορίστηκε με το πρόγραμμα Protparam.

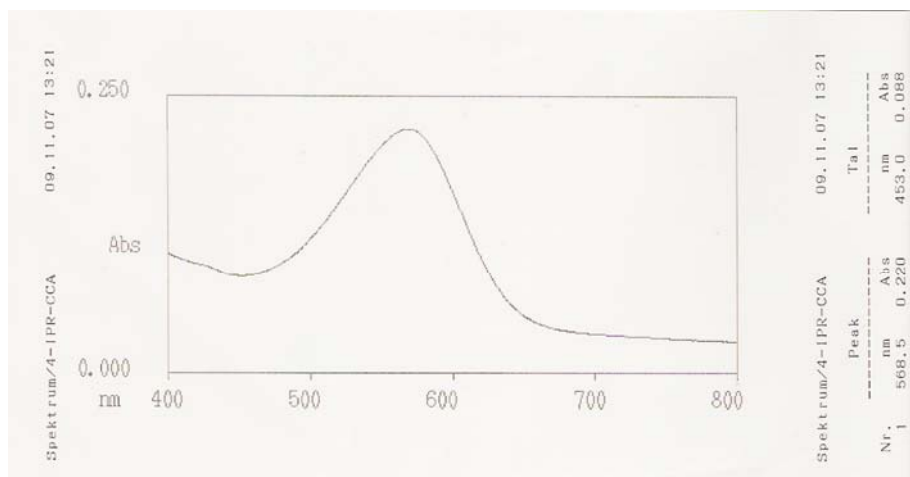
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Φάσμα Απορρόφησης

Προκειμένου να ελεγχθεί η κατάσταση της βακτηριοροδοψίνης, λαμβάνεται φάσμα απορρόφησης αυτής και συγκρίνεται με ένα τυπικό φάσμα απορρόφησης που λαμβάνεται από το εργαστήριο παρασκευής της. Υπό συνθήκες σταθερής κατάστασης της πρωτεΐνης, αναμένεται απορρόφηση στα 570nm όπου απορροφά η ρετινάλη. Στο φάσμα της εικόνας 3.1 παρατηρούνται μέγιστα στα 570nm, 218nm 275nm που οφείλονται στην παρουσία της ρετινάλης (570nm) και στην παρουσία των πεπτιδικών δεσμών και των αρωματικών ενώσεων αντίστοιχα που εκτείνονται στην περιοχή του υπεριώδους.



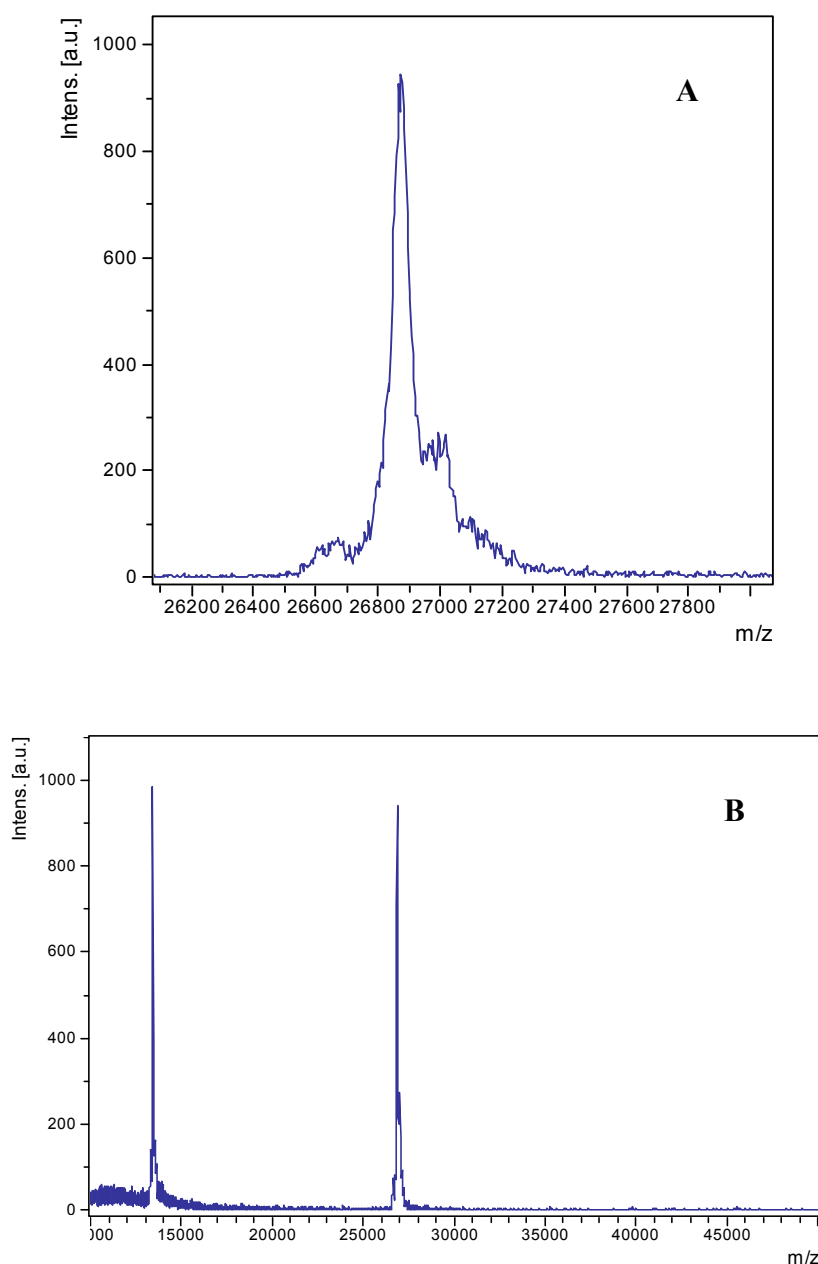
Εικόνα 3.1 : Τυπικό φάσμα απορρόφησης της βακτηριοροδοψίνης σε υδατικό διάλυμα pH 7 (www.mib-biotech.de)



Εικόνα 3.2 : Φάσμα απορρόφησης βακτηριοροδοψίνης του προς επεξεργασία και ανάλυση δείγματος (πρωτεϊνική συγκέντρωση 18.33mgr/ml)

3.2 Έλεγχος Καθαρότητας Βακτηριοροδοψίνης

Ο έλεγχος της καθαρότητας της βακτηριοροδοψίνης καθώς και ο έλεγχος της θραυσματοποίησης αυτής πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-Tricine 16.5%T, 6%C και με φασματοσκοπία μάζας. Η μάζα της προς ανάλυση βακτηριοροδοψίνης όπως έγινε γνωστή με το φασματόμετρο μάζας Ultraflex (MALDI-TOF-TOF) όπως απεικονίζεται στο φάσμα της εικόνας 3.4A είναι 26875Da. Από το φάσμα της εικόνας 3.4B στο οποίο παρατηρείται μία επιπλέον κορυφή στα 13397Da, γίνεται αντιληπτό ότι η βακτηριοροδοψίνη έχει υποστεί εν μέρη πρωτεόλυση.



Εικόνα 3.4: A) Φάσμα μάζας βακτηριοροδοψίνης πριν την πέψη B) Ολικό φάσμα βακτηριοροδοψίνης .

3.3 Αλληλουχία αμινοξέων της βακτηριοροδοψίνης και ποσοστό υδροφοβικότητας των ελίκων (<http://expasy.org>)

10	20	30	40	50	60
MLELLPTAVE	GVSQAQITGR	PEWIWLALGT	ALMGLGTYLF	LVKGMGVSDP	DAKKFY AITT
70	80	90	100	110	120
LVP AIAFTMY	LSM LLGYGLT	MVPFGGEQNP	I YW ARYADWL	FTT PLLLLDL	ALLVDADQGT
130	140	150	160	170	180
IL ALVGADGI	MIG TGLVGAL	TKVYSYR FVW	WA I STA AMLY	ILY V LF FGFT	SKAESMRPEV
190	200	210	220	230	240
ASTFK V LRNV	TV V L WSAYPV	VW LIGSEGAG	IV PLNIETLL	FM VLDVSAKV	GF GLILLRSR
250	260				
AIFGAEAPE	PSAGDGAAAT	SD			

Πίνακας 1: Απεικόνιση της αλληλουχίας της βακτηριοροδοψίνης. Τα αμινοξέα με εντονότερο χρώμα αποτελούν της α-έλικες της πρωτεΐνης

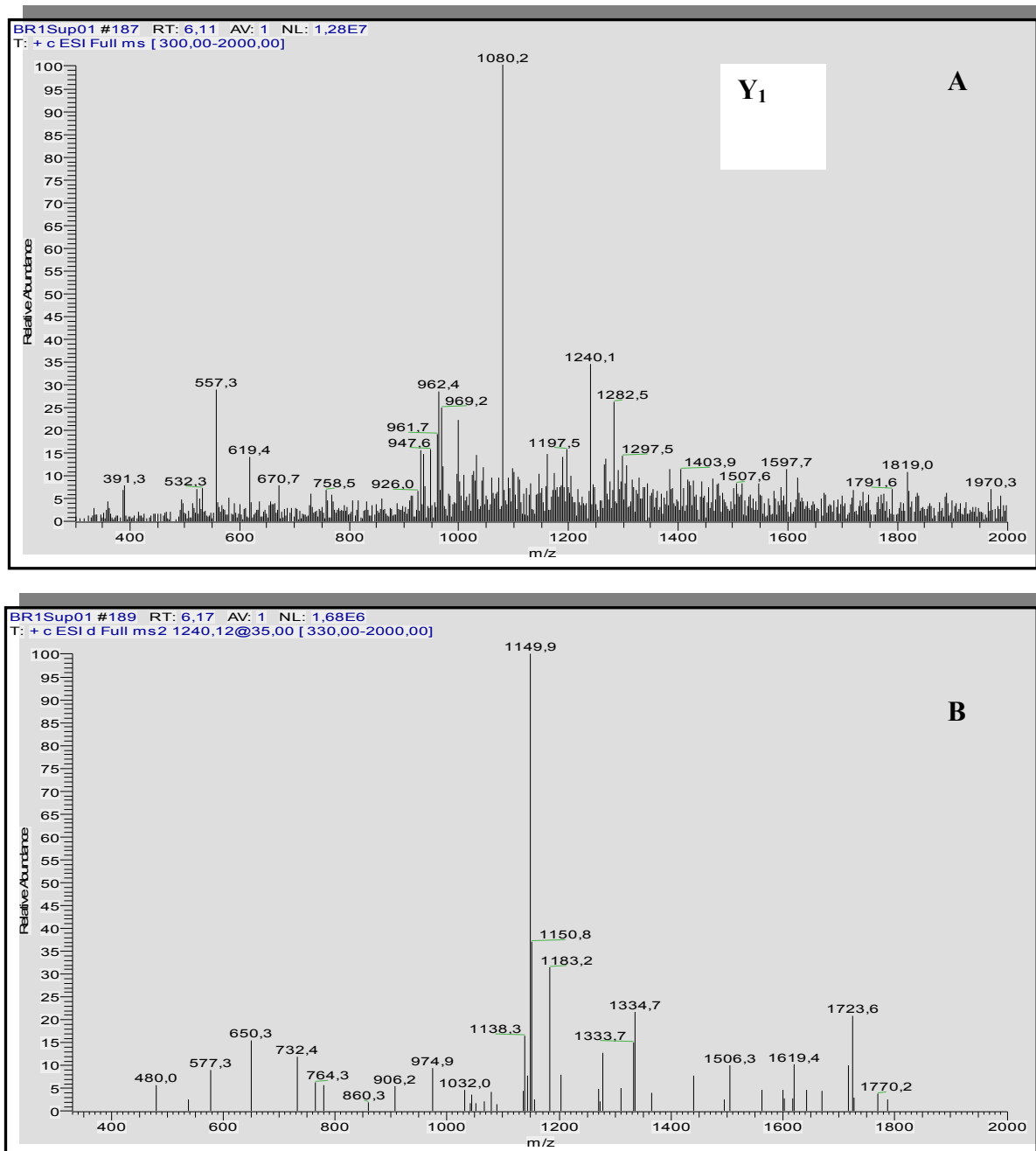
Helix	SEQUENCE	Grand average of hydrophobicity (GRAVY)
A	IWLALGTALM GLGTYLFLV	1.842
B	AITTLVPAIA FTMYSMLL	1.821
C	YWARYADWLF TTPLLLLD	0.361
D	ILALVGADGI MIGTGLVGAL	1.910
E	FVWWAISTAA MLYILYVLF	1.930
F	VLRNVTVVLW SAYPVWLI	1.511
G	ETLLFMVLDV SAKVGFGLIL	1.376

Πίνακας 2: Στον παραπάνω πίνακα απεικονίζεται η αλληλουχία των αμινοξέων των επτά α-ελίκων της βακτηριοροδοψίνης καθώς και το ποσοστό υδροφοβικότητας της κάθε έλικας .

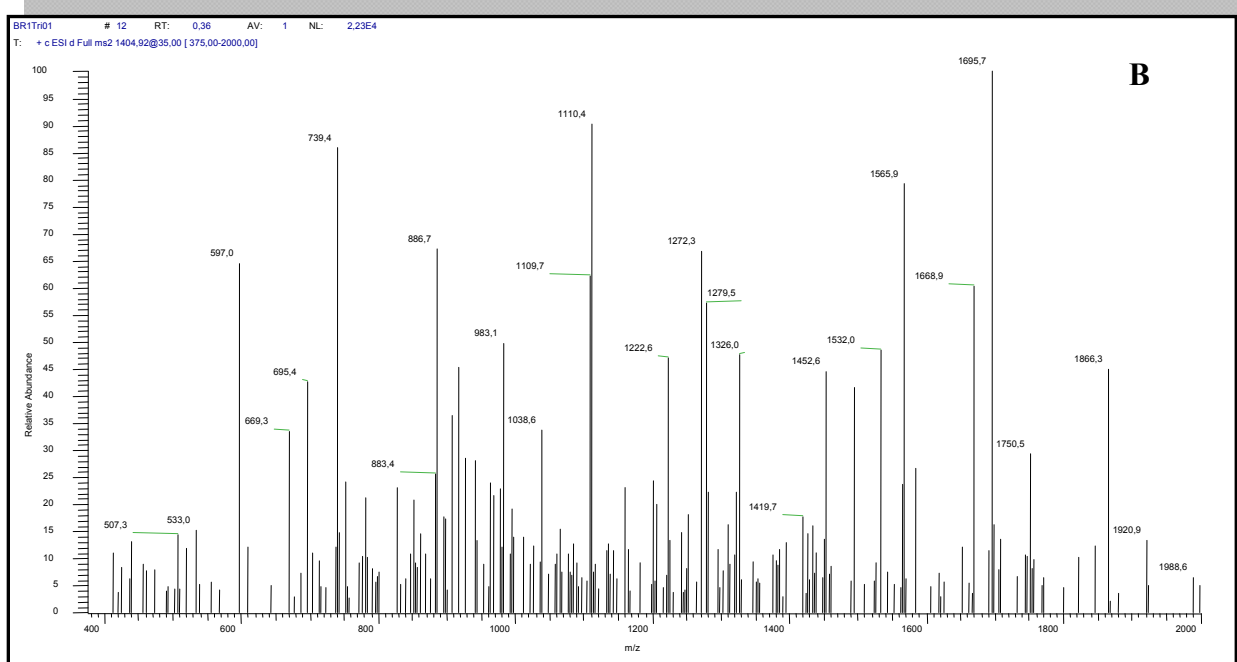
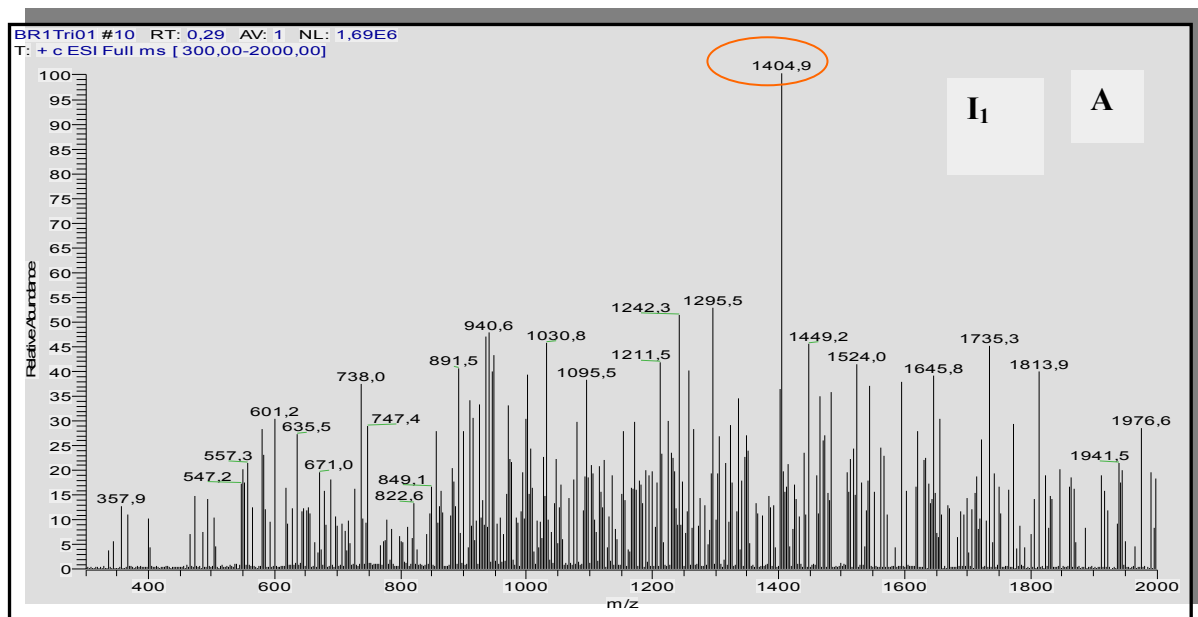
Όπως γίνεται αντιληπτό από τις τιμές GRAVY των τμημάτων αυτών της πρωτεΐνης,(πίνακας 2) οι έλικες της πρωτεΐνης είναι ιδιαίτερα υδροφοβικές και είναι αρκετά δύσκολο να πραγματοποιηθεί αναγνώριση της πρωτεΐνης βασιζόμενη σε πεπτίδια που εμπεριέχονται σε έλικες.

3.4 Ταυτοποίηση Βακτηριοροδοψίνης με πέψη σε διάλυμα και LCQ Mass Spectrometer

Με την διαδικασία της πέψης σε διάλυμα ο ο φασματογράφος μάζας με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό αναγνώρισε δύο πεπτίδια της βακτηριοροδοψίνης. Το δείγμα στο οποίο έγινε η αναγνώριση των πεπτιδίων ήταν το υπερκείμενο και το ίζημα που προέκυψε από την πέψη της BR με πρωτεΐναση- K που πραγματοποιήθηκε 2h με αναλογία BR/PrK 1/5 .



Εικόνα 3.5: Α) Πλήρες φάσμα (Full MS) υπερκειμένου των θραυσμάτων της BR μετά από πέψη με Pr.K 2h στους 37⁰C. Β) Φάσμα MS-MS της κορυφής 1240.1 .



Εικόνα 3.6: Α) Πλήρες φάσμα (Full MS) ιζήματος των θραυσμάτων της BR μετά από πέψη με Pr.K 2h στους 37⁰C. Β) Φάσμα MS-MS της κορυφής 1404.9

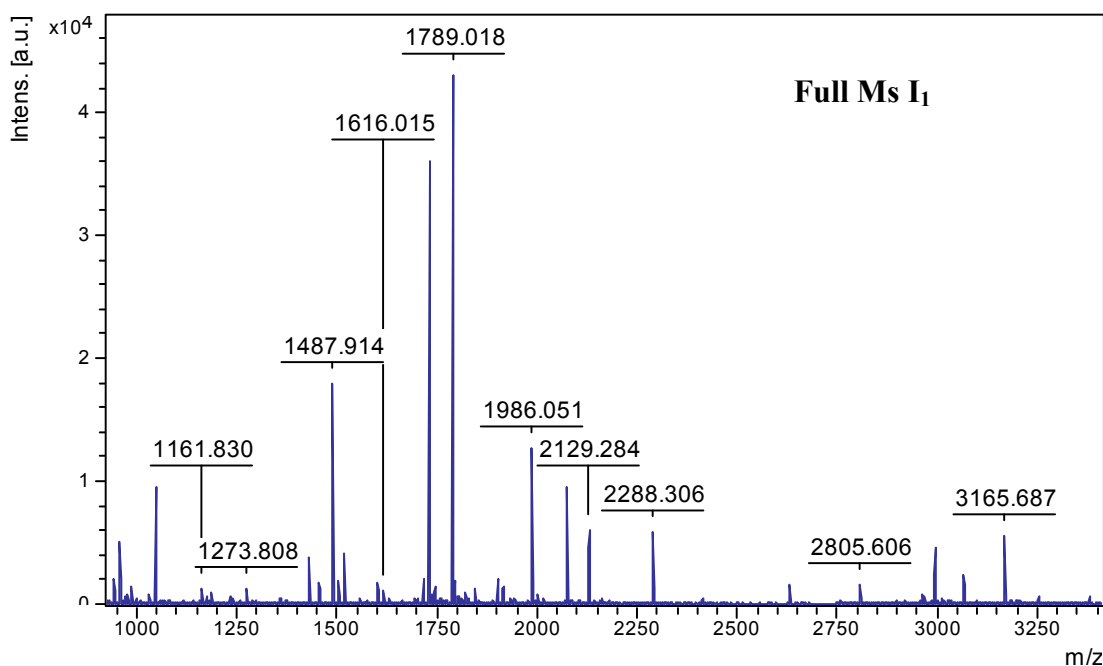
Είδος Δείγματος	Κορυφή m/z	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ME ESI	ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)
Y ₁	1240.1	G IVPLNIETLL FMVLDVSAKV GFGLILLRSR	1.376
I ₁	1404.9	GR PEWIWLALGT ALMGLGTL YF LVK	0.808

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MLELLPTAVE	GVSQAQITGR	PEWIWLALGT	ALMGLGTYF	LVKGMGVSDP	DAKKFYAITT
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
LVPPIAFTMY	LSMLLGYGLT	MVPFGEQNP	IYWARYADWL	FTTPLLILLD	ALLVDADQGT
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
ILALVGADGI	MIGTGLVGAL	TKVYSYRFVW	WAISTAAMLY	ILYVLFFGFT	SKAESMRPEV
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
ASTFKVLRNV	TVVLWSAYPV	VWLIIGSEGAG	IVPLNIETLL	FMVLDVSAKV	GFGLILLRSR
<u>250</u>	<u>260</u>				
AIFGEAEAPE	PSAGDGAAAT	SD			

Πίνακας 3: Απεικόνιση της αλληλουχίας της βακτηριοροδοψίνης. Τα αμινοξέα με εντονότερο και γαλάζιο χρώμα αποτελούν της α-έλικες της πρωτεΐνης, ενώ τα υπογραμμισμένα και πλάγια γραφής αμινοξέα αποτελούν τα αναγορισμένα πεπτίδια..

