

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ PSEUDOMONAS ENTOMORHILA



ΝΤΑΛΑΜΠΥΡΑ ΕΛΕΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

Κοντού Μαρία : Λέκτορας Κλινικής Χημείας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Μόσιαλος Δημήτριος : Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σίσκος Αλέξανδρος : Διδάσκων με το Π/Δ 407/80

ΛΑΡΙΣΑ 2011

| ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ | ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ |
|---|--------------------|
| Κοντού Μαρία – Λέκτορας Κλινικής Χημείας | |
| Μόσιαλος Δημήτριος - Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων | |
| Σίσκος Αλέξανδρος – Διδάσκων με το Π/Δ 407/80, Επιστημονικός συνεργάτης Ι.Ι.Ε.Α.Α | |

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| • Ευχαριστίες..... | 5 |
| • Περίληψη | 6 |
| • A. Θεωρητικό μέρος | |
| 1. Περιγραφή <i>Pseudomonas entomophila</i> | 7 |
| 2. Παθογένεια..... | 8 |
| 3. Αμυντικοί μηχανισμοί της <i>Drosophila melanogaster</i> | 9 |
| 4. Διαδικασία μόλυνσης της <i>Drosophila melanogaster</i> από την <i>Pseudomonas entomophila</i> | 10 |
| 5. Ρυθμιστικό σύστημα GacS/GacA..... | 10 |
| i. Ρυθμιστικό σύστημα GacS/GacA στην <i>Pseudomonas entomophila</i> | 11 |
| 6. Πρωτεομική..... | 12 |
| i. Εφαρμογές πρωτεομικής..... | 13 |
| ii. Εργαλεία πρωτεομικής..... | 13 |
| • Σκοπός..... | 16 |
| • B. Πειραματικό μέρος | |
| 1. Γενικό διάγραμμα ροής πειραμάτων..... | 17 |
| 2. Υλικά..... | 18 |
| 3. Μέθοδοι | |
| 1. Υγρή καλλιέργεια <i>Pseudomonas entomophila</i> | 19 |
| 1. Μέτρηση μικροβιακής ανάπτυξης..... | 20 |
| 2. Απομόνωση κυττάρων από την καλλιέργεια..... | 20 |
| 2. Διάρρηξη κυτταρικής μεμβράνης..... | 20 |
| 3. Επεξεργασία υπερκειμένου καλλιέργειας..... | 21 |
| 4. Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός Bradford.. | 21 |
| 5. Κατακρήμιση/καθαρισμός εξωκυττάρων πρωτεϊνών | |
| 1. TCA/ Ice-cold acetone..... | 23 |
| 2. Phenol/Ice-cold acetone..... | 24 |
| 3. Ammonium sulfate..... | 26 |
| 4. TCA/DOC..... | 27 |
| 5. Chloroform/Methanol..... | 27 |
| 6. Κατακρήμιση/καθαρισμός ενδοκυττάρων πρωτεϊνών | |
| 2D clean-up kit..... | 28 |
| 7. Πρώτη διάσταση-ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)..... | 29 |
| 8. Δεύτερη διάσταση-SDS ηλεκτροφόρηση | |
| πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)..... | 31 |
| 9. Χρώση πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο (Silver stain).... | 33 |

| | |
|---|----|
| 10.Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant blue..... | 34 |
| 11.In-gel Digestion..... | 35 |
| • Γ. Αποτελέσματα | |
| 1. Ενδοκυττάρια πρωτεΐνες..... | 36 |
| 2. Εξωκυττάρια πρωτεΐνες..... | 42 |
| • Δ. Συζήτηση..... | 44 |
| • Βιβλιογραφία..... | 50 |

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία μου έδωσε τη δυνατότητα να ζήσω και να εξοικειωθώ με τις απαιτητικές συνθήκες ενός ερευνητικού εργαστηρίου βιοεπιστημών. Απέκτησα γνώσεις και εμπειρίες που θα μου φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μετέπειτα επαγγελματική μου πορεία.

