

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ
ΦΑΙΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΕΝΑ ΝΕΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ
ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Pseudomonas***

Ειρήνη Γ. Τσιρογιάννη

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

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Τομέα Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επιστημονική επιμέλεια του επίκουρο καθηγητή κ. *Γεώργιου Τσιώτη*, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για τη βοήθεια, την ενθάρρυνση και τη συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριό του. Οι πάντα εποικοδομητικές συζητήσεις για τα προβλήματα που παρουσιάζονταν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, αποτέλεσαν το σημαντικότερο βοήθημα για τη πραγμάτωση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κ. *Δημήτριο Γανωτάκη* από το Πανεπιστήμιο Κρήτης και τον Δρ. *Μιχαήλ Φουντουλάκη* από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, που δέχτηκαν με ευχαρίστηση να συμμετάσχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καλό μου φίλο, υποψήφιο διδάκτορα, κ. *Μιχάλη Αϊβαλιώτη* για την πολύτιμη βοήθεια και συνεργασία του κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της εργασίας.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή *Michael Karas* και την ερευνητική του ομάδα στο πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης, για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τις αναλύσεις φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS στο εργαστήριο ενόργανης αναλυτικής χημείας, τομέας φαρμακευτικής χημείας του πανεπιστημίου Φρανκφούρτης.

Επίσης ευχαριστώ τον καθηγητή κ. *Ευριπίδη Στεφάνου* για την ευγενική προσφορά του νέου βακτηριακού στελέχους του γένους *Pseudomonas*.

Ευχαριστώ επίσης το τμήμα Χημείας που με δέχθηκε ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια και για την ευκαιρία που μου έδωσε να διευρύνω του επιστημονικούς μου ορίζοντες στον τομέα Βιοχημείας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα του εργαστηρίου στο οποίο πραγματοποίησα τη παρούσα εργασία για την ενθάρρυνση και την συνεργασία τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους γονείς μου Γρηγόρη και Δήμητρα και τον αδελφό μου Χρήστο για την συνεχή τους ενθάρρυνση και την οικονομική και ηθική στήριξη όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | 2 |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ | 3 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 5 |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ | 7 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 8 |
| 1.1 Βιοαποικοδόμηση..... | 8 |
| 1.2 Βακτήρια που αποικοδομούν αρωματικές ενώσεις..... | 9 |
| 1.3 Χαρακτηριστικά των gram αρνητικών βακτηρίων..... | 9 |
| 1.4 Αποικοδόμηση της φαινόλης..... | 13 |
| 1.4.1 <i>Μέτα</i> μεταβολισμός της φαινόλης..... | 15 |
| 1.4.2 <i>Ορθο</i> μεταβολισμός της φαινόλης..... | 18 |
| 1.5 Απεικόνιση του πρωτεόματος: Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση..... | 20 |
| 1.6 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών..... | 20 |
| 1.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας..... | 21 |
| 1.7.1 MALDI..... | 21 |
| 1.8 Σκοπός της εργασίας..... | 24 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 25 |
| 2.1 Υλικά..... | 25 |
| 2.1.1 Αντιδραστήρια –διαλύματα..... | 25 |
| 2.2 Μέθοδοι..... | 31 |
| 2.2.1 Οργανισμός..... | 31 |
| 2.2.2 Απομόνωση της 23 διοξυγενάσης της κατεχόλης..... | 32 |
| 2.2.3 Χρωματογραφία ιονανταλλαγής..... | 32 |
| 2.2.4 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση..... | 33 |
| 2.2.5 Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (IEF / SDS PAGE)..... | 33 |
| 2.2.5.1 1 ^η διάσταση: αναλυτική ισοηλεκτρική εστίαση..... | 33 |
| 2.2.5.2 2 ^η διάσταση: SDS-PAGE..... | 34 |
| 2.2.6 Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (Blue Native PAGE / SDS PAGE)..... | 35 |
| 2.2.6.1 1 ^η διάσταση: μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση..... | 35 |
| 2.2.6.2 2 ^η διάσταση: SDS PAGE..... | 35 |
| 2.2.7 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού ακτινοβολίας..... | 36 |
| 2.2.8 Πρωτεολυτική διάσπαση <i>in situ</i> σε πηκτική ακρυλαμιδίου..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.9 Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας..... | 37 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 38 |
| 3.1 Απομόνωση και χαρακτηρισμός της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης..... | 38 |
| 3.1.1 Απομόνωση του ενζύμου 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης..... | 38 |
| 3.1.2 Ανιοντική χρωματογραφία..... | 39 |
| 3.1.3 Χαρακτηρισμός του ενζύμου με φασματομετρία υπεριώδους-ορατού..... | 40 |
| 3.1.4 Χαρακτηρισμός του απομονωμένου ενζύμου με φασματομετρία μάζας..... | 41 |
| 3.2 Προσδιορισμός και λειτουργικός χαρακτηρισμός των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης..... | 44 |
| 3.2.1 Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (IEF / SDS PAGE)..... | 44 |
| 3.2.2 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση..... | 46 |
| 3.2.3 Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (Blue Native PAGE / SDS PAGE)..... | 50 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 58 |
| 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 63 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 64 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαδικασία αποικοδόμησης μονοαρωματικών ενώσεων και κυρίως ο μηχανισμός αποικοδόμησης της φαινόλης από το νέο βακτήριο rhDVI του γένους *Pseudomonas*, υπήρξε αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Η πλήρης αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* καθώς και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός πολλών πρωτεϊνών, διαφόρων βακτηριακών στελεχών του γένους *Pseudomonas* υπήρξαν χρήσιμα εργαλεία στη διαδικασία μελέτης του μηχανισμού αποικοδόμησης της φαινόλης.

Για τον προσδιορισμό του μεταβολικού μονοπατιού που ακολουθεί το βακτήριο για το μεταβολισμό της φαινόλης απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το ένζυμο «κλειδί» στην διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου της κατεχόλης, η 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης. Η απομόνωση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με διαβάθμισης ζάχαρης και ανιοντική χρωματογραφία, ενώ ο χαρακτηρισμός του ενζύμου έγινε με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού και φασματομετρία μάζας.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν και τα υπόλοιπα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε αρχικά δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση μία μέθοδος που επιτρέπει το διαχωρισμό μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε φαινόλη και γλυκόζη, αντίστοιχα, ηλεκτροφορήθηκαν αρχικά σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου με διαβάθμιση pH (Ισοηλεκτρική εστίαση με αμφολύτες φορείς). Κατόπιν πραγματοποιήθηκε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ώστε να ληφθεί το πρωτεϊνικό αποτύπωμα των δύο δειγμάτων και να γίνει σύγκριση μεταξύ τους. Η μέθοδος αυτή δεν είχε μεγάλη επαναληψιμότητα λόγω της πρώτης διάστασης της ισοηλεκτρικής εστίασης που χρησιμοποιήθηκαν πηκτές ακρυλαμίδιου που παρασκευάσαμε με αμφολύτες φορείς.

Έπιτα δοκιμάστηκε κλασματοποίηση των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών με χρήση υπερφυγοκέντρωσης σε διαβάθμιση ζάχαρης ώστε να γίνει απλούστευση και εμπλουτισμός του δείγματος με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης ώστε να εντοπισθούν πρωτεϊνικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων των διαφορετικών καλλιεργειών. Με χρήση φασματομετρίας μάζας επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση όλων των βασικών ενζύμων που συμμετέχουν στο μέτα μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια προσδιορισμού πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης με χρήση μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (Blue Native ηλεκτροφόρηση) σε συνδυασμό με δεύτερη διάσταση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας. Κατά τη διαδικασία αυτή βρέθηκαν ταυτοποιήθηκαν πρωτεϊνικά σύμπλοκα που περιέχουν ένζυμα του μεταβολισμού της φαινόλης αλλά και άλλες υδατοδιαλυτες πρωτεΐνες του κυττάρου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

| | |
|---------|---|
| ACN | : ακετονιτρίλιο |
| APS | : υπερθειϊκό αμμώνιο |
| DTT | : διθειοθρεϊτόλη |
| EDTA | : αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ |
| IEF | : ισοηλεκτρική εστίαση |
| kDa | : kilodalton |
| NADP | : νικοτινάμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο φωσφορικού εστέρα |
| NADH | : νικοτινάμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο |
| PAGE | : ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου |
| SDS | : δωδεκυλοθειϊκό νάτριο |
| MS | : φασματομετρία μάζας |
| MALDI | : ιονισμός με laser απόπτωση υποβοηθούμενη με υπόστρωμα (matrix (assisted laser desorption) |
| ESI | : ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization) |
| LC | : υγρή χρωματογραφία |
| TEMED | : N,N,N',N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη |
| TFA | : τριφθοροξικό |
| TOF | : time of flight (χρόνος πτήσης) |
| Tris | : τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο |
| AB-mix | : διάλυμα ακρυλαμιδίου, δισακρυλαμιδίου |
| Tricine | : N-τρις(υδροξυμέθυλο-)μέθυλο-γλυκίνη |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοαποικοδόμηση

Η ανάπτυξη της βιομηχανίας προκάλεσε την ραγδαία αύξηση των χημικών συνθετικών ουσιών που εναποτίθενται καθημερινά στο περιβάλλον. Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής συντίθενται ετήσια πάνω από 1700 εκατομμύρια κιλά φαινόλης και τεράστιες ποσότητες φαινολικών παραγώγων παράγονται σαν βιομηχανικά παραπροϊόντα [1]. Πέρα από τα βιομηχανικά απόβλητα, πολλές πετρελαϊκές ενώσεις είναι τοξικές για το περιβάλλον.

Η βιοαποικοδόμηση είναι μια διαδικασία που συντελείται από μικροοργανισμούς όπως τα βακτήρια και οι μύκητες, του εδάφους και του νερού. Αρκετά βακτηριακά στελέχη έχουν την ικανότητα να διασπούν ή να μετασχηματίζουν τις χημικές ουσίες και να τις χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα.

Τα βακτήρια χρησιμοποιούνται ευρέως για την βιοαποικοδόμηση και την βιοεπιβίωση του εδάφους και νερού λόγω της δυνατότητας που έχουν να καλλιεργούνται εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες. Επίσης με τη βοήθεια της μοριακής βιολογίας επιδέχονται εύκολα χρωμοσωμικές τροποποιήσεις, ώστε να αποικοδομούν μεγαλύτερο αριθμό αρωματικών και χλωριωμένων ενώσεων και έχουν τη δυνατότητα στοιχειοποίησης των χημικών ενώσεων χρησιμοποιώντας αυτές ως πηγή άνθρακα και ενέργειας.

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν μία ή περισσότερες μονοαρωματικές και πολυαρωματικές ενώσεις, τα υποκατεστημένα παράγωγα τους όπως επίσης και αλκυλικές ενώσεις. Επομένως η αποτελεσματική *in situ* βιοαποικοδόμηση πετρελαϊκής ή βιομηχανικής μόλυνσης απαιτεί μίγμα πληθυσμών από διαφορετικά γένη ώστε να επιτυγχάνεται η αποικοδόμηση όσο το δυνατόν μεγαλύτερου αριθμού ρύπων.

Παρόλο που οι μύκητες έχουν την ικανότητα αποικοδόμησης αρωματικών ενώσεων, απαιτούν για την αποικοδόμηση τους την συνοξείδωση γλυκόζης ή κυτταρίνης. Σε πολλές περιπτώσεις η οξείδωση των αρωματικών ενώσεων δεν είναι πλήρης, αλλά σχηματίζονται πολλές φορές τοξικά ενδιάμεσα και είναι αναγκαία η παρουσία άλλου βακτηρίου για την πλήρη στοιχειοποίηση των συγκεκριμένων οργανικών ενώσεων.

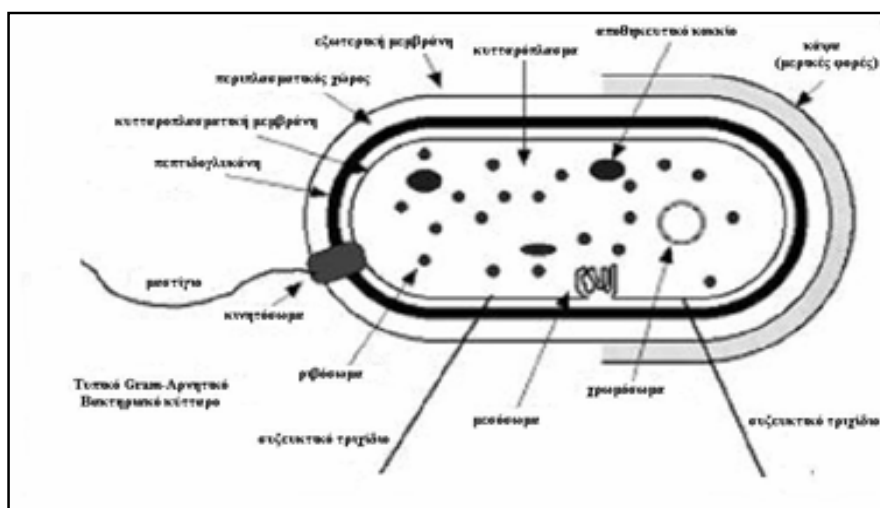
1.2 Βακτήρια που αποικοδομούν αρωματικές ενώσεις

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών που έχουν την δυνατότητα να μεταβολίζουν αρωματικές ενώσεις δείχνει τη μεγάλη ποικιλότητα που υπάρχει στο μικροβιακό κόσμο. Βακτηριακά γένη που μπορούν να μεταβολίζουν αρωματικές ενώσεις είναι το γένος *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* και *Bacillus*[2].

Η ικανότητα των βακτηρίων αυτών να μεταβολίζουν αρωματικές ενώσεις οφείλεται στην έκφραση επαγόμενων πρωτεϊνών από γονίδια που βρίσκονται στο χρωμοσωμικό DNA του βακτηρίου αλλά και σε έξτρα χρωμοσωμικό (πλασμιδιακό) DNA. Η ύπαρξη των πλασμιδίων δίνει την δυνατότητα στο βακτήριο να επάγει την σύνθεση αναγκαίων πρωτεϊνών πολύ γρήγορα και ανεξάρτητα από την υπόλοιπη πρωτεϊνοσύνθεση που συντελείται στον οργανισμό. Η διάταξη των γονιδίων αυτών των πρωτεϊνών σε οπερόνια στο πλασμιδιακό DNA δίνει την δυνατότητα στο βακτήριο να ελέγχει την σύνθεση όλων των μεταβολικών πρωτεϊνών για μια ουσία.

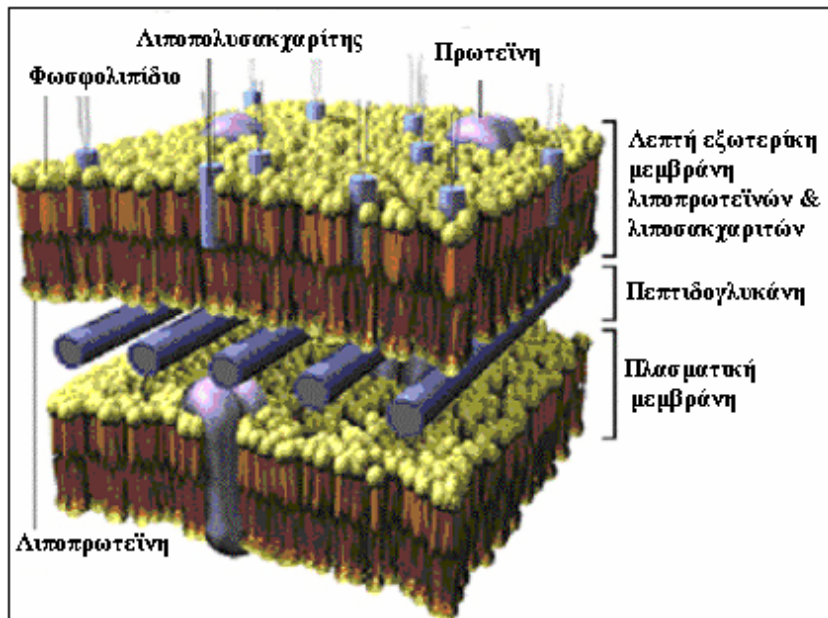
1.3 Χαρακτηριστικά των gram αρνητικών βακτηρίων

Το γένος *Pseudomonas* ανήκει στην τάξη των gram-αρνητικών βακτηρίων και είναι ευρέως διαδεδομένα σε πολλά φυσικά περιβάλλοντα. Τα διάφορα είδη του γένους διαθέτουν ένα μεγάλο αριθμό δυνατοτήτων σχετικών κυρίως με τη στοιχειοποίηση του οργανικού άνθρακα και τη διατήρηση του κύκλου του. Στο σχήμα 1.1 φαίνεται η δομή ενός gram αρνητικού βακτηριδίου.



Σχήμα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός gram αρνητικού βακτηριδίου

Το κυτταρικό τοίχωμα των gram-αρνητικών βακτηρίων, έχει διαφορετική δομή από το αντίστοιχο τοίχωμα των gram-θετικών βακτηρίων. Αποτελείται από μια επιπλέον κυτταρική μεμβράνη εκτός από την κυτταροπλασματική. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη περιβάλλεται από μια ανοιχτή περιοχή η οποία ονομάζεται περιπλασματικός χώρος, στην οποία υπάρχει μια λεπτή στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης. Εξωτερικά της πεπτιδογλυκάνης υπάρχει μια επιπλέον στοιβάδα, η εξωτερική μεμβράνη (Σχήμα 1.2).



Σχήμα 1.2: Δομή του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηριδίων

Η εξωτερική μεμβράνη είναι μια διπλοστοβάδα λιπιδίων, όπως και η κυτταροπλασματική μεμβράνη, που περιέχει λιπίδια, πρωτεΐνες, αλλά και λιποσακχαρίδια. Η μεμβράνη αυτή έχει διακριτές πλευρές, με την πλευρά που περιέχει τα λιποσακχαρίδια να είναι προς τον εξωκυττάριο χώρο. Τα λιποσακχαρίδια προσδίδουν ένα αρνητικό φορτίο στο βακτήριο και απωθούν υδρόφοβα μόρια. Μερικά είδη ζουν στο έντερο των θηλαστικών και τα λιποσακχαρίδια απωθούν κάποια μόρια που διαλυτοποιούν τα λίπη. Το Ο-αντιγόνο συμμετέχει, επίσης, στην αναγνώριση συγκεκριμένων βακτηριοφάγων. Τα ελεύθερα λιποσακχαρίδια σε διάλυμα είναι τοξικά και ονομάζονται ενδοτοξίνες. Για το λόγο αυτό τα gram αρνητικά βακτήρια χαρακτηρίζονται και ως παθογόνα.

A. Εξωτερική μεμβράνη

Τα είδη των διαφορετικών πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης είναι πολύ λιγότερα σε σύγκριση με αυτά των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, αλλά βρίσκονται σε

μεγαλύτερη αφθονία. Αποτελούν περίπου το 50% της συνολικής μάζας της εξωτερικής μεμβράνης [3, 4] Στις πρωτεΐνες αυτές συμπεριλαμβάνονται διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, αλλά, και λιποπρωτεΐνες που είναι ακινητοποιημένες στην εξωτερική μεμβράνη με λιπίδια προσδεσμένα στο N-τερματικό τους. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι βασικές για την διατήρηση της ακεραιότητας και της επιλεκτικής διαπερατότητας των βακτηριακών μεμβρανών [4]. Η παραγωγή των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης συχνά ρυθμίζεται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα και για το λόγο αυτό παίζουν σημαντικό ρόλο στην βακτηριακή παθογένεση αυξάνοντας την προσαρμοστικότητα των βακτηρίων σε διάφορα περιβάλλοντα. Ο ρόλος της εξωτερικής μεμβράνης στην λειτουργία του βακτηρίου, όπως ήδη αναφέρθηκε είναι πολύ σημαντικός. Οι σημαντικότερες λειτουργίες της είναι:

- Προσδίδει αρνητικό φορτίο στο κύτταρο.
- Επιλεκτική διαπερατότητα για την είσοδο υδρόφυλων μορίων.
- Περιέχει υποδοχείς φάγων.
- Παθογόνες ιδιότητες.
- Σταθεροποιεί την επικοινωνία των κυττάρων.
- Διατηρεί τα ένζυμα στο περίπλασμα.

B. Περιπλασματικός χώρος

Ο περιπλασματικός χώρος είναι ο χώρος μεταξύ της στοιβάδας της πεπτιδογλυκάνης και της εξωτερικής μεμβράνης, όπου περιέχονται αρκετές διαφορετικές πρωτεΐνες. Ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών είναι να ανιχνεύουν το περιβάλλον και να μεταφέρουν τα απαραίτητα θρεπτικά εντός του κυττάρου. Μερικά παραδείγματα περιπλασματικών ενζύμων αναφέρονται παρακάτω:

1. Υδρολυτικά ένζυμα
 - Φωσφατάσες
 - Πρωτεάσες
 - Ενδονουκλεάσες
2. πρωτεΐνες πρόσδεσης- αναγνωρίζουν συγκεκριμένες ενώσεις και τις μεταφέρουν διαμέσου της μεμβράνης:
 - σάκχαρα
 - αμινοξέα

- ανόργανα ιόντα
 - βιταμίνες
3. Χημικοδοχείς- βοηθούν την αναγνώριση της χημικής σύστασης του περιβάλλοντος από το κύτταρο.
 4. Ένζυμα αποτοξίνωσης- τροποποιούν επικίνδυνες ενώσεις πριν εισέλθουν εντός του κυττάρου, π.χ. β- λακταμάση.
 5. Οσμωτική προστασία- όταν τα κύτταρα τοποθετηθούν σε υψηλή οσμωτική πίεση προκαλεί την ροή νερού έξω από το κύτταρο.

Γ. Πεπτιδογλυκάνη

Η πεπτιδογλυκάνη στα Gram-αρνητικά βακτήρια περιέχει λιγότερες διασυνδέσεις και καθόλου πεπτιδικές διασυνδέσεις. Συγκριτικά με την στοιβάδα της πεπτιδογλυκάνης των Gram-θετικών βακτηρίων είναι μόνο το 20% αυτής. Ομοιοπολικά προσδεδεμένες στην πεπτιδογλυκάνη είναι λιποπρωτεΐνες οι οποίες έχουν υδρόφοβες περιοχές που προσδένονται στην εξωτερική μεμβράνη. Με αυτόν τον τρόπο η πεπτιδογλυκάνη προσδέεται ισχυρά στην εξωτερική μεμβράνη.