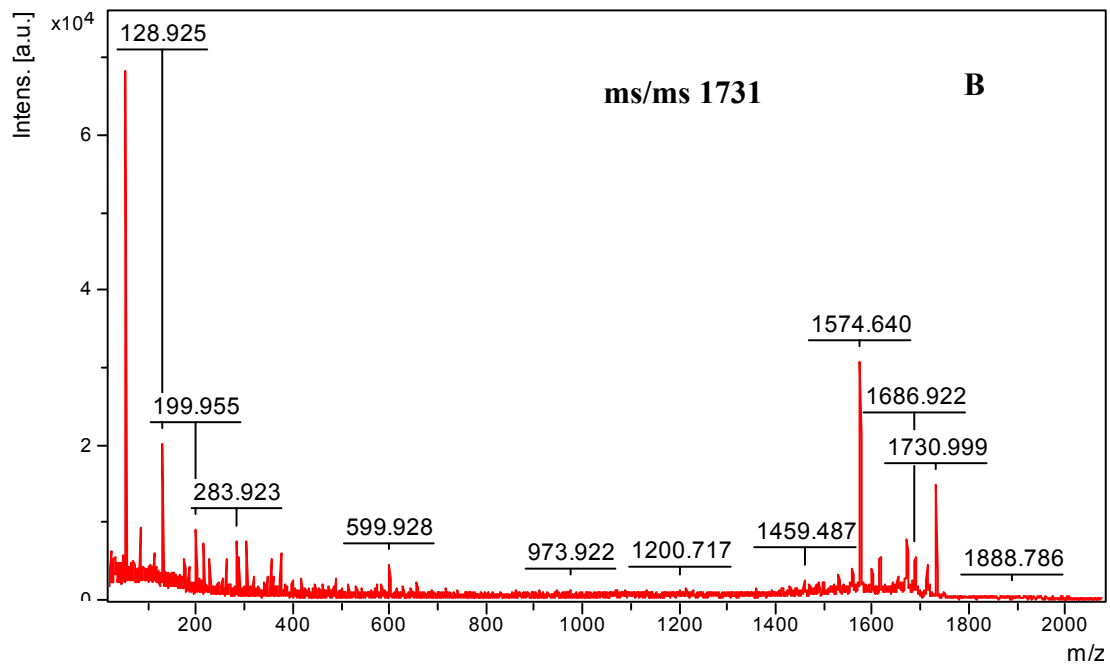
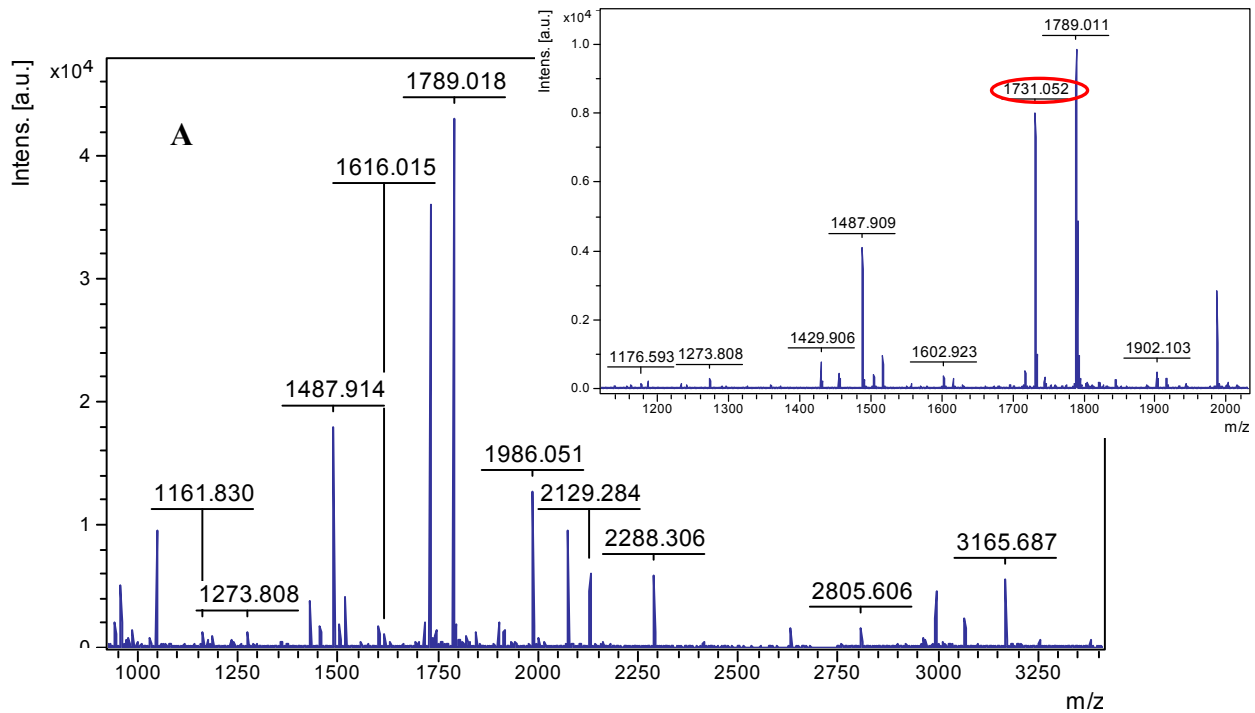
3.5 Ταυτοποίηση Βακτηριοροδοψίνης με πέψη σε διάλυμα και Ultraflex TOF-TOF Mass Spectrometer

Αρχικά μελετήθηκαν τα ιζήματα και τα υπερκείμενα που προέκυψαν από τα διάφορα βήματα της διαδικασίας που αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Κατά την διαδικασία αυτή η αρχική ποσότητα βακτηριοροδοψίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 50μg, η διάρκεια πέψης 2 ώρες και η αναλογία BR/Pr.K: 1/20. Τα δείγματα εκ των οποίων έγινε αναγνώριση πεπτιδίων ήταν το ίζημα (**I₁**) που προκύπτει μετά την πέψη 2 ωρών με πρωτεΐναση-K σε υδατικό διάλυμα NH₄HCO₃ καθώς και το ίζημα (**I₂**) και το υπερκείμενο (**Y₂**) που προκύπτει μετά την δωδεκάωρη επώαση του ιζήματος πέψης με αιθανόλη.

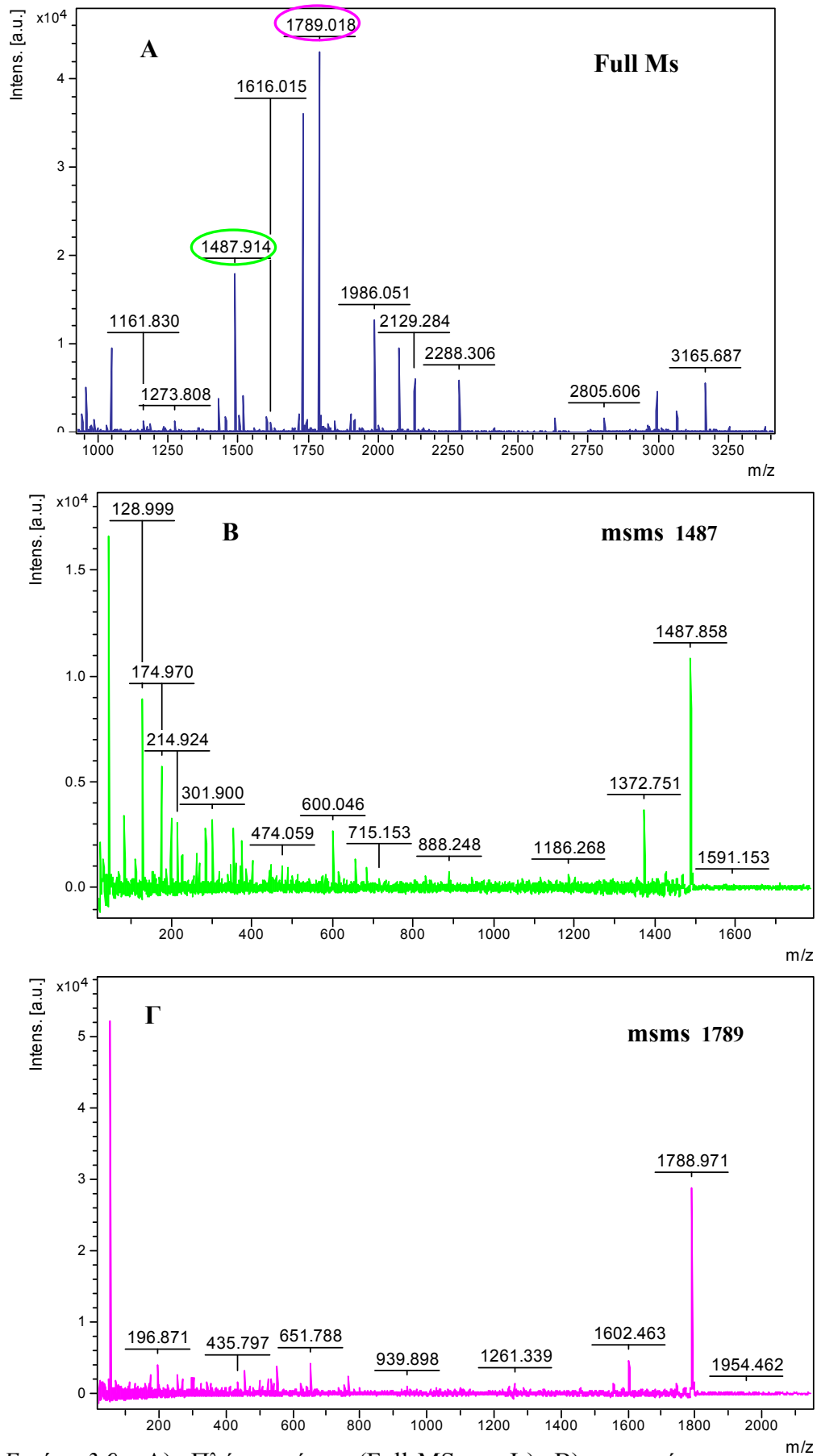


Εικόνα 3.7: Πλήρες φάσμα (Full MS) ιζήματος των θραυσμάτων της BR μετά από πέψη με Pr.K 2h στους 37°C.

Από το Full Ms I₁ φάσμα μόνο τα ms-ms φάσματα των κορυφών m/z 1730, m/z 1788 και m/z 1487 αναγνώρισαν πεπτίδια.



Εικόνα 3.8: A) Πλήρες φάσμα (Full MS) και B) msms φάσμα της κορυφής 1731 m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο DVSAKVGFLILLRSR.

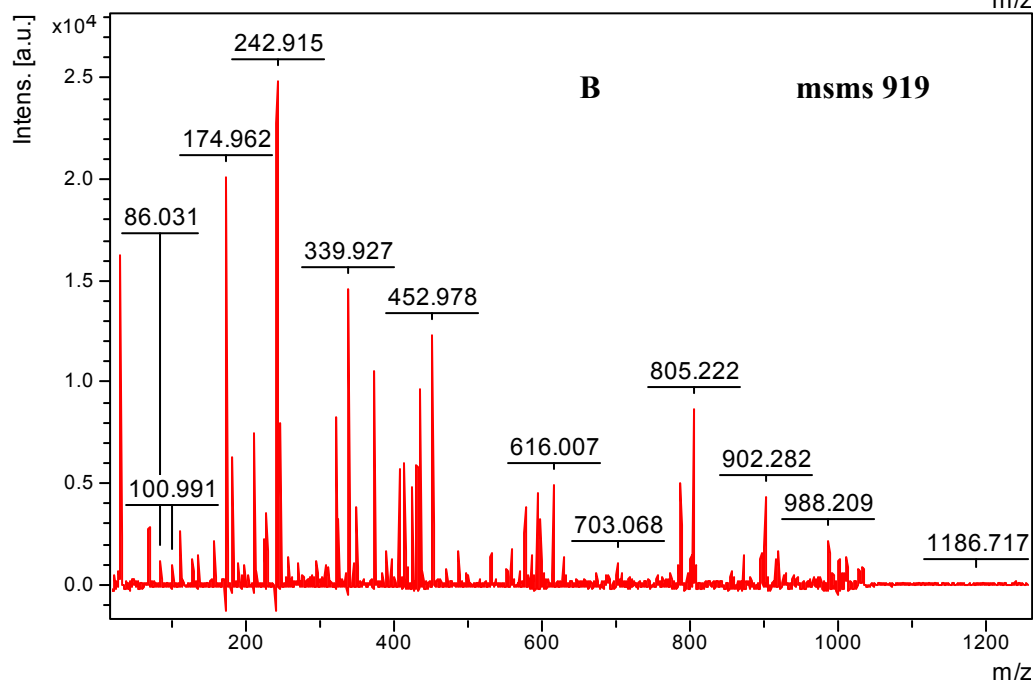
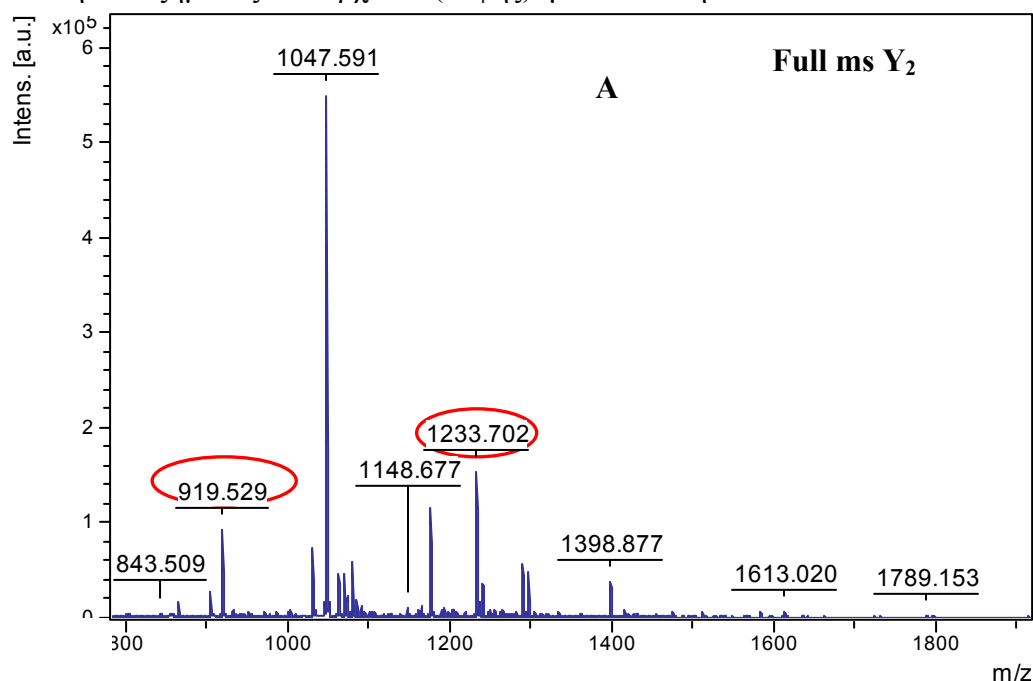


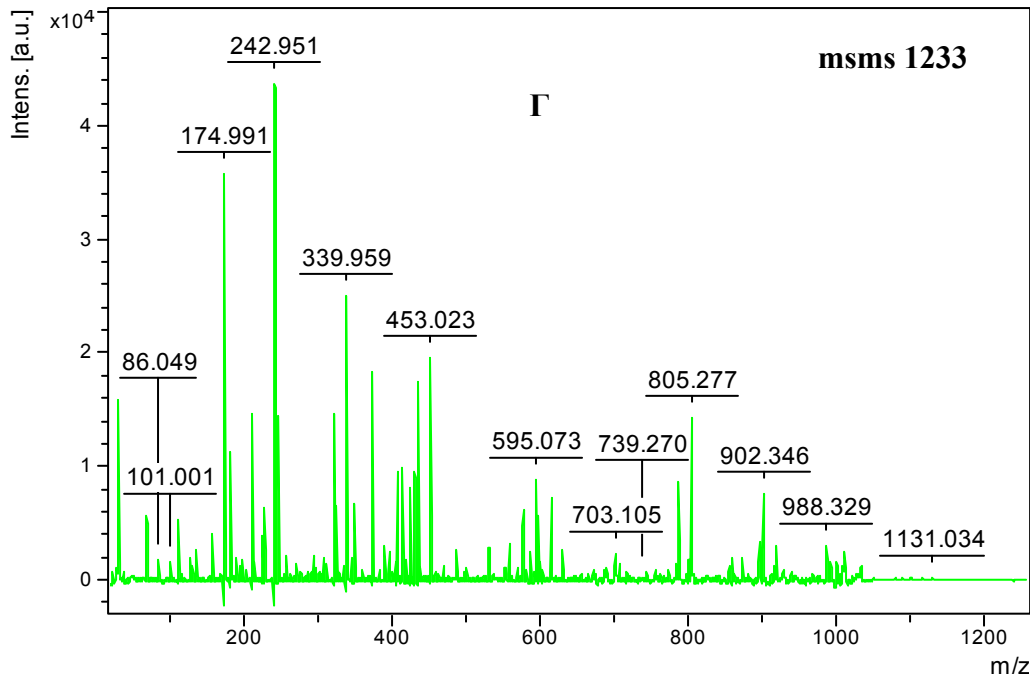
Εικόνα 3.9 : Α) Πλήρες φάσμα (Full MS του I₁) Β)msms φάσμα της κορυφής 1487m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτιδίο DVSAKVGFGILLR Γ) msms φάσμα της κορυφής 1789m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτιδίο RNVTVLWSAYPVW

Ο παρακάτω πίνακας μας δείχνει συνοπτικά τα πεπτίδια που αναγνωρίστηκαν από το ίζημα που προκύπτει αμέσως μετά την πέψη της βακτηριοροδοψίνης. Όπως γίνεται αντιληπτό από τις τιμές GRAVY τα πεπτίδια που αναγνωρίστηκαν είναι αρκετά υδροφοβικά.

<i>Είδος Δείγματος</i>	<i>Κορυφή m/z</i>	<i>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ME MALDI</i>	<i>ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)</i>
I ₁	1731	DVSAKVGFLILLRSR.	0.631
I ₁	1487	DVSAKVGFLILLR	1.100
I ₁	1789	RNVTVVLSAYPVVW	0.827

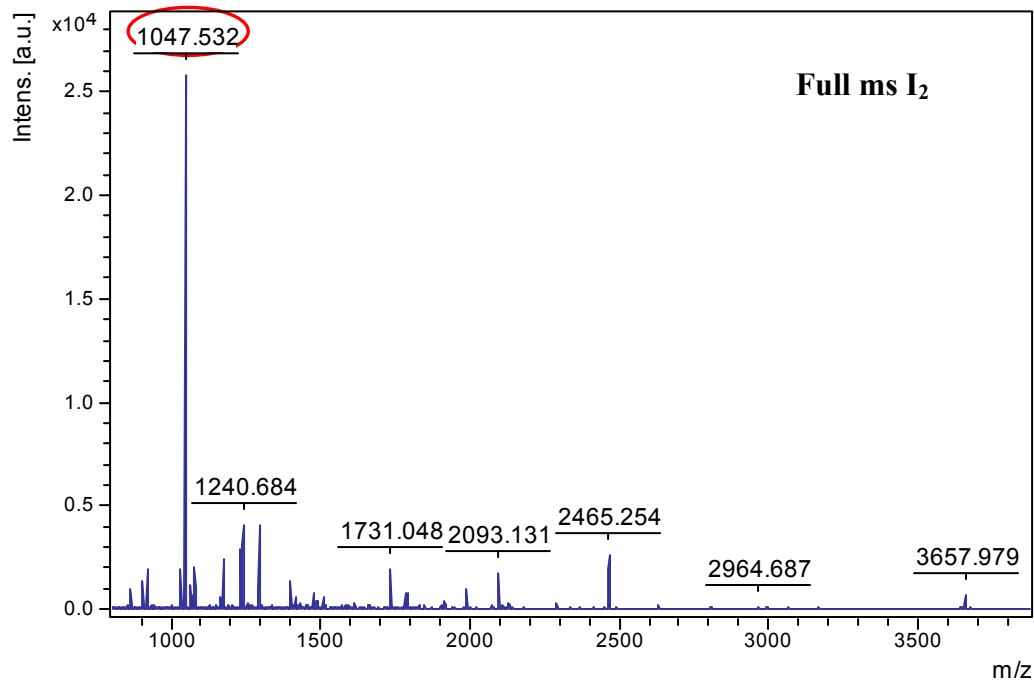
Ακολουθούν τα φάσματα του υπερκειμένου που προέκυψαν μετά την δωδεκάωρη επώαση του ιζήματος του αρχικού (πέψης) με αιθανόλη.