Αισθάνομαι, λοιπόν, την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, κ. Κοντού Μαρία, κ. Μόσιαλο Δημήτρη και κ. Σίσκο Αλέξανδρο. Αρχικά για την εμπιστοσύνη αλλά και την πίστη που έδειξαν στο πρόσωπο μου για την εκπόνηση του θέματος, όπως και για την καταλυτική βοήθεια και καθοδήγηση κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών. Επιπλέον το επιστημονικό προσωπικό του ερευνητικού κέντρου «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» και ιδιαίτερως την κ. Σαμιωτάκη Μαρτίνα για την πολύτιμη συνεργασία τους.

Δε θα μπορούσα βέβαια να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Αναλυτικής Βιοχημείας για την υπέροχη συνύπαρξη, τη στήριξη και τη βοήθεια τους που αλάφρυναν το δύσκολο καθημερινό πρόγραμμα. Βέβαια ξεχωριστή θέση κατέχουν η Καντσάνδη Νατάσα για τη συνεχή βοήθεια και τη μετάδοση των γνώσεων πάνω στο συγκεκριμένο θέμα ως προκάτοχος του, η Καρούλια Ζωή και η Βούρκου Εργίνα για την συμπαράσταση και στήριξη τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους που έκαναν υπομονή, στάθηκαν δίπλα μου και πίστεψαν σε μένα, δίνοντας μου δύναμη και όρεξη να συνεχίσω μπροστά σε κάθε δυσκολία.

Περίληψη

Οι ανάγκες της σύγχρονης κοινωνίας για την αντικατάσταση προϊόντων και εφαρμογών που επιβαρύνουν το περιβάλλον ή τον άνθρωπο έκαναν επιτακτική την εντατική έρευνα νέων οργανισμών.

Πρόσφατες προσπάθειες οδήγησαν στον χαρακτηρισμό ενός νέου βακτηρίου του γένους *Pseudomonas*, το *Pseudomonas entomophila* το οποίο έχει φυσικό ξενιστή το έντομο *Drosophila melanogaster*. Η ικανότητα του να θανατώνει τον ξενιστή του καθώς και λάβρες άλλων εντόμων, το καθιστά ένα πολύ υποσχόμενο μοντέλο για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παθογένειας καθώς και την ανάπτυξη βιοελέγχου κατά διαφόρων εντόμων.

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη του βακτηρίου για τη μελέτη των παραπάνω αλληλεπιδράσεων. Ένα άγριου τύπου, το οποίο μετά από κατάποση, μολύνει και σκοτώνει την *Drosophila melanogaster* και ένα μεταλλαγμένο, στο οποίο είχε αντικατασταθεί ο γονιδιακός τόπος του ρυθμιστικού συστήματος *GacS /GacA* με ένα τρανσποζόνιο *Tn5* που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, με αποτέλεσμα την απώλεια δυνατότητας μόλυνσης του εντόμου.

Επιλέχθηκε να μελετηθεί το σύνολο των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων πρωτεϊνών των δύο στελεχών με μεθόδους πρωτεομικής, διότι το ρυθμιστικό σύστημα *GacS /GacA* που υπάρχει στο άγριο στέλεχος ευθύνεται για την έκφραση ενός αριθμού γονιδίων που κωδικοποιούν *snRNAs*, υπεύθυνων για τη δέσμευση πρωτεϊνών που λειτουργούν ως *μεταφραστικοί καταστολείς* αρκετών *mRNA* γονιδίων. Ο ρόλος δηλαδή αυτού του συστήματος είναι να επιτρέπει την έκφραση γονιδίων που φυσιολογικά καταστέλλονται από τις πρωτεΐνες-καταστολείς. Πιθανόν, λοιπόν, στο άγριο στέλεχος το ρυθμιστικό σύστημα να ελέγχει θετικά την μετάφραση *mRNA* γονιδίων που παράγουν μολυσματικούς παράγοντες. Αντίθετα στο μεταλλαγμένο στέλεχος η παραγωγή αυτών των μολυσματικών παραγόντων να καταστέλλεται λόγω της απουσίας αυτού του θετικού ελέγχου.