Δ. Κυτταροπλασματική μεμβράνη

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι ένα οργανωμένο συγκρότημα το οποίο αποτελείται από διπλοστοιβάδα λιπιδίων, κυρίως φωσφολιπίδια, και πρωτεΐνες βυθισμένες στην λιπιδική στοιβάδα. Προσδίδει στα κύτταρα την ατομικότητα τους, διαχωρίζοντας το κάθε κύτταρο από το περιβάλλον του. Παρέχει επιλεκτική διαπερατότητα, επειδή περιέχει εξειδικευμένες μοριακές αντλίες και μοριακά κανάλια. Ειδικοί υποδοχείς για εξωτερικά ερεθίσματα που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ελέγχουν την ροή πληροφοριών.

Ε. Κυτταρόπλασμα

Το κυτταρόπλασμα είναι το μέρος του κυττάρου που περιβάλλεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και αποτελείται κυρίως από νερό και πρωτεΐνες. Σε αυτό πραγματοποιούνται οι ζωτικές για το κύτταρο χημικές αντιδράσεις. Περιέχει επίσης το πλασμιδιακό και τα χρωμοσωμικό DNA του βακτηρίου το οποίο δε περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη όπως στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το κυτταρόπλασμα έχει

παχύρρευστη υφή και περιέχει διακριτές περιοχές στις οποίες πραγματοποιούνται διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις. Για παράδειγμα, τα ένζυμα της γλυκόλυσης οργανώνονται σε μια μονάδα και αποικοδομούν το υπόστρωμα με μια γραμμικά καθορισμένη διαμόρφωση. Επίσης, πολλά ένζυμα της σύνθεσης του DNA συναθροίζονται στην φουρκέτα αντιγραφής

Το κυτταρόπλασμα αποτελείται από πρωτεΐνες, βιταμίνες, ιόντα, νουκλεϊκά οξέα, αμινοξέα, υδατάνθρακες, υδρογονάνθρακες και τα παράγωγα τους καθώς επίσης και λιπαρά οξέα και τα παράγωγα τους. Πολλά κυτταρικά συστατικά συμπεριλαμβανομένων και των παραπάνω μορίων συνυπάρχουν στο κυτταρόπλασμα επιτελώντας μια πληθώρα χημικών αντιδράσεων. Οι χημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα είναι πολύ σημαντικές για την ανάπτυξη του κυττάρου, τον μεταβολισμό και την μεταφορά πληροφοριών μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντος.

Η ύπαρξη καταβολικών πλασμιδίων και η ικανότητα εξειδίκευσης των ενζύμων επιτρέπουν στις ψευδομονάδες να μεταβολίζουν ένα μεγάλο αριθμό αρωματικών ενώσεων. Επίσης μέσω του γονιδιακού ανασυνδυασμού είναι σε θέση να δημιουργούν αυθόρμητα νέα μεταβολικά μονοπάτια για την αποικοδόμηση περισσότερων και πολυπλοκότερων χημικών ενώσεων.

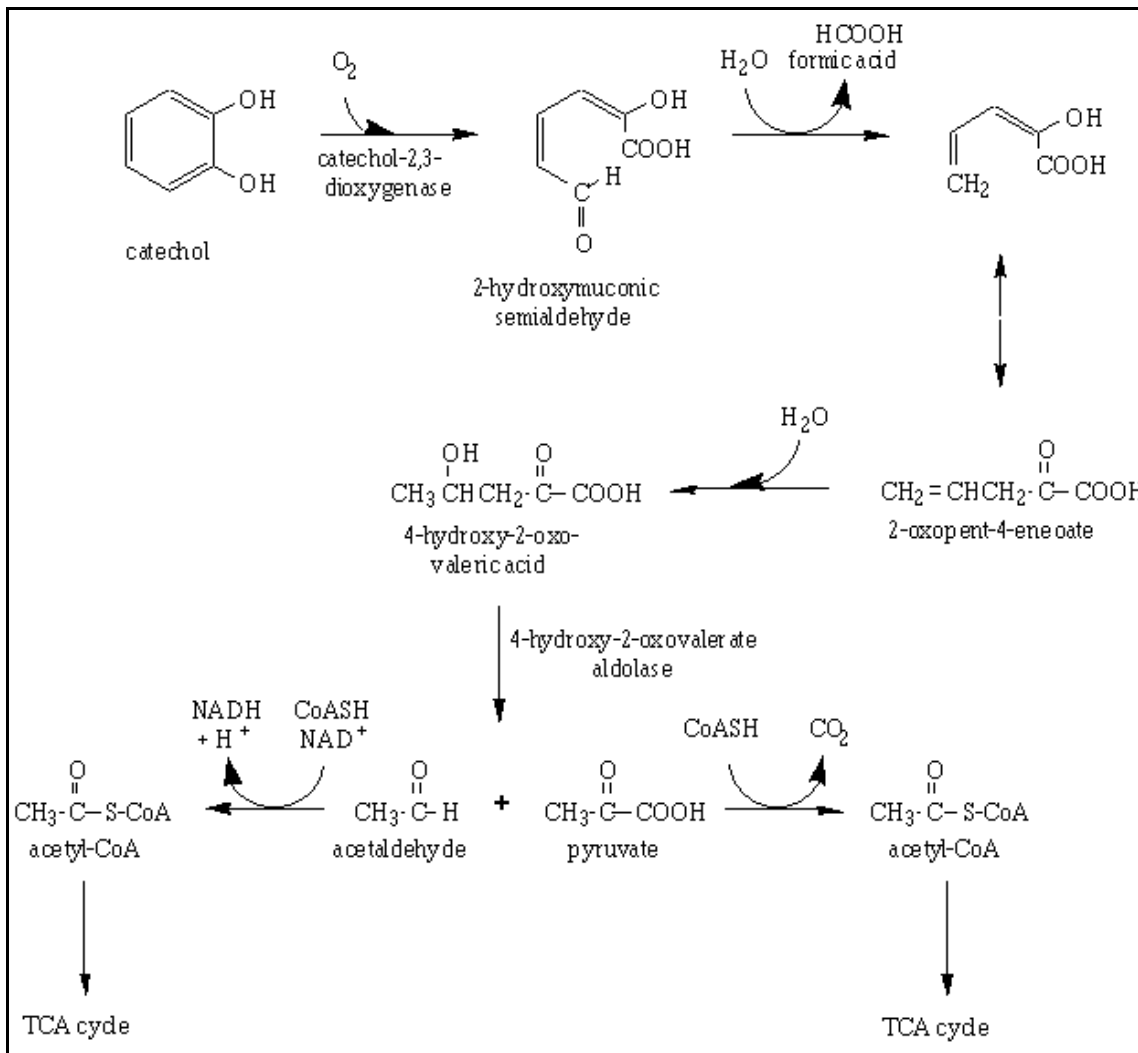
1.4 Αποικοδόμηση της Φαινόλης

Οι περισσότερες μονοαρωματικές ενώσεις όπως η φαινόλη αποικοδομούνται κάτω από αερόβιες συνθήκες. Οι αερόβιες διαδικασίες είναι σχετικά γρήγορες και ο μοναδικός περιοριστικός παράγοντας είναι η διαθεσιμότητα του οξυγόνου και των μεταβολικών ενζύμων. Μονοαρωματικές ενώσεις μπορούν επίσης να αποικοδομηθούν υπό αναερόβιες συνθήκες, παρουσία ιόντων NO_3^- , Fe^{+3} , SO_4^{-2} και διοξειδίου του άνθρακα, τα οποία λειτουργούν ως αποδέκτες ηλεκτρονίων [5, 6]. Η αναερόβια αποικοδόμηση των μονοαρωματικών υδρογονανθράκων θεωρείται ότι σχετίζεται με την παραγωγή λιπαρών οξέων, μεθανίου, διοξειδίου του άνθρακα, με την διαλυτοποίηση του σιδήρου, καθώς και με τη μείωση των νιτρικών και θειικών ιόντων.

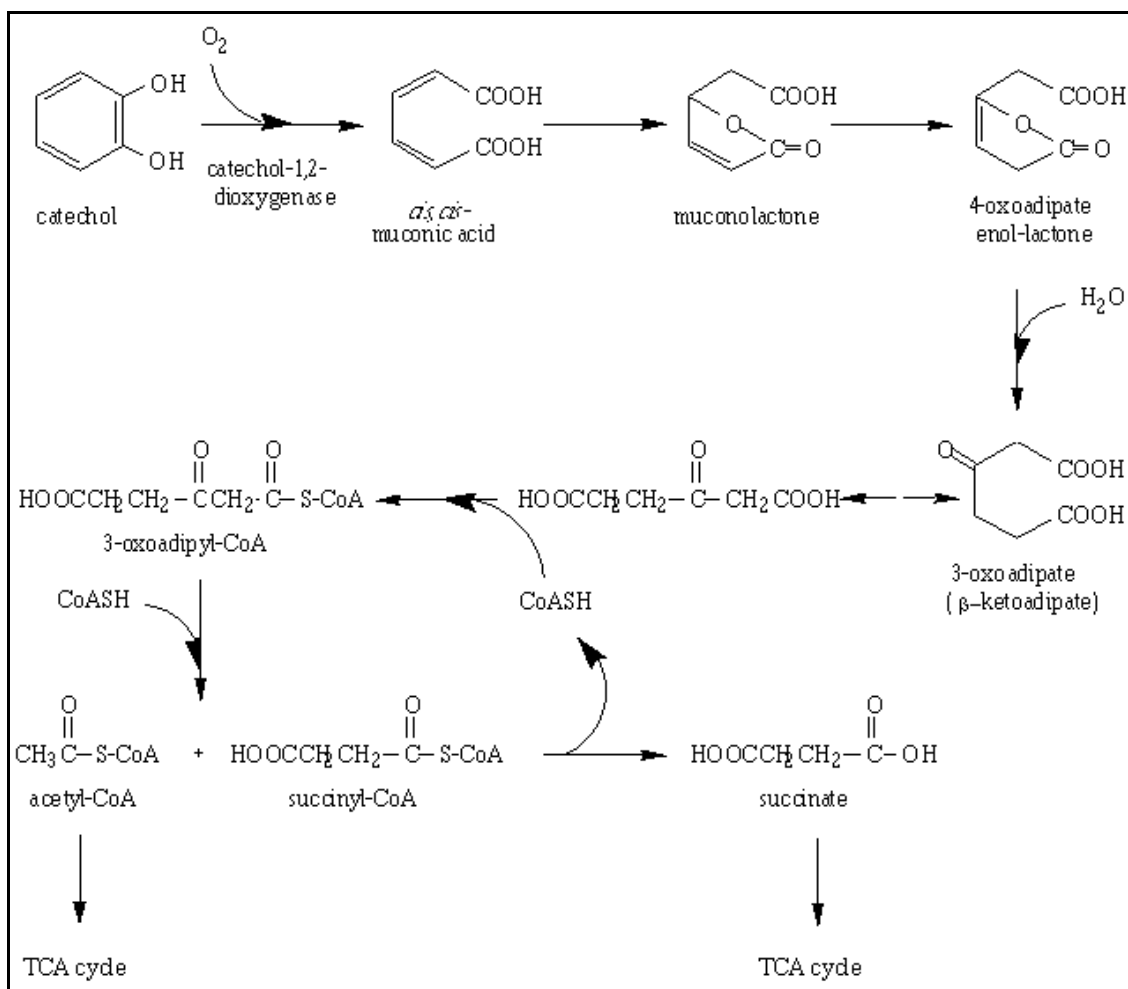
Ο αερόβιος καταβολισμός αρωματικών ενώσεων έχει διερευνηθεί διεξοδικά για ένα μεγάλο πλήθος μικροοργανισμών σε διάφορες φυσικές και ξενοβιοτικές ενώσεις. Κύρια μονοπάτια καταβολισμού αρωματικών ενώσεων στα βακτήρια έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι ενώ διαφορετικά ένζυμα συμμετέχουν στα αρχικά στάδια μεταβολισμού

των ενώσεων, αυτές μετατρέπονται σε ένα περιορισμένο αριθμό κεντρικών ενδιάμεσων όπως η πρωτοκατεχάση και οι υποκατεστημένες κατεχόλες. Αυτά τα διυδροξυλιωμένα ενδιάμεσα εισάγονται στο *όρθο* η /και *μέτα* μεταβολικό μονοπάτι [7, 8]. Στο σχήμα 1.3 περιγράφονται σχηματικά τα στάδια αποικοδόμησης της φαινόλης στα δύο μεταβολικά μονοπάτια. Ως τελικά προϊόντα λαμβάνουμε για το *μετα* μεταβολικό μονοπάτι το πυροσταφυλικό οξύ και την ακεταλδεύδη ενώ για το *όρθο* μεταβολικό μονοπάτι το ηλεκτρικό, τα οποία εισάγονται στο κύκλο του κίτρικού οξέος και μεταβολίζονται τελικά από τον οργανισμό για την παραγωγή ενέργειας.

A. *Μέτα* μεταβολικό μονοπάτι



B.Ορθο μεταβολικό μονοπάτι

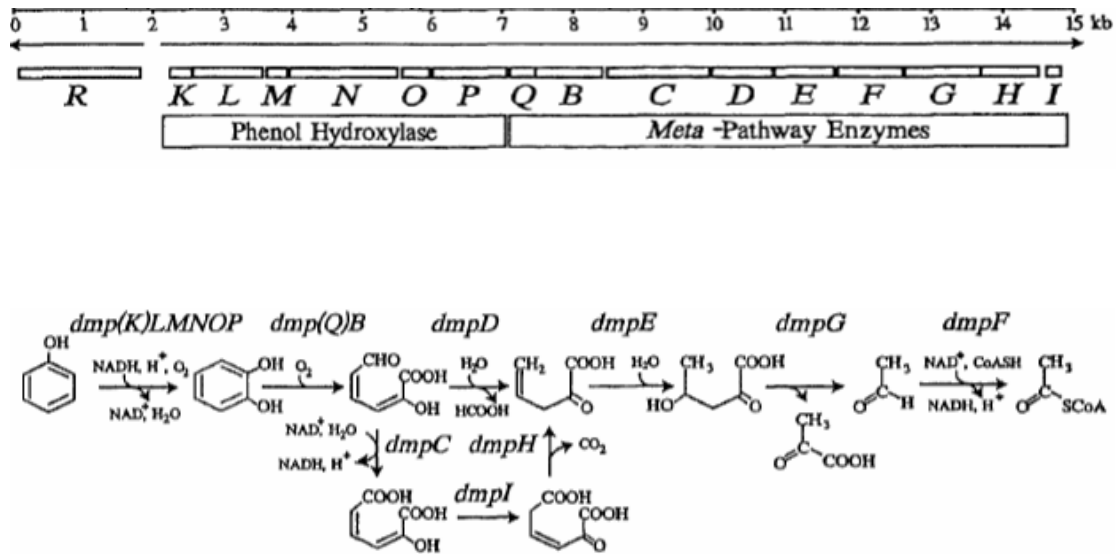


Σχήμα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση του μεταβολισμού της φαινόλης Α) στο *μέτα* και Β) στο *ορθο* μεταβολικό μονοπάτι.

1.4.1 *Μέτα* μεταβολισμός της φαινόλης

Τα ένζυμα που συμμετέχουν στο *μέτα* μεταβολικό μονοπάτι προκύπτουν από την έκφραση γονιδίων που βρίσκονται σε οπερόνια στο πλασμιδιακό DNA του βακτηρίου. Η έκφραση των γονιδίων αυτών ρυθμίζεται από ένα ρυθμιστικό γονίδιο που βρίσκεται ανοδικά του οπερονίου. Αναγνώριση των διαφόρων ενώσεων από τον ρυθμιστή έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση όλων των ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στο μεταβολισμό της ένωσης. Στο σχήμα 1.4 φαίνεται το οπερόνιο του καταβολικού πλασμιδίου που εκφράζει

τις πρωτεΐνες του *μέτα* μεταβολικού μονοπατιού, από τον οργανισμό CF600 του γένους *Pseudomonas* καθώς και το μεταβολικό μονοπάτι καταβολισμού της φαινόλης με τα συμμετέχοντα ένζυμα [9]. Στον πίνακα 1.1 συνοψίζονται όλα τα γονίδια και οι πρωτεΐνες που εκφράζονται από αυτά, στο *dmp* οπερόνιο.



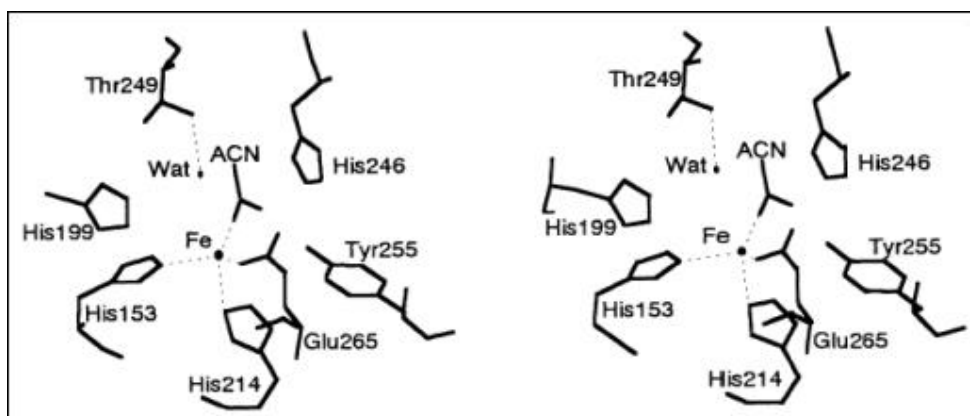
Σχήμα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση του *μέτα* μεταβολικού μονοπατιού αποικοδόμησης της φαινόλης από το pV1150 καταβολικό πλασμίδιο του στελέχους CF600 του γένους *Pseudomonas*.

| Γονίδιο | Αριθμός αμινοξέων | Μοριακό βάρος (kDa) θεωρητικό/πρακτικό | Πρωτεΐνη | Λειτουργία |
|-------------|-------------------|--|----------|---|
| <i>dmpK</i> | 92 | 10.6/12.5 | P0 | άγνωστη |
| <i>dmpL</i> | 331 | 38.2/34.0 | P1 | Phenol hydroxylase component |
| <i>dmpM</i> | 90 | 10.5/10.0 | P2 | Phenol hydroxylase component |
| <i>dmpN</i> | 517 | 60.5/58.0 | P3 | Phenol hydroxylase component |
| <i>dmpO</i> | 119 | 13.2/13.0 | P4 | Phenol hydroxylase component |
| <i>dmpP</i> | 353 | 38.5/39.0 | P5 | Phenol hydroxylase component |
| <i>dmpQ</i> | 112 | 12.2/12.0 | DmpQ | Ferredoxin-like protein |
| <i>dmpB</i> | 307 | 35.2/32.0 | C2,3O | Catechol 2,3 dioxygenase |
| <i>dmpC</i> | 486 | 51.7/50.0 | HSMD | 2-Hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase |
| <i>dmpD</i> | 283 | 31.0/30.0 | HMSH | 2-Hydroxymuconic semialdehyde hydrolase |
| <i>dmpE</i> | 261 | 27.9/28.0 | OEH | 2-Oxopent-4-dienoate hydratase |
| <i>dmpF</i> | 312 | 32.7/35.0 | ADA | Aldehyde dehydrogenase |
| <i>dmpG</i> | 345 | 37.5/39.0 | HOA | 4-Hydroxy-2-oxovalerate hydratase |
| <i>dmpH</i> | 264 | 28.4/28.5 | 4OD | 4-Oxalocrotonate decarboxylase |
| <i>dmpI</i> | 63 | 7.1/6.7 | 4OI | 4-Oxalocrotonate isomerase |

Πίνακας 1.1: Σύνοψη των γονιδίων και των γονιδιακών προϊόντων του οπερονίου *dmp*

Στο *μέτα* μεταβολικό μονοπάτι, η φαινολική υδροξυλάση καταλύει το πρώτο στάδιο υδροξυλίωσης της φαινόλης. Απαντάται συνήθως ως ένζυμο με πολλές υπομονάδες. Έχουν ταυτοποιηθεί έξι γονίδια που κωδικοποιούν τις P0 – P5 υπομονάδες. Διαδικασίες απομόνωσης του ολοενζύμου έδειξαν ότι οι υπομονάδες απαντώνται σε τρία διαφορετικά σύμπλοκα: η υπομονάδα P2 μόνη της, οι υπομονάδες P1, P3, P4 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο το οποίο για να είναι καταλυτικά ενεργό *in vitro* χρειάζεται την παρουσία της αναγωγάσης P5.

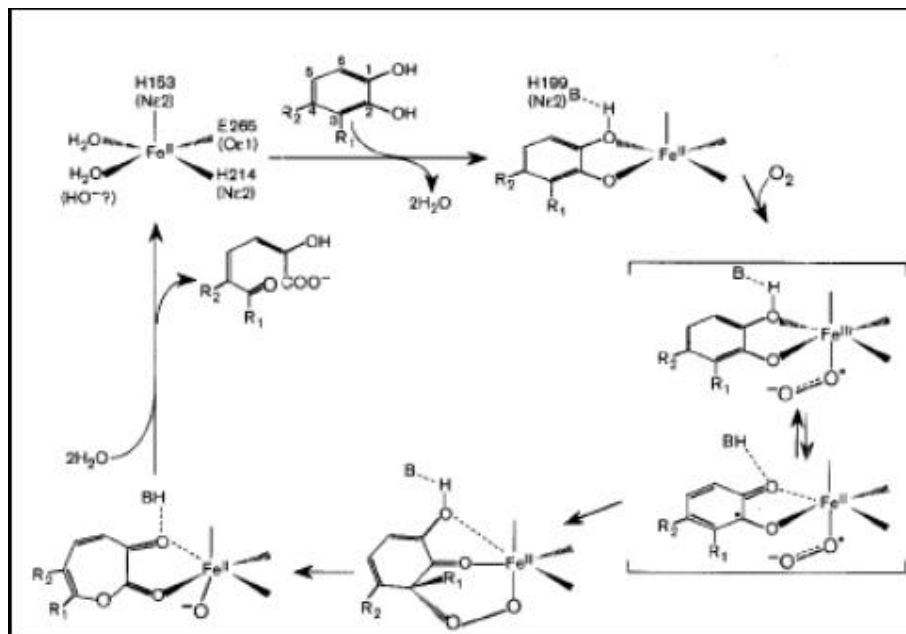
Το ένζυμο «κλειδί» στη *μέτα* διάσπαση της φαινόλης είναι η 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης. Πρόκειται για το ένζυμο που διασπά τον αρωματικό δακτύλιο της κατεχόλης σε *μέτα* θέση σχηματίζοντας το ενδιάμεσο της ημιαλδεΐδης του 2-ύδροξυ μουκονικού οξέος. Η παρουσία αυτού του ενδιαμέσου έχει ως αποτέλεσμα την χρωματική αλλαγή του θρεπτικού μέσου κατά τη διαδικασία καταβολισμού της φαινόλης [10]. Η 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης έχει μοριακό βάρος 30-35 kDa. και το ολόενζυμο της είναι ένα ομοτετραμερές που φέρει ένα μη αιμικό Fe (II) στο ενεργό κέντρο κάθε μονομερούς. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το ενεργό κέντρο βρίσκεται σε μία δομή χωνιού στην καρβοξυ-τελική περιοχή. Σε αυτή την κοιλότητα ο σίδηρος σχηματίζει δεσμούς με τρία κατάλοιπα αμινοξέων της πρωτεΐνης (His153, His214 και Glu265) και δυο μόρια νερού, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.5 [11].