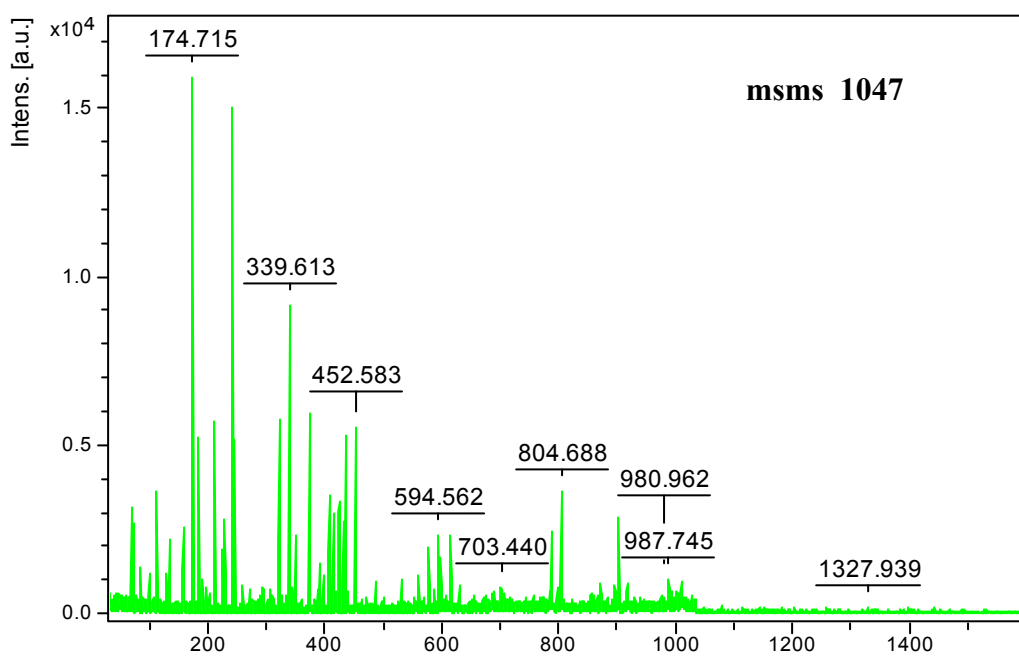




Εικόνα 3.10 : Α) Πλήρες φάσμα (Full MS του Y_2) Β)msms φάσμα της κορυφής 919m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο NPIYWAR Γ) msms φάσμα της κορυφής 1233m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο GEQNPIYWAR.

Ακολουθούν το φάσμα του ιζήματος που προέκυψε μετά την δωδεκάωρη επώαση του ιζήματος του αρχικού (πένης) με αιθανόλη.





Εικόνα 3.11 : Α) Πλήρες φάσμα (Full MS του I₂) Β)msms φάσμα της κορυφής 1047m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο QNPIYWAR

Είδος Δείγματος	Κορυφή m/z	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ME MALDI	ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)
Y ₂	919	NPIYWAR	-0.786
Y ₂	1233	GEQNPIYWAR	-1290
I ₂	1047	QNPIYWAR	-1.125

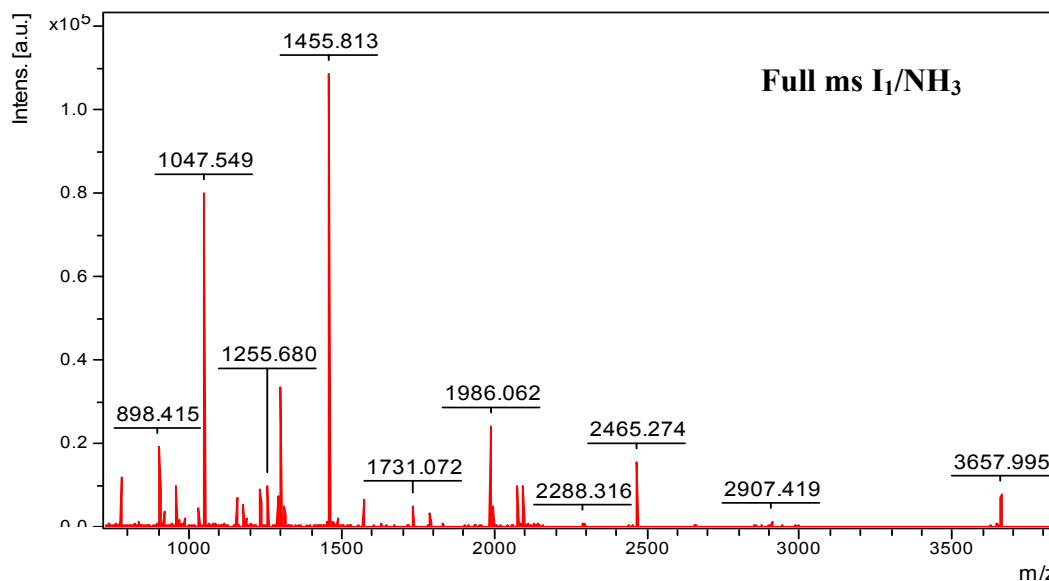
Συνολικά από την μεθοδολογία που περιγράφηκε αναγνωρίστηκαν έξι πεπτίδια. Τα πεπτίδια που αναγνωρίστηκαν από το ίζημα που προέκυψε μετά της δύο ώρες πρωτεόλυσης ήταν αρκετά υδρόφοβα καθώς οι τιμές GRAVY που προέκυψαν ήταν θετικές. Αντίθετα τα πεπτίδια που ταυτοποιήθηκαν μετά την δύωρη επώαση των θραυσμάτων σε αιθανόλη ήταν υδρόφιλα καθώς οι τιμές GRAVY τους, ήταν αρνητικές. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζεται η θέση των πεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν .

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MLELLPTAVE	GVSQAQITGR	PEWIWLALGT	ALMGLGTYLF	LVKGMGVS DP	DAKKFY AITT
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
LVPAIAFTMY	LSMLLGYGLT	MVPFG GEQNP	IYWARYADWL	FTTPLLLLDL	ALLVDADQGT
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
ILALVGADGI	MIGTGLVGAL	TKVYSYR FVW	WAISTAAMLY	ILYVLFFGFT	SKAESMRPEV
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
ASTFK VLRNV	TVVLWSAYPV	VWLI GSEGAG	IVPLNIETLL	FMVLDVSAKV	GFGLILLRSR
<u>250</u>	<u>260</u>				
AIFGEAEAPE	PSAGDGAAAT	SD			

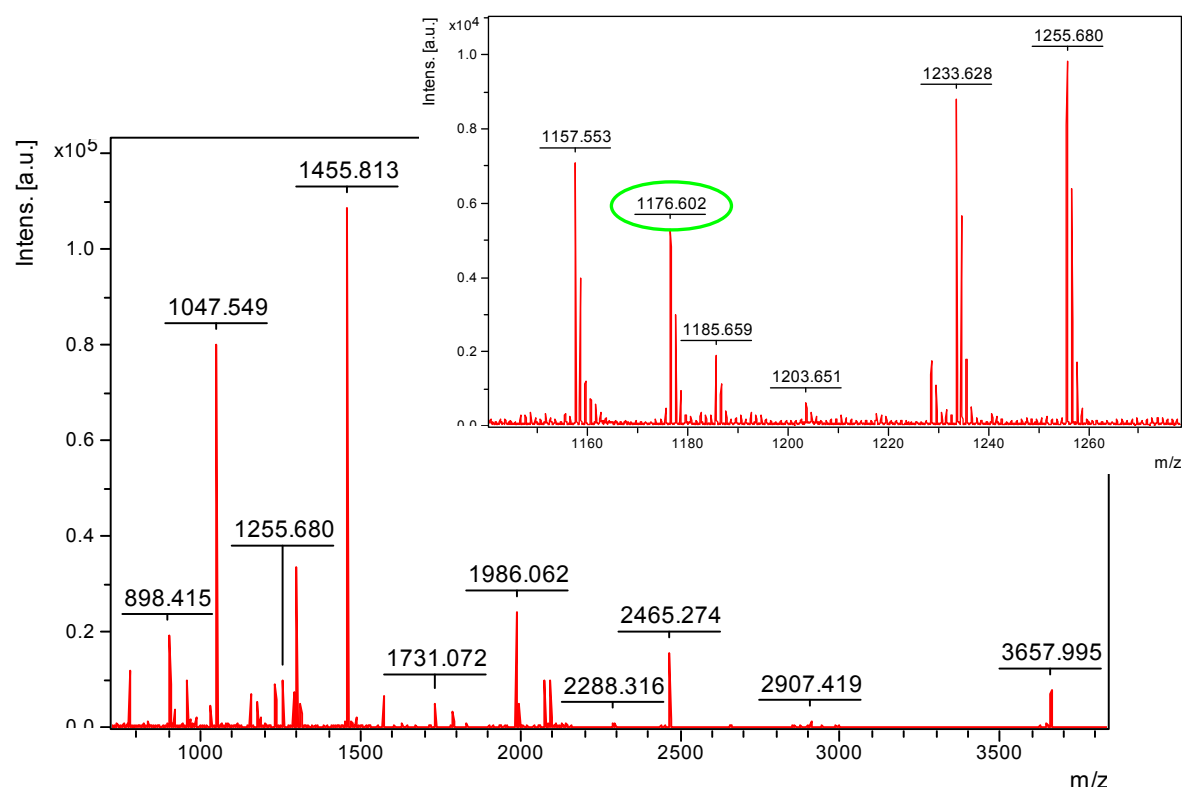
Πίνακας 4: Απεικόνιση της αλληλουχίας της βακτηριοροδοψίνης. Τα αμινοξέα με εντονότερο και γαλάζιο χρώμα αποτελούν της α-έλικες της πρωτεΐνης, ενώ τα υπογραμμισμένα και πλάγιας γραφής αμινοξέα αποτελούν τα αναγνωρισμένα.

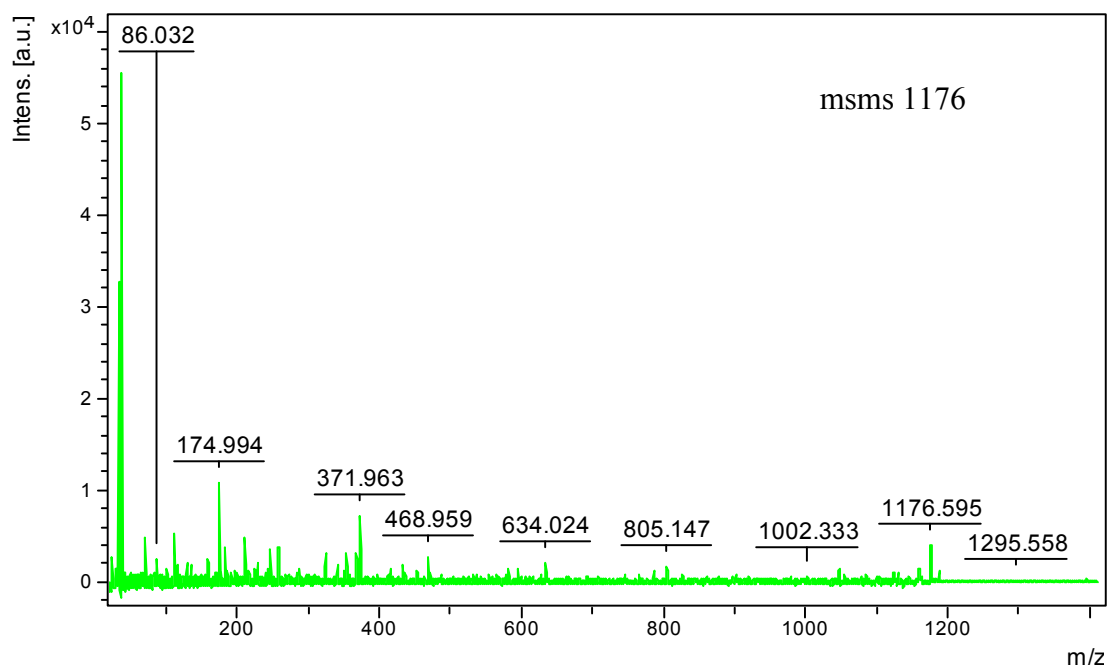
3.5.2 Πρωτεόλυση Παρουσία Αμμωνίας

Στην συνέχεια τροποποιήθηκε η διαδικασία πέψης και το διάλυμα πέψης 50mM NH_4HCO_3 αντικαταστάθηκε από διάλυμα 50mM NH_4HCO_3 / NH_3 1.77M / H_2O . Η ώρα πέψης διατηρήθηκε σταθερή. Από την τροποποίηση αυτή ταυτοποιήθηκαν έξι πεπτίδια και βρίσκονταν στο ίζημα (I_1) που προκύπτει μετά την πέψη 2 ωρών με πρωτεϊνάση-K.

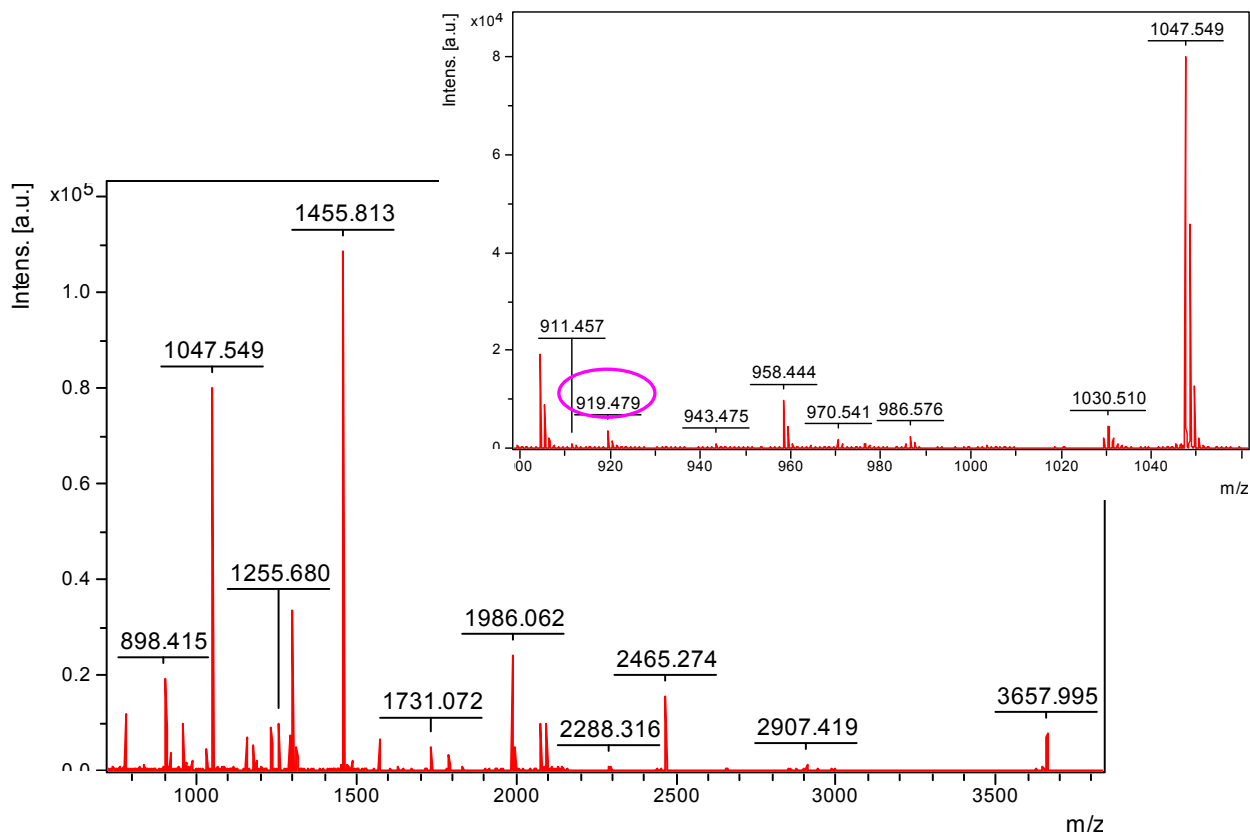


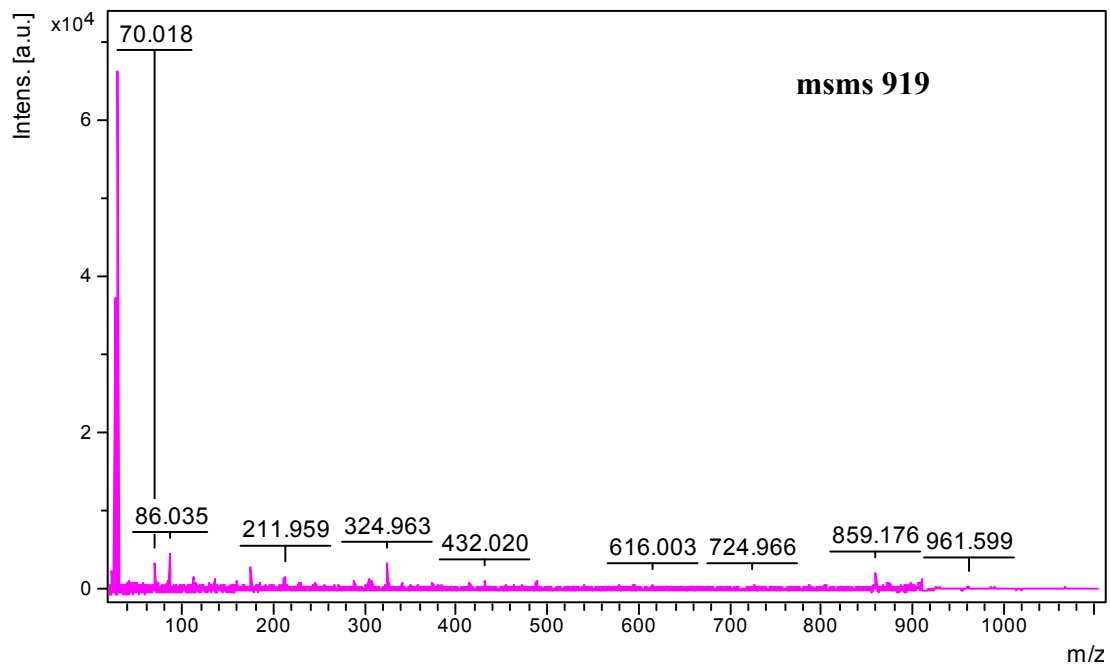
Εικόνα 3.12: Πλήρες φάσμα (Full MS) ιζήματος των θραυσμάτων της BR μετά από πέψη με Pr.K 2h στους 37°C