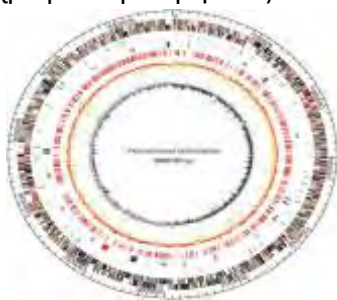
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Περιγραφή *Pseudomonas entomophila*

Βακτηριακό στέλεχος του γένους *Pseudomonas*. Απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε μόλις το 2001 με σύγκριση της ακολουθίας 16S rRNA του με 16S rRNA ακολουθίες στη βάση δεδομένων BLAST. Πήρε το όνομα του από τις μοναδικές εντομοπαθογόνες ιδιότητες, χαρακτηριστικό που μοιράζεται με το στέλεχος *Pseudomonas rutida* (Vodovar et al 2005).

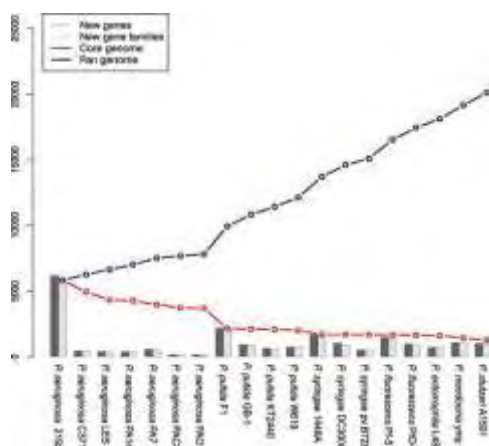
Πρόκειται για ένα Gram αρνητικό, χημειοργανοτροφικό και αερόβιο βάκιλλο με πολικά μαστίγια. Ο μεταβολισμός του στηρίζεται στο μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης, το μονοπάτι Entner-Doudoroff, τον κύκλο τρικαρβοξυλικών οξέων και ένα μη ολοκληρωμένο, λόγω της απουσίας της 6-φωσφοφρουκτοκινάσης, Embden-Meyerhof-Parnas μονοπάτι.

Το γονιδίωμα του *Pseudomonas entomophila* αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα μήκους 5.888.780 νουκλεοτιδίων. Μετά από τη σύγκριση με τις προσδιορισμένες αλληλουχίες τεσσάρων ειδών *Pseudomonas*, αποδείχθηκε ότι είναι στενά συγγενικό με το στέλεχος *Pseudomonas rutida*, αφού έχει τα περισσότερα από τα καταβολικά του γονίδια. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί τις ευπροσάρμοστες μεταβολικές του ιδιότητες καθώς και το οικολογικό του περιβάλλον, το νερό, το έδαφος και τη ριζόσφαιρα.