Σχήμα 1.5: Το περιβάλλον συναρμογής του σιδήρου στην κρυσταλλική δομή της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης παρουσία ακετόνης

Η ακετόνη είναι ένας ασθενής συναγωνιστικός αναστολέας εναντίον της κατεχόλης (συγκέντρωση αναστολής 13 mM) καθιστώντας την ως τον καταλληλότερο σταθεροποιητή του ενζύμου. Η ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης μειώνεται κατά 80% μέσα σε

λίγες μέρες ενώ παρουσία 10 mM ακετόνης παραμένει σταθερή για μήνες [12]. Στο σχήμα 1.6 φαίνεται ο προτεινόμενος μηχανισμός της *μέτα* διάσπασης (proximal extradiol cleavage) της κατεχόλης και της 3- ή 4- άλκυλουποκατεστημένης κατεχόλης από την 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης.



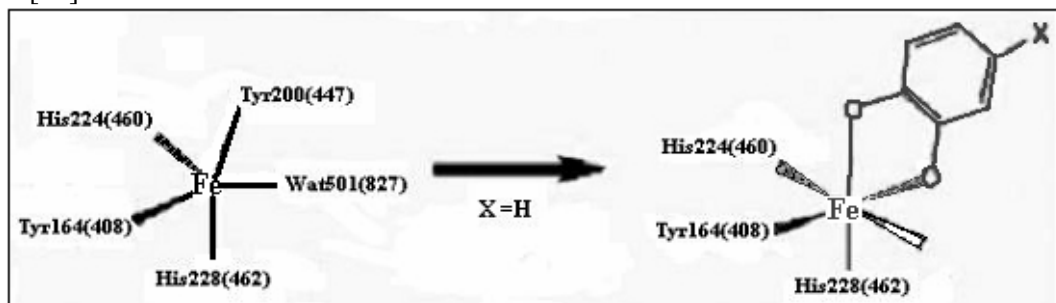
Σχήμα 1.6: Προτεινόμενος μηχανισμός διάσπασης της κατεχόλης και της 3- ή 4- άλκυλο υποκατεστημένης κατεχόλης από την 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης

1.4.2 *Όρθο* μεταβολισμός της φαινόλης

Στο *όρθο* μεταβολικό μονοπάτι η φαινολική υδροξυλάση που καταλύει το αρχικό στάδιο υδροξυλίωσης της φαινόλης, απαντάται συνήθως ως μονομερές σε αντίθεση με το αντίστοιχο ένζυμο στο *μέτα* μεταβολικό μονοπάτι. Τα ένζυμα αυτά είναι κυρίως φλαβοπρωτεϊνικές υδροξυλάσες που υδροξυλιώνουν τον φαινολικό δακτύλιο συνήθως σε *όρθο* θέση. Ο ρόλος της φλαβίνης στα ένζυμα αυτά είναι η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου με την αντίδραση της ανιγμένης φλαβίνης με το μοριακό οξυγόνο προς το σχηματισμό του 4α-υδρουπεροξειδίου.

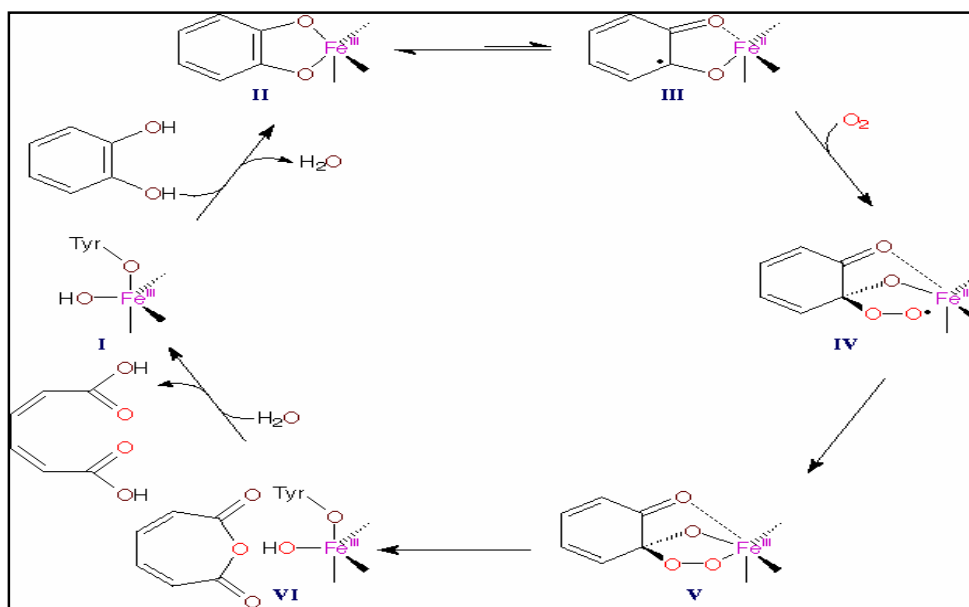
Το ένζυμο «κλειδί» στην *όρθο* διάσπαση της φαινόλης είναι η 1,2 διοξυγενάση της κατεχόλης. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη διάσπαση της κατεχόλης σε *όρθο* θέση, σχηματίζοντας το ενδιάμεσο του *cis-cis* μουκονικού οξέος. Το λειτουργικό ένζυμο της 1,2 διοξυγενάσης της κατεχόλης είναι ένα ομοδιμερές με ένα μη αιμικό σίδηρο Fe (III) στο καταλυτικό ενεργό κέντρο κάθε μονομερούς. Ο σίδηρος στο καταλυτικό κέντρο

συναρμόζεται με τέσσερα κατάλοιπα αμινοξέων της πρωτεΐνης όπως φαίνεται στο σχήμα 1.7 [13].



Σχήμα 1.7: Το περιβάλλον συναρμογής του Fe^{+3} στο ενεργό κέντρο της 1,2 διοξυγενάσης της κατεχόλης.

Ο μηχανισμός της καταλυτικής δράσης της 1,2 δυοξυγενάσης της κατεχόλης στη διάσπαση του δακτυλίου της κατεχόλης φαίνεται στο σχήμα 1.8.



Σχήμα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού διάσπασης της κατεχόλης στο ενεργό κέντρο της 1,2 δυοξυγενάσης της κατεχόλης.

Τα γονίδια των ενζύμων που επάγονται στο *όρθο* μεταβολικό μονοπάτι βρίσκονται συνήθως στο χρωμοσωμικό DNA του βακτηριδίου και όχι στο πλασμιδιακό DNA, όπως τα γονίδια του *μέτα* μεταβολικού μονοπατιού, με αποτέλεσμα η διαδικασία της αποικοδόμησης να είναι πολλές φορές βραδύτερη.

1.5 Απεικόνιση του πρωτεόματος: Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση

Οι πρωτεΐνες είναι τα βιομόρια τα οποία επιτελούν όλες τις διεργασίες στο κύτταρο. Αν και η χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας επιτρέπει την ανίχνευση των γονιδίων δεν μπορεί να δώσει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για την έκφραση των πρωτεϊνών στο κύτταρο. Για αυτό το λόγο αναπτύχθηκαν διάφοροι μέθοδοι διαχωρισμού πρωτεϊνών που βασίζονται στο συνδυασμό δυο ή και περισσότερων βιοχημικών μεθόδων. Μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδος με διαχωριστική ικανότητα μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών είναι η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων [14, 15]. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται στη πρώτη διάσταση με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο, ενώ στη δεύτερη διάσταση διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Αυτή η μεθοδολογία επιτρέπει την ανάλυση περισσότερων από 1000 πρωτεϊνών και μπορεί να διακρίνει πολλές μέτα μεταφραστικές τροποποιήσεις μίας πρωτεΐνης. Η αύξηση της επαναληψιμότητας έχει επιτευχθεί με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων πηκτών με διαβάθμιση pH για την πρώτη διάσταση [16], που επιτρέπουν ασφαλή και ποσοτική σύγκριση δισδιάστατων πηκτών του πρωτεόματος. Το μειονέκτημα της δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρησης έγκειται στην αδυναμία της να αναλύσει συγκεκριμένες κατηγορίες πρωτεϊνών, υδρόφοβες πρωτεΐνες (κυρίως μεμβρανικές), κυτταροσκελετικές και πρωτεΐνες με ισοηλεκτρικό σημείο σε ακραίες περιοχές της κλίμακας του pH (όπως όξινες, υπερφωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες και αλκαλικές, πρωτεΐνες προσδεόμενες σε DNA). Υπάρχουν επίσης προβλήματα ποσοτικού προσδιορισμού των πρωτεϊνών λόγω του χαμηλού δυναμικού εύρους των χρώσεων. Η χρώση αργύρου, η πιο ευαίσθητη ευρέως χρησιμοποιούμενη χρώση, εμφανίζει γραμμικότητα μόνο στη περιοχή 0.04 ng/mm^2 και 2 ng/mm^2 . Η χρήση πηκτών μικρού εύρους pH και η μέθοδος εισαγωγής του δείγματος με ενυδάτωση μπορούν να ξεπεράσουν ως ένα βαθμό αυτό το πρόβλημα επιτρέποντας τη χρήση μεγαλύτερης ποσότητας δείγματος.

1.6 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών

Αν και οι μέθοδοι διαχωρισμού μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών ήταν γνωστές από το 1975 δεν βρήκαν μεγάλη απήχηση λόγω της μεγάλης δυσκολίας ταυτοποίησης των πρωτεϊνών. Οι συνήθεις μέθοδοι ταυτοποίησης είναι η ανοσοανίχνευση με χρήση αντισωμάτων για γνωστές πρωτεΐνες και η N-τερματική ανάλυση των αμινοξέων και ταυτοποίηση αυτών σε βάση δεδομένων. Οι αναφερόμενες μέθοδοι είναι χρονοβόρες και

αυτό είχε σαν συνέπεια την ανάλυση μικρού αριθμού πρωτεϊνών. Η φασματομετρία μάζας MS είναι μια τεχνική που μετράει με μεγάλη ακρίβεια την μάζα των μορίων, μία φυσική ιδιότητα χαρακτηριστική για κάθε μόριο. Η μέθοδος αυτή αν και πρωτοεμφανίστηκε στις αρχές του προηγούμενου αιώνα άργησε να βρει εφαρμογή στην ανάλυση βιολογικών μορίων λόγω της δυνατότητας ανάλυσης μόνο φορτισμένων και πτητικών μορίων. Τα βιομόρια είναι μεγάλα και πολικά μόρια που δεν μεταφέρονται και δεν ιονίζονται εύκολα στην αέρια φάση. Ο ηλεκτροψεκασμός (ES) [14] και η απόπτωση με laser υποβοηθούμενη από υπόστρωμα (MALDI) [15] είναι οι τεχνικές ιονισμού στις οποίες οφείλεται η επιτυχημένη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας σε βιολογικά μόρια. Η ραγδαία αναπτύξη της πληροφορικής σε συνδυασμό με την αποδικοποίηση του γενετικού υλικού μεγάλου αριθμού οργανισμών πείραξαν στην MS τα εργαλεία για την γρήγορη και ακριβή ταυτοποίηση μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών σε μικρο χρονικό διάστημα.

1.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας

Με τον όρο πρωτεομική ανάλυση ορίζεται η μεγάλου εύρους ανάλυση της λειτουργίας των γονιδίων. 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 την δυνατότητα αποτύπωσης εκατοντάδων ή ακόμα και χιλιάδων πρωτεϊνών σε μία απλή πηκτή [17, 18]. Ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών στιγμάτων που διαχωρίζονταν στη πηκτή με χρήση της φασματομετρία μάζας ανέδειξε την μέθοδο αυτή ως αναπόσπαστο κομμάτι του τομέα της πρωτεομικής ανάλυσης και χρησιμοποιείται κυρίως σε τρία πεδία. Στη μοριακή βιολογία για το χαρακτηρισμό και τον έλεγχο ποιότητας ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων. Στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών σε απλά βιοχημικά πειράματα ή σε μεγάλης κλίμακας πρωτεομική ανάλυση. Τέλος, για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό μετά μεταφραστικών τροποποιήσεων προσδιορίζοντας μεγάλου εύρους ομοιοπολικών τροποποιήσεων στις πρωτεΐνες.

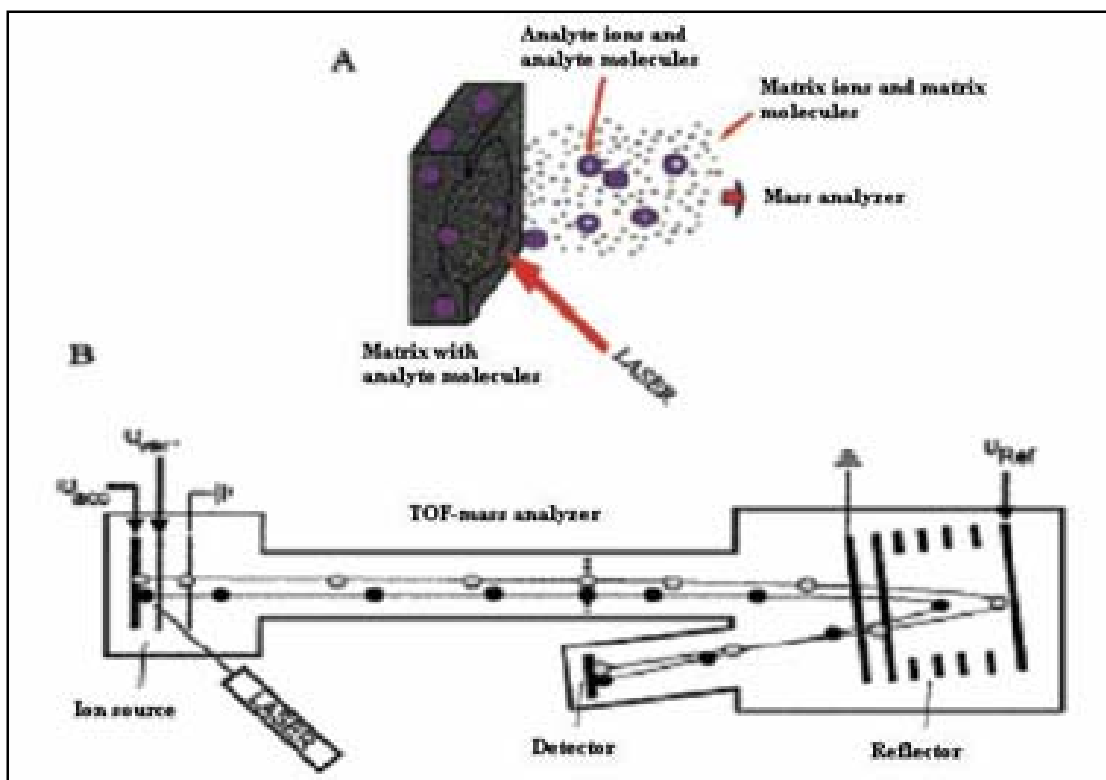
1.7.1 MALDI

Το MALDI ανακαλύφθηκε από τους Karas & Hillenkamp στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Στη μέθοδο αυτή, για να δημιουργηθεί η απαραίτητη αέρια φάση, πρωτονιομένα μόρια και μεγάλη ποσότητα υποστρώματος συνκρυσταλλώνονται με μόρια του αναλύτη

πάνω σε μεταλλική επιφάνεια. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι ακτινοβολούνται από παλμό laser, συνήθως αζώτου με μήκος κύματος 337 nm. Το υπόστρωμα είναι συνήθως μικρό οργανικό μόριο που εμφανίζει απορρόφηση στο μήκος κύματος του laser που χρησιμοποιείται. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα είναι το α-κυάνο-4-κινναμινικό οξύ και το διϋδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB). Τα υποστρώματα διαφέρουν 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 και η ένταση του σήματος εξαρτάται από την ποσότητα των πεπτιδίων στον κρύσταλλο, την δυνατότητα του βιομορίου να προσλαβεί ή να δώσει ένα πρωτόνιο κατά τη διαδικασία της απόπτωσης και ένα μεγάλο αριθμό άλλων παραγόντων. Για το λόγο αυτό δεν είναι αξιόπιστη για ποσοτικές μετρήσεις.

Τρεις είναι οι βασικές αρχές διαχωρισμού μαζών: διαχωρισμός στηριζόμενος στο χρόνο πτήσης των ιόντων (time of flight, TOF), διαχωρισμός από τετραπολικό ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από μεταλλικούς ράβδους (quatropole MS), ή από επιλεκτική εισαγωγή ιόντων σε τρισδιάστατο πεδίο παγίδευσης (ion trap). Για δομική ανάλυση, όπως προσδιορισμός αλληλουχίας αμινοξέων των πεπτιδίων, χρησιμοποιείται φασματομετρίαμάζας σε σειρά (MS/MS), η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί εφαρμόζοντας δύο φορές την ίδια αρχή ή συνδιάζοντας δύο διαφορετικές αρχές διαχωρισμού.

Στο σχήμα 1.9 φαίνεται ένας μηχανήμα φασματογραφίας μάζας που συνδυάζει τη μέθοδο ιονισμού MALDI με τη μέθοδο διαχωρισμού TOF. Κατά τη διαδικασία αυτή τα δείγματα τοποθετούνται σε μεταλλική επιφάνεια που μπορεί να χωρέσει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών στιγμάτων. 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. Τα μικρότερα ιόντα έχουν μεγαλύτερη ταχύτητα και φτάνουν στον ανιχνευτή πριν από τα μεγαλύτερα ιόντα, παράγοντας το φάσμα του χρόνου πτήσης.



Σχήμα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας ενός φασματογράφου μάζας MALDI-TOF MS. A) Το συγκρυσταλλωμένο δείγμα με το υπόστρωμα ακτινοβολείται με δέσμη laser και επιτυγχάνεται η εξάχνωση και ο ιονισμός των πεπτιδίων. B) 100-500 ns μετά τον παλμό του laser ένα ισχυρό πεδίο επιτάχυνσης ενεργοποιείται το οποίο δίνει καθορισμένη κινητική ενέργεια στα ιόντα που έχουν παραχθεί από το MALDI. Στη συνέχεια ταξιδεύουν στο σωλήνα πτήσης και στρίβουν στο καθρέπτη ιόντων ή σε ανακλαστήρα. Ο λόγος μάζας προς φορτίο σχετίζεται με το χρόνο που χρειάζεται το ιόν για να φτάσει στον ανιχνευτή.

1.7 Σκοπός της εργασίας

Η ανακάλυψη καινούργιων βακτηριακών στελεχών που να μπορούν να εποικοδομούν αρωματικές ενώσεις αυξάνει τις δυνατότητες βιοαποικοδόμησης περιβαντολογικών ρύπων. Ένα νέο βακτήριο rhDV1 του γένους *Pseudomonas*, απομονώθηκε από Ένα διυλιστήριο στην Δανία λόγω της ικανότητας του να αποικοδομεί αρωματικές ενώσεις.

Η κατανόηση της αποικοδόμησης μονοαρωματικών ενώσεων από το νέο βακτήριο ήταν κεντρικός στόχος της παρούσας εργασίας. Η συμπεριφορά του βακτηρίου μελετήθηκε παρουσία διαφόρων μονοαρωματικών ενώσεων και βασικός στόχος ήταν ο χαρακτηρισμός του μεταβολισμού που χρησιμοποιείται για την αποικοδόμηση αυτών. Βασικός στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του μεταβολισμού της φαινόλης. Για την επίτευξη του στόχου αυτού απαραίτητη είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός του ενζύμου «κλειδιού» στην διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου της κατεχόλης. Επίσης ο χαρακτηρισμός των υπόλοιπων επαγόμενων ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό αλλά και οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους θα δώσει απαντήσεις για τα λειτουργικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα που είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό της φαινόλης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Αντιδραστήρια-διαλύματα

Τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που περιγράφονται στην εργασία αυτή, παρουσιάζονται παρακάτω και προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma, Fluka, Pharmacia, Roche. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν απιονισμένο, με στήλη ιοντοανταλλακτικών ρητινών.

Αντιδραστήρια

1. όξινο φωσφορικό νάτριο
2. δισόξινο φωσφορικό κάλιο
3. χλωριούχο αμμώνιο
4. χλωριούχο νατριο
5. καυστικό νάτριο
6. θειϊκό αμμώνιο
7. θειϊκος σίδηρος
8. Ουρία
9. νιτρικός άργυρος
10. αμφολύτες, pH 3-6
11. αμφολύτες, pH 3-10
12. Triton X-100
13. μερκαπτοαιθανόλη
14. APS
15. TEMED
16. coomassie blue
17. γλυκερόλη
18. ιοδοακεταμίδιο
19. ζάχαρη
20. κατεχόλη
21. α-κυάνο-4-υδροξυκινναμικό οξύ

- 22. διττανθρακικό αμμώνιο
- 23. βοδινή θρυψίνη (Sequence Grade from Boehringer/Roche)

Διάλυμα καλλιέργειας

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα 5 x M₉ pH=7.4 (Sokol 1988)**

| | |
|-------------|----------------------------------|
| 37.61 gr/lt | Na ₂ HPO ₄ |
| 15 gr/lt | KH ₂ PO ₄ |
| 2.5 gr/lt | NaCl |
| 5 gr/lt | NH ₄ Cl |

➤ **Θειϊκά άλατα**

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

Το τελικό διάλυμα καλλιέργειας (1 lt) περιείχε 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος M₉, 7 ml διαλύματος θειϊκών αλάτων, 2 ml διαλύματος 1 M Mg₂SO₄, 0.1 ml διαλύματος 1 M CaCl₂ και 4 ml 0.5 M Φαινόλης. Το κάθε διάλυμα αποστειρώθηκε ξεχωριστά, στους 120 °C για 20 min. Το τελικό διάλυμα καλλιέργειας παρασκευάστηκε αμέσως πριν την χρήση.