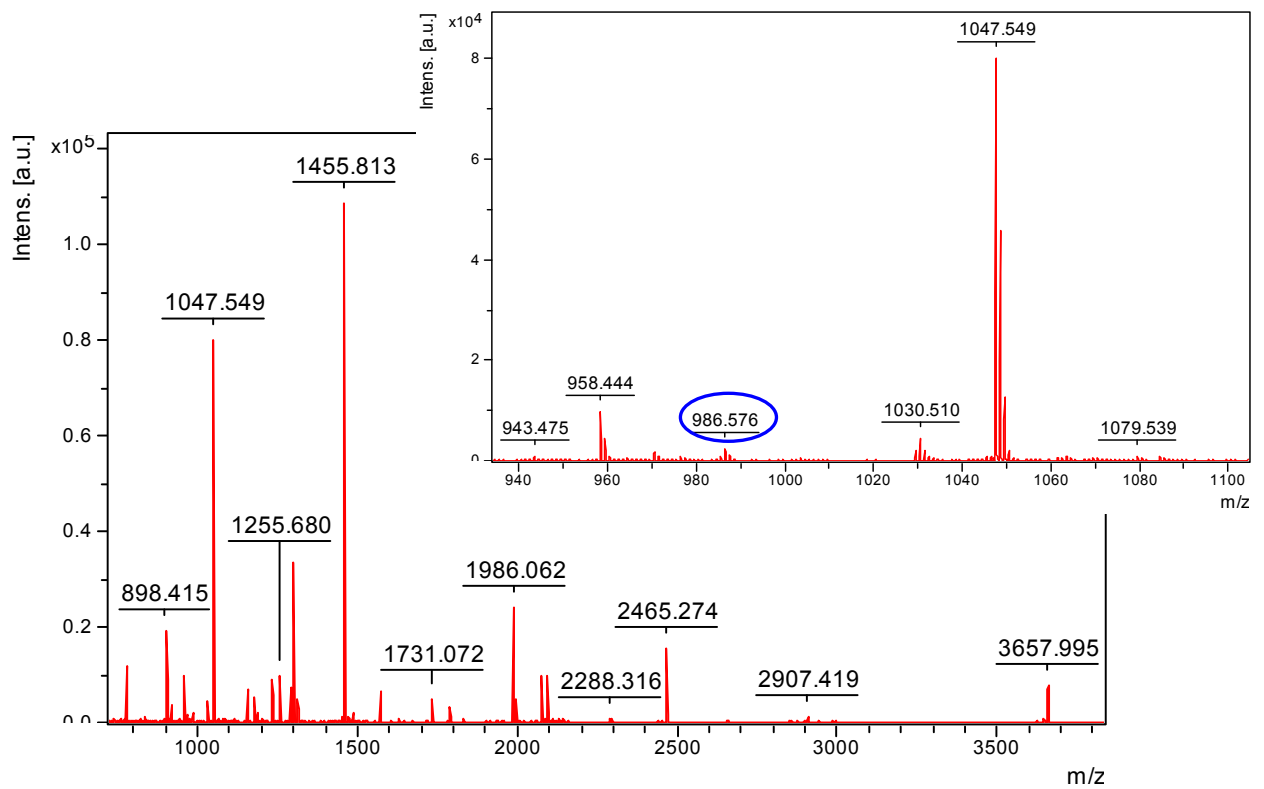


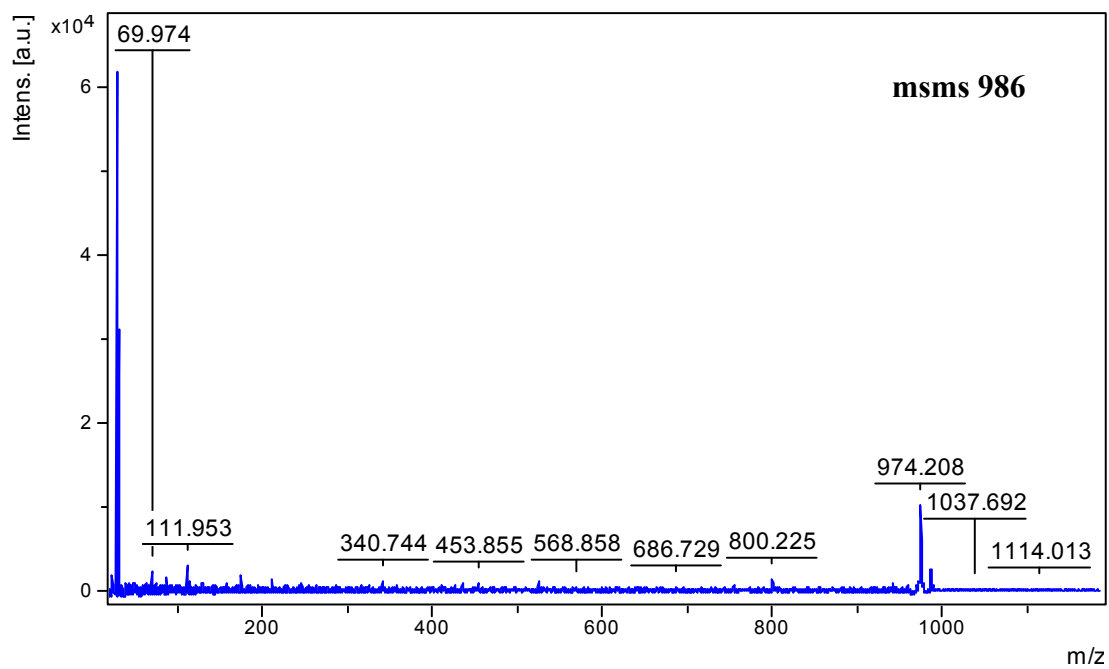
Εικόνα 3.13: Α) Πλήρες φάσμα (Full MS) και Β)msms φάσμα της κορυφής 1176m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο EQNPIYWAR.



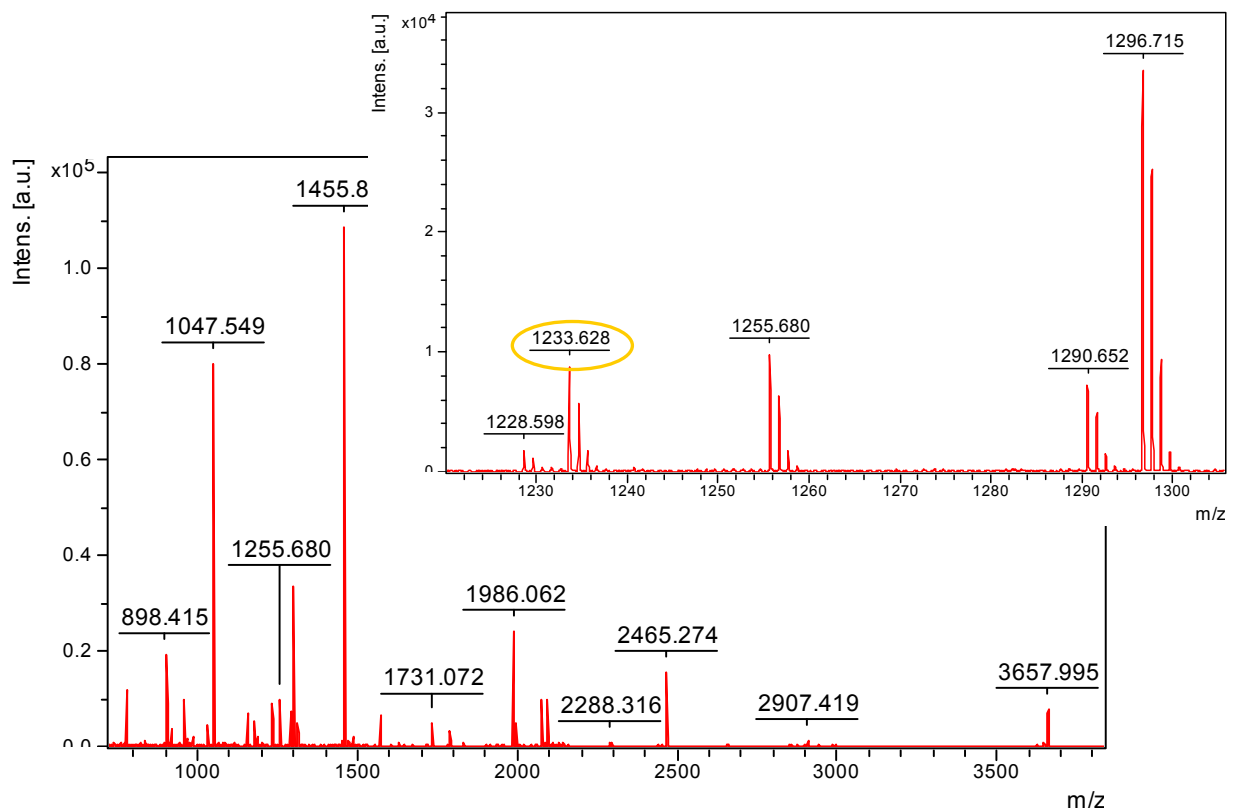


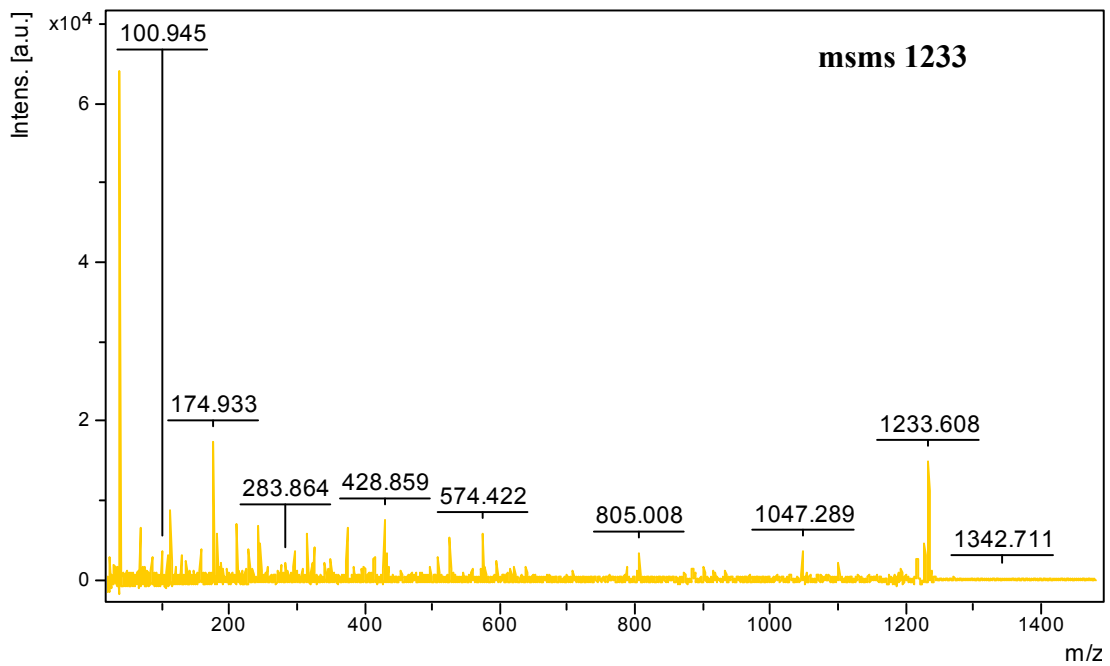
Εικόνα 3.14: A) Πλήρες φάσμα (Full MS) και B) msms φάσμα της κορυφής 919 m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο NPIYWAR



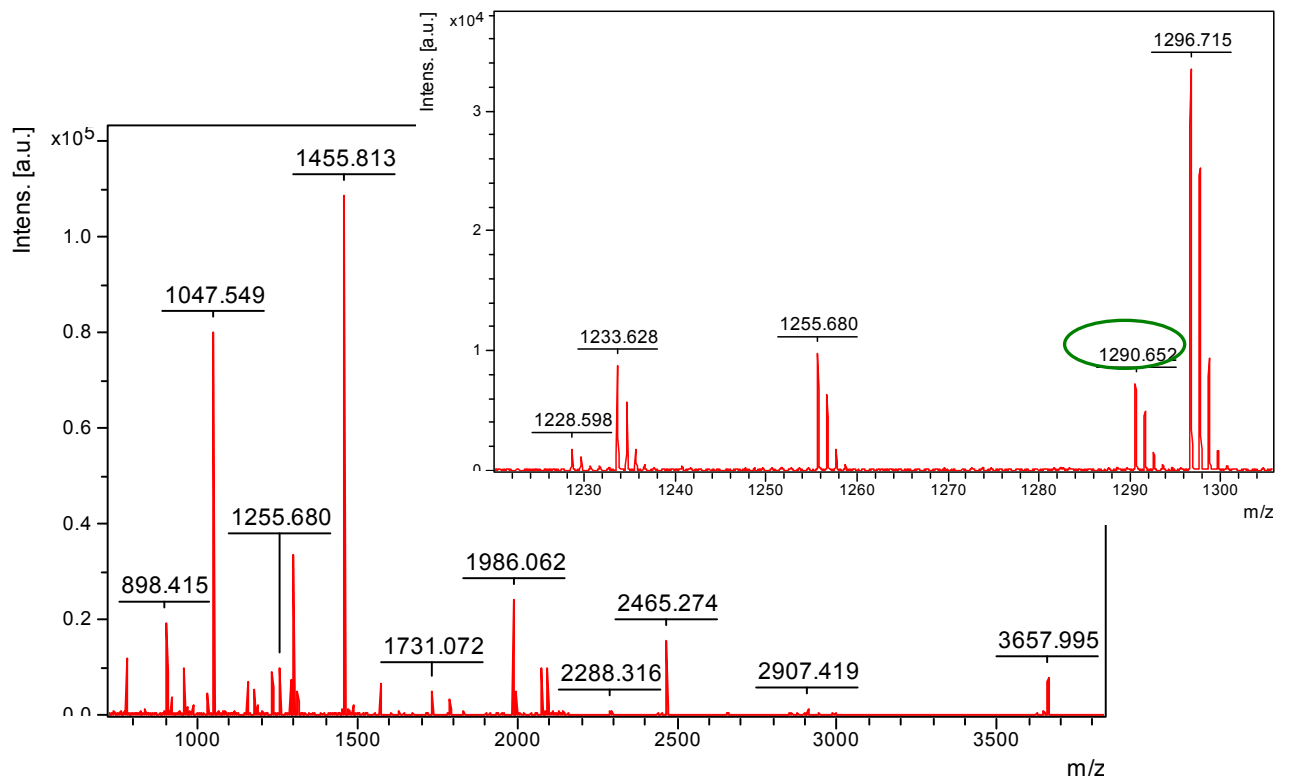


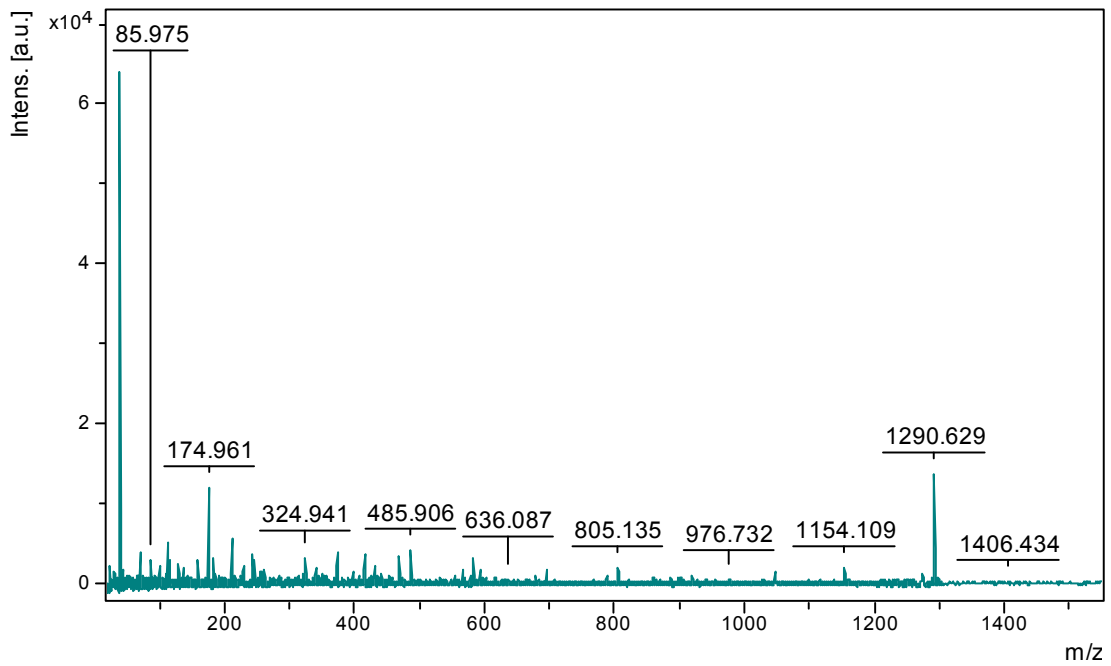
Εικόνα 3.15: Α) Πλήρες φάσμα (Full MS) και Β) msms φάσμα της κορυφής 986 m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο RNVTVVLW



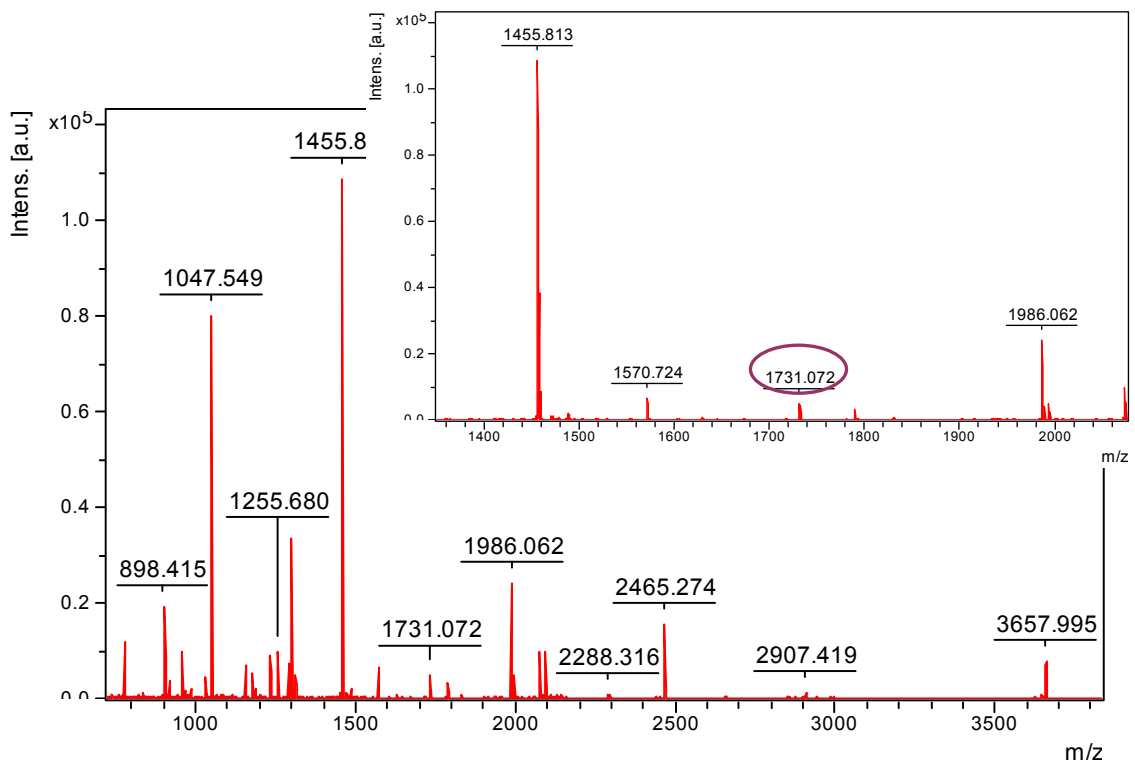


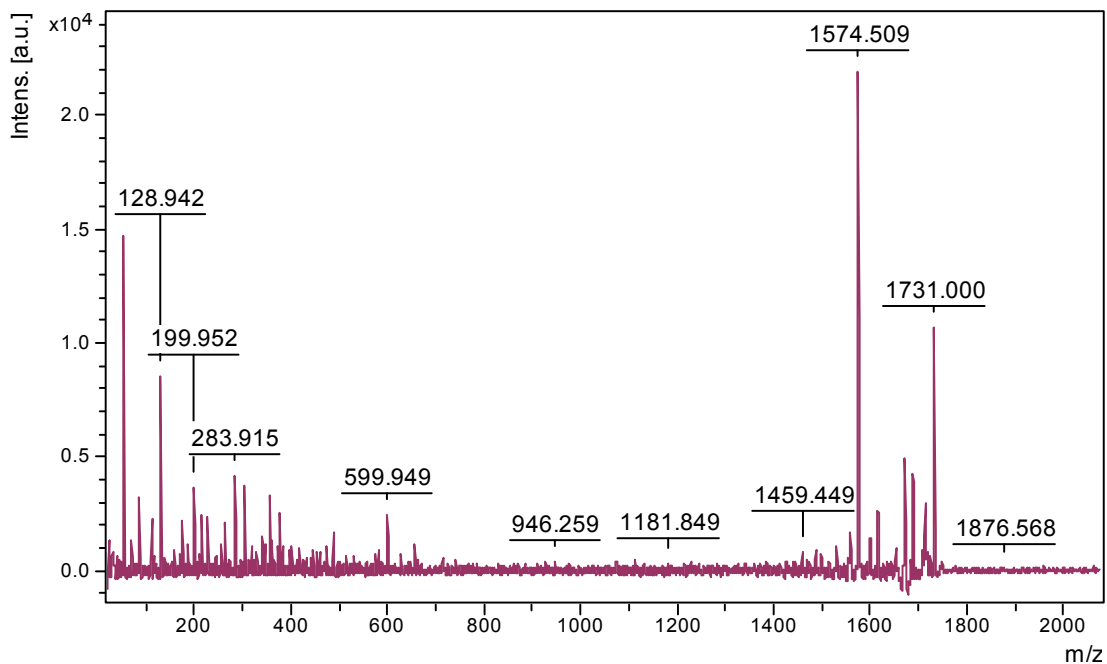
Εικόνα 3.16: A) Πλήρες φάσμα (Full MS) και B) msms φάσμα της κορυφής 1233 m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο GEQNRIYWAR





Εικόνα 3.17: Α) Πλήρες φάσμα (Full MS) και Β) msms φάσμα της κορυφής 1290 m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο GGEQNPIYWAR





Εικόνα 3.18: Α) Πλήρες φάσμα (Full MS) και Β)msms φάσμα της κορυφής 1731 m/z από το οποίο ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο DVSAKVGFLILLRSR

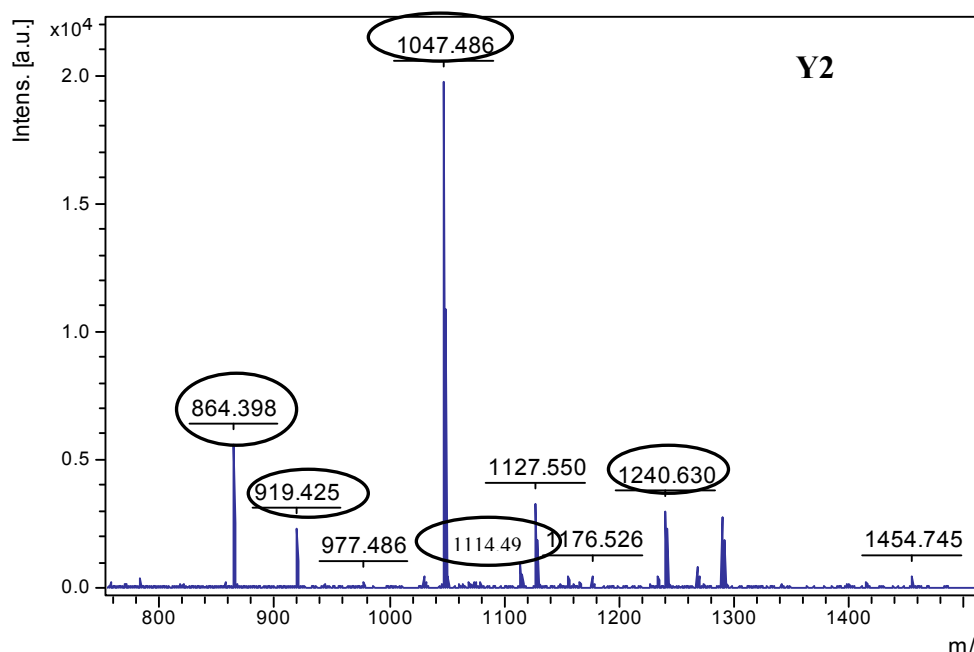
Είδος Δείγματος BR ^{NH3}	Κορυφή m/z	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΜΕ MALDI	ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)
l ₁ NH3	919	NPIYWAR	-0.786
l ₁ NH3	986	RNVTVVLW	0.850
l ₁ NH3	1176	EQNPIYWAR	-1.389
l ₁ NH3	1233	GEQNPIYWAR	-1290
l ₁ NH3	1290	GGEQNPIYWAR	-1209
l ₁ NH3	1731	DVSAKVGFLILLRSR	0.631

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MLELLPTAVE	GVSQAQITGR	PEWIWLALGT	ALMGLGTLYF	LVKGMGVSDP	DAKKFYAITT
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
LVPAIAFTMY	LSMLLGYGLT	MVPFGGEQNP	IYWARYADWL	FTTPLLLLDL	ALLVDADQGT
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
ILALVGADGI	MIGTGLVGAL	TKVYSYRFVW	WAISTAAMLY	ILYVLFFGFT	SKAESMRPEV
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
ASTFKVLRNV	TVVLWSAYPV	VWLI GSEGAG	IVPLNIETLL	FMVLDVSAKV	GFLILLRSR
<u>250</u>	<u>260</u>				
AIFGEAEAPE	PSAGDGAAT	SD			

Πίνακας 5: Απεικόνιση της αλληλουχίας της βακτηριοροδοψίνης. Τα αμινοξέα με εντονότερο και γαλάζιο χρώμα αποτελούν της α-έλικες της πρωτεΐνης, ενώ τα υπογραμμισμένα αμινοξέα αποτελούν τα αναγνωρισμένα πεπτίδια.