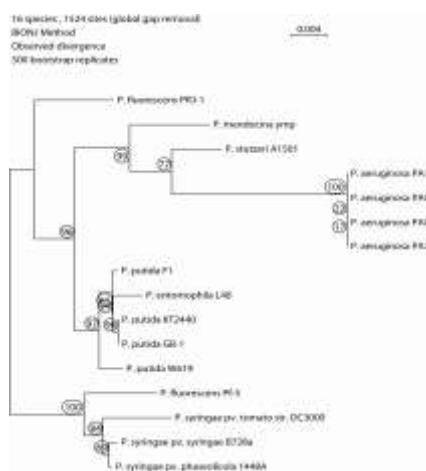


Εικόνα 1: κυκλικό χρωμόσωμα *Pseudomonas entomophila*

Ανάμεσα στις 5.160 κωδικεύουσες αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν 3.446 γονίδια (67%) στα οποία έχει αποδοθεί μια συγκεκριμένη λειτουργία. Σύγκριση του γενώματος, μέσω της βάσης δεδομένων BLAST, με πέντε ταυτοποιημένα είδη *Pseudomonas* αποκάλυψε μια ομάδα 2.065 γονιδίων που αποτελούν το πυρηνικό γονιδίωμα του *Pseudomonas*. Στηριζόμενοι σε αυτή την ανάλυση ταυτοποιήθηκαν 1.002 γονίδια, μοναδικά για το στέλεχος *Pseudomonas entomophila* (Vodovar et al 2006).



Εικόνα 2 : Pan/core γένωμα *Pseudomonas*



Εικόνα 3 : 16S φυλογενετικό δέντρο γένους *Pseudomonas*

2. Παθογένεια

Η *Pseudomonas entomophila* είναι το πρώτο βακτήριο αυτού του γένους που έχει αποδειχθεί πως είναι φυσικά παθογόνο για την *Drosophila Melanogaster*. Μετά από την ανάλυση και των 28 στελεχών που καλύπτουν το είδος, μόνο 4 από αυτά-εκτός του *Pseudomonas entomophila*-ήταν μολυσματικά. Ωστόσο κανένα δεν μπόρεσε να προκαλέσει σημαντικό ποσοστό θνησιμότητας, δείχνοντας έτσι την ιδιαίτερη αλληλεπίδραση μεταξύ *Drosophila Melanogaster*- *Pseudomonas entomophila* που σίγουρα δεν είναι αποτέλεσμα μόνο των γενικών μεταβολικών ιδιοτήτων του είδους *Pseudomonas* (Vodovar N. et al 2005).

Η *Pseudomonas entomophila* έχει την ικανότητα να μολύνει την *Drosophila melanogaster* μετά από τη δια στόματος πρόσληψή του. Επάγεται θνησιμότητα στο στάδιο της προνύμφης σε ποσοστό περίπου 70% μέσα σε 24 ώρες μετά τη μόλυνση, ενώ το υπόλοιπο 30% τελικά υποκύπτει στο στάδιο της ενήλικης νύμφης (Vodovar N. et al 2005).

Το εντυπωσιακό όσον αφορά τις στρατηγικές μόλυνσης αυτού του στελέχους είναι πως ενώ με την πρόσληψη του ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και την έκφραση παραγόντων για την καταπολέμηση του, (Liehl P. et al 2006) παρόλα αυτά οι ξενιστές υποκύπτουν στη μόλυνση και τελικά πεθαίνουν. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει πως η *P.entomophila* έχει αναπτύξει στρατηγικές «διαφυγής» του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή ή καταφέρνει να ανατρέψει τις άμυνες του με την πυροδότηση μιας συστημικής-δευτερογενούς απόκρισης.

Λόγω της δυνατότητας επιβίωσης και μετά από την ανοσοαπόκριση η παρουσία του στελέχους στο έντερο του ξενιστή έχει ως αποτέλεσμα την μαζική καταστροφή των κυττάρων του εντέρου. Ηλεκτρονικές και οπτικές μικρογραφίες του εγκάρσιου τμήματος του μεσεντέρου έδειξαν πως η μόλυνση από την *P.entomophila* προκαλεί μια ισχυρή διαταραχή στο επιθήλιο του εντέρου, τόσο στη βλέννη όσο και στις μικρολάχνες. Η παρουσία γονιδίων στο γένωμα του που κωδικοποιούν πρωτεάσες, άλλων που εμπλέκονται γενικά στο μεταβολισμό και γονιδίων που κωδικοποιούν συστατικά του κυτταροσκελετού που ρυθμίζονται από το μονοπάτι JNK, εξηγεί τις τροποποιήσεις στις οποίες υποβάλλονται τα κύτταρα του εντέρου εξαιτίας της παρουσίας των βακτηρίων (Vodovar N. et al 2005).