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης (I) pH = 8**

| | |
|-------|---------------------------------------|
| 50 mM | Tris / H ₂ SO ₄ |
|-------|---------------------------------------|

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης (II) pH = 8**

| | |
|-------|---------------------------------------|
| 20 mM | Tris / H ₂ SO ₄ |
| 10 mM | Ακετόνη |

➤ **Διάλυμα λύσης IEF με αμφολύτες φορείς**

| | |
|-----------|----------------------------|
| 9.8 M | Ουρία |
| 100 mM | DTT |
| 2 % (v/v) | Triton X-100 |
| 2 % (v/v) | Διάλυμα αμφολυτών, pH 3-10 |

- **Διάλυμα επικάλυψης IEF με αμφολύτες φορείς**

| | |
|-----------|----------------------------|
| 8 M | Ουρία |
| 100 mM | DTT |
| 5 % (v/v) | Triton X-100 |
| 1 % (v/v) | Διάλυμα αμφολυτών, pH 3-10 |

- **Διάλυμα εξισορρόπησης IEF με αμφολύτες φορείς**

| | |
|----------|--------------------|
| 0.06 M | Tris / HCl, pH=6,8 |
| 2 % w/v | SDS |
| 100 mM | DTT |
| 10 % v/v | Γλυκερόλη |

- **Διάλυμα αγαρόζης IEF με αμφολύτες φορείς**

| | |
|------------|--------------------|
| 0.06 M | Tris / HCl, pH=6,8 |
| 2% w/v | SDS |
| 100 mM | DTT |
| 10% v/v | Γλυκερόλη |
| 1% w/v | Αγαρόζη |
| 0.002% w/v | Μπλέ βρωμοφαινόλη |

- **Μίγμα βαθμονόμησης MALDI-TOF MS**

| | |
|------------------------|-------------------------------|
| der – Arg1-Bradykinin | (904.47 Da) |
| Glu – Fibrinopeptide B | (1570.68 Da) |
| ACTH | (2093.0, 2465.20, 3657.93 Da) |

- **Διάλυμα πρωτεόλυσης**

| | |
|-------|-----------------------|
| 50 mM | διττανθρακικό αμμώνιο |
| 5 mM | χλωριούχο ασβέστιο |

Διαλύματα παρασκευής αποδιατακτικών πηκτών Tricine-SDS PAGE

- **AB-mix (49.5%T, 3%C)**

| | |
|--------------|----------------|
| 48 gr/100ml | Ακρυλαμίδιο |
| 1.5 gr/100ml | Δισακρυλαμίδιο |

➤ **Gel Buffer (3x) pH = 8.45**

| | |
|------------|-----------|
| 3 M | Tris /HCl |
| 0.3% (w/v) | SDS |

➤ **Διάλυμα μετουσίωσης pH=7**

| | |
|-------------|------------------|
| 150 mM | Tris / HCl |
| 12% (w/v) | SDS |
| 10% (w/v) | Γλυκερόλη |
| 6% (v/v) | Μερκαπτοαιθανόλη |
| 0.05% (w/v) | Coomassie blue G |

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα ανόδου (10x) pH = 8.9**

| | |
|-----|------------|
| 1 M | Tris / HCl |
|-----|------------|

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου (10x) pH = 8.25**

| | |
|------------|-----------|
| 1 M | Tris /HCl |
| 1 M | Tricine |
| 1.0% (w/v) | SDS |

Οι πηκτές Tricine - SDS -πολυακρυλαμίδιου παρασκευάστηκαν σε πλάκες διαστάσεων: 16 cm x 18 cm και πάχος 1 mm. Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτών φαίνονται παρακάτω.

➤ **Διάλυμα για τη πηκτική διαχωρισμού (60 ml)**

10% T

| | |
|--------|---------------------------|
| 12 ml | Ακρυλαμίδιο (ABmix) stock |
| 20 ml | Gel buffer (3x) |
| 6 gr | Γλυκερόλη |
| | H ₂ O |
| 300 μl | APS (10%) |
| 30 μl | TEMED |

➤ **Διάλυμα για τη πηκτική στοίβαξης (18 ml)**

3% T

| | |
|---------|---------------------------|
| 1.5 ml | Ακρυλαμίδιο (ABmix) stock |
| 4.5 ml | Gel buffer |
| 12 ml | H ₂ O |
| 135 μl | APS (10%) |
| 13.5 μl | TEMED |

Τα παραπάνω διαλύματα απαερώθηκαν πριν την προσθήκη των APS και TEMED.

➤ **Πρότυπες πρωτεΐνες για SDS-PAGE (Fluka)**

- α-λακταλβουμίνη από βοδινό γάλα 14.2 kDa
- αναστολέας θρυψίνης από σόγια 20 kDa
- θρυψινογόνο από βοδινό πάγκρεας 24 kDa
- καρβονική ανυδράση από βοδινά ερυθροκύτταρα 29 kDa
- γλυκεραλδεϋδη-3-φωσφορική-δευδρογωναση από μύ κουνελιού 36 kDa
- α-λακταλβουμίνη από το λεύκωμα αυγού κότας 45 kDa
- α-λακταλβουμίνη από βοδινό ορό 67 kDa

➤ **Διάλυμα σταθεροποίησης για χρώση μπλε Coomassie**

| | |
|-----------|-----------|
| 50% (v/v) | Μεθανόλη |
| 10% (v/v) | Οξικό οξύ |

➤ **Διάλυμα χρώσης για χρώση μπλε Coomassie**

| | |
|--------------|---------------------|
| 0.025% (w/v) | Μπλε Coomassie G250 |
| 10% (v/v) | Οξικό οξύ |

➤ **Διάλυμα αποχρωματισμού για χρώση μπλε Coomassie**

| | |
|-----------|-----------|
| 10% (v/v) | Οξικό οξύ |
|-----------|-----------|

➤ **Διάλυμα σταθεροποίησης για χρώση κολλοειδές μπλε Coomassie**

| | |
|-----------|-----------|
| 50% (v/v) | Μεθανόλη |
| 1% (v/v) | Οξικό οξύ |

➤ **Διάλυμα χρώσης για χρώση κολλοειδές μπλε Coomassie**

| | |
|------------|---------------------|
| 0.1% (w/v) | Μπλε Coomassie G250 |
| 0.5% (v/v) | Οξικό οξύ |
| 34% (v/v) | Μεθανόλη |
| 17% (w/v) | Θειικό αμμώνιο |

Διαλύματα παρασκευής μη αποδιατακτικών πηκτών Blue Native

➤ **Διάλυμα ακρυλαμιδίου (AB-mix buffer) stock**

| | |
|------------|----------------|
| 48% (w/v) | Ακρυλαμίδιο |
| 1.5% (w/v) | Δισακρυλαμίδιο |

➤ **Gel buffer pH=7 / HCl**

| | |
|---------|-----------------------|
| 1500 mM | 6- Άμινο-καπροϊκό οξύ |
| 150 mM | Bis Tris |

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα ανόδου pH=7 / HCl**

| | |
|-------|----------|
| 50 mM | Bis Tris |
|-------|----------|

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου pH=7 / HCl**

| | |
|-------------|--------------|
| 50 mM | Tricine |
| 15 mM | Bis Tris |
| 0.02% (w/v) | Serva Blue G |

Προετοιμασία των πηκτών:

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου, για την μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, παρασκευάστηκαν σε πλάκες διαστάσεων 20 x 27 cm και πάχος 1.5 mm

➤ **Διάλυμα για τη πηκτική διαχωρισμού**

8%

| | |
|---------|------------------|
| 9.7 ml | AB-mix |
| 20.0 ml | Gel buffer |
| 30.3 ml | H ₂ O |
| 250 μl | APS |
| 50 μl | TEMED |

➤ **Διάλυμα για τη πηκτική στοίβαξης**

3%

| | |
|---------|------------------|
| 1.9 ml | AB-mix |
| 10 ml | Gel buffer |
| 18.1 ml | H ₂ O |
| 100 μl | APS |
| 30 μl | TEMED |

Τα παραπάνω διαλύματα απαερώθηκαν πριν την προσθήκη των APS και TEMED.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Οργανισμός

Το βακτήριο που μελετήθηκε στη παρούσα εργασία ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου Περιβαλλοντικών Χημικών διεργασιών του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το βακτήριο απομονώθηκε από μολυσμένο έδαφος, σε βιομηχανική περιοχή της Δανίας. Το βακτήριο αναφέρεται ως στέλεχος rhDVI του γένους *Pseudomonas*. Ανάλυση της αλληλουχίας του 16S-rRNA, έδωσε 99.8% ομολογία με το γένος *Pseudomonas pseudoalcaligenes* [19].

Οι υγρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες με πόμα 1lt οι οποίες περιείχαν 500 ml θρεπτικού μέσου M9R με πηγή άνθρακα φαινόλη, στους 30°C υπό ανάδευση (170στροφές/min) και περιείχαν 1%(v/v) εγκλιματισμένα κύτταρα. Η συλλογή των κυττάρων έγινε μετά από 24 h, όταν η οπτική πυκνότητα των κυττάρων, μετρούμενη στα 600 nm, ήταν ίση με 1.

2.2.2 Απομόνωση της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης

Υγρά κύτταρα ομογενοποιούνται με ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης I σε αναλογία 1:2. Στη συνέχεια τα κύτταρα σπάζονται με υπερήχους (Broxon ultrasonic processor) στη μέγιστη ισχύ (20 φορές 15 sec υπέρηχοι, 45 sec παύση). Η διαδικασία γίνεται σε παγόλουτρο ώστε η θερμοκρασία να μην ξεπερνά τους 10 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 15 min στους 4 °C για την απομάκρυνση των άσπαστων κυττάρων. Το υπερκείμενο στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 100.000 g για 1 h, στους 4 °C για την κατακρήμνιση των μεμβρανών. Οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες στη συνέχεια κλασματοποιούνται με διαβάθμιση ζάχαρης. Ο σωλήνας της υπερφυγοκέντρου περιείχε βήματα πυκνότητας ζάχαρης 30% (1 ml), 20% (4 ml) και 10% (4ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης I με 10 mM ακετόνη. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε στα 210.000 g, σε Sorval TH-641 ρότορα και είχε διάρκεια 10 h. Μετά την φυγοκέντρηση η περιοχή που έδωσε ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης συλεχθηκε.

2.2.3 Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Για την απομόνωση της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης το κλάσμα της διαβάθμισης ζάχαρης που έδειξε ενζυμική ενεργότητα, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία ιονανταλλαγής. Το κλάσμα εισήχθη σε μία στήλη ανιοντικής χρωματογραφίας Mono Q (Pharmacia). Η στήλη ήταν συνδεδεμένη σε σύστημα HPLC και ισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα I που περιείχε επιπλέον 10 mM ακετόνη και 25 mM Na₂SO₄. Ο όγκος του δείγματος που εισήχθη ήταν 10 ml και πραγματοποιήθηκε πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα I οκταπλάσιου όγκου. Για την έκλυση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε γραμμική διαβάθμιση άλατος Na₂SO₄ από 25-500 mM με ροή 1 ml/min. Συλλέχθηκαν κλάσματα με αυτόματο συλλέκτη κλασμάτων ανά 3min. Για περαιτέρω καθαρισμό, τα κλάσματα που περιείχαν την μεγαλύτερη ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης συλλέχθηκαν και μετά από διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα II, εισήχθησαν ξανά σε στήλη Mono Q ισορροπημένη σε ρυθμιστικό διάλυμα II. Οι πρωτεΐνες εκλούσθηκαν με γραμμική διαβάθμιση άλατος NaCl από 0-500 mM με ροή 1 ml/min. Τα κλάσματα συλλέχθηκαν ανά 3 min.

2.2.4 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση

Η πρωτεϊνική σύσταση των δειγμάτων εξετάστηκε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου με την χρήση Tricine και του απορρυπαντικού SDS (Tricine-SDS-PAGE), σύμφωνα με τους Schägger and von Jagow [20]. Η πηκτή συμπίκνωσης είχε συγκέντρωση 4% ακρυλαμιδίου/ δις-ακρυλαμιδίου και η πηκτή διαχωρισμού είχε συγκέντρωση 16.5% ακρυλαμιδίου/ δις-ακρυλαμιδίου, για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με μοριακό βάρος από 5-70 kDa, και 10% για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών από 1-100 kDa.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε αρχικά υπό χαμηλή τάση (~30 V), μέχρι τα δείγματα να συμπυκνωθούν στη πηκτή συμπίκνωσης και κατόπιν η τάση αυξήθηκε στα 130 -150 V χωρίς το ρεύμα να ξεπερνάει τα 100 mA ανά πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση είχε διάρκεια περίπου 8 h. Τα δείγματα πριν την ηλεκτροφόρηση αναμείχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης σε αναλογία 3:1 και στη συνέχεια θερμάνθηκαν στους 40 °C για 30 min.

Οι χρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν με μπλε Coomassie και κολλοειδές μπλε Coomassie.

Η διαδικασία της χρώσης με μπλε Coomassie ήταν η εξής:

- | | |
|---------------------------|-----------|
| 1. Διάλυμα σταθεροποίησης | 15-30min |
| 2. Διάλυμα χρώσης | 30-60min |
| 3. Διάλυμα αποχρωματισμού | 2 x 30min |

Η διαδικασία της χρώσης με κολλοειδές μπλε Coomassie ήταν η εξής:

- | | |
|---|-------------------|
| 1. Διάλυμα σταθεροποίησης | τουλάχιστον 20min |
| 2. Διάλυμα χρώσης | 12-18 h |
| 3. Αποχρωματισμός με απιονισμένο νερό μέχρι να έχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα | |

Για την εύρεση των φαινομενικών μοριακών βαρών των πρωτεϊνών συγκρίθηκαν με δείκτη πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (βλ. §2.1.1).

2.2.5 Δύο-διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (IEF / SDS PAGE)

2.2.5.1 1^η διάσταση: Αναλυτική ισοηλεκτρική εστίαση

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την αναλυτική ισοηλεκτρική εστίαση ήταν πηκτές πολυακρυλαμιδίου με διαβάθμιση pH δημιουργούμενη με αμφολύτες φορείς [21].

Η πηκτική δημιουργήθηκε σε γυάλινους σωλήνες διαστάσεων, 14 cm μήκος και 2 mm εσωτερική διάμετρος (δικιάς μας κατασκευής). Το μήκος των πηκτών εντός των σωλήνων ήταν 12.5 cm..

Η πηκτική περιείχε τα εξής:

1,46 ml ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο (stock: 28.38% A / 1.62 Δις- A)

2.25 ml Triton X-100 (10% w/v)

2.25 ml H₂O

0.45 ml Αμφολύτες pH = 3-6

0.15 ml Αμφολύτες pH = 3-10

Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου επιτεύχθει με την χρήση υπερθειικού αμμωνίου και TEMED. Οι γυάλινοι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε ειδική συσκευή IEF (δικιάς μας κατασκευής) στην οποία μπορούν να τρέξουν ταυτόχρονα 12 γυάλινοι σωλήνες. Οι πηκτές IEF αρχικά έτρεξαν χωρίς δείγμα για την δημιουργία της διαβάθμισης pH. Στο επάνω μέρος των πηκτών (άνοδος) τοποθετήθηκε αντί για δείγμα, 10μl διάλυμα λύσης και 10 μl διάλυμα επικάλυψης. Στην επάνω δεξαμενή της συσκευής τοποθετήθηκε διάλυμα 20 mM NaOH και στην κάτω 10 mM H₃PO₄. Οι πηκτές έτρεξαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15min στα 200 V, 30min στα 300 V και 60 min στα 400 V. Στην συνέχεια το επάνω μέρος των σωλήνων πλύθηκε με νερό και σκουπίστηκε με χαρτί Whatmann 3mm. Τοποθετήθηκαν 50μl δείγματος σε διάλυμα λύσης και στη συνέχεια 10μl διαλύματος επικάλυψης. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην συσκευή τα διαλύματα ανόδου και καθόδου 10 mM H₃PO₄ και 20 mM NaOH αντίστοιχα., και πραγματοποιήθηκε ισοηλεκτρική εστίαση για 19 h στα 400 V, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ισοηλεκτρική εστίαση οι πηκτές αφαιρέθηκαν από τους γυάλινους σωλήνες και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα εξισορρόπησης για 2-5 min σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -20 °C, μέχρι την χρήση τους. Μέτρηση του pH τους έδειξε ότι η διαβάθμιση του pH που δημιουργήθηκε ήταν εύρους 4-7 περίπου.

2.2.5.2 2^η διάσταση: SDS-PAGE

Οι πηκτές από την IEF τοποθετήθηκαν σε πηκτές SDS-PAGE (βλ. § 2.2.4) για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Οι πηκτές τοποθετήθηκαν επάνω στην πηκτική συμπύκνωση και σταθεροποιήθηκαν με διάλυμα αγαρόζης (βλ. 2.1.1).

Παράλληλα τοποθετήθηκε μίγμα με πρότυπες πρωτεΐνες για SDS-PAGE, για τον υπολογισμό των μοριακών βαρών. Η SDS-PAGE πραγματοποιήθηκε ολονύχτια με αρχική σταθερή τάση 50 V για 1 h και στην συνέχεια σταθερή τάση 100 V μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης. Η χρώση των πηκτών πραγματοποιήθηκε με μπλε Coomassie ως εξής:

1. Διάλυμα σταθεροποίησης τουλάχιστον 20 min
2. Διάλυμα χρώσης 12-18 h
3. Αποχρωματισμός με απιονισμένο νερό μέχρι να έχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα

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

2.2.6.1 1^η διάσταση: Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα μελετήθηκαν με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου Blue Native PAGE [22].

Η πηκτή συμπύκνωσης είχε συγκέντρωση 3% ακρυλαμιδίου / δις-ακρυλαμιδίου και η πηκτή διαχωρισμού είχε συγκέντρωση 8% ακρυλαμιδίου / δις-ακρυλαμιδίου. Τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν περιείχαν 20% γλυκερόλη. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 10 °C, αρχικά σε χαμηλή τάση (~80 V) μέχρι τα δείγματα να συμπυκνωθούν στη πηκτή συμπύκνωσης και στη συνέχεια στα 160 V και είχε διάρκεια περίπου 12 h.

2.2.6.2 2^η διάσταση: SDS PAGE

Τα διαχωρισμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα ηλεκτροφορήθηκαν σε μια δεύτερη διάσταση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης SDS PAGE για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών που συγκροτούν τα σύμπλοκα αυτά. Η ζώνη από την μην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση που φέρει τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, επώαζεται για 30 min σε διάλυμα που περιέχει 1% SDS / 1% μερκαπτοαιθανόλη και στη συνέχεια σε διάλυμα με 1% SDS μόνο. Στη συνέχεια η ζώνη της πηκτής ηλεκτροφορείται σε μια δεύτερη διάσταση αποδιατακτικής πηκτής Tricine-SDS PAGE, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.4. Η αποδιατακτική πηκτή αποτελείται μόνο από τη πηκτή διαχωρισμού που είχε συγκέντρωση 10% ακρυλαμιδίου / δις ακρυλαμιδίου.

2.2.7 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού ακτινοβολίας

Η παρουσία ενεργότητας 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης και 1,2 διοξυγενάσης της κατεχόλης, εξετάστηκε φασματοφωτομετρικά σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (Aminco DW2000) παρατηρώντας το σχηματισμό της ημιαλδεύδης του 2-υδροξυμουκονικού οξέως και του cis-cis μουκονικού οξέως στα 375 nm και 260 nm, αντίστοιχα. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C σύμφωνα με τις διαδικασίες των F. Briganti et al. 1997 [23]. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κυψελίδες χαλαζία όγκου 3 ml και πλάτος 1 cm.

Η ενεργότητα 1,2 διοξυγενάσης της κατεχόλης μετρήθηκε σε διάλυμα όγκου 2ml που περιείχε 1 mM EDTA, 33 mM Tris / HCl pH = 8 και 10 μl δείγματος. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη κατεχόλης και παρατηρείται στα 260 nm ο σχηματισμός του cis-cis μουκονικού οξέως ($\epsilon_{260} = 1.6 \times 10^4 \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 25 °C) και συγκρίνεται με το μείγμα αντίδρασης χωρίς κατεχόλη.

Η ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης προσδιορίστηκε μετρώντας την απορρόφηση στα 375 nm που οφείλεται στο σχηματισμό της ημιαλδεύδης του 2-υδροξυμουκονικού οξέως ($\epsilon_{375} = 4.4 \times 10^4 \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 25 °C). Το μείγμα αντίδρασης όγκου 2 ml περιείχε 50 mM Tris / HCl, pH = 7.5 και 10μl δείγματος. Όμοια η αντίδραση ξεκινάει με τη προσθήκη κατεχόλης. Το φάσμα απορρόφησης συγκρίνεται με αυτό του μείγματος αντίδρασης χωρίς την παρουσία κατεχόλης.

Μία ενζυμική μονάδα ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που παράγει 1μmol cis-cis μουκονικού οξέως ή ημιαλδεύδη του 2 -υδροξυ μουκονικού οξέως ανά λεπτό στους 25 °C.

2.2.8 Πρωτεολυτική διάσπαση *in situ* σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

Τα στίγματα των πρωτεϊνών αποκόπηκαν από τις βαμμένες με μπλε Coomassie και αποχρωματίστηκαν με ένα διάλυμα 50% v/v ακετονιτρίλιο και 25 mM διττανθρακικό αμμώνιο, pH=8.0. Τα κομμάτια της πηκτής αφυδατώθηκαν με ακετονιτρίλιο και ξηράθηκαν σε μία Speed Vac. Αναγωγή των ξηραμένων πηκτών πραγματοποιήθηκε με 10 mM DTT σε 100 mM διττανθρακικό αμμώνιο για 1h στους 56 °C. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλκυλίωση με 55 mM ιοδοακεταμίδιο σε 100 mM διττανθρακικό αμμώνιο για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Τα κομμάτια της πηκτής πλύθηκαν με 100 mM διττανθρακικό αμμώνιο, αφυδατώθηκαν με ακετονιτρίλιο και

ξηράθηκαν σε Speed Vac. Στα ξηραμένα κομμάτια της πηκτής προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεόλυσης το οποίο περιείχε 125-300 ng βοδινής θρυψίνης και αφέθηκαν για 45min σε πάγο. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεόλυσης χωρίς θρυψίνη. Πραγματοποιήθηκε ολονύχτια πρωτεόλυση στους 37 °C. Το υπερκείμενο συλλεχθεί έπειτα από φυγοκέντρηση για 20 min στα 15000 g. Τα πεπτίδια από τα κομμάτια της πηκτής εκχειλίστηκαν με 50% v/v ακετονιτρίλιο / 0.1% v/v τριφθοροξικό και το εκχύλισμα συλλέχθηκε και ενώθηκε με το υπερκείμενο. Το συνολικό διάλυμα που προέκυψε ξηράθηκε σε Speed Vac.