3.5.3 Μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος

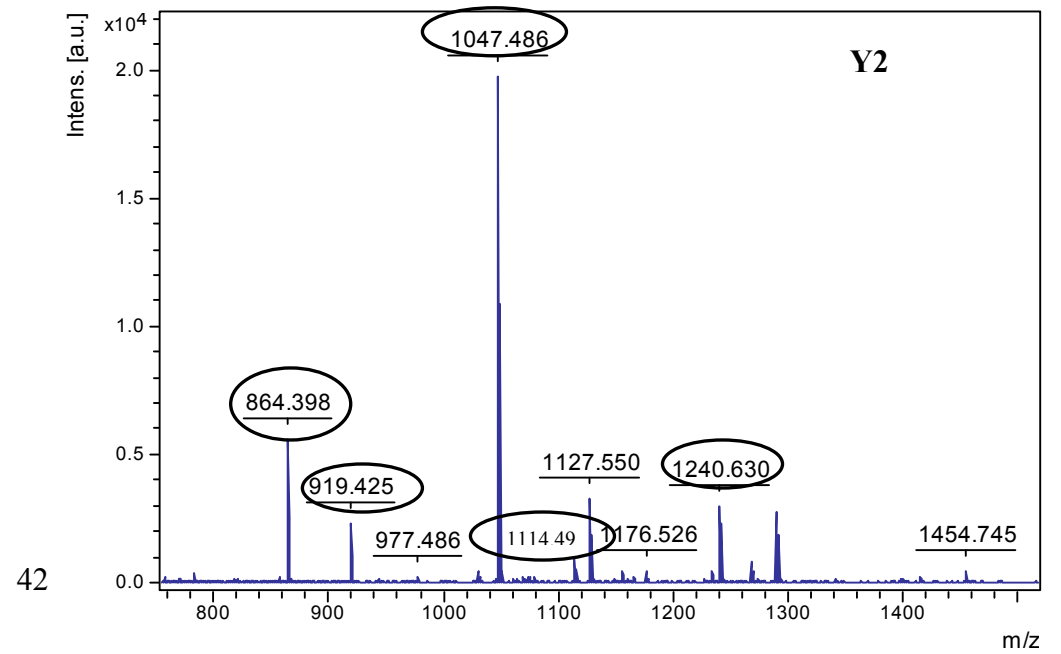
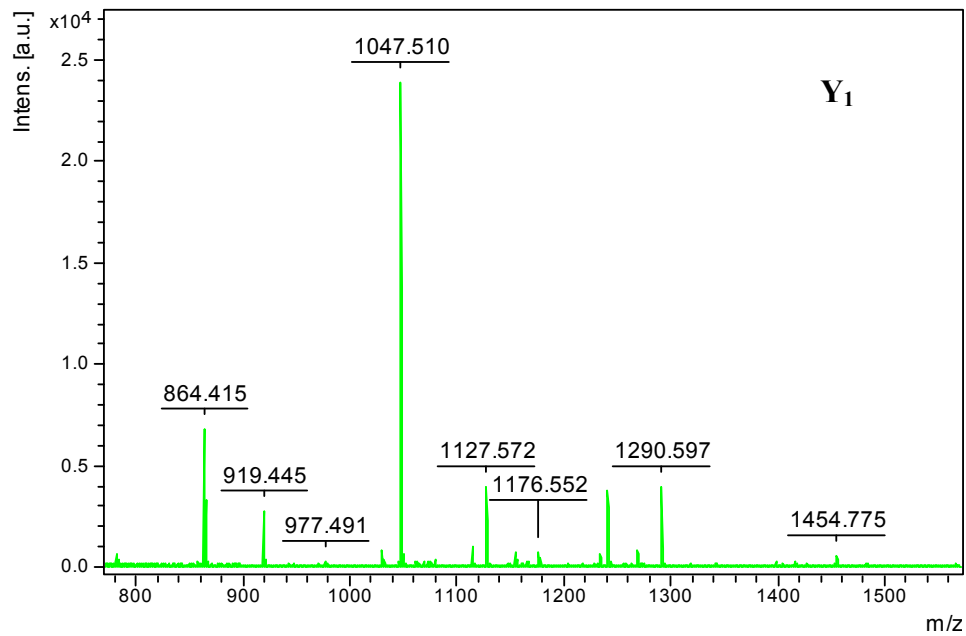
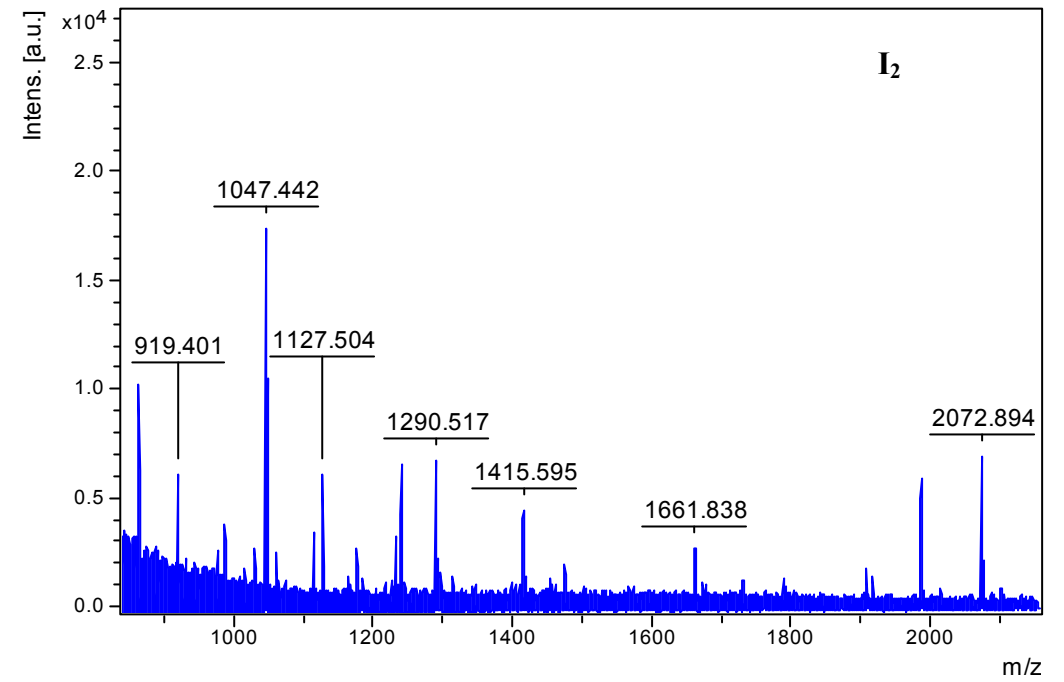
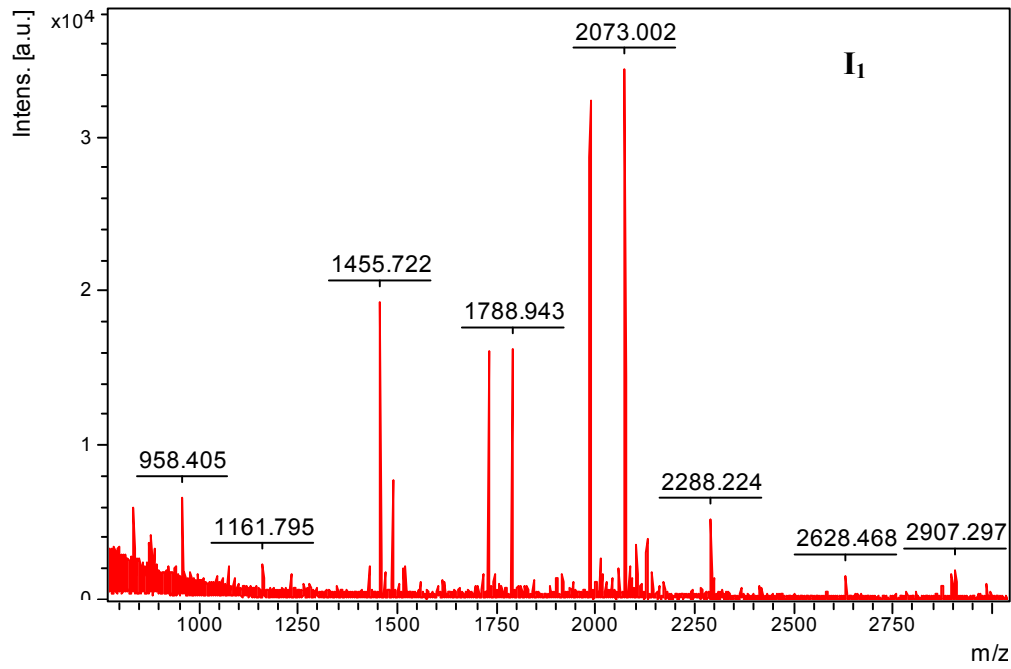
Στην συνέχεια μελετήθηκαν τα φάσματα που λήφθηκαν από την διαδικασία πέψης με 50mM NH₄HCO₃ αλλά με διπλάσια ποσότητα BR σε σχέση με την αρχική διαδικασία. Τα μόνα πεπτίδια που αναγνωρίστηκαν ήταν του υπερκειμένου που προέκυπτε μετά από επώαση με για 12 ώρες με αιθανόλη.

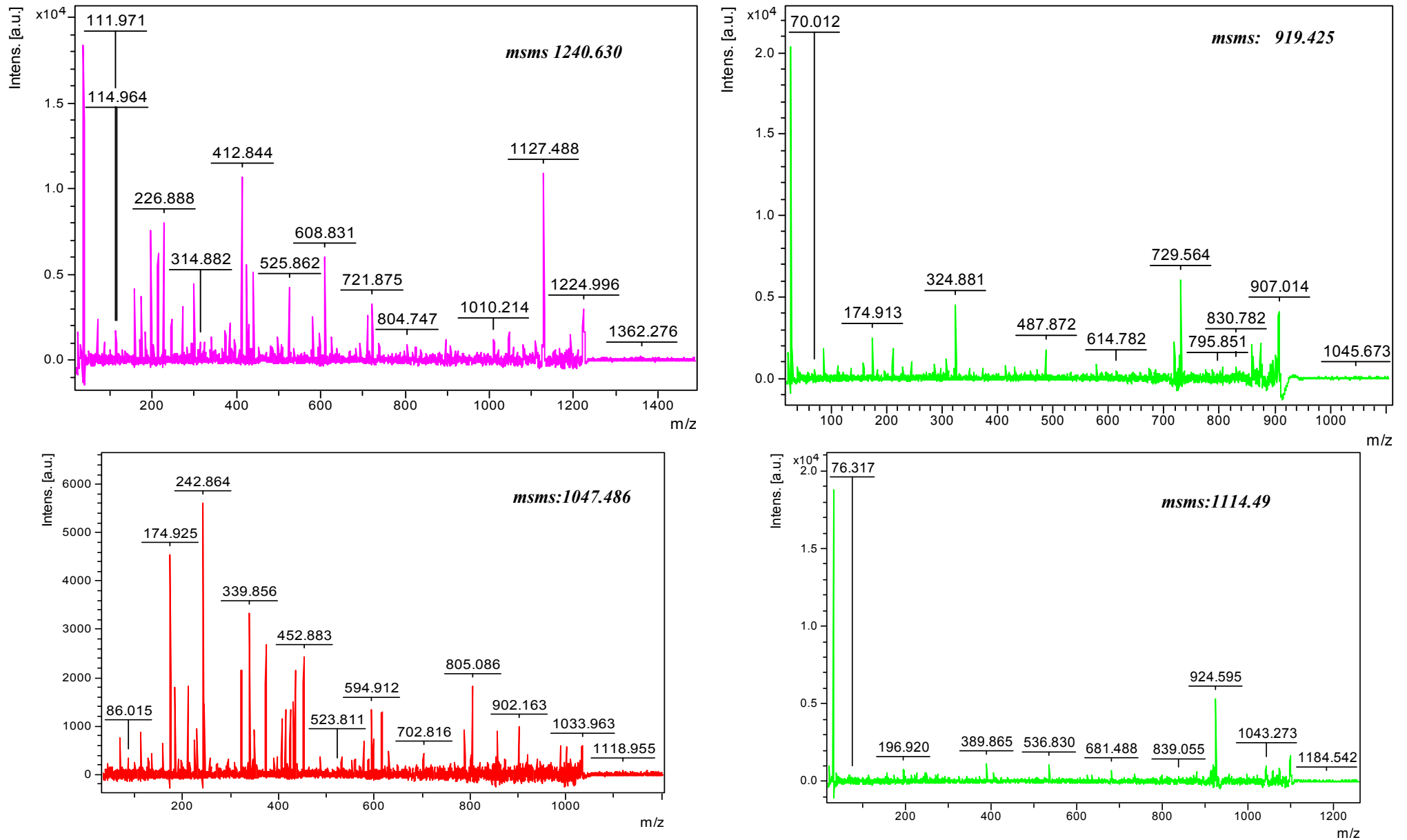


Εικόνα 3.19: Πλήρες φάσμα (Full MS) του υπερκειμένου που προκύπτει μετά από φυγοκέντριση του διαλύματος αιθανόλης με το ίζημα (I1) που προκύπτει από την φυγοκέντριση αμέσως μετά την πέψη. Η αρχική ποσότητα της BR είναι διπλάσια της αρχικής διαδικασίας επεξεργασίας.(100μgr)

Παρακάτω (εικόνα 3.20) απεικονίζονται όλα τα φάσματα που ελήφθησαν με την αύξηση της ποσότητας της BR, καθώς και τα φάσματα ms-ms των κορυφών του υπερκειμένου που προήλθε από την επώαση με την αιθανόλη από τα οποία έγινε η αναγνώριση των πεπτιδίων. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται τα πεπτίδια που αναγνωρίστηκαν.

Είδος Δείγματος 2[BR]	Κορυφή m/z	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΜΕ MALDI	ΥΠΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)
I ₁	1731	DVSAKVGFLILRSR.	0.631
I ₁	1487	DVSAKVGFLILLR	1.100
I ₁	1789	RNVTVVLWSAYPVVW	0.827
I ₂	1047	QNPIYWAR	-1.125
Y ₂	919	NPIYWAR	-0.786
Y ₂	1047	EQNPIYWAR.Y	-1.380
Y ₂	1114	APEPSAGDGAAT	-0.269
Y₂	1240	TGRPEWIWLALG	0.127





Εικόνα 3.20: Α) {Σελ.40} Φάσματα που ελήφθησαν με την αύξηση της ποσότητας της BR .Β) {Σελ.41} Φάσματα ms-ms των κορυφών m/z 1047, 1114, 919,1240 του Y2 που προήλθε από την επώαση με την αιθανόλη.

10	20	30	40	50	60	
MLELLPTAVE	GVSQAQITGR	PEWIWLALGT	ALMGLGTYF	LVKGMGVSDP	DAKKFYAITT	
70	80	90	100	110	120	
LVPAAIAFTMY	LSMLLGYGLT	MVPFGGEQNP	IYWARYADWL	FTTPLLLLDL	ALLVDADQGT	
130	140	150	160	170	180	
ILALVGADGI	MIGTGLVGAL	TKVYSYRFVW	WAISTAAMLY	ILYVLFFGFT	SKAESMRPEV	
190	200	210	220	230	240	
ASTFKVLRNV	FVVLWSAYPV	VWLI	GSEGAG	IVPLNIETLL	FMVLDVSAKV	GFGLILLRSR
250	260					
AIFGEAEAPE	PSAGDGAAAT	SD				

Πίνακας 6: Απεικόνιση της αλληλουχίας της βακτηριοροδοψίνης. Τα αμινοξέα με εντονότερο και γαλάζιο χρώμα αποτελούν της α-έλικες της πρωτεΐνης, ενώ τα υπογραμμισμένα αμινοξέα αποτελούν τα αναγνωρισμένα πεπτίδια.