Ένα ακόμα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της μολυσματικότητας του *P.entomophila* είναι η παύση πρόσληψης τροφής, στρατηγική που χρησιμοποιείται από αρκετά εντομοπαθογόνα βακτήρια για να διακόψουν τις περισταλτικές κινήσεις του εντέρου του εντόμου που μπορεί να επιφέρουν την εξάλειψή τους (Liehi P. et al 2006).

Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του *P.entomophila* παίζουν τρεις εντομοκτόνες τοξίνες, τύπου TccC, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια PSEEN2485, PSEEN2697, PSEEN2788, τα οποία βρίσκονται μόνο σε εντομοπαθογόνα εντεροβακτήρια, όπως το *Serratia entomophila*, *Xenorhabdus nematophilus* και *Photorhabdus luminescens* (Waterfield et al 1998), (Bowen et al 1998).

Επιπλέον είναι το μοναδικό στέλεχος του γένους που εκκρίνει μια βακτηριακή αιμολυσίνη, μια εξωτοξίνη, που προκαλεί λύση των κυττάρων. Παρόμοια δράση έχουν και οι λιπάσες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια PSEEN709, PSEEN1065, PSEEN2195 και PSEEN3432 (Vodovar et al 2006).

Μια ακόμα πολύ σημαντική ομάδα εξωκυττάρων βιολογικά ενεργών ουσιών που συμβάλλουν στην παθογονικότητα των βακτηριακών ειδών είναι οι πρωτεάσες. Στο *P. entomophila* ταυτοποιήθηκαν τρία γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεάσες σερίνης, τα PSEEN3027, PSEEN3028 και PSEEN4433, καθώς και το γονίδιο PSEEN1550 που κωδικοποιεί μια αλκαλική πρωτεάση, ομόλογης της ArgA που εμπλέκεται σε πολλές μολυσματικές διαδικασίες σε διάφορα είδη (Miyoshi et al 2000).

Ωστόσο το γονιδίωμα της *P. entomophila* δεν περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα ικανά να διαρρήξουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρατήρηση πως το συγκεκριμένο στέλεχος δεν είναι παθογόνο για τα φυτά (Vodovar et al 2006).

Συνοψίζοντας, λοιπόν, μετά από γενετικές αναλύσεις η μολυσματικότητα της *P. entomophila* είναι πολυπαραγοντική με μια ξεκάθαρη διαφοροποίηση μεταξύ των παραγόντων εκείνων που ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα της *D. melanogaster* και εκείνων που ευθύνονται για την παθογένεια.

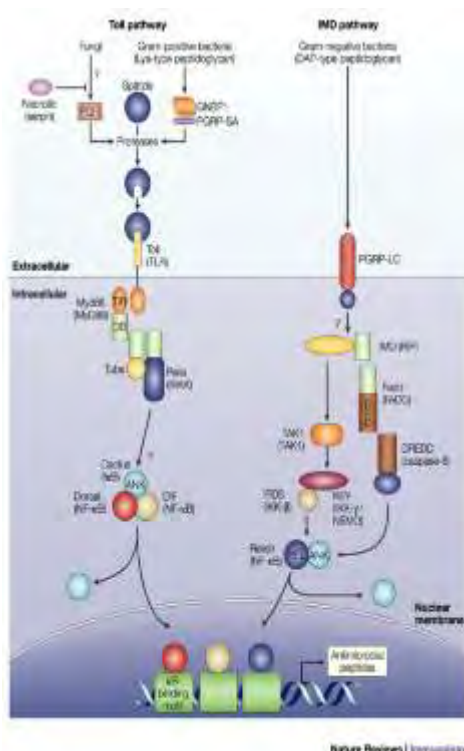
3.Αμυντικοί μηχανισμοί της *Drosophila melanogaster*

Η *Drosophila melanogaster* διαθέτει ένα πολύπλοκο αμυντικό σύστημα αποτελούμενο από πολλαπλές στρατηγικές, όπως φυσικούς φραγμούς-εμπόδια μαζί με την τοπική και συστηματική χημική ανοσοαπόκριση, αλλά και αρκετούς παράγοντες.