2.2.9 Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας (MS)

Τα δείγματα που προέκυψαν από την πρωτεόλυση των στιγμάτων, αναλύθηκαν με MALDI-TOF MS. Τα ξηρά δείγματα, μετά την πρωτεόλυση (βλ. § 2.2.5), επαναδιαλύθηκαν σε 5 µL 50% ακετονιτρίλιο / 0.5-1.0% v/v τριφθοροξικό. 0.5 µl από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε πλακίδιο 96 θέσεων MALDI και προστέθηκαν 0.5 µl διαλύματος 10 mg / ml α-κυάνο-4-υδροξυκινναμικό οξύ σε 50% v/v ακετονιτρίλιο και 1% v/v τριφθοροξικό. Τα δείγματα αφέθηκαν να ξηραθούν σε θερμοκρασία δωματίου και το πλακίδιο τοποθετήθηκε στο φασματογράφο μάζας Voyager-DE STR instrument (Applied Biosystems). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο της αργής εξαγωγής (delayed extraction) και με την χρήση του ανακλαστήρα με τις παρακάτω παραμέτρους: 950-1100 ένταση laser, 20 kV τάση επιτάχυνσης, 68.5% τάση πλέγματος, 0.02% τάση σύρματος καθοδήγησης, 150 ns καθυστέρηση και πύλη χαμηλού μοριακού βάρους 500 Da. Τα φάσματα που ελήφθησαν βαθμονομήθηκαν με ένα μίγμα πέντε πεπτιδίων με την χρήση του λογισμικού Data Explorer (Applied Biosystems). Τα αποτυπώματα πεπτιδικών μαζών (peptide mass fingerprints, PMF) που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με την χρήση των λογισμικών MS-Fit, PROWL, Mascot, Spectrum Mill MS Proteomics Workbench [24].

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

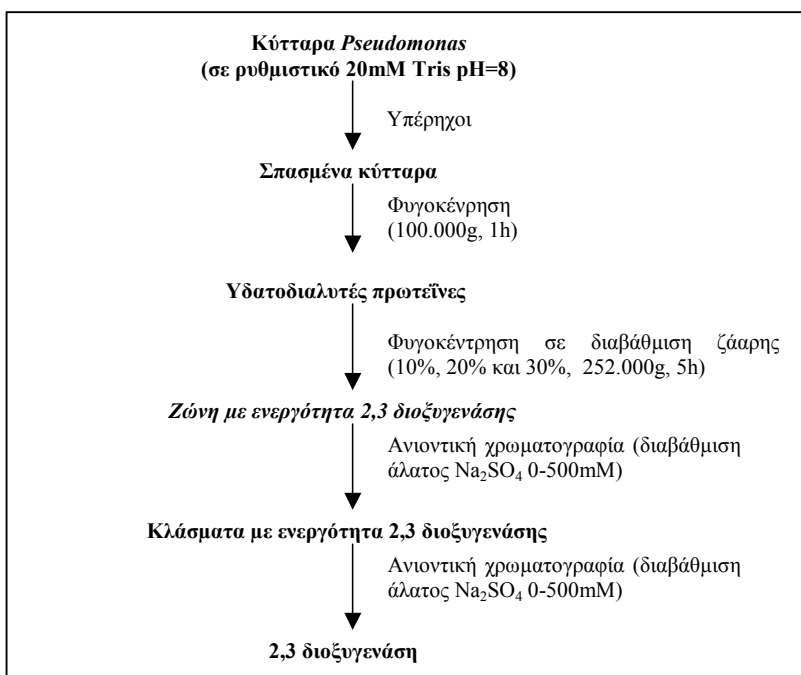
3.1 Απομόνωση και Χαρακτηρισμός της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης

Για τον προσδιορισμό του μεταβολικού μονοπατιού που ακολουθεί το βακτήριο παρουσία μονοαρωματικών ενώσεων, εξετάστηκε η ικανότητα του να αποικοδομεί βενζόλιο, τολουόλιο, μ-κρεσόλη μ-νιτροβενζόλιο μ-βρωμοβενζόλιο και φαινόλη. Σε συγκέντρωση ρύπου 100 mg/l και 200 mg/l το βακτήριο μεγάλωσε μόνο σε φαινόλη, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.1. Κατόπιν αυτού μελετήθηκε το εύρος της ποσότητας της φαινόλης που μπορεί να αποικοδόμει το βακτήριο και κυμαίνεται μεταξύ 0.2–1200 mg/l.

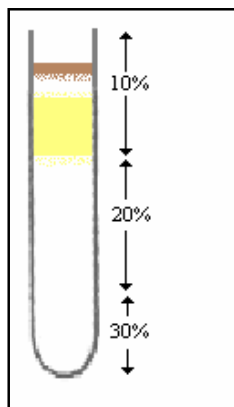
| Πηγή άνθρακα | Καλλιέργεια |
|-----------------|-------------|
| Βενζόλιο | - |
| Τολουόλιο | - |
| Φαινόλη | + |
| μ-Κρεσόλη | - |
| μ-Νιτροβενζόλιο | - |
| μ-Βρωμοβενζόλιο | - |
| Βενζοϊκό οξύ | + |

3.1.1 Απομόνωση του ενζύμου 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης

Η διαδικασία που περιγράφεται στο παρακάτω διάγραμμα είχε σαν αποτέλεσμα την απομόνωση του ενζύμου 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης.



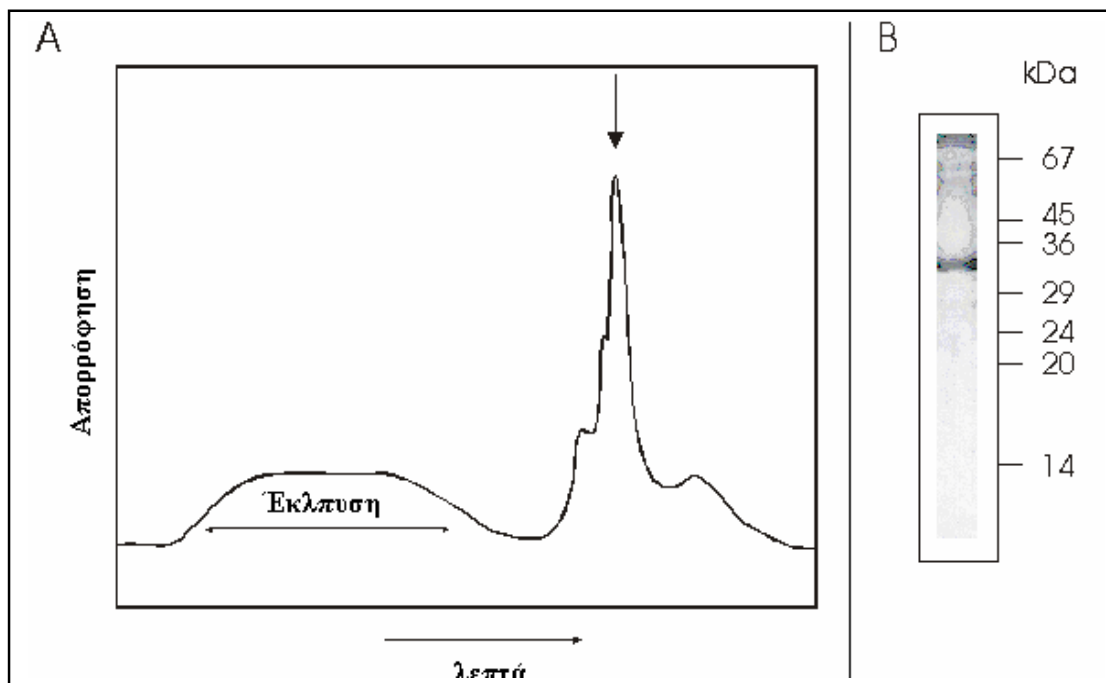
Η πρωτεΐνη απομονώθηκε από τις κλασματοποιημένες υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες με την χρήση διαβάθμιση ζάχαρης. Κατά τη διαδικασία αυτή παρατηρήθηκε μια κίτρινη ζώνη η οποία έδειξε ενζυμική ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης. (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1: Διαβάθμιση ζάχαρης σε βήματα 30%, 20% και 10% ζάχαρης σε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης I. Η κίτρινη ζώνη που σχηματίστηκε σε πυκνότητα ζάχαρης 20% - 10% έδειξε ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης.

3.1.2 Ανιοντική χρωματογραφία

Μετά την διαβάθμιση ζάχαρης, η κίτρινη ζώνη με ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης διαβιβάστηκε σε στήλη ανιοντικής χρωματογραφίας Mono Q. Για τη βελτίωση της καθαρότητας της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης, χρησιμοποιήθηκε και δεύτερη ανιοντική στήλη Mono Q. Έτσι τα κλάσματα που έδωσαν μεγάλη ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης μετά την πρώτη ανιοντική χρωματογραφία, εισήχθηκαν μετά από διαπίδυση στο ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης II, ξανά στην ανιονανταλλακτική στήλη, μετά την οποία επιτεύχθηκε ο καθαρισμός της πρωτεΐνης (βλ. § 2.2.2). Η απομονωμένη πρωτεΐνη εκλούσθηκε στα 100 mM Na₂SO₄, όπως έδειξε και το λειτουργικό τεστ ενεργότητας (Σχήμα 3.2 A). Η πρωτεϊνική σύσταση του εκλούόμενου κλάσματος που περιέχει την 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης εξετάστηκε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση Tricine SDS-PAGE. Όπως φαίνεται στο σχήμα 3.2 B μετά τη διαδικασία της απομόνωσης το απομονωμένο ένζυμο λαμβάνεται σαν μια απλή πρωτεϊνική ζώνη με μοριακό βάρος 32000 Da.

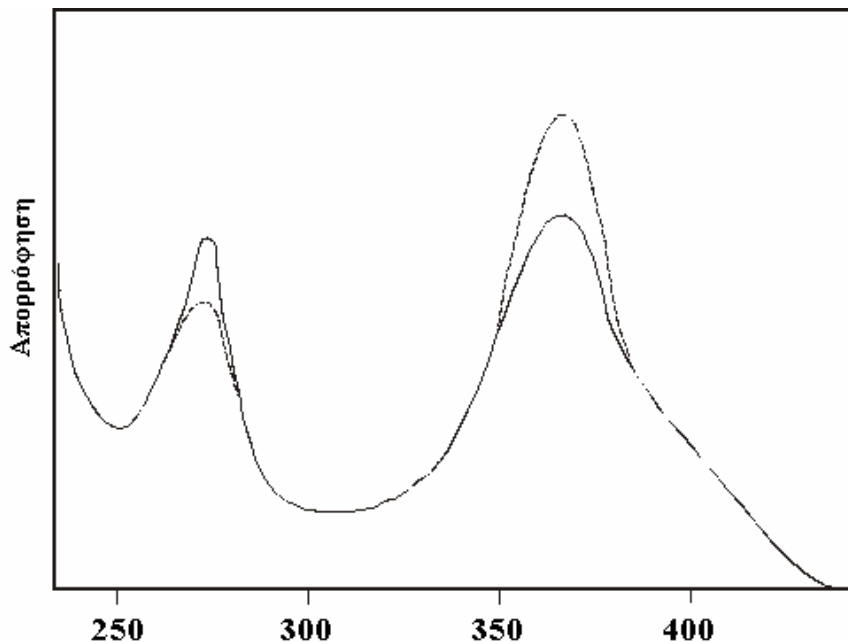


Σχήμα 3.2: A) Χρωματογράφημα έκλυσης από τη δεύτερη Mono Q. Το βέλος στα 100 mM Na₂SO₄ αντιστοιχεί στην κορυφή που έδωσε ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης.

B) Πηκτή Tricine SDS – PAGE σε 16.5% ακρυλαμίδιο και χρώση coomassie της απομονωμένης πρωτεΐνης που εκλύεται στα 100 mM Na₂SO₄ μετά τη δεύτερη Mono Q.

3.1.3 Χαρακτηρισμός του ενζύμου με φασματοφωτομετρία υπεριώδους - ορατού (UV-VIS)

Το απομονωμένο ένζυμο χαρακτηρίστηκε με φασματοφωτομετρία ορατού υπεριώδους με βάση το λειτουργικό τεστ ενεργότητας (§ 2.2.7). Στο σχήμα 3.3 φαίνεται το φάσμα απορρόφησης της καθαρής πρωτεΐνης παρουσία κατεχόλης στο εύρος μηκών κύματος 230-450 nm μετά από 1 min αντίδρασης (διακεκομμένη γραμμή) και μετά από 4 min (συνεχής γραμμή), λαμβάνοντας σαν φάσμα υποβάθρου το διάλυμα αντίδρασης χωρίς κατεχόλη. Η κορυφή στα 274 nm αντιστοιχεί στην κατεχόλη ενώ η κορυφή στα 375 nm αντιστοιχεί στη σχηματιζόμενη ημιαλδεΐδη του 2-ύδροξυ μουκονικού οξέως. Η μείωση της κορυφής στα 274 nm και η αύξηση της κορυφής στα 375 nm με την πάροδο του χρόνου πιστοποιεί την ύπαρξη της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης η οποία οξειδώνει την κατεχόλη σε ημιαλδεΐδη του 2-υδροξυ μουκονικού οξέως.

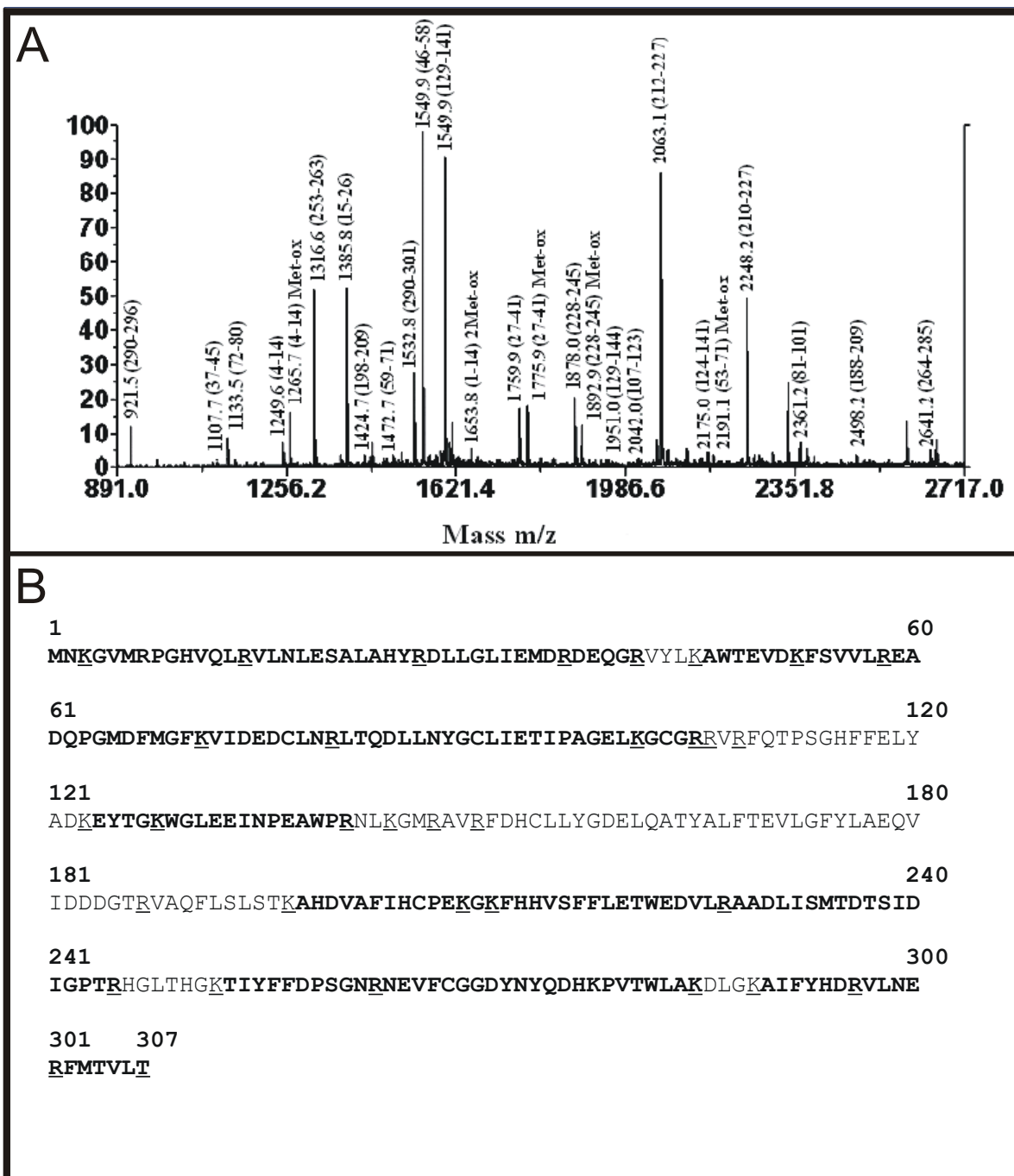


Σχήμα 3.3: Φάσμα απορρόφησης της απομονωμένης πρωτεΐνης παρουσία κατεχόλης σε 1 min αντίδρασης (διακεκομμένη γραμμή) και σε 4 min αντίδρασης (συνεχής γραμμή). Το φάσμα δείχνει ότι η κορυφή στα 274 nm μειώνεται ενώ η κορυφή στα 375 nm αυξάνεται.

3.1.4 Χαρακτηρισμός του απομονωμένου ενζύμου με φασματομετρία μάζας

Η ταυτοποίηση της απομονωμένης επιτεύχθηκε με χαρτογράφηση των πεπτιδίων με φασματομετρία μάζας. Για την φασματοσκοπική ανάλυση η ζώνη στα 32.000 Da της πηκτής Tricine SDS PAGE που αντιστοιχεί στην απομονωμένη πρωτεΐνη τεμαχίστηκε και πρωτεολύθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο § 2.2.8. Με χρήση φασματογράφου μάζας MALDI-TOF MS σύμφωνα με τις συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο § 2.2.9, προέκυψε το φάσμα μάζας του πρωτεολυμένου μείγματος της πρωτεΐνης. Το φάσμα μάζας του πρωτεολυμένου ένζυμου (σχήμα 3.4 A) εμφανίζει 71% ομολογία (218 / 307 αμινοξέα) με τη 2,3 διοξυγενάση της κτεχόλης από τον οργανισμό *Pseudomonas aeruginosa* (Q8KQ37, αριθμός καταχώρησης στο Swiss-Prot) [25]. Στο σχήμα 3.4 B φαίνεται η αλληλουχία των πεπτιδίων (έντονα γράμματα) που προέκυψαν από την πρωτεολυμένη πρωτεΐνη και απαντώνται στην αλληλουχία αμινοξέων της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης από τον οργανισμό *Pseudomonas aeruginosa*. Οι υπογραμμισμένες περιοχές δηλώνουν τις θέσεις πρωτεόλυσης από την θρυψίνη.

Η χρήση της φασματομετρίας μάζας επέτρεψε την ταυτοποίηση με μεγάλη ακρίβεια της απομονωμένης πρωτεΐνης ως 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης. Προσπάθειες ανίχνευσης του γονιδίου της 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης και 1,2 διοξυγενάση της κατεχόλης με χρήση εκκινιτών για συντηρητικές περιοχές των πρωτεϊνών και PCR δεν ήταν επιτυχείς.



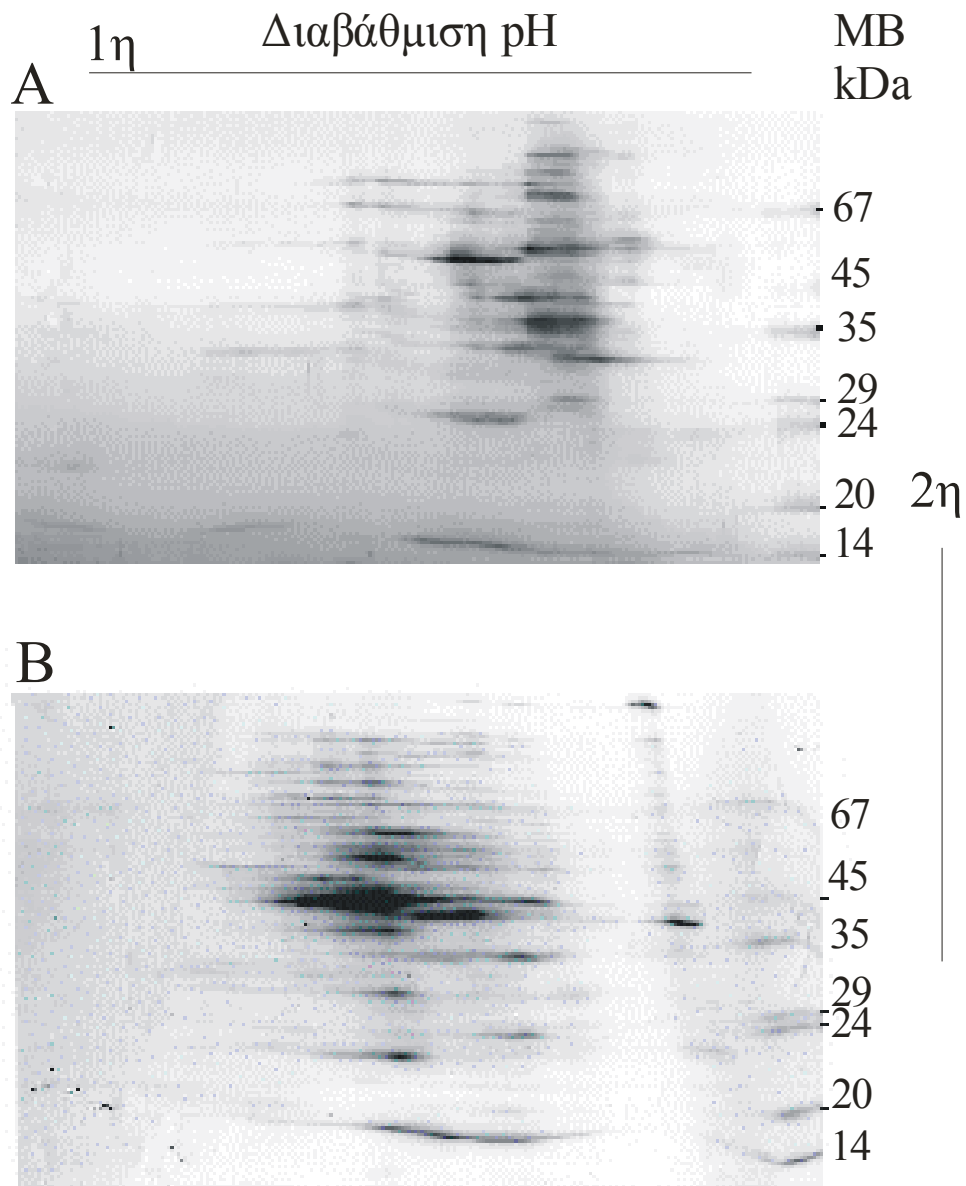
Σχήμα 3.4: A) MALDI -TOF MS στην πρωτεολυμένη πρωτεϊνική ζώνη από την πηκτική Tricine-SDS PAGE (σχήμα 4.2B). Στο σχήμα φαίνονται η ακριβής μάζα των πεπτιδίων και η θέση τους στην αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης.