3.5.4 Μεταβολή Χρόνου πέψης

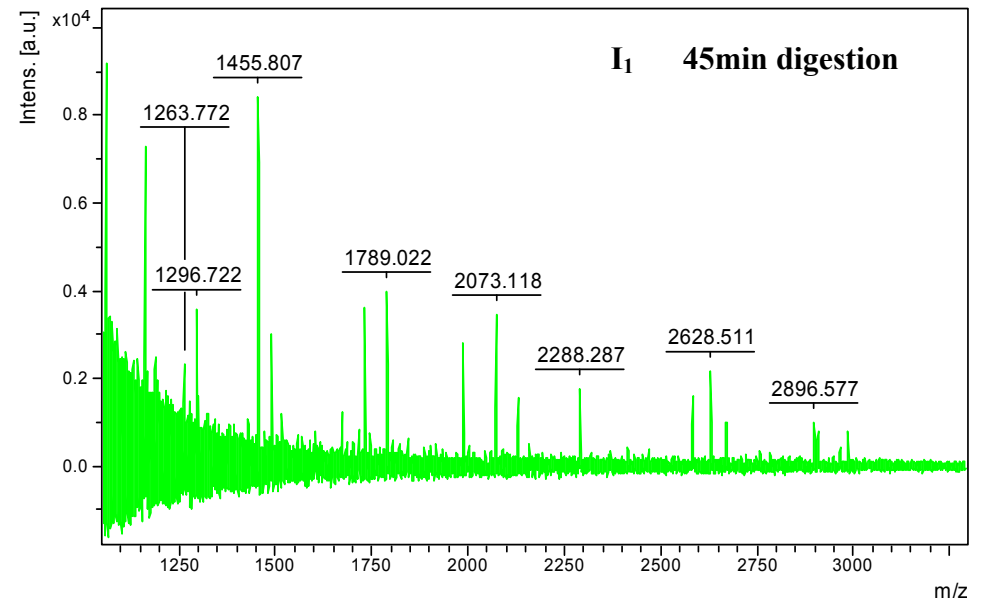
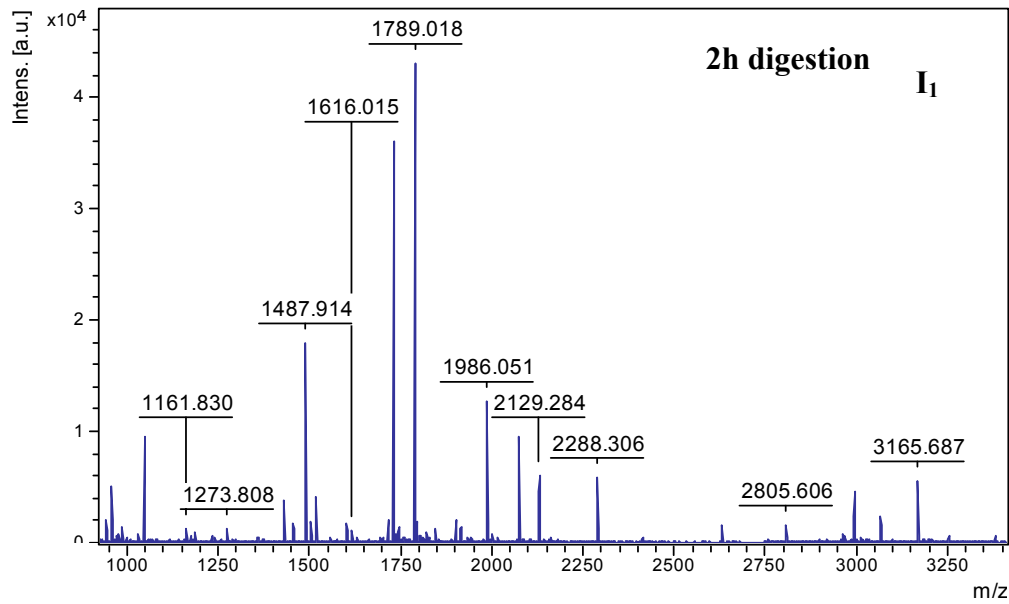
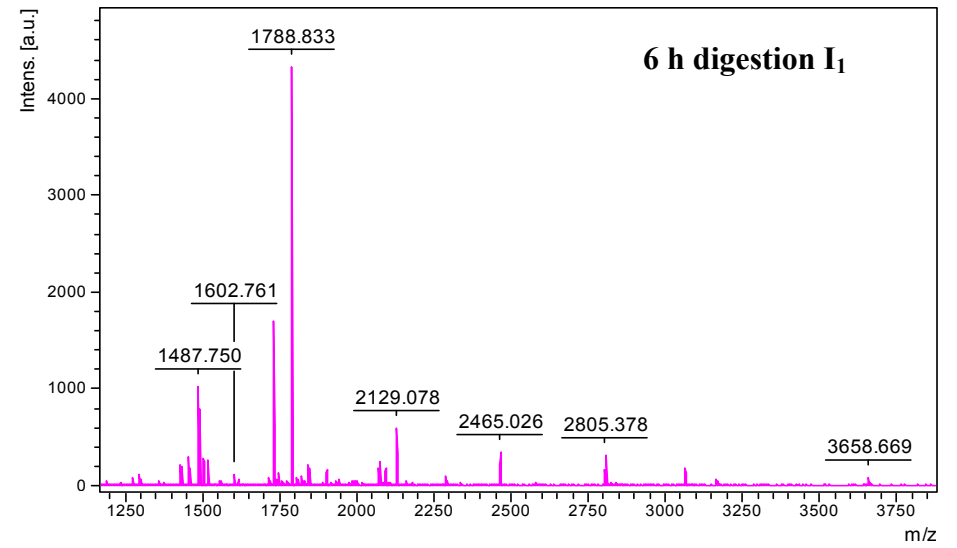
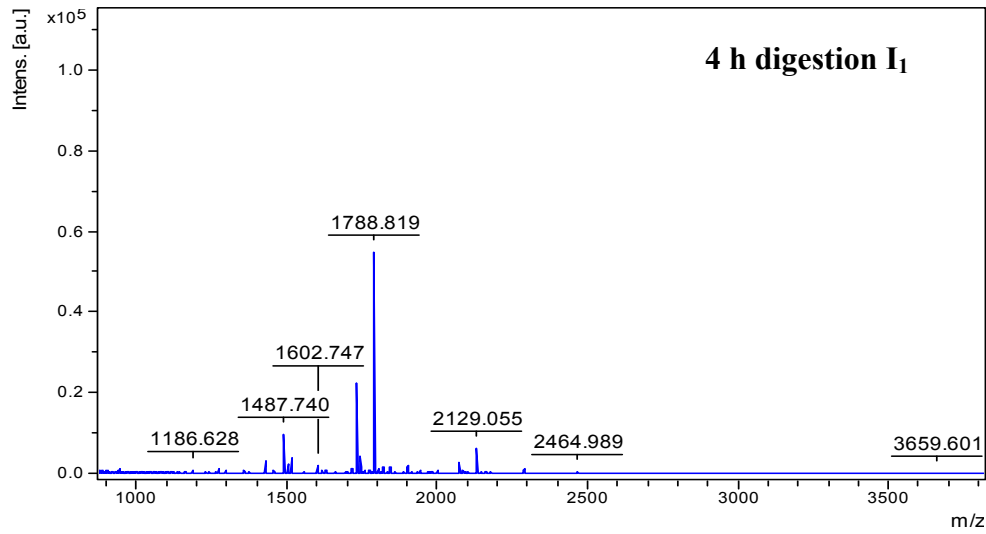
Στην συνέχεια μελετήθηκαν τα φάσματα που λήφθηκαν από την διαδικασία πέψης με 50mM NH₄HCO₃ με αρχική ποσότητα BR 50μgr αλλά με αλλαγή του χρόνου πέψης. Τα φάσματα που ελήφθησαν απεικονίζονται παρακάτω (σελ. 45-46) και συγκρίνονται με το φάσμα που προκύπτει μετά την δίωρη πέψη με πρωτεΐνωση K. Από τα φάσματα από τα οποία έγινε αλλαγή του χρόνου πέψης δεν υπήρξε καμία ταυτοποίηση πεπτιδίου.

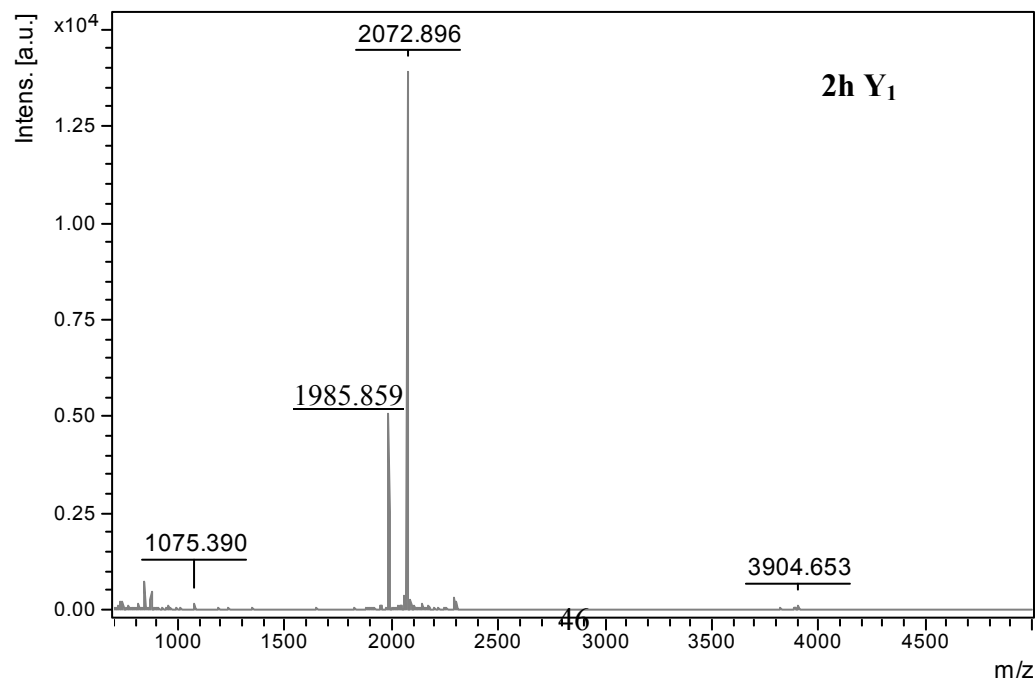
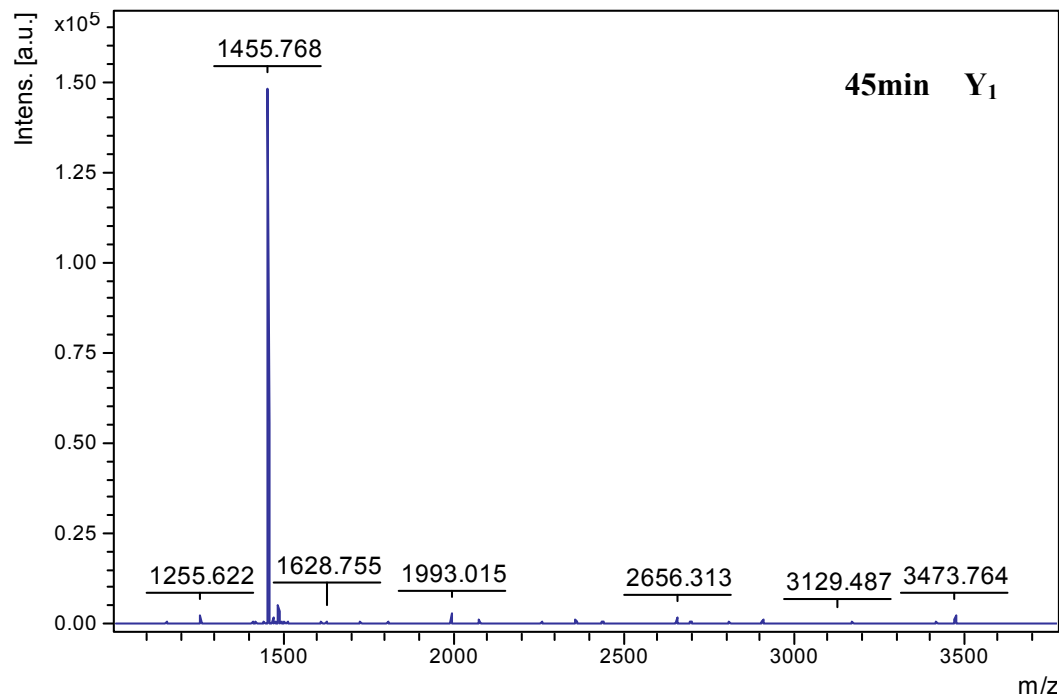
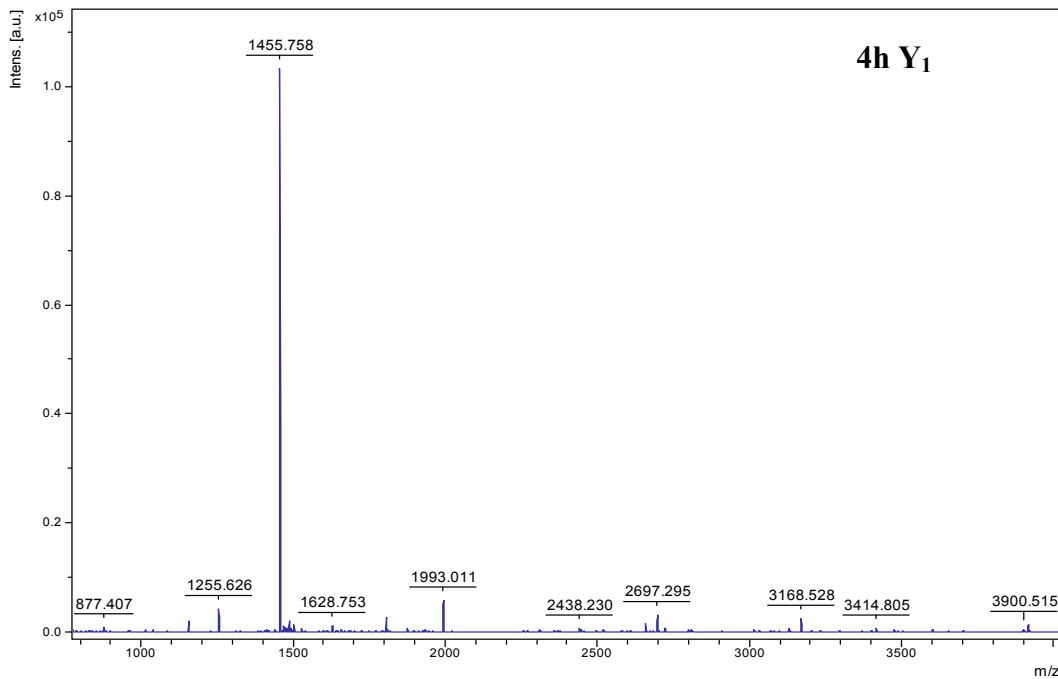
3.5.5 Αλλαγή πρωτεολυτικού ενζύμου

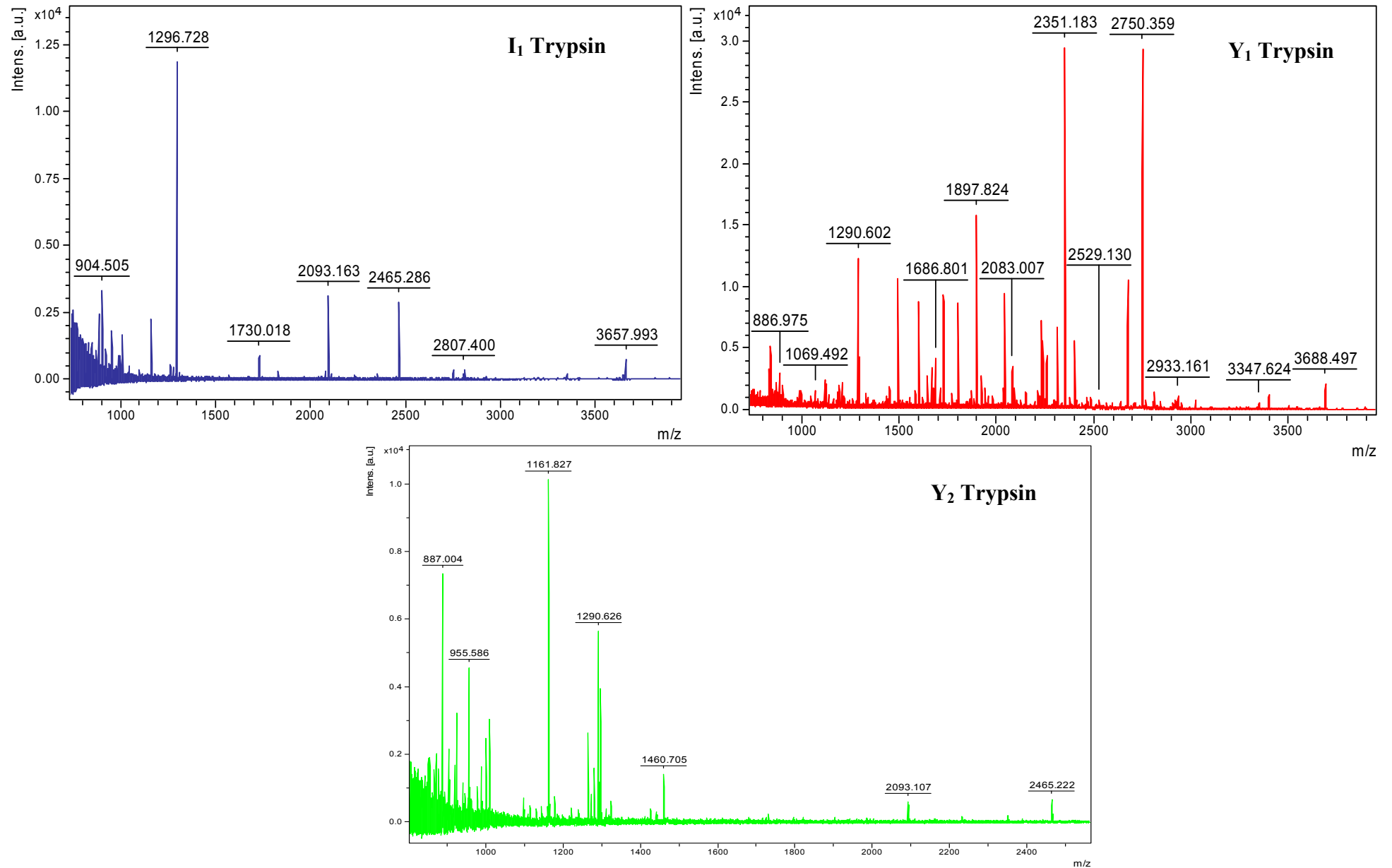
Ακολουθούν φάσματα που προέκυψαν μετά από αντικατάσταση της πρωτεΐνωσης K με τρυψίνη που αποτελεί και το πιο διαδεδομένο ένζυμο για τις διαδικασίες αναγνώρισης των πρωτεϊνών. Τα φάσματα της διαδικασίας με αντικατάσταση του ενζύμου απεικονίζονται στην σελίδα 47. Με την διαδικασία της τρυψινοποίησης δεν ταυτοποιήθηκε κανένα πεπτίδιο.

3.5.6 Αλλαγή αναλογίας ένζυμου / υπόστρωμα

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παραπάνω προήλθαν από πρωτεόλυση της βακτηριοροδοψίνης με αναλογία Πρωτεΐνωση K/Βακτηριοροδοψίνη 1/20 στην περίπτωση των δειγμάτων που αναλύθηκαν με MALDI, και με αναλογία Πρωτεΐνωση K/Βακτηριοροδοψίνη 1/5 στην περίπτωση των δειγμάτων που αναλύθηκαν με ESI. Όταν πραγματοποιήθηκε αλλαγή της αναλογίας ένζυμου / υπόστρωμα σε Πρωτεΐνωση K/ Βακτηριοροδοψίνη 20/1 και 50/1 δεν έγινε καμία ταυτοποίηση.







3.6 Πρωτεόλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%

Στην συνέχεια εφαρμόστηκε η κλασική μέθοδος τρυψινοποίησης μετά από τοποθέτηση του δείγματος της βακτηριοροδοψίνης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Με την κλασική μέθοδο της τρυψινοποίησης σε πηκτή δεν πραγματοποιήθηκε καμία ταυτοποίηση πεπτιδίου.



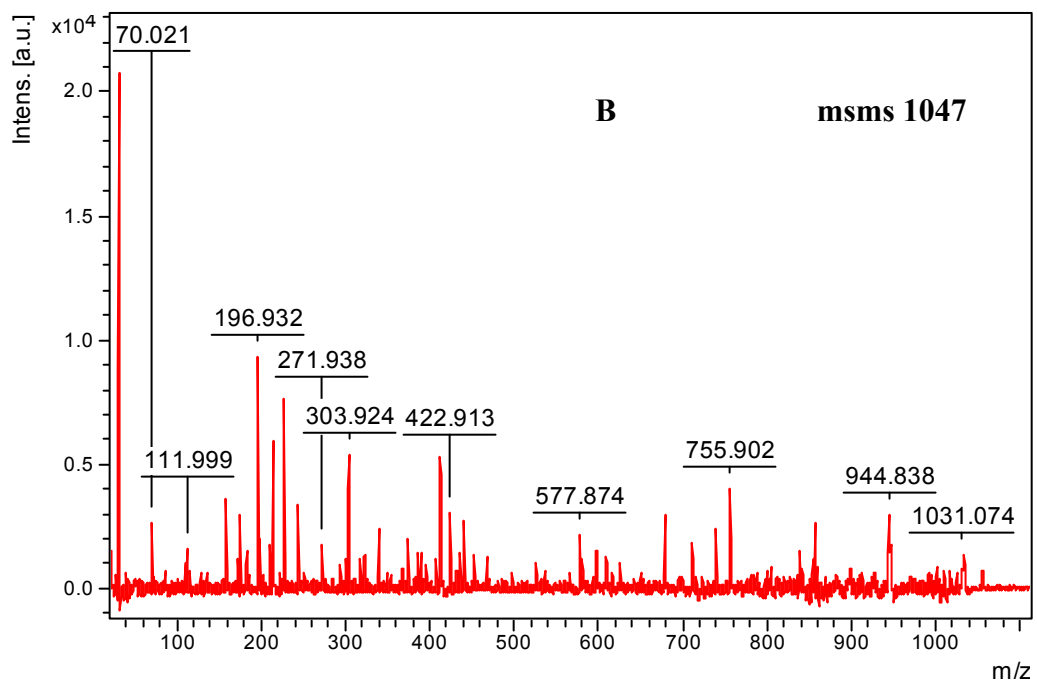
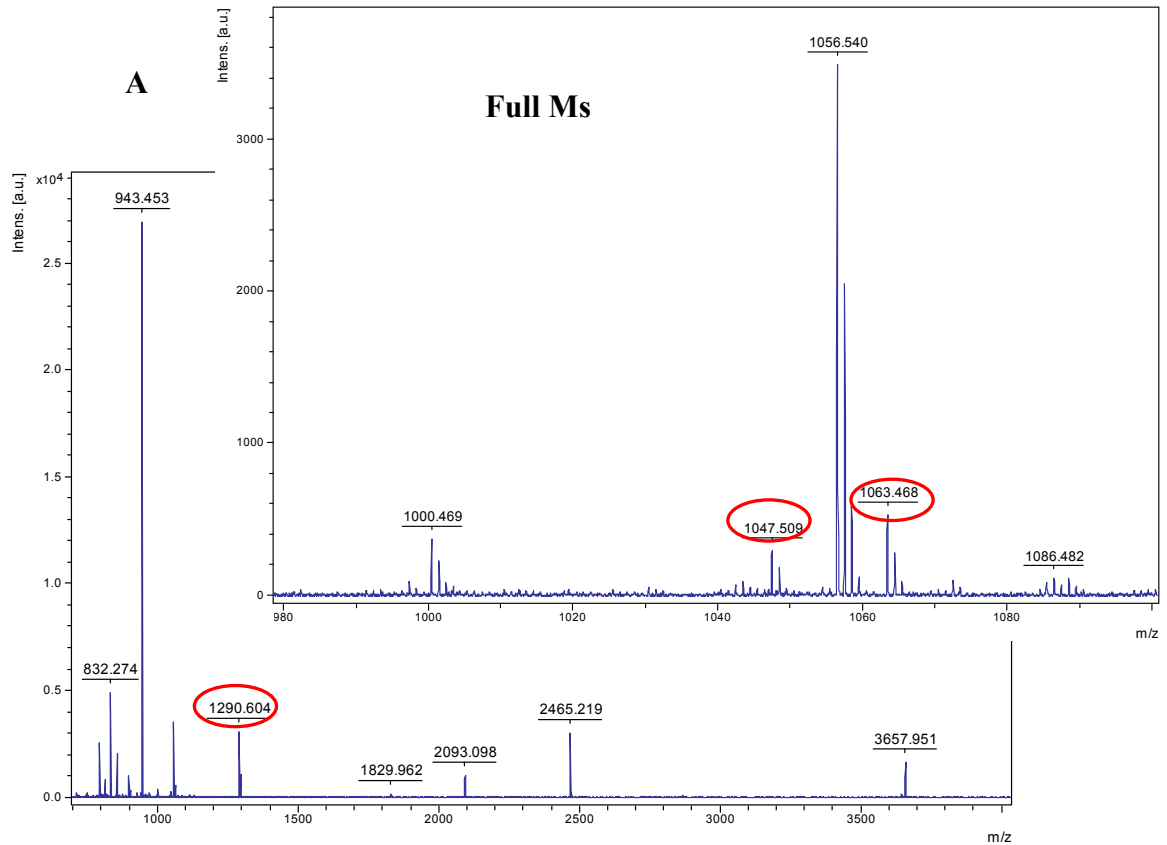
Εικόνα 3.21: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Τα δείγματα 1,2,3,4 περιλαμβάνουν βακτηριοροδοψίνη πριν την πέψη, το δείγμα 5 την πρωτεΐνάση K και το δείγμα 6 την βακτηριοροδοψίνη μετά την πέψη όπου παραμένει και λόγω της πέψης ποσότητα ένζυμου στο διάλυμα.