Πρώτη γραμμή άμυνας είναι το επιθήλιο της τραχείας και του πεπτικού σωλήνα που παράγουν αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs) και δραστικές μορφές οξυγόνου. Στη συνέχεια ειδικά αιματοκύτταρα συμμετέχουν στη φαγοκυττάρωση και τον εγκλεισμό των ξένων εισβολέων σε κυστίδια. Τελικά στο λιπαρό σώμα, ένα λειτουργικό ισοδύναμο του ήπατος των θηλαστικών, λαμβάνει χώρα η χυμική ανοσοαπάντηση και ακόμα μεγαλύτερη σύνθεση AMPs.

Γενετικές αναλύσεις έδειξαν πως τα μονοπάτια Toll και Imd ρυθμίζουν την έκφραση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων AMPs. Το μονοπάτι Toll παίζει κύριο ρόλο στην άμυνα των κατά Gram θετικών βακτηριακών και μυκητιακών μολύνσεων, ενώ το μονοπάτι Imd μεσολαβεί στις περισσότερες αποκρίσεις των μολύνσεων από Gram αρνητικά βακτήρια (Liehl et al 2006).

Το Imd μονοπάτι ρυθμίζει την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένου και αυτών που κωδικοποιούν AMPs και ειδικά των Diptericin και Attacin που συντίθενται μετά από βακτηριακή μόλυνση του πεπτικού σωλήνα του εντόμου (Tzou P. et al 2002).

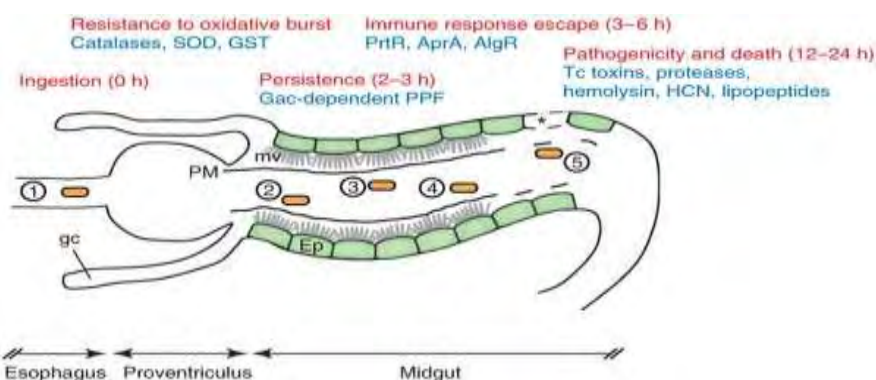


Εικόνα 4 : Οργάνωση Toll και Imd μονοπατιών για την άμυνα κατά των Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων αντίστοιχα.

Υπερέκφραση είτε του ενός είτε του άλλου αντιμικροβιακού πεπτιδίου προσφέρει προστασία ενάντια στο *P. entomophila*. Συγκεκριμένα το Dipteracin παίζει ουσιώδη ρόλο στην άμυνα ενάντια στα Gram αρνητικά βακτήρια και η έκφραση του στο πρόσθιο έντερο παρέχει πολύ γρήγορα έναν αποτελεσματικό φραγμό, επιτρέποντας στο έντομο να εξουδετερώνει ταχύτατα τα περισσότερα βακτήρια μετά την κατάποση τους (Liehl et al 2006).

4. Διαδικασία μόλυνσης της *Drosophila melanogaster* από την *Pseudomonas entomophila*

Οι παθογόνες ιδιότητες του βακτηριακού στελέχους εκδηλώνονται αφού πρώτα καταποθεί από τον ξενιστή και τελικά φτάσει στο έντερο, όπου ασκεί