B) Η παρατηρούμενη αλληλουχία πεπτιδίων (έντονα γράμματα) που ταιριάζει με την αλληλουχία αμινοξέων της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης από τον οργανισμό *Pseudomonas aeruginosa*

3.2 Προσδιορισμός και λειτουργικός χαρακτηρισμός των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης

3.2.1 Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (IEF / SDS PAGE)

Για τον προσδιορισμό των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης χρησιμοποιήθηκε αρχικά δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (IEF / SDS PAGE). Οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες που προέκυψαν μετά από υπερφυγοκέντρηση των διαρυσμένων κυττάρων, από καλλιέργειες γλυκόζης και φαινόλης (§ 2.2.2) ηλεκτροφορήθηκαν αρχικά με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο. 150 mg πρωτεΐνης μεταφέρθηκαν σε διάλυμα λύσης (§ 2.1.2) και διαχωρίστηκαν σε σωληνοειδής πηκτές πολυακρυλαμιδίου. Μετά την πρώτη διάσταση της ισοηλεκτρικής εστίασης, οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος σε αποδιατακτική πηκτή 15% πολυακρυλαμιδίου. Το πρωτεϊνικό αποτύπωμα μετά από δισδιάστατη ηλεκτοφόρηση των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, κυττάρων που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα γλυκόζη και φαινόλη φαίνεται στο σχήμα 3.5 A και 3.5 B, αντίστοιχα. Κατόπιν έγινε προσπάθεια συσχέτισμού των δύο αποτυπωμάτων και προσδιορισμού πιθανών διαφοροποιήσεων στο πρωτεϊνικό αποτύπωμα των δύο δειγμάτων. Κατά τη διαδικασία αυτή ήταν δύσκολος ο προσδιορισμός πρωτεϊνικών διαφοροποιήσεων μεταξύ των δύο δειγμάτων, λόγω του ότι δεν υπήρχε επαναληψιμότητα στο μοτίβο της δεύτερης διάστασης, γεγονός που δεν επέτρεπε τον προσδιορισμό με ακρίβεια κοινών και μη πρωτεϊνών μεταξύ των δειγμάτων.

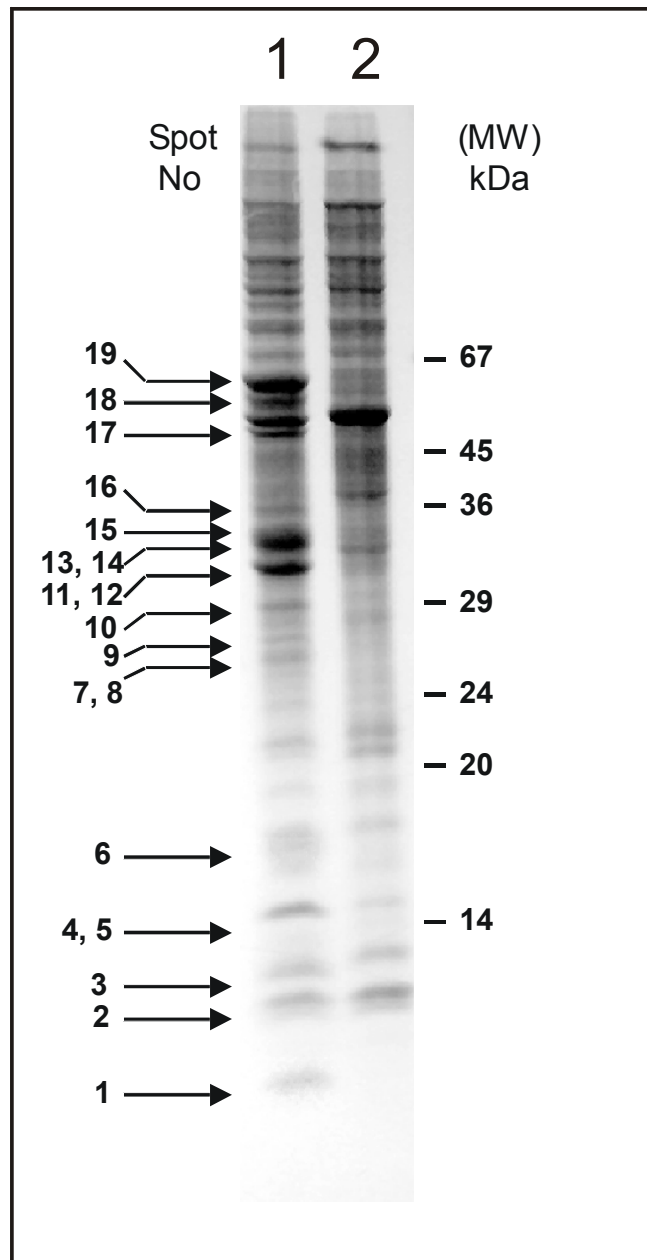


Σχήμα 3.5: A) Δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών κυτταροκαλλιέργειας με πηγή άνθρακα γλυκόζη. Πηκτική πολυακρυλαμιδίου 15% και χρώση μπλε κολλοειδές coomassie.

B) Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών κυτταροκαλλιέργειας με πηγή άνθρακα φαινόλη. Πηκτική πολυακρυλαμιδίου 15% και χρώση μπλε κολλοειδές coomassie.

3.2.2 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση

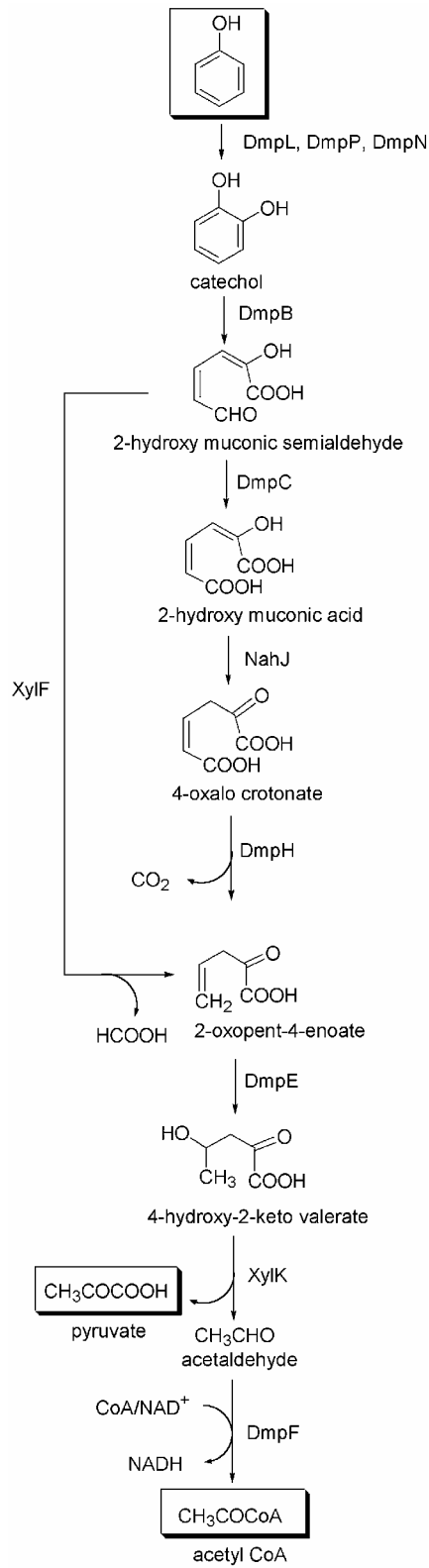
Μετά τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (IEF / SDS PAGE) έγινε προσπάθεια απλούστευσης και εμπλουτισμού του δείγματος που περιέχει ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης. Η κλασματοποίηση και ο εμπλουτισμός του δείγματος επιτεύχθηκε με υπερφυγοκέντρηση σε διαβάθμιση ζάχαρης (§ 2.1.2). Η κιτρίνη ζώνη μετά τη διαβάθμιση ζάχαρης που έδειξε ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης καθώς και η αντίστοιχη ζώνη από διαβάθμιση ζάχαρης των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών κυττάρων που μεγάλωσαν σε γλυκόζη, ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή Tricine SDS –PAGE. Οι διαφορές που εντοπίστηκαν στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των δύο κλασμάτων μετά τη διαδικασία της μονοδιάστατης αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης φαίνονται στο σχήμα 3.6. Τα πρωτεϊνικά στίγματα αποκόπηκαν από την πηκτή, πρωτεολύθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο § 2.2.8 και αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS (βλ. § 2.2.9). Μετά από επεξεργασία του πεπτιδικού αποτυπώματος μαζών (PMF) κάθε πρωτεΐνης, επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών. Στον πίνακα 3.2 περιγράφονται οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες. από τις 19 πρωτεΐνες οι 15 είναι πρωτεΐνες που ανήκουν στο οπερόνιο *dmp* που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες μεταβολισμού της φαινόλης. Στο σχήμα 3.7 φαίνεται το *μέτα* μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης και τα στάδια στα οποία συμμετέχουν τα ένζυμα που προσδιορίστηκαν.



Σχήμα 3.6: Tricine SDS PAGE ηλεκτροφόρηση του κλάσματος με ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης και του αντίστοιχου κλάσματος από διαβάθμιση ζάχαρης υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, κυττάρων που μεγάλωσαν σε γλυκόζη. Η χρώση των πρωτεϊνών έγινε με κολλοειδές μπλε Coomassie. Τα βέλη δείχνουν διαφοροποιήσεις στις πρωτεΐνες που εκφράζονται ανάλογα με το θρεπτικό μέσο.

| Spot No | Accession No/ Organism | Protein Definition (Gene Name) | Predicted MW/pI | Peptides Matched | Peptides Coverage % |
|---------|--|--|-----------------|------------------|---------------------|
| 1 | Q9Z431/ <i>Pseudomonas putida</i> | 4-oxalocrotonate tautomerase (NahJ) | 71.18/5.76 | 9 | 76 |
| 2 | Q52163/ <i>Pseudomonas putida</i> | subunit of phenol hydroxylase (Phl C) | 10.661/4.6 | 4 | 51 |
| 3 | P95409/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | BmoB protein (Bmo B) | 97.67/6.4 | 9 | 51 |
| 4 | ZP_000864011/ <i>Pseudomonas fluorescens</i> | transhyaluronate lyase (PflU3671) | 129.50/5.8 | 5 | 56 |
| 5 | Q9HTR6/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | nitrogen regulatory protein P-II (Gln K) | 122.79/5.41 | 14 | 89 |
| 6 | ZP_00086215/ <i>Pseudomonas fluorescens</i> | transcription elongation factor (PflU3483) | 181.33/4.95 | 6 | 55 |
| 7 | Q8RQD7/ <i>Pseudomonas putida</i> | 2-hydroxymuconic semialdehyde hydratase (Xyl F) | 31.337/5.5 | 11 | 45 |
| 8 | Q52060/ <i>Pseudomonas putida</i> | acetaldehyde dehydrogenase acetylating (Dmp F) | 32.685/5.9 | 23 | 79 |
| 9 | P17262/ <i>Pseudomonas sp.</i> | catechol 2,3 dioxxygenase (Dmp E) | 35.575/5.55 | 29 | 69 |
| 10 | P49156/ <i>Pseudomonas putida</i> | 4-oxalocrotonate decarboxylase (Dmp H) | 28.427/5.1 | 14 | 60 |
| 11 | Q52059/ <i>Pseudomonas putida</i> | 2-hydroxyperit-2,4-dienoate hydratase (Dmp E) | 27.867/5.2 | 15 | 69 |
| 12 | Q88KC2/ <i>Pseudomonas putida</i> | oxidoreductase aldoketo reductase family (PP_2368) | 29.008/7.82 | 11 | 54 |
| 13 | P51019/ <i>Pseudomonas putida</i> | 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (Xyl K) | 37.444/5.57 | 18 | 68 |
| 14 | P19730/ <i>Pseudomonas sp.</i> | phenol 2 monooxygenase P1 component (Dmp L) | 38.298/5.17 | 16 | 63 |
| 15 | P19734/ <i>Pseudomonas sp.</i> | phenol 2 monooxygenase P5 component (Dmp P) | 38.52/4.79 | 18 | 70 |
| 16 | P09591/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | elongation factor Tu (Tuf A) | 43.370/5.2 | 15 | 41 |
| 17 | P19059/ <i>Pseudomonas sp.</i> | 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydratase (Dmp C) | 51.683/5.4 | 11 | 33 |
| 18 | P95408/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | benzene monooxygenase oxygenase subunit (Bmo A) | 58.012/4.89 | 26 | 45 |
| 19 | P19732/ <i>Pseudomonas sp.</i> | phenol 2 monooxygenase P3 component (Dmp N) | 60.523/6.0 | 25 | 45 |

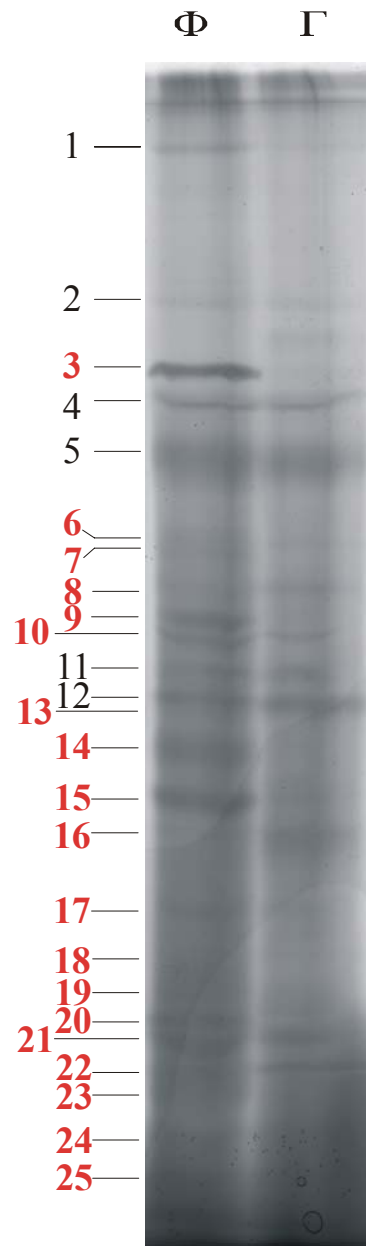
Πίνακας 3.2: Τα ένζυμα που επάγονται στον οργανισμό για το μεταβολισμό της φαινόλης, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με φασματομετρία μάζας MALDI – TOF MS.



Σχήμα 3.7: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων του *μέτα* μεταβολικού μονοπατιού που συμμετέχουν τα παραπάνω ένζυμα.

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

Μελέτες πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων παρέχουν σημαντικές δομικές και λειτουργικές πληροφορίες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση κατά την οποία τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα δεν αποδιατάσσονται λόγω των ήπιων συνθηκών διαχωρισμού [22]. Στη συνέχεια για τον προσδιορισμό του πλήθους και του είδους των πρωτεϊνών που σχημάτισαν σύμπλοκα χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερη διάσταση η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση Tricine SDS-PAGE. Όπως και στην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση Tricine SDS-PAGE έτσι και εδώ χρησιμοποιήθηκε η αντίστοιχη ζώνη στα 10% ζάχαρης από καλλιέργεια γλυκόζης, ώστε να είναι πιο εύκολος ο εντοπισμός πρωτεϊνικών συμπλόκων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της φαινόλης. Στο σχήμα 3.8 φαίνονται τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα του κλάσματος στα 10% ζάχαρης με ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης, μετά την υποφυγοκέντρηση σε διαβάθμιση ζάχαρης και της αντίστοιχης περιοχής στα 10% ζάχαρης από καλλιέργεια κυττάρων σε γλυκόζη. Όμοια με την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση τα πρωτεϊνικά στίγματα αποκόπηκαν από την πηκτή, πρωτεολύθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο § 2.2.8 και αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF (βλ. § 2.2.9).



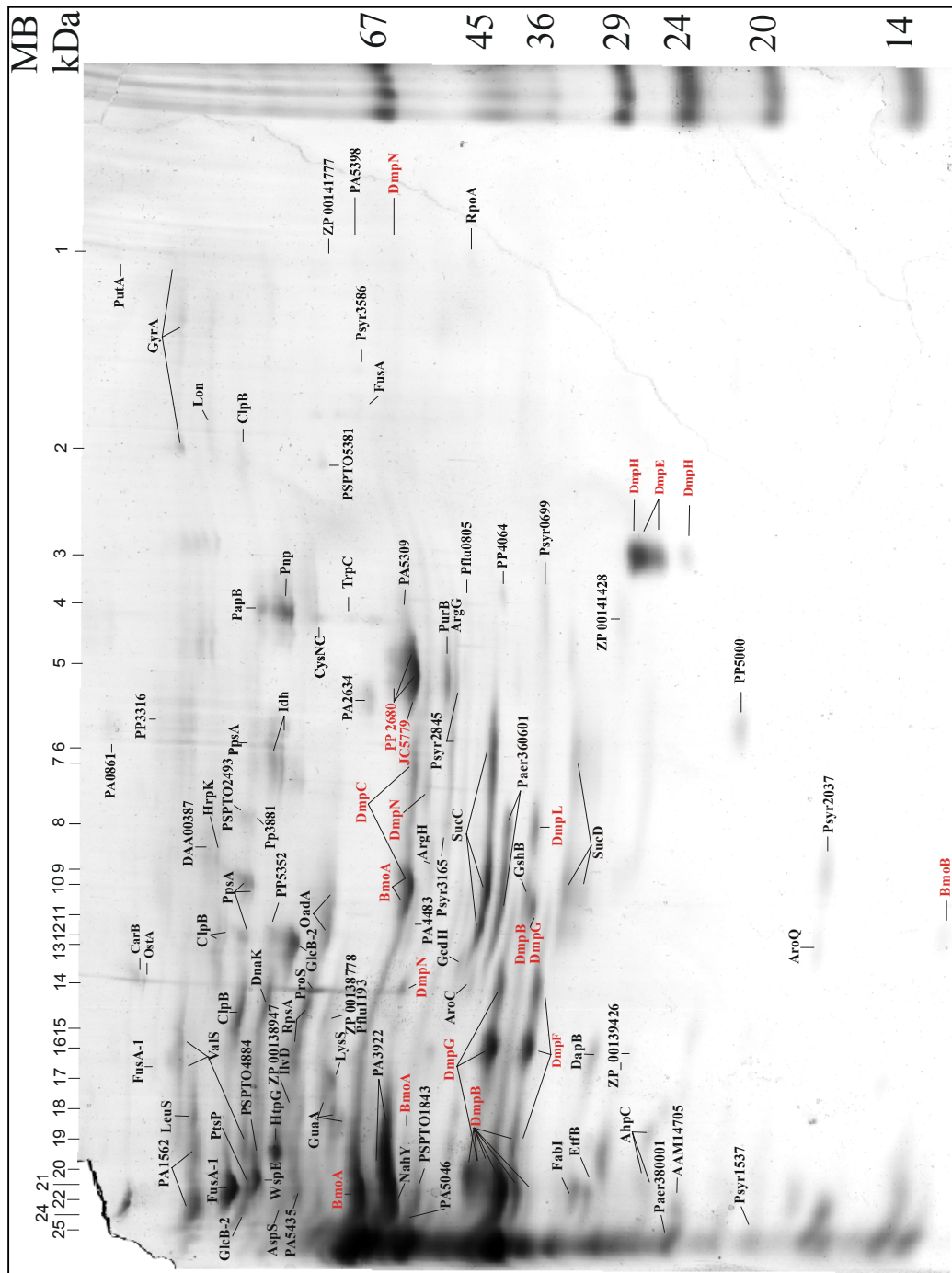
Σχήμα 3.8: Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (Blue Native PAGE) στο κλάσμα με ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης μετά τη διαβάθμιση ζάχαρης και της αντίστοιχης ζώνης από καλλιέργεια γλυκόζης. Τα νούμερα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα που περιέχουν ένζυμα του μεταβολισμού της φαινόλης.