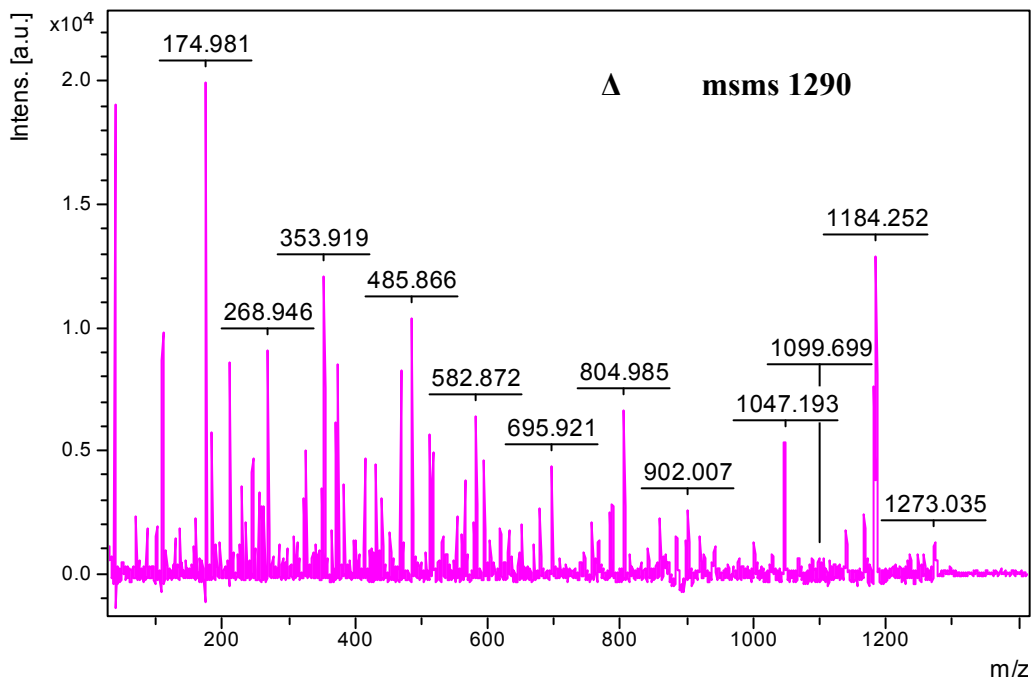
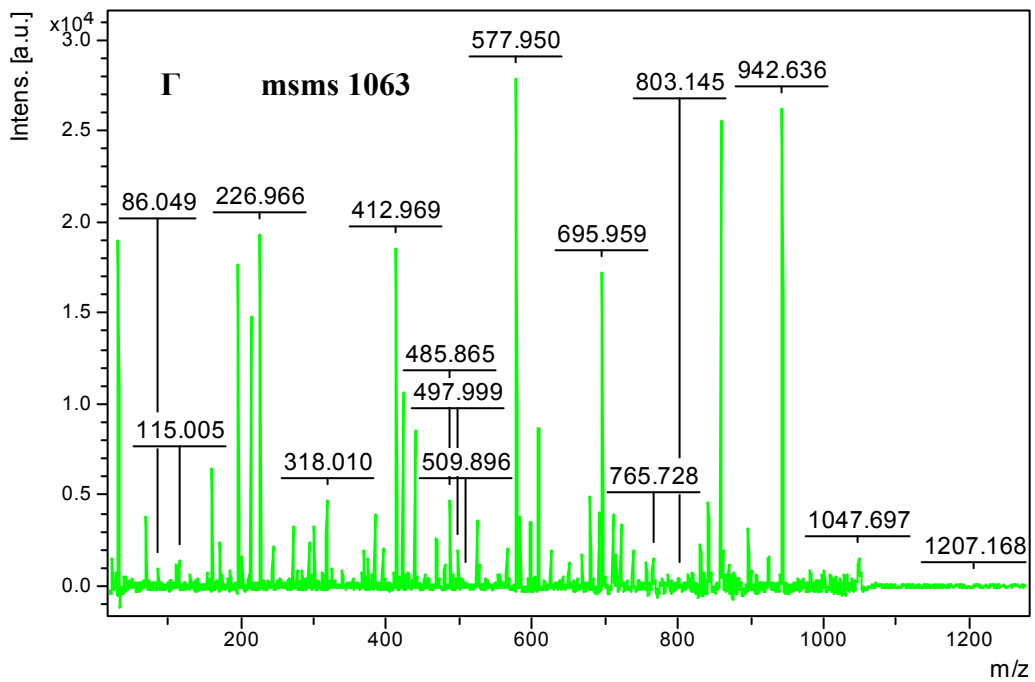
Από τα παραπάνω δείγματα, μελετήθηκε η πέψη δύο ωρών και η πέψη δώδεκα ωρών των δειγμάτων 2 και 3 αντίστοιχα της πηκτής. Το δείγμα 4 χρησιμοποιήθηκε για την πέψη σε πηκτή με τρυψίνη.

3.6.1 Πρωτεόλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με Πρωτεΐνάση-K (12h)

Με την μέθοδο πρωτεόλυσης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με πρωτεΐνάση K ελήφθησαν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την κλασική μέθοδος πρωτεόλυσης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με τρυψίνη. Η διάρκεια της πρωτεόλυσης ήταν δώδεκα ώρες. Τα πεπτίδια που αναγνωρίστηκαν απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

<i>Είδος Δείγματος 12hours</i>	<i>Κορυφή m/z</i>	<i>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ME MALDI</i>	<i>ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)</i>
Πηκτή	1047	MGVSDPDAKK	-0.970
Πηκτή	1290	GGEQNPIYWAR	-1.209
Πηκτή	1063	GGEQNPIYW	-1.178





Εικόνα 3.22: Α) Πλήρες φάσμα βακτηριοροδοψίνης μετά από πέψη σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με πρωτεϊνάση K (12h). Β) msms φάσμα της κορυφής m/z 1047 από την οποία αναγνωρίστηκε το πεπτίδιο MGVS^DPD^AKK. Γ) msms φάσμα της κορυφής m/z 1063 από την οποία αναγνωρίστηκε το πεπτίδιο GGEQN^RPIY^W. Δ) msms

φάσμα της κορυφής m/z 1290 από την οποία αναγνωρίστηκε το πεπτίδιο GGEQNPIYWAR.

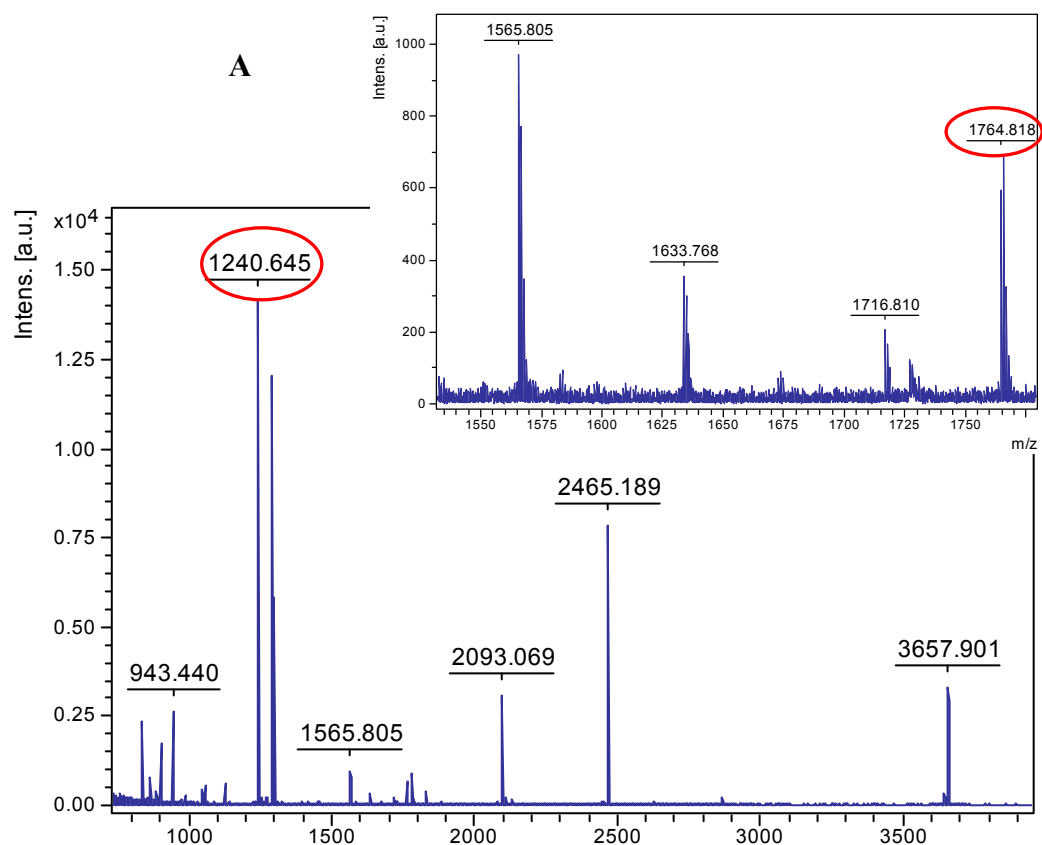
10	20	30	40	50	60
MLELLLP T A V E	G V S Q A Q I T G R	P E W I W L A L G T	A L M G L G T L Y F	L V K G M G V S D P	D A K K F Y A I T T
70	80	90	100	110	120
L V P A I A F T M Y	L S M L L G Y G L T	M V P F G G E Q N P	I Y W A R Y A D W L	F T T P L L L L L D L	A L L V D A D Q G T
130	140	150	160	170	180
I L A L V G A D G I	M I G T G L V G A L	T K V Y S Y R F V W	W A I S T A A M L Y	I L Y V L F F G F T	S K A E S M R P E V
190	200	210	220	230	240
A S T F K V L R N V	T V V L W S A Y P V	V W L I G S E G A G	I V P L N I E T L L	F M V L D V S A K V	G F G L I L L R S R
250	260				
A I F G E A E A P E	P S A G D G A A A T	S D			

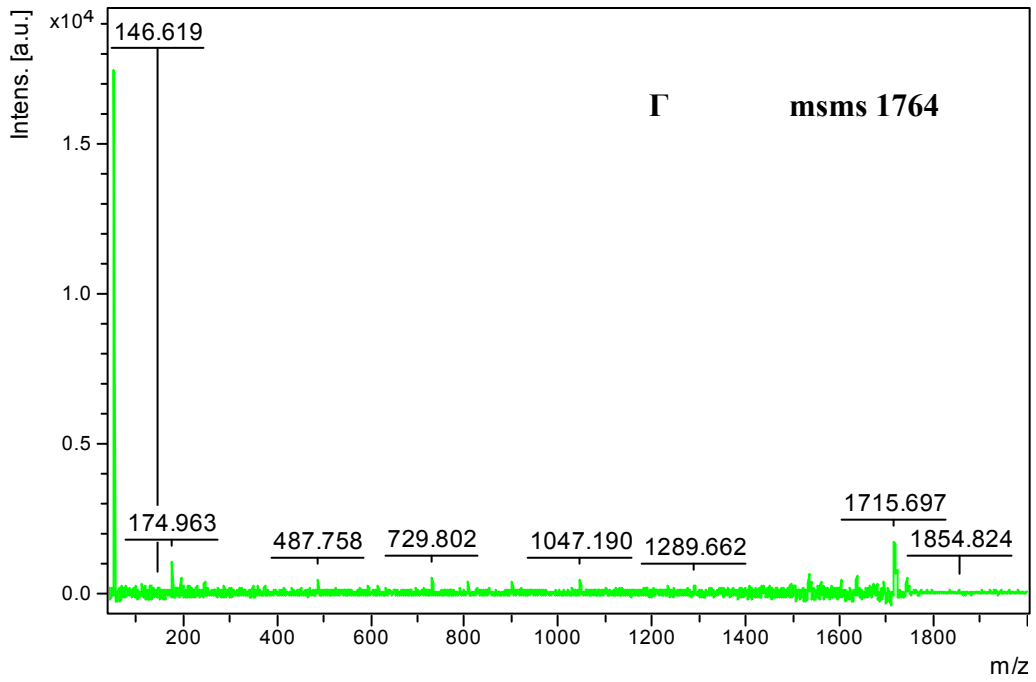
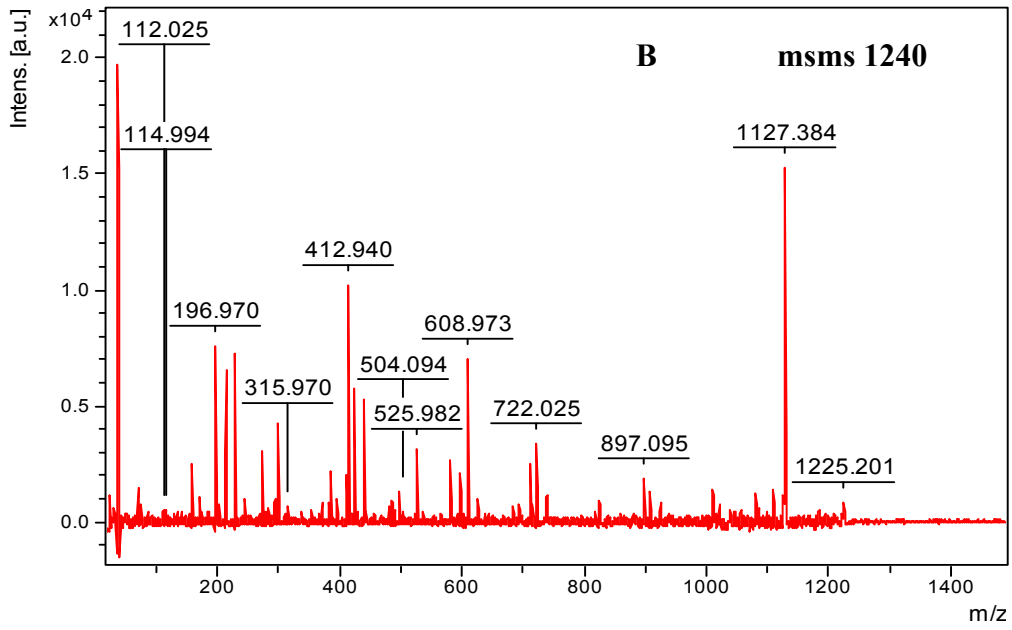
Πίνακας 7: Απεικόνιση της αλληλουχίας της βακτηριοροδοψίνης. Τα αμινοξέα με εντονότερο και γαλάζιο χρώμα αποτελούν της α-έλικες της πρωτεΐνης, ενώ τα υπογραμμισμένα αμινοξέα αποτελούν τα αναγνωρισμένα πεπτίδια.

3.6.2 Πρωτεόλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με Πρωτεΐναση-K με αλλαγή χρόνου πρωτεόλυσης (2h)

Τα πεπτίδια που αναγνωρίστηκαν με την αλλαγή χρόνου πρωτεόλυσης απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα

Είδος Δείγματος 2hours	Κορυφή m/z	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ME MALDI	ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)
Πηκτή	1240	GRPEWIWLALGTAL	0.471
Πηκτή	1764	MVPF G G E Q N P I Y W A R	-0.400





Εικόνα 3.23: Α) Πλήρες φάσμα βακτηριοροδοψίνης μετά από πέψη σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με πρωτεϊνάση K (2h). Β) msms φάσμα της κορυφής m/z 1240 από την οποία αναγνωρίστηκε το πεπτίδιο GRPEWIWLALGTAL. Γ) msms φάσμα της κορυφής m/z 1764 από την οποία αναγνωρίστηκε το πεπτίδιο MVPFGGGEQNPIYWAR

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MLELLPTAVE	GVSQAQITGR	PEWIWLALGT	ALMGLGTLYF	LVKGMGVSDP	DAKKFYAITT
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
LVPAlAFTMY	LSMLLGYGLT	MVPFGGGEQNP	IYWARYADWL	FTTPLLLLDL	ALLVDADQGT
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
ILALVGADGI	MIGTGLVGAL	TKVYSYRFVW	WAISTAAMLY	ILYVLFFGFT	SKAESMRPEV
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
ASTFKVLRNV	TVVLWSAYPV	VWLI GSEGAG	IVPLNIETLL	FMVLDVSAKV	GFGLILLRSR
<u>250</u>	<u>260</u>				
AIFGEAEAPE	PSAGDGAAAT	SD			

Πίνακας 8: Απεικόνιση της αλληλουχίας της βακτηριοροδοψίνης. Τα αμινοξέα με εντονότερο και γαλάζιο χρώμα αποτελούν της α-έλικες της πρωτεΐνης, ενώ τα υπογραμμισμένα αμινοξέα αποτελούν τα αναγνωρισμένα πεπτίδια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4⁰ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όπως αναφέρθηκε και κατά την εισαγωγή, η ανάλυση των πρωτεϊνών εσωτερικής μεμβράνης παραμένει μία πρόκληση για τους ερευνητές. Βασικό πρόβλημα στην ανάλυση των πρωτεϊνών αυτών, είναι η διαλυτότητα τους όταν εξαχθούν από το λιπιδικό τους περιβάλλον [28]. Οι υδρόφοβες πρωτεΐνες στο σύνολο τους κολλούν στις επιφάνειες με τις οποίες έρχονται σε επαφή και είναι συχνά αδιάλυτες σε διαλύτες που είναι απαραίτητοι για την ευαισθησία και την συμβατότητα των μεθόδων ανάλυσης. Οι περισσότερες έως τώρα μέθοδοι ταυτοποίησης πρωτεϊνών, χρησιμοποιούν πεπτίδια που προήλθαν από πέψη μεμβρανικών πρωτεϊνών που ανήκουν στις υδατοδιαλυτές περιοχές των πρωτεϊνών [29]. Στόχος της μεθόδου που εφαρμόσαμε εμείς είναι να πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση με πεπτίδια που ανήκουν κυρίως στις υδρόφοβες περιοχές. Η μελέτη των πεπτιδίων αυτών καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη, καθώς η αλληλουχία αμινοξέων μιας πρωτεΐνης εσωτερικής μεμβράνης δεν είναι καθόλου ομαλή. Τα μη-μεμβρανικά τμήματα μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης είναι εμπλουτισμένα με θετικά φορτισμένα κατάλοιπα ακολουθώντας τον κανόνα της “θετικά φορτισμένης περιοχής” που αρχικά καθιερώθηκε από τον von Heijke [30] ενώ τα μεμβρανικά τμήματα της πρωτεΐνης αποτελούνται κυρίως από υδρόφοβα πεπτίδια που είναι δύσκολα προσβάσιμα στα διάφορα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την πέψη, λόγω των λιπιδίων που τα περιβάλλει. Είναι ενδεικτικό το ότι η δωδεκάωρη πέψη της βακτηριοροσίνης με τρυψίνη (εξειδικευμένο ένζυμο πέψης σε λυσίνη και αργινίνη) δίνει ένα μόλις ταυτοποιημένο πεπτίδιο σύμφωνα με παλιότερες μελέτες [31]. Κατά τα δικά μας πειράματα δεν μπόρεσε να ταυτοποιηθεί κανένα πεπτίδιο με τρυψίνη. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν και υδρόφοβα πεπτίδια σε αρκετές μελέτες χρησιμοποιήθηκε κυανιούχο βρώμιο (BrCN) [32,33] . Παρόλα αυτά, οι μέθοδοι που βασίζονται στο κυανιούχο βρώμιο είναι αρκετά περίπλοκοι ενώ δεν αποφεύγεται η χρήση πηκτής και απορρυπαντικών .