| Αριθμός Ζώνης | Ορισμός πρωτεΐνης | Αρ. Καταχώρησης ή γονίδιο/ Οργανισμός | Προβλεπόμενα ρ/ΜΒ(kDa) | Πεπτιδία | Καλύψη Πεπτιδίων % |
|---------------|---|--|-------------------------|----------|--------------------|
| 1 | DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit DNA-directed RNA polymerase, beta subunit | RpoA/Pseudomonas putida KT2440 | 4.9/36.73 | 9 | 19 |
| | | rpob/Pseudomonas putida KT2440 | 5.6/151.55 | 30 | 23 |
| 2 | DNA gyrase subunit A putative TraC protein type III helper protein HrpK(Pto) ATP-dependent protease, putative | GyrA/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 4.9/101.23 | 22 | 21 |
| | | traC/Pseudomonas putida | 9.4/108.95 | 21 | 29 |
| | | hrpK/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.3/81.08 | 15 | 27 |
| | | PSPTO4585/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 4.8/89.98 | 13 | 19 |
| 3 | 4-oxalocrotonate decarboxylase 2-hydroxyput -2,4 dienoate hydratase | dmpH/Pseudomonas putida | 5.1/28.52 | 6 | 30 |
| | | dmpE/Pseudomonas putida | 5.2/28.13 | 9 | 51 |
| 4 | polyribonucleotide nucleotidyltransferase isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent | pnp/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.2/75.14 | 13 | 24 |
| | | PSPTO3356/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.5/81.05 | 15 | 25 |
| | sulfate adenylate transferase, subunit I/adenylylsulfate kinase | cysNC/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.5/69.21 | 15 | 28 |
| 5 | aldehyde dehydrogenase family protein | PP2680/Pseudomonas putida KT2440 | 5.5/55.23 | 13 | 31 |
| 6 | isocitrate dehydrogenase pyruvate dehydrogenase, E1 component phenol 2-monoxygenase P3 component oxidoreductase, FMN-binding | idh/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.8/81.84 | 15 | 30 |
| | | aceE-2/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.5/99.53 | 15 | 21 |
| | | dmpN/Pseudomonas Putida | 6.0/60.90 | 8 | 23 |
| | | PP0310/Pseudomonas putida KT2440 | 5.8/76.37 | 13 | 30 |
| 7 | aspartyl-tRNA synthetase non-ribosomal peptide synthetase, initiating component phenol 2-monoxygenase P3 component | gjl28871126/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.3/66.62 | 12 | 25 |
| | | gjl28871652/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 dmpN/Pseudomonas Putida | 5.9/196.28 6.0/60.90 | 14 7 | 14 19 |
| 8 | phosphoenolpyruvate synthase benzene monoxygenase oxygenase subunit pyruvate dehydrogenase, E1 component translation elongation factor G | PpsA/Pseudomonas putida KT2440 | 5.0/86.02 | 21 | 32 |
| | | BmoA/Pseudomonas aeruginosa | 4.9/58.17 | 13 | 34 |
| | | aceE-2/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.5/99.53 | 17 | 28 |
| | | fusA-1/Pseudomonas putida KT2440 | 5.1/79.08 | 19 | 37 |
| 9 | 2-hydroxyisovaleryl-CoA dehydrogenase COG1112: Superfamily I DNA and RNA helicases and helicase subunits still frameshift probable component of chemotactic signal transduction system DNA polymerase III, alpha chain | dmpC/Pseudomonas Putida | 5.4/52.06 | 14 | 34 |
| | | Paer033801/Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14 | 5.6/230.29 | 15 | 11 |
| | | PA0413/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 4.4/269.07 | 13 | 9 |
| | | dnaE/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.3/131.63 | 12 | 14 |
| 10 | benzene monoxygenase oxygenase subunit phenol 2-monoxygenase P3 component phosphoenolpyruvate synthase probable polyketide synthase type I oxaloacetate decarboxylase, alpha subunit DNA-directed RNA polymerase, beta subunit | BmoA/Pseudomonas aeruginosa | 4.9/58.17 | 26 | 43 |
| | | dmpN/Pseudomonas Putida | 6.0/60.90 | 13 | 36 |
| | | PpsA/Pseudomonas putida KT2440 | 86017/5.0 | 21 | 29 |
| | | pltB/Pseudomonas fluorescens | 5.3/265.17 | 22 | 14 |
| | | oadA/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.5/65.81 | 13 | 37 |
| | | rpob/Pseudomonas putida KT2440 | 5.6/151.55 | 11 | 11 |
| 11 | oxaloacetate decarboxylase, alpha subunit succinyl-CoA synthetase, beta subunit succinyl-CoA synthetase, alpha subunit aconitate hydratase, putative clpB protein | oadA/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.5/65.81 | 16 | 27 |
| | | sucC/Pseudomonas putida KT2440 | 5.8/41.51 | 14 | 40 |
| | | sucD/Pseudomonas putida KT2440 | 5.9/30.49 | 9 | 57 |
| | | PP2336/Pseudomonas putida KT2440 | 5.4/94.46 | 14 | 26 |
| | | clpB/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.4/95.28 | 11 | 17 |
| | | Psy1985/Pseudomonas syringae pv. syringae B728a | 8.7/198.23 | 28 | 24 |
| 12 | hypothetical protein glutamate synthase large subunit exodeoxyribonuclease V, gamma subunit DNA polymerase III, alpha chain clpB protein translation elongation factor G pyruvate dehydrogenase, E1 component | gluB/Pseudomonas aeruginosa | 5.8/162.77 | 22 | 30 |
| | | recC/Pseudomonas putida KT2440 | 5.3/131.00 | 19 | 19 |
| | | dnaE/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.3/131.63 | 15 | 14 |
| | | clpB/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.4/95.28 | 19 | 29 |
| | | fusA-1/Pseudomonas putida KT2440 | 5.1/79.08 | 14 | 31 |
| | | aceE-2/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.5/99.53 | 11 | 16 |
| | | pltB/Pseudomonas fluorescens | 5.3/265.17 | 17 | 13 |
| | | dnaE/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.3/131.63 | 13 | 13 |
| | | kdgA/Pseudomonas putida | 6.2/103.87 | 15 | 23 |
| | | dmpN/Pseudomonas Putida | 6.0/60.90 | 10 | 35 |
| 13 | probable polyketide synthase type I DNA polymerase III, alpha chain 2-oxoglutarate dehydrogenase phenol 2-monoxygenase P3 component glutamate synthase large subunit clpB protein | gluB/Pseudomonas aeruginosa | 5.8/162.77 | 13 | 16 |
| | | clpB/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.4/95.28 | 13 | 23 |
| 14 | acetaldehyde dehydrogenase (acetylating) (EC 1.2.1.10) phenol 2-monoxygenase P3 component 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase ATP-dependent helicase HrpA prolyl-tRNA synthetase ClpB protein | dmpF/Pseudomonas putida | 5.9/32.78 | 17 | 60 |
| | | dmpN/Pseudomonas Putida | 6.0/60.90 | 10 | 20 |
| | | dmpG/Pseudomonas Putida | 5.9/36.49 | 11 | 46 |
| | | hrpA/Pseudomonas putida KT2440 | 8.5/147.50 | 14 | 17 |
| | | proS/Pseudomonas putida KT2440 | 5.2/63.78 | 11 | 33 |
| | clpB/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.9/32.78 | 19 | 28 | |
| 15 | acetaldehyde dehydrogenase (acetylating) (EC 1.2.1.10) 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase benzene monoxygenase oxygenase subunit | dmpF/Pseudomonas putida | 5.9/32.78 | 16 | 61 |
| | | dmpG/Pseudomonas Putida | 5.9/36.49 | 12 | 48 |
| | | BmoA/Pseudomonas aeruginosa | 4.9/58.17 | 9 | 19 |
| 16 | benzene monoxygenase oxygenase subunit lysyl-tRNA synthetase | BmoA/Pseudomonas aeruginosa | 4.9/58.17 | 12 | 24 |
| | | lysS/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.0/57.04 | 11 | 25 |
| 17 | hypothetical protein benzene monoxygenase oxygenase subunit pyruvate dehydrogenase, E1 component | gjl23470359/[Pseudomonas syringae pv. syringae B728a] | 8.7/198.23 | 34 | 28 |
| | | BmoA/Pseudomonas aeruginosa | 4.9/58.17 | 17 | 32 |
| | | aceE-2/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.5/99.53 | 21 | 30 |
| 18 | benzene monoxygenase oxygenase subunit catechol 2,3 dioxygenase phenol 2-monoxygenase P3 component | BmoA/Pseudomonas aeruginosa | 4.9/58.17 | 15 | 32 |
| | | dmoB/Pseudomonas Putida | 5.6/35.58 | 13 | 48 |
| | | dmpN/Pseudomonas Putida | 6.0/60.90 | 8 | 25 |
| 19 | catechol 2,3 dioxygenase benzene monoxygenase oxygenase subunit phenol 2-monoxygenase P3 component 2-oxoglutarate dehydrogenase (E1 subunit) | dmoB/Pseudomonas Putida | 5.6/35.58 | 24 | 68 |
| | | BmoA/Pseudomonas aeruginosa | 4.9/58.17 | 22 | 41 |
| | | dmpN/Pseudomonas Putida | 6.0/60.90 | 14 | 39 |
| | sucA/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 6.1/106.43 | 11 | 20 | |

| Αριθμός Ζώνης | Όρισμός πρωτεΐνης | Αρ. Καταχώρησης ή γονίδιο/ Οργανισμός | Προβλεπόμενα pI/MW(kDa) | Πεπτίδια | Κάλυψη Πεπτιδίων % | |
|--|--|---|-------------------------|----------|--------------------|--|
| 20 | benzene monooxygenase oxygenase subunit | BmoA/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4.9 /58.17 | 17 | 33 | |
| | catechol 2,3 dioxygenase | dmoB/ <i>Pseudomonas Putida</i> | 5.6 /35.58 | 13 | 48 | |
| | phenol 2-monoxygenase P3 component | dmpN/ <i>Pseudomonas Putida</i> | 6.0 / 60.90 | 14 | 36 | |
| | Phenol 2-monoxygenase P1 component | dmpL/ <i>Pseudomonas Putida</i> | 5.2 /38.30 | 10 | 36 | |
| | phosphoribosylformylglycinamide synthase | purL/ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000 | 5.0/ 141.43 | 14 | 19 | |
| 21 | benzene monooxygenase oxygenase subunit | BmoA/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4.9 /58.17 | 20 | 31 | |
| | phenol 2-monoxygenase P3 component | dmpN/ <i>Pseudomonas Putida</i> | 6.0 / 60.90 | 10 | 28 | |
| | translation elongation factor G | fusA-1/ <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 | 5.1 /79.08 | 20 | 36 | |
| | phosphoribosylformylglycinamide synthase | purL/ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000 | 5.0 /141.43 | 9 | 12 | |
| | | | | | | |
| 22 | benzene monooxygenase oxygenase subunit | BmoA/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4.9 /58.17 | 25 | 45 | |
| | phenol 2-monoxygenase P3 component | dmpN/ <i>Pseudomonas Putida</i> | 6.0 / 60.90 | 12 | 33 | |
| | Phenol 2-monoxygenase P1 component | dmpL/ <i>Pseudomonas Putida</i> | 5.2 /38.30 | 9 | 35 | |
| | | | | | | |
| 23 | benzene monooxygenase oxygenase subunit | BmoA/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4.9 /58.17 | 30 | 52 | |
| | phenol 2-monoxygenase P3 component | dmpN/ <i>Pseudomonas Putida</i> | 6.0 / 60.90 | 13 | 31 | |
| | translation elongation factor G | fusA-1/ <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 | 5.1 /79.08 | 11 | 26 | |
| | | | | | | |
| 24 | benzene monooxygenase oxygenase subunit | BmoA/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4.9 /58.17 | 22 | 37 | |
| | phenol 2-monoxygenase P3 component | dmpN/ <i>Pseudomonas Putida</i> | 6.0 / 60.90 | 11 | 27 | |
| | | | | | | |
| | Phenol 2-monoxygenase P1 component | dmpL/ <i>Pseudomonas Putida</i> | 5.2 /38.30 | 12 | 44 | |
| | | | | | | |
| COG3519: Uncharacterized protein conserved in bacteria | | gji23472744/ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. syringae B728a | 6.8 /70.16 | 17 | 33 | |
| | pyruvate dehydrogenase, E1 component | aceE-2/ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000 | 5.5 /99.53 | 16 | 24 | |
| | sigma-54 dependent transcriptional regulator | PP3467/ <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 | 6.3 /69.56 | 14 | 36 | |
| | | | | | | |
| 25 | benzene monooxygenase oxygenase subunit | BmoA/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4.9 /58.17 | 18 | 36 | |
| | phosphoribosylformylglycinamide synthase | purL/ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000 | 5.0 /141.43 | 15 | 20 | |
| | DNA-directed RNA polymerase, beta subunit | rpoB/ <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 | 5.6 /151.55 | 16 | 18 | |
| | pyruvate dehydrogenase, E1 component | aceE-2/ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000 | 5.5 /99.53 | 13 | 24 | |

Πίνακας 3.3: πρωτεΐνες που περιέχονται στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που διαχωρίστηκαν με BN PAGE. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο κάθε συμπλόκου υπολογίστηκε με το λογισμικό Spectrum Mill MS Proteomics Workbench. Με έντονα γράμματα φαίνονται τα ένζυμα που προσδιορίστηκαν και σχετίζονται με το μεταβολισμό της φαινόλης.

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της φαινόλης πραγματοποιήθηκε δεύτερη διάσταση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης για να προσδιοριστούν οι πρωτεΐνες που περιέχονται σε κάθε πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Για τον ευκολότερο εντοπισμό των ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της φαινόλης, χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς το πρωτεϊνικό αποτύπωμα από καλλιέργεια γλυκόζης. Τα πρωτεϊνικά στίγματα αποκόπηκαν από την πηκτή, πρωτεολύθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο § 2.2.8 και αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS (βλ. § 2.2.9). Σε όλα τα επιπλέον πρωτεϊνικά σύμπλοκα ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στην αποικοδόμηση της φαινόλης (Εικόνα 3.9 Α. κόκκινα στίγματα). Ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας πρωτεϊνικά συμπλοκα όπως στην περίπτωση των DmpH και DmpE, DmpG και DmpF όπως και της DmoA με το εαυτο της. Σύγκριση των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών μετά από την διδιάστατη ηλεκτροφόρηση με αυτές που ταυτοποιήθηκαν στη μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση δείχνει την αύξηση του αριθμού των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών.



Σχήμα 3.9 Α: Δύο διαστάσεων (Blue Native PAGE / SDS PAGE) ηλεκτροφόρηση του κλάσματος με ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης μετά από τη διαβάθμιση ζάχαρης, στον οριζόντιο άξονα δίνονται τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα από την πρώτη διάσταση στα οποία αντιστοιχούν οι προσδιορισμένες ποσότητες.



Σχήμα 3.9 Β: Δύο διαστάσεων (Blue Native PAGE / SDS PAGE) ηλεκτροφόρηση του αντίστοιχου κλάσματος χωρίς ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης μετά από τη διαβάθμιση ζάχαρης, από καλλιέργεια γλοκόζης

| Αριθμός Ζώνης | Όρισμός πρωτεΐνης | Αρ. Καταχώρησης ή γονίδιο/ Οργανισμός | Προβλεπόμενα pI/MW(kD) | Πεπτιδία | Καλύψη Πεπτιδίων % |
|---------------|---|--|------------------------|----------|--------------------|
| 1 | 4-oxalocrotonate decarboxylase | dmpH/Pseudomonas putida | 5.1/28.52 | 7 | 31 |
| 2 | 2-hydroxyput -2,4 dienoate hydratase | dmpE/Pseudomonas putida | 5.2/28.13 | 11 | 56 |
| 3 | phenol 2-monoxygenase P3 component | dmpN/Pseudomonas Putida | 6.0/60.90 | 10 | 23 |
| 4 | acetaldehyde dehydrogenase (acetylating) (EC 1.2.1.10) | dmpF/Pseudomonas putida | 5.9/32.78 | 13 | 44 |
| 5 | 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase | dmpC/Pseudomonas Putida | 5.4 / 52.06 | 8 | 26 |
| 6 | catechol 2,3 dioxygenase | dmoB/Pseudomonas Putida | 5.6 / 35.58 | 7 | 39 |
| 7 | 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase | dmpG/Pseudomonas Putida | 5.9 / 36.49 | 8 | 30 |
| 8 | Phenol 2-monoxygenase P1 component | dmpL/Pseudomonas Putida | 5.2 / 38.30 | 16 | 51 |
| 9 | bmoB | bmoB/Pseudomonas aeruginosa | 6.4 / 98.10 | 4 | 47 |
| 10 | benzene monoxygenase oxygenase subunit 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.45) | BmoA/Pseudomonas aeruginosa | 4.9/ 58.17 | 19 | 35 |
| 11 | aldehyde dehydrogenase family protein | JC5779/Pseudomonas sp | 4.8 / 51.95 | 15 | 39 |
| 12 | | PP2680/Pseudomonas putida KT2440 | 5.5 / 55.23 | 13 | 44 |
| 13 | probable FMN oxidoreductase | PA5398/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.6 / 76.38 | 14 | 31 |
| 14 | COG0210: Superfamily I DNA and RNA helicases | ZP_00141777/Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14 | 5.7 / 76.09 | 11 | 22 |
| 15 | DNA gyrase subunit A | gyrA/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 4.9 / 101.23 | 19 | 24 |
| 16 | proline dehydrogenase | PutA /Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.8 / 11.62 | 15 | 27 |
| 17 | COG1157: Flagellar biosynthesis/type III secretory pathway ATPase | Psy5386/Pseudomonas syringae pv. syringae B728a | /8.8 / 50.86 | 16 | 34 |
| 18 | translation elongation factor G | fusA/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.2 / 77.44 | 18 | 33 |
| 19 | biotin carboxylase/biotin carboxyl carrier protein | PSPT05381/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.3 / 62.16 | 9 | 20 |
| 20 | PapB protein | papB/Pseudomonas aeruginosa | 5.0 / 73.65 | 24 | 42 |
| 21 | polyribonucleotide nucleotidyltransferase | pnp/Pseudomonas putida KT2440 | 5.1 / 75.22 | 22 | 39 |
| 22 | sulfate adenylyltransferase, subunit 1/adenylylsulfate kinase | cysNC/Pseudomonas putida KT2440 | 5.5 / 69.20 | 14 | 28 |
| 23 | probable oxidoreductase | PA5309/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 6.9 / 48.08 | 9 | 24 |
| 24 | COG2130: Putative NADP-dependent oxidoreductases | Psy6699/Pseudomonas syringae pv. syringae B728a | 5.9 / 36.30 | 11 | 46 |
| 25 | COG2897: Rhodanese-related sulfurtransferase | ZP_00141428/Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14 | 5.3 / 29.48 | 9 | 47 |
| 26 | hypothetical protein | PA0861/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.2 / 91.70 | 11 | 18 |
| 27 | chaperone-associated ATPase, putative | PP3316/Pseudomonas putida KT2440 | 5.8 / 103.92 | 24 | 26 |
| 28 | phosphoenolpyruvate synthase | ppsA/Pseudomonas putida KT2440 | 5.0 / 86.02 | 19 | 29 |
| 29 | isocitrate dehydrogenase | idh/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.8 / 81.84 | 16 | 27 |
| 30 | probable isocitrate lyase | PA2634/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.7 / 59.33 | 13 | 34 |
| 31 | heat shock protein HslV | PP5000/Pseudomonas putida KT2440 | 5.8 / 18.81 | 8 | 64 |
| 32 | adenylosuccinate lyase | purB/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.6 / 50.98 | 10 | 28 |
| 33 | argininosuccinate synthase | argG/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.3 / 45.51 | 9 | 30 |
| 34 | COG0105: Nucleoside diphosphate kinase | Psy2037/Pseudomonas syringae pv. syringae B728a | 5.4 / 14.93 | 5 | 29 |
| 35 | 3-dehydroquinate dehydratase, type II | AROQ/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 6.1 / 16.40 | 6 | 76 |
| 36 | argininosuccinate lyase | argH/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.5 / 51.91 | 17 | 37 |
| 37 | COG2718: Uncharacterized conserved protein | Psy3165/Pseudomonas syringae pv. syringae B728a | 6.8 / 48.77 | 15 | 48 |
| 38 | COG0137: Argininosuccinate synthase | gji23471208/Pseudomonas syringae pv. syringae B728a | 5.3 / 45.49 | 22 | 53 |
| 39 | phage terminase, large subunit, putative | PP3881/Pseudomonas putida KT2440 | 5.4 / 67.58 | 9 | 27 |
| 40 | glycosyl hydrolase, family 15 | PSPT02493/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.1 / 69.91 | 12 | 28 |
| 41 | HrpK [Pseudomonas syringae pv. syringae] | HrpK/Pseudomonas syringae pv. Syringae | 5.1 / 79.82 | 15 | 34 |
| 42 | TPA: putative type III effector HolP/PSyAG | DAA00387/Pseudomonas syringae pv. syringae B728a | 9.8 / 79.28 | 12 | 22 |
| 43 | phosphoenolpyruvate synthase | ppsA/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.0 / 86.26 | 30 | 43 |
| 44 | carbamoyl-phosphate synthase, large subunit | carB/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.2 / 118.77 | 15 | 19 |
| 45 | organic solvent tolerance protein OstA precursor | ostA/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.4 / 104.60 | 10 | 16 |
| 46 | ClpB protein | ClpB/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.3 / 95.10 | 27 | 30 |
| 47 | DNA helicase II | PP5352/Pseudomonas putida KT2440 | 5.9 / 81.79 | 16 | 25 |
| 48 | oxaloacetate decarboxylase, alpha subunit | OadA/Pseudomonas putida KT2440 | 5.4 / 65.89 | 21 | 39 |
| 49 | Glu-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A | PA4483/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.5 / 52.07 | 9 | 28 |
| 50 | malate synthase G | GlcB-2/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.9 / 80.38 | 14 | 23 |
| 51 | glutaryl-CoA dehydrogenase | gcdH/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.8 / 43.64 | 13 | 51 |
| 52 | chorismate synthase | aroC/Pseudomonas putida KT2440 | 6.1 / 39.14 | 12 | 44 |
| 53 | succinyl-CoA synthetase, beta subunit | sucC/Pseudomonas putida KT2440 | 5.8 / 41.51 | 24 | 63 |
| 54 | hypothetical protein | Paer360601/Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14 | 5.9 / 35.59 | 11 | 38 |
| 55 | glutathione synthetase | gshB/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.2 / 35.55 | 10 | 51 |
| 56 | succinyl-CoA synthetase alpha chain | sucD/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.8 / 30.65 | 15 | 56 |
| 57 | Dihydrodipicolinate reductase (DHPR) | dapB/Pseudomonas struzeri | 6.2 / 28.16 | 9 | 33 |
| 58 | COG4067: Uncharacterized protein conserved in archaea | ZP_00139426/Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14 | 9.7 / 24.57 | 9 | 52 |
| 59 | alkyl hydroperoxide reductase subunit C | ahpC/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.9 / 20.64 | 9 | 44 |
| 60 | enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase | fabI/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.4 / 28.07 | 9 | 29 |
| 61 | electron transfer flavoprotein beta-subunit | EtfB/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 9.0 / 26.42 | 11 | 45 |
| 62 | valyl-tRNA synthetase | valS/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.4 / 107.45 | 15 | 16 |
| 63 | lysyl-tRNA synthetase | lysS/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.0 / 57.04 | 17 | 43 |
| 64 | GMP synthase | GuaA/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.4 / 58.56 | 19 | 44 |
| 65 | COG1960: Acyl-CoA dehydrogenases | ZP_00138778/Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14 | 8.8 / 51.22 | 14 | 36 |
| 66 | COG3200: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase | Pflu1193/Pseudomonas fluorescens PFO-1 | 6.0 / 51.07 | 11 | 46 |
| 67 | ribosomal protein S1 Chaperone protein dnaK (Heat shock protein /0) (Heat shock /0 kDa protein) | gi28868956/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 4.9 / 62.43 | 12 | 24 |
| 68 | | dnaK/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 4.9 / 68.99 | 14 | 20 |

| Αριθμός Ζώνης | Όρισμός πρωτεΐνης | Αρ. Καταχώρησης ή γονίδιο/ Οργανισμός | Προβλεπόμενα pI/MW(kD) | Πεπτίδια | Κάλυψη Πεπτιδίων % |
|---------------|---|---|------------------------|----------|--------------------|
| 69 | dihydroxy-acid dehydratase | IIVD/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.7 / 65.88 | 13 | 32 |
| 70 | heat shock protein HtpG | HtpG/Pseudomonas putida KT2440 | 5.2 / 71.59 | 12 | 20 |
| 71 | WspE | WspE/Pseudomonas fluorescens | 5.0 / 83.50 | 19 | 39 |
| 72 | phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase | PtsP/Pseudomonas putida KT2440 | 5.4 / 83.49 | 15 | 30 |
| 73 | hypothetical protein | PSPTO4884/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 8.6 / 85.91 | 17 | 30 |
| 74 | malate synthase G | GlcB-2/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.9 / 80.38 | 19 | 32 |
| 75 | leucyl-tRNA synthetase | leuS/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.5 / 98.31 | 24 | 31 |
| 76 | probable transcarboxylase subunit | PA5435/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.6 / 66.31 | 21 | 39 |
| 77 | aspartate kinase, monofunctional class | gii28869048/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.2 / 44.50 | 10 | 33 |
| 78 | malic enzyme | PA5046/Pseudomonas aeruginosa PA01 | 5.1 / 45.75 | 11 | 26 |
| 79 | COG4067: Uncharacterized protein conserved in archaea | Paer380001/Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14 | 9.7 / 24.57 | 8 | 43 |
| 80 | COG0360: Ribosomal protein S6 | Psyr1537/Pseudomonas syringae pv. syringae B728a | 4.9 / 16.38 | 9 | 59 |
| 81 | aspartyl-tRNA synthetase | aspS/Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | 5.3 / 66.62 | 19 | 34 |
| 82 | methyl-accepting chemotaxis protein | NahY/Pseudomonas putida | 5.0 / 58.97 | 12 | 38 |

Πίνακας 3.4: Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μετά τη δεύτερη διάσταση της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης. Με έντονα γράμματα φαίνονται τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ικανότητα πολλών μικροοργανισμών να αποικοδομούν αρωματικές ενώσεις έχει μελετηθεί εκτενώς και τα περισσότερα από τα μεταβολικά μονοπάτια έχουν αναφερθεί [7, 8, 26]. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι συνθήκες καλλιέργειας καθώς και το μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης από ένα νέο βακτηριακό στέλεχος rhDV1 που ανήκει στο γένος *Pseudomonas*. Δοκιμάστηκαν πολλές διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης 10-1000 mg/l, κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας χωρίς να παρατηρείται αλλαγή στο μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της. Τελικά, για την μελέτη των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες που περιείχαν 200 mg/ml φαινόλη.

Τα αποτελέσματα μας, έδειξαν ότι το στέλεχος rhDV1 του γένους *Pseudomonas* ακολουθεί το *μέτα* μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης. Σε όλες τις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης που δοκιμάστηκαν (10-1000 mg/l), το θρεπτικό μέσο κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των κυττάρων είχε χρώμα κίτρινο-πράσινο, χαρακτηριστικό του σχηματισμού του ενδιάμεσου ημιαλδεΐδη του 2-ύδροξυ μουκονικού οξέως. Επίσης το εκχύλισμα κυττάρων εμφάνιζε απορρόφηση στα 375 nm που οφείλονταν στο σχηματισμό της ημιαλδεΐδης του 2-ύδροξυ μουκονικού οξέως. Ο σχηματισμός της ημιαλδεΐδης του 2-ύδροξυ μουκονικού οξέως, η οποία είναι ένα μεταβολικό ενδιάμεσο στο *μέτα* σχάσιμο της κατεχόλης οφείλεται στην επαγωγή της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης από την φαινόλη. Ένα εναλλακτικό μονοπάτι αποικοδόμησης του βενζοϊκού οξέως, όταν αυτό χρησιμοποιείται ως μοναδική πηγή άνθρακα, έχει μελετηθεί πρόσφατα από τους Loh και Chua [27]. Σύμφωνα με τους Loh και Chua το βενζοϊκό οξύ μπορεί να αποικοδομηθεί από ένα στέλεχος του γένους *Pseudomonas* ακολουθώντας το *όρθο* μεταβολικό μονοπάτι αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις ρύπου επάγεται το *μέτα* μεταβολικό μονοπάτι [27]. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι το βενζοϊκό από μόνο του δεν μπορεί να είναι ο επαγωγέας του *μέτα* μεταβολικού μονοπατιού. Αντίθετα δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στο μεταβολικό μονοπάτι που χρησιμοποιείται από τον οργανισμό *Acinetobacter radioresistences*, το οποίο χρησιμοποιεί το *όρθο* μεταβολικό μονοπάτι για την αποικοδόμηση της φαινόλης και του βενζοϊκού οξέως, ανεξάρτητα από την συγκέντρωση του ρύπου [28]. Τα δικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταβολή της συγκέντρωσης της φαινόλης δεν επηρεάζει το μεταβολικό μονοπάτι και κανένα ίχνος ταυτόχρονης παρουσίας του *όρθο* μεταβολικού μονοπατιού δεν βρέθηκε. Αυτές οι

παρατηρήσεις δείχνουν ότι ο ίδιος μεταβολίτης μπορεί να δράσει ως επαγωγέας διαφορετικών ενζύμων και κατά συνέπεια διαφορετικών μεταβολικών μονοπατιών στο ίδιο στέλεχος ή σε διαφορετικά κυτταρικά στελέχη.

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών που επάγονται από την φαινόλη καθώς και για την απομόνωση της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε φαινόλη ως αποκλειστική πηγή άνθρακα. Δύο βήματα καθαρισμού οδήγησαν στην απομόνωση του ενζύμου 2,3 διοξυγενάση της κατεχόλης, με ενζυμική ενεργότητα 20 U/mg και απόδοση 49%, παρόμοια με αυτή που επιτεύχθηκε κατά την απομόνωση της 1,2 διοξυγενάσης της κατεχόλης από τον οργανισμό *Acinetobacter radioresistens* [23, 29]. Το μοριακό βάρος της απομονωμένης πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση Tricine SDS-PAGE γύρω στα 32000 Da όμοιο με αυτό που προσδιορίστηκε για άλλες 2,3 διοξυγενάσες [30-32]. Στη συνέχεια έγινε χαρτογράφηση των πεπτιδίων της απομονωμένης πρωτεΐνης με χρήση φασματομετρίας MALDI-TOF. Επιπρόσθετα δοκιμάστηκε η χρήση γενικών προαγωγέων για την εύρεση των γονιδίων που αντιστοιχούν στα ένζυμα κλειδιά 1,2 διοξυγενάση της κατεχόλης και 2,3 διοξυγενάσης κατεχόλης, όμως η προσπάθεια δεν ήταν επιτυχής [33]. Έτσι η χαρτογράφηση των πεπτιδίων της πρωτεΐνης με φασματομετρία μάζας αποδείχθηκε πιο ευαίσθητη μέθοδος συγκρινόμενη με τη μελέτη του γενετικού υλικού με χρήση κατάλληλων προαγωγέων.

Η μέθοδος της δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρησης (1^η διάσταση ισοηλεκτρική εστίαση και 2^η διάσταση αποδιατακτική SDS PAGE), χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό ολόκληρου του κυτταρικού εκχυλίσματος. Η μέθοδος αυτή φάνηκε αναποτελεσματική στον προσδιορισμό των πρωτεϊνών που επάγονται κατά τον καταβολισμό του παρα-ύδροξυ βενζοϊκού οξέως [34]. Αυτό φανερώνει τα όρια των δυνατοτήτων της μεθόδου λόγω του ότι εκατοντάδες πρωτεϊνικά στίγματα από τα εκχυλιζόμενα κύτταρα εμφανίζονται στη πηκτή μετά τη δεύτερη διάσταση, καθιστώντας δύσκολο τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών που επάγονται από το πάρα βενζοϊκό οξύ. Γενικά όταν χρησιμοποιείται η δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση για τον προσδιορισμό όλων των πρωτεϊνών του κυττάρου, τότε τόσο ο αριθμός όσο και το είδος των πρωτεϊνών που μπορούν να αναλυθούν περιορίζουν τη δυναμική της μεθόδου. Επιπλέον στην πρώτη διάσταση της ισοηλεκτρικής εστίασης χρησιμοποιήθηκαν αμφολύτες φορείς, που καθιστούν τη διαδικασία ακόμα πιο ευαίσθητη λόγω της ποικιλίας στο εύρος του pH που σχηματίζεται, με αποτέλεσμα να διαφέρει το πρωτεϊνικό αποτύπωμα από διαδικασία σε διαδικασία. Για το λόγο αυτό στις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες κυττάρων από καλλιέργειες

φαινόλης και γλυκόζης εφαρμόστηκε υπερφυγοκέντρωση σε διαβάθμιση ζάχαρης ώστε να μειωθεί η πολυπλοκότητα του δείγματος και να συλλεχθεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση το κλάσμα που εμφανίζει ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης.

Πρόσφατα, έγινε πρωτεομική ανάλυση κυτταρικού εκχυλίσματος του οργανισμού *Acinetobacter radioresistens* από καλλιέργειες φαινόλης και βενζοϊκού [35]. Αν και 29 πρωτεϊνικά στίγματα προσδιορίστηκαν, μόνο 4 από αυτά ταυτοποιήθηκαν με N-τερματική αλληλουχία ως πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των ρύπων. Αντίθετα ένα υποσύνολο 19 πρωτεϊνών φαίνεται να υπερεκφράζεται στην ζώνη της διαβάθμισης ζάχαρης που εμφανίζει ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης που ηλεκτροφορήθηκε σε μία διάσταση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (σχήμα 3.6) Κατά την πρωτεομική ανάλυση πιστοποιήθηκαν πολλές πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μεταβολισμό της φαινόλης (πίνακας 3.2, σχήμα 3.7). Έτσι οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι η μονοδιάστατη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε συνδυασμό με μεθόδους εμπλουτισμού του δείγματος, είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος από την δυο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση του κυτταρικού εκχυλίσματος, όταν ο βασικός στόχος μας είναι ο προσδιορισμός επαγόμενων πρωτεϊνών. Συνοψίζοντας, συμπεραίνουμε ότι διαταραχές στο μεταβολισμό, που επάγονται όταν χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα κάποιος ρύπος, μπορούν να προκαλέσουν μεταβολές στην έκφραση και άλλων πρωτεϊνών που δεν σχετίζονται με το μεταβολισμό του ρύπου.

Για να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το λειτουργικό ρόλο των πρωτεϊνών που εκφράζονται όταν το βακτήριο καλλιεργείται σε θρεπτικό με μοναδική πηγή άνθρακα φαινόλη, πρέπει να εστιάσουμε το ενδιαφέρον μας στο πρώτο βήμα μετατροπής της φαινόλης σε κατεχόλη. Η φαινολική υδροξυλάση είναι υπεύθυνη για την μετατροπή της φαινόλης σε κατεχόλη. Στο μετά μεταβολικό μονοπάτι το ένζυμο αυτό αποτελείται από πολλές ετερομερείς υπομονάδες [36]. Οι υπομονάδες 1, 3 και 5 χαρακτηρίστηκαν. Τα ένζυμα που βρέθηκαν να σχετίζονται με το μεταβολισμό της φαινόλης είναι η αφυδρογονάση της ημιαλδεΐδης του 2-ύδροξυ-μουκονικού οξέως, η ταυτομεράση του οξαλοκροτονικού, η αποκαρβοξυλάση του οξαλοκροτονικού, 2-υδροξυπεντ-2,4-διεν υδρατάση, 4-ύδροξυ 2-οξοβαλερική αλδολάση, και η αφυδρογονάση της ακεταλδεΐδης, τα οποία οξειδώνουν τη φαινόλη σε πυροσταφυλικό και ακετυλ-CoA, τα οποία εισάγονται τελικά στο κύκλο του κιτρικού οξέως και αποδίδουν ενέργεια στον οργανισμό [37]. Επιπλέον η ταυτοποίηση της υδρολάσης της ημιαλδεΐδης του 2-ύδροξυ μουκονικού οξέως έδειξε ότι το 2-οξοπεντ 4-ενοϊκό σχηματίζεται απευθείας από την ημιαλδεΐδη του 2-ύδροξυ μουκονικού οξέως [38].

Συμπερασματικά, πρωτεομική ανάλυση μετά από κλασματοποίηση κυτταρικού εκχυλίσματος του στελέχους rhDV1 του γένους *Pseudomonas*, που καλλιεργήθηκε σε φαινόλη και γλυκόζη, οδήγησε στην ταυτοποίηση όλων των ενζύμων που συμμετέχουν στον καταβολισμό αρωματικών μορίων.

Για τον προσδιορισμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης, χρησιμοποιήθηκε η μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε συνδυασμό με δεύτερη διάσταση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης, μια διαδικασία γρήγορη και με μεγάλη επαναληψιμότητα. Κατά την μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση του κλάσματος με ενεργότητα 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης από τη διαβάθμιση ζάχαρης, χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο κλάσμα από καλλιέργεια γλυκόζης, ήταν εύκολος ο προσδιορισμός δεκαπέντε συμπλόκων που απαντώνται μόνο στο κλάσμα της φαινόλης (πίνακας 3.3). Ανάλυση αυτών των συμπλόκων, τα οποία μετά από αποκοπή των ζωνών, πρωτεόλυση και ανάλυση με φασματομετρία μάζας MALDI TOF MS επιβεβαιώθηκε ότι περιέχουν ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού. Παράλληλα μόνο πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος γενικά στον μεταβολισμό του κυττάρου εντοπίστηκαν στις περιοχές που δεν υπήρξε διαφοροποίηση. Αυτό δείχνει την μεγάλη ευαισθησία της φασματοσκοπίας μάζας σε σχέση με άλλες μεθόδους διότι είναι σε θέση να ταυτοποιήσει πρωτεΐνες σε μείγμα πρωτεϊνών.

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε σύμπλοκο μετά από πρωτεόλυση των ζωνών και ανάλυση στο φασματογράφο μάζας καθιστά δύσκολο τον προσδιορισμό πρωτεϊνών με χαμηλό μοριακό βάρος και μικρή αφθονία. Στις περιπτώσεις αυτές το πρωτεϊνικό αποτύπωμα που λαμβάνεται για τη συγκεκριμένη ζώνη περιέχει πεπτίδια των πρωτεϊνών αυτών σε πολύ μικρό, αναλογικά, ποσοστό. Έτσι η δεύτερη διάσταση της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης μπορεί να δώσει περισσότερες πληροφορίες για πρωτεΐνες των παραπάνω κατηγοριών.

Στη δεύτερη διάσταση της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης προσδιορίστηκαν αρχικά τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης χρησιμοποιώντας ως σημείο αναφοράς τη δεύτερη διάσταση της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης από καλλιέργεια γλυκόζης και τη πρώτη διάσταση της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης. Μετά από πρωτεόλυση των πρωτεϊνικών στιγμάτων και ανάλυση του πρωτεϊνικού αποτυπώματος με MALDI TOF, επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός όλων σχεδόν των ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της φαινόλης και περιγράφονται στο σχήμα 3.9 και περιέχονται στον πίνακα 3.4.

Η ανάλυση με MALDI TOF των πρωτεϊνικών συμπλόκων και των πρωτεϊνών που αυτά περιέχουν, με δεύτερη διάσταση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης, έδειξε ξεκάθαρα ότι η 4-οξαλοκροτονική αποκαρβοξυλάση (DmpH) σχηματίζει σύμπλοκο με την 2-οξοπεντ 4- διενοϊκή υδρατάση (DmpE) (σύμπλοκο 3). Επίσης η αφυδρογονάση της αλδεύδης σχηματίζει σύμπλοκα (14, 16) με την 4-ύδροξυ 2-οξοβαλερική υδρατάση. Η 2,3 της κατεχόλης φαίνεται να αλληλεπιδρά με την BmoA, την αφυδρογονάση της αλδεύδης.

Τα αποτελέσματα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης δείχνουν την ύπαρξη πρωτεϊνών που δεν σχετίζονται άμεσα με το μεταβολισμό της φαινόλης στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα των ενζύμων του μεταβολικού μονοπατιού. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πιθανές αλληλεπιδράσεις κάποιων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών με μεταβολικά ένζυμα, όμως είναι επίσης πιθανό στις πρωτεϊνικές ζώνες της πρώτης διάστασης να εμπεριέχονται περισσότερα από ένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα στα οποία δεν επιτεύχθει ο διαχωρισμός τους λόγω του ότι τα σύμπλοκα αυτά έχουν παρόμοια μοριακά βάρη.

Πρωτεϊνικά σύμπλοκα στη πρώτη διάσταση, είναι πιθανόν λόγω μεγάλης πρωτεϊνικής πυκνότητας να εμφανίζονται διαχυμένα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται 'σύρσιμο' στα πρωτεϊνικά στίγματα που περιέχονται σε αυτά και να μην βρίσκονται απόλυτα στην ίδια κατακόρυφο. Το γεγονός ότι κάποια από τα ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού βρίσκονται σε περισσότερα από ένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, όπως η υπομονάδα P3 της φαινολικής 2 μονοξυγενάσης δείχνει ότι τα ένζυμα αυτά μπορούν να αλληλεπιδρούν με πολλές άλλες πρωτεΐνες μία δεδομένη στιγμή.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η απομόνωση της 2,3 διοξυγενάσης της κατεχόλης με χρήση διαβάθμισης ζάχαρης και ανιοντικής χρωματογραφίας έδειξε ότι το νέο βακτηριακό στέλεχος *phDVI* του γένους *Pseudomonas* ακολουθεί το *μέτα* μεταβολικό μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης.

Στη συνέχεια με δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (IEF/SDS-PAGE) δοκιμάστηκε ο προσδιορισμός και των υπόλοιπων ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης. Λόγω μικρής επαναληψιμότητας της μεθόδου και πολυπλοκότητας του δείγματος, πραγματοποιήθηκε απλούστευση και εμπλουτισμός του δείγματος με ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού. Πραγματοποιήθηκε υπερφυγοκέντρωση σε διαβάθμιση ζάχαρης και κατόπιν μία διάσταση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιώντας σε όλη τη διαδικασία ως σημείο αναφοράς το αντίστοιχο δείγμα από καλλιέργεια γλυκόζης. Κατά τη διαδικασία αυτή προσδιορίστηκαν όλα τα κύρια ένζυμα του μεταβολισμού της φαινόλης και ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας.

Προσπάθεια προσδιορισμού πιθανών αλληλεπιδράσεων των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της φαινόλης έγινε με δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση (Blue Native/SDS PAGE) και ταυτοποίηση των ενζύμων με φασματομετρία μάζας. Όμοια στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς το αντίστοιχο δείγμα από καλλιέργεια γλυκόζης. Κατά τη διαδικασία αυτή εντοπίστηκαν τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που περιέχουν τα ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού. Είναι όμως δύσκολο να εξάγουμε κάποιο συμπέρασμα για το αν τα ένζυμα αυτά σχηματίζουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα και με άλλες υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες που βρίσκονται στην ίδια κατακόρυφο. Κατά τη δεύτερη διάσταση της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης. Η δυσκολία αυτή οφείλεται στην αδυναμία διαχωρισμού στη πρώτη διάσταση της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνικών συμπλόκων με μικρή διαφορά μοριακών βαρών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Anonymous. (1993) Chem. engineer. News 71, 38-82.
- [2] I.A. Kataeva and L.A. Golovleva. (1990) Methods Enzymol 188, 115-121.
- [3] L.K. Koebnik R, Van Gelder P. (2000) *Mol Microbiol.* 37, 239-53.
- [4] S.B. Buchanan SK, Venkatramani L, Xia D, Esser L, Palnitkar M, Chakraborty R, van der Helm D, Deisenhofer J. (1999) *Nat Struct Biol.* 6, 56-63.
- [5] B.H. Wilson, G.B. Smith and J.F. Rees. (1986) Environmental Science and Technology.
- [6] P.J. Evans, M. D.T. and Y. L.Y.Y. (1991) Applied and Environmental Microbiology 58, 2531-2535.
- [7] L.N. Ornston and R.Y. Stanier. (1966) J.Biol.Chem. 241, 3776-3786.
- [8] S. Harayama, M. Kok and E.L. Neidle. (1992) Annu.Rev.Microbiol. 46, 565-601.
- [9] J. Powlowski. (1994) Biodegradation 5, 219-236.
- [10] A. Mörsen and H.-J. Rehm. (1960) Applied Microbiology and Biotechnology 33, 206-212.
- [11] T. Ishida, A. Kita, K. Miki and M. Nozaki. (2002) International Congress Series 1233, 213-220.
- [12] T. Kobayashi, T. Ishida, K. Horiike, Y. Takahara, N. Numao, A. Nakazawa, T. Nakazawa and M. Nozaki. (1995) 117, 614-622.
- [13] M.W. Vetting and D.H. Ohlendorf. (2000) Structure With Folding & Design 8, 429-40.
- [14] J. Fenn, M. Mann, M. CK, W. SF and W. CM. (1989) Science 246, 64-71.
- [15] M. Karas and F. Hillenkamp. (1988) Analytical chemistry 60, 299-301.
- [16] B. Bjellqvist, K. Ek, P. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, R. Westermeier and W. Postel. (1982) J. Biochem Biophys Methods 6, 317-339.
- [17] J. Klose. (1975) Humangenetik 26, 231-243.
- [18] P. O'Farrell. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007-21.
- [19] P. Polymenakou, E. Stefanou and N.J. Panopoulos. (2003) Submitted.
- [20] H. Schaegger and G. von Jagow. (1987) Anal Biochem 166, 368-379.
- [21] J.E. Celis, H.H. Rasmussen, E. Olsen, P. Madsen, K. Dejgaard, P. Gromov, H.J. Hoffmann, M. Nielsen, A. Vassilev, O. Vintermyr, J. Hao, A. Celis, B. Basse, J.B. Lauriden, G.P. Ratz, A.H. Andersen, E. WALbum, I. Kjaergaard, M. Puype, J. Van Damme and J. Vandekerckhove. (1993) Electrophoresis 14, 1091-1198.

- [22] H. Schaeffer and J. von. (1991) *Anal Biochem* 199, 223-231.
- [23] F. Briganti, E. Pessione, C. Giunta and A. Scozzafava. (1997) *Febs Letters* 416, 61-64.
- [24] D. Pappin and J. Bleasby. (1993) *Current Biology* 3, 327-332.
- [25] Y.X. Chen, H. Liu and H.L. Chen. (2002) Submitted (MAY-2002) to the EMBL/GenBank/DDBJ database.
- [26] S. Harayama, M. Rekik, A. Wasserfallen and A. Bairoch. (1987) *Molecular & General Genetics* : Mgg 210, 241-7.
- [27] K.C. Loh and S.S. Chua. (2002) *Enzyme Microbial Technology* 30, 620-626.
- [28] E. Pessione and C. Giunta. (1997) *Microbios* 89, 105-17.
- [29] F. Briganti, E. Pessione, C. Giunta, R. Mazzoli and A. Scozzafava. (2000) *Journal of Protein Chemistry* 19, 709-716.
- [30] A. Kitayama, T. Achioku, T. Yanagawa, K. Kanou, i.M. Kikuch, H. Ueda, E. Suzuki, H. Nishimura, T. Nagamune and Y. Kawakami. (1996) *J. Ferment. Bioeng.* 82, 217-223.
- [31] I. Nordlund and V. Shingler. (1990) *Biochim Biophys Acta* 1049, 227-230.
- [32] I.S. You, D. Ghosal and I.C. Gunsalus. (1991) *Biochemistry* 30, 1635-1641.
- [33] A. Okuta, K. Ohnishi and S. Harayama. (1998) *Gene* 212, 221-228.
- [34] H.Y. Kahng, K. Cho, S.Y. Song, S.J. Kim, S.H. Leem and S.I. Kim. (2002) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295, 903-9.
- [35] G. Giuffrida, E. Pessione, R. Mazzoli, G. Dellavalle, C. Barrello, A. Conti and C. Giunta. (2001) *Electrophoresis* 22, 1705-1711.
- [36] E. Pessione, S. Divari, E. Griva, M. Cavaletto, G.L. Rossi, G. Gilardi and C. Giunta. (1999) *European Journal of Biochemistry* 265, 549-55.
- [37] V. Shingler, U. Marklund and J. Powlowski. (1992) *J.Bacteriol.* 174, 711-724.
- [38] H.G. Wessler, D.R. Hares, M.D. Poulter, J.A. Voss, H.S. Khedairy, R.F. Baker, E.E. Azadpour, X. Luo and R.C. Benjamin. (2002) Submitted (MAR-2002) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.