Γενικότερα έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές μέθοδοι που βασίζονται σε απορρυπαντικά προκειμένου να διαλυτοποιηθούν τα υδρόφοβα τμήματα των μεμβρανικών περιοχών [34,35]. Οι περισσότερες τεχνικές στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν απορρυπαντικά συνδιάστηκαν με προετοιμασία και διαχωρισμό των μεμβρανικών δειγμάτων με δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση [36,37].

Παρά το γεγονός ότι οι τεχνικές ηλεκτροφόρησης εξελίσσονται με ραγδαία πρόοδο [39-45], έχουν πολλούς περιορισμούς και δυσκολίες στην αναγνώριση πρωτεϊνών εσωτερικής μεμβράνης που είναι πολύ υδροφοβικές. [34, 38]. Οι περιορισμοί των προσεγγίσεων αυτών έχουν τεκμηριωθεί από προηγούμενες μελέτες [28]. Βασικό πρόβλημα των μεθόδων παραμένει η διαλυτότητα των πρωτεϊνών, καθώς αρκετές υδρόφοβες πρωτεΐνες δεν διαλυτοποιούνται σε διαλύματα ισοηλεκτρικής εστίασης που δεν περιέχουν απορρυπαντικά, ενώ άλλες πρωτεΐνες που διαλυτοποιούνται έχουν τάση να καθιζάνουν στο ισοηλεκτρικό τους σημείο Ένας επιπλέον περιορισμός είναι η οριοθετημένη περιοχή δυναμικού στην οποία γίνεται η ανίχνευση των πρωτεϊνών, καθώς οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι τυπικά λιγότερες σε αφθονία εν σύγκριση με τις διαλυτές πρωτεΐνες. Αρκετά σημαντικό βήμα για μία επιτυχημένη αναγνώριση παραμένει η προετοιμασία του δείγματος, η αρχική διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης [47]. Το στάδιο αυτό της ανάλυσης είναι το κρίσιμο σημείο στο οποίο “χάνονται” οι πρωτεΐνες. Τα βελτιωμένα σε διαλυτοποίηση κλάσματα πρωτεϊνών όπως αρκετές αναφορές εστιάζουν, περιλαμβάνουν την διαλυτοποίηση των δειγμάτων σε οργανικούς διαλύτες [47,48] ή μη ιοντικά απορρυπαντικά [52].

Μία ακόμα τεχνική η οποία εφαρμόστηκε και κατά την παρούσα εργασία είναι η τεχνική της μονοδιάστατης ηλεκτροφόρησης σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας [49,50]. Η συγκεκριμένη τεχνική στην κλασική της μορφή, με πέψη με τρυψίνη στην περίπτωση της βακτηριοδοψίνης, όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο σύμφωνα με τα πειράματά μας δεν μπόρεσε να αποδώσει κανένα αναγνωρισμένο πεπτίδιο. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η βακτηριοδοψίνη λόγω των επτά ελίκων της, έχει έλλειψη των περιοχών στις οποίες μπορεί να κόψει η τρυψίνη. Οι δυσκολίες της τρυψινοποίησης μπορούν αρκετές φορές να παρακαμφθούν με την χρήση συνδιασμού προτεασών και χημικών μεθόδων πέψης [51]. Η εφαρμογή της μεθοδολογίας της μοναδιάστατης ηλεκτροφόρησης με πέψη με πρωτεΐνάση-K έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με την πέψη με τρυψίνη αλλά όχι και πάλι πολύ ενθαρρυντικά. Τα τρία πεπτίδια που αναγνωρίστηκαν μετά από δωδεκάωρη πρωτεόλυση του δείγματος, ήταν υδρόφιλα, και τα δύο εξ αυτών βρίσκονταν στην ίδια περιοχή της BR που αναγνωρίστηκε από το δείγμα υπερκειμένου μετά την επώαση με αιθανόλη με την μεθοδολογία της πρωτεόλυσης σε διάλυμα. Στην ίδια περιοχή της BR με διαφορά λίγων μόνο αμινοξέων, βρίσκεται και το ένα εκ των δύο πεπτιδίων που

ταυτοποιήθηκαν μετά από την δίωρη πρωτεόλυση της πηκτής. Το δεύτερο πεπτίδιο που αναγνωρίστηκε με την ίδια μεθοδολογία, ήταν υδρόφιλο και ταυτοποιήθηκε επίσης από το υπερκείμενο της πρωτεόλυσης που προήλθε με την μεθοδολογία της πρωτεόλυσης σε διάλυμα και αναλύθηκε με το LCQ. Το ίδιο πεπτίδιο αναγνωρίστηκε και από το υπερκείμενο της επώασης με αιθανόλη όταν διπλασιάστηκε η ποσότητα της BR.

Αναλυτικότερα, με την χρήση 50μg βακτηριοροδοψίνης, σε αναλογία BR/Pr.K 5/1 και με την βοήθεια της φασματοσκοπίας μάζας με ηλεκτροψεκασμό, ταυτοποιήθηκαν δύο πεπτίδια, μεγέθους 34 και 25 αμινοξέων τα οποία βρίσκονται στην περιοχή της A και G έλικας αντίστοιχα. Τα πεπτίδια αυτά προέκυψαν από το υπερκείμενο και το ίζημα της δύωρης πρωτεόλυσης της BR, και είναι αρκετά υδρόφοβα όπως γίνεται αντιληπτό από τις τιμές GRAVY τους. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό, φαίνεται να ταυτοποιεί μεγαλύτερου μήκους πεπτίδια και αρκετά υδρόφοβα σε σχέση με τον ιοντισμό τον υποβοηθούμενο από μήτρα και λέιζερ. Παρόλα αυτά λόγω προβλημάτων που προέκυψαν στον φασματογράφο μάζας δεν μπορέσαμε να λάβουμε περισσότερες μετρήσεις των δειγμάτων μας. Με την ίδια μεθοδολογία, και αναλογία BR/PrK 1/20 ελήφθησαν μετρήσεις με φασματογράφο μάζας ιοντισμού MALDI. Η αλλαγή της αναλογίας υποστρώματος /ένζυμο πραγματοποιήθηκε προκειμένου να μειωθούν οι υψηλές εντάσεις των κορυφών της Pr.K και δυσκολεύουν στην απομόνωση και ανίχνευση των κορυφών της BR. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με αναλογία BR/PrK 20/1 έδειξαν πως δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί καμία ταυτοποίηση πεπτιδίου. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό, είναι ίσως το ότι η ποσότητα πρωτεΐνης K που παρέχεται δεν είναι ικανή να πρωτεολύσει την συγκεκριμένη ποσότητα βακτηριοροδοψίνης. Τα πεπτίδια που ταυτοποιήθηκαν από τα πειράματα αυτά προέρχονταν από το ίζημα της πρωτεόλυσης, και το ίζημα και το υπερκείμενο της που δημιουργείται μετά την επώαση των θραυσμάτων με αιθανόλη. Τα πεπτίδια που ταυτοποιήθηκαν μετά την επώαση με αιθανόλη ήταν υδρόφιλα και ανήκουν στην ίδια περιοχή της BR. Αντίθετα τα πεπτίδια που προέκυψαν από το ίζημα της πρωτεόλυσης ήταν αρκετά υδρόφοβα και τα δύο εξ αυτών αποτελούν τμήμα του πεπτιδίου που αναγνωρίστηκε με το ESI στο ίζημα της πρωτεόλυσης.

Προκειμένου να μειωθούν οι πιθανότητες της μη παρατήρησης ταυτοποιημένων πεπτιδίων, λόγω “χασίματος” της πρωτεΐνης στα διάφορα στάδια της επεξεργασίας, πραγματοποιήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία με διπλάσια ποσότητα BR. Τα πεπτίδια που αναγνωρίστηκαν από την διαδικασία αυτή ήταν ίδια με αυτά που αναγνωρίστηκαν με μικρότερη ποσότητα BR, με διαφοροποιήσεις στην ταυτοποίηση δύο επιπλέον πεπτιδίων που βρίσκονταν στο υπερκείμενο της επώασης με αιθανόλη. Το ένα από τα πεπτίδια αυτά ήταν αρκετά υδρόφιλο, ενώ το δεύτερο πεπτίδιο είχε ήδη αναγνωριστεί στο υπερκείμενο της πρωτεόλυσης από το LCQ. Το γεγονός ότι δεν υπάρχουν σπουδαίες διαφοροποιήσεις με τον διπλασιασμό της ποσότητας της BR μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι για την κρυσταλλοποίηση του δείγματος που πραγματοποιείται πριν την ανάλυση με φασματογράφο μάζας MALDI χρειάστηκε η αραίωση αυτού.

Μια επιπλέον μεταβολή που πραγματοποιήθηκε στην αρχική μεθοδολογία ήταν η αλλαγή του χρόνου πρωτεόλυσης. Λόγω του ότι το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι μη εξειδικευμένο, μειώθηκε ο χρόνος πρωτεόλυσης ώστε να μειωθούν οι πιθανότητες μη ταυτοποίησης πεπτιδίων λόγω πρωτεόλυσης τους σε αρκετά σημεία της BR με αποτέλεσμα να έχει μειωθεί το μήκος των πεπτιδίων τόσο που να μην μπορούν να αναλυθούν από τον φασματογράφο μάζας. Η υπόθεση αυτή τελικά δεν ίσχυε καθώς με την μείωση του χρόνου πρωτεόλυσης δεν πραγματοποιήθηκε κάποια αναγνώριση. Το ίδιο συνέβη και με την αύξηση του χρόνου πρωτεόλυσης λόγω ίσως της υπόθεσης που προαναφέρθηκε.

Γενικά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι με όλες τις μεταβολές που πραγματοποιήθηκαν στην μεθοδολογία, ταυτοποιήθηκαν οι ίδιες κάθε φορά περιοχές της BR. Πιθανόν οι περιοχές αυτές της BR να είναι ευκολότερα προσβάσιμες στο ένζυμο οπότε και ευκολότερα ταυτοποιήσιμες ή πιθανόν το φορτίο των περιοχών αυτών να βοηθάει στον ιοντισμό των πεπτιδίων και επομένως στην ταυτοποίηση τους από τον φασματογράφο μάζας. Πολύ πιθανόν το πρόβλημα της ταυτοποίησης των υδρόφοβων πεπτιδίων να μην οφείλεται μόνο στην διαδικασία επεξεργασίας αυτών αλλά κατά μεγάλο ποσοστό στην φασματοσκοπία μάζας που τα αναλύει λόγω του ελλιπούς φορτίου τους για παράδειγμα, να μην μπορούν να ιοντιστούν.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Koebnik R,L.K., Van Gelder P., '*Structure and function of bacterial outer membrane proteins :barrels in a nutshell*' Mol Microbiol., 2000. **37**(2): p. 239-53
2. Buchanan SK, S.B., Venkatramani L, Xia D,Esser L, Palnitkar M, Chkraborty R, van der Helm D, Deisenhofer J., '*Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from Escherichia coli*' Nat Struct Biol.,1999. **6**(1): p.56-63
3. Lubert Stryer '*Βιοχημεία*' Πρώτος τόμος Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 1991 p.304-306
4. Alberts,Bray,Johnson,Lewis,Raff,Roberts,Walter '*Βασικές Αρχές Κυτταρικής -Βιολογίας*' Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης . Μέρος Β : p.575-482
5. Lubert Stryer '*Βιοχημεία*' Δεύτερος τόμος Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 1991 p.1061-1062
6. Karas M, H.F., '*Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*' Anal Chem.,1998. **60**(20):p.2299-301
7. Koichi Tanaka, H.W., Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida and Tamio Yoshida, '*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.151-53
8. Mann, M., R.C. Hendrickson and A.Pandey,Annual Rev Biochemistry, 2001. **70**:p.437-73
9. Fenn J ., Science, 1989.**246**:p.64-71
10. Karas, M. and F.Hillenkamp, Analytical Chem,1988. **60**:p.299-301
11. Klose J., Human genetic, 1975. **26**:p.231-243
12. O Farrell, P., J.Biol.Chem., 1975 **250**:p.407-21
13. Chait BT,Kent SBH '*Praktical high accuracy mass measurement of peptides and proteins*.Science **257** p.1885-1894
14. Wallin,E von Heije,G.Protein. Heije,G. '*Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms*' Sci 7, 1998 p.1029-1038

15. Barnidge,D R Dratz, E. A Jesaitis, A,J Sunner,," *Extraction method for analysis of detergent-solubilized bacteriorhodopsin and hydrophobic peptides by electrospray ionization mass spectrometry*" J.Anal. Biochem. 1999, p.269,1-9
16. Blonder,B et al. J. " *Enrichment of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*".
Proteome.Res1 , 2002 p.351-360
17. Goshe,M.B., Blonder, B&Smith. " *Affinity labelling of highly hydrophobic integral membrane proteins from proteome wide analysis.*"
Proteome.Res2 ,2003: p.153-161
18. Alberts,Bray,Johnson,Lewis,Raff,Roberts,Walter " *Βασικές Αρχές Κυτταρικής -Βιολογίας*" Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης . Μέρος Α : p.161-165
19. Alberts,Bray,Johnson,Lewis,Raff,Roberts,Walter " *Βασικές Αρχές Κυτταρικής -Βιολογίας*" Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης . Μέρος Β : p.420-423
20. M.Dole, L.L.Mack, R.L.Hines, R.C Moble, L.D. Ferguston, M.B. Alice. J Cem Phys, 1968, **49**, :p.2240-2249
21. J.V.Iribarne, BA.Thomson. J. Chem. Phys. 1976. **64**:p. 2287-2294
22. Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant. " *Mass Spectrometry, Principles and Applications*" 2001 second edition 34
23. A.P.Bruins. In : Cole RB (Ed.). New York : Wiley and Sons, Inc. 1997: p.107-135
24. Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant. " *Mass Spectrometry, Principles and Applications*" 1990 second edition p.78-79
25. Greer Ly, Markey SP, Kowalak JA,Wagner L, Xu M,Mayuard DM,Jang X, Shiw, Bryant SH, Proteome Res **3**(5) 2004 :p. 958-964
26. MacCoss MJ, Wu CC, Yates JR 3rd Anal. Chem **74**(21). 2002:p5593-5599
27. Perkins D, Pappin D., Creasy P, Cottrell J., Electrophoresis **20**(18) 1999: p.3551-3567
28. Santoni V,Molloy M , Rabilloud T " *Membrane proteins and proteomics un amour impossible?*" Electrophoresis **21** 2000: p.1054-1070
29. Wu CC, Yates JR Nat Biotechnol **21** 2003 p.263-267
30. Heijne G, V EMBO **5** 1986 p.3021-3027

31. Shevchenko , A. Loboda A, Ens W Standing K. G *Analytical Chemistry* **72** 2000 2132-2141
32. Kraft, P. Millis J, Dranz E *Analytical Biochemistry* **292** 2001 p.76-86
33. Quach T.T, Li N Richards D.P Zheng J Keller B.O Li L J. *Proteome Res* **2** 2003 p.543-552
34. Molloy M. P Herbert B, R Slade M, B Rabilloud T, Nouwens A. S Williams K . L Gooley A.A *Eur. J Biochem* **267** 2000 2871-2881
35. Barnidge D, R Dratz E, A Jesaitis A, J. Sunner J. *Analytical Biochemistry* **269** 1999 p.1-9
36. Rabilloud T *Electrophoresis* **17** 1996 p.813-829
37. Santoni V , Kieffer S, Desclaux , Masson F, Rabilloud T *Electrophoresis* **21** 2000 p.3329-3344
38. Nouwens, A S.Cordwell S, J Larsen M .R Molloy M.P, Gillings M, Willcox M, D, P.Walsh B J *Electrophoresis* **21**, 2000 p.3797-3809
39. Qi, S. Y . Moir A, Oconnor, D J *Bacteriol* **178** 1996 p. 5032-5038
40. Langen H, Takacs B,Evers S Berndt P, Lahm H W Wipf B. Gray .C, Fountoulakis M. *Electrophoresis* **21** 2000 p.411-429
41. Rosenkrands I, King A, Weldingh K, Moniatte M, Moertz E, Andersen P *Electrophoresis* **21** 2000 p.3740-3756
42. Regula J. T, Ueberle B, Boguth G, Gorg A, Schnortzel M, Hermann R, Frank R *Electrophoresis* **21** 2000 p. 3765-3780
43. Bumann D, Meyer T, F, Jungblut P, R *Proteomics* **1** 2001 p. 473-479
44. Phadke N, D, Molloy M,P Steinhoff S,A Ulintz P, J , Andrews P.C Maddock J. R *Proteomics* **1** 2001 p. 705-720
45. Molloy M, P, Phadke N.D Maddock J,R, Andrews P.C Maddock *Proteomics* **22** 2001 p. 1686-1696
46. Willkins , M .R Gasteiger E, Sanchez J.C, Bairoch A, Hochstrasser D.F *Electrophoresis* **19** 1998 p.1501- 1505
47. Ferro M et al. *Integral membrane proteins of the chloroplast envelope : identification and subcellular localization of new transporters* Proc Natl. Acad. Sci. USA **99** 2002 11487-11492
48. Ferro M et al *Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins* *Electrophoresis* **21** 2002 p.3517-3526

49. Galeva N & Altermann M, *“Comparison of one-dimensional and two dimensional gel Electrophoresis as a separation tool for proteomic analysis of rat liver microsomes: cytochromes P450 and other membrane proteins.* Proteomics **2** 2002 p.713-722
50. Simpson :R.J et al *Proteomic analysis of human colon carcinoma cell line LIM 1215: Development of a membrane protein database.* Electrophoresis **21** 2000 p.1707-1732
51. van Montfold BA Canas B Duurkens R Godovac-Zimmermann J & Robillard G.T *“ Improved in-gel approaches to generate peptide mass of integral membrane proteins with matrix –assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry* J.Mass Spectrom. **37** 2002 p.322-330
52. Redeby T, Asa Emmer et al. *“Membrane protein and peptide sample handling for MS analysis using a structured MALDI target”* Anal Bioanal Chem **381** 2005 p.225-232
53. Alberts,Bray,Johnson,Lewis,Raff,Roberts,Walter *“Βασικές Αρχές Κυτταρικής -Βιολογίας”* Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης . Μέρος Β : p 407-419

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ
ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

<i>Είδος Δείγματος</i>	<i>Κορυφή m/z</i>	<i>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΜΕ MALDI</i>	<i>ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)</i>
I ₁	1731	DVSAKVGFGILLRSR.	0.631
I ₁	1487	DVSAKVGFGILLR	1.100
I ₁	1789	RNVTVVLWSAYPVVW	0.827
I ₂	1047	QNPIYWAR	-1.125
Y ₂	919	NPIYWAR	-0.786
Y ₂	1233	QEQNPIYWAR.	-1.290

<i>Είδος Δείγματος 12hours</i>	<i>Κορυφή m/z</i>	<i>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΜΕ MALDI</i>	<i>ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)</i>
Πηκτή	1047	MGVSDPDAKK	-0.970
Πηκτή	1290	GGEQNPIYWAR	-1.209
Πηκτή	1063	GGEQNPIYW	-1.178

<i>Είδος Δείγματος BR^{NH3}</i>	<i>Κορυφή m/z</i>	<i>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΜΕ MALDI</i>	<i>ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)</i>
I ₁ ^{NH3}	919	NPIYWAR	-0.786
I ₁ ^{NH3}	986	RNVTVVLW	0.850
I ₁ ^{NH3}	1176	EQNPIYWAR	-1.389
I ₁ ^{NH3}	1233	GEQNPIYWAR	-1.290
I ₁ ^{NH3}	1290	GGEQNPIYWAR	-1.209
I ₁ ^{NH3}	1731	DVSAKVGFGILLRSR	0.631

<i>Είδος Δείγματος 2 BR </i>	<i>Κορυφή m/z</i>	<i>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΜΕ MALDI</i>	<i>ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)</i>
I ₁	1731	DVSAKVGFGILLRSR.	0.631
I ₁	1487	DVSAKVGFGILLR	1.100
I ₁	1789	RNVTVVLWSAYPVVW	0.827
I ₂	1047	QNPIYWAR	-1.125
Y ₂	919	NPIYWAR	-0.786
Y ₂	1047	EQNPIYWAR.Y	-1.380
Y ₂	1114	APEPSAGDGAAT	-0.269
Y ₂	1240	TGRPEWIWLALG	0.127

<i>Είδος Δείγματος 2hours</i>	<i>Κορυφή m/z</i>	<i>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΜΕ MALDI</i>	<i>ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)</i>
Πηκτή	1240	GRPEWIWLALGTAL	0.471
Πηκτή	1764	MVPFGGEQNPIYWAR	-0.400

<i>Είδος Δείγματος</i>	<i>Κορυφή m/z</i>	<i>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΜΕ ESI</i>	<i>ΥΔΡΟΦΟΒΙΚΟΤΗΤΑ (GRAVY)</i>
I ₁	1240.1	G IVPLNIETLL FMVLDVSAKV GFGILLRSR	1.376
Y ₁	1404.9	GR PEWIWLALGT ALMGLGTYF LVK	0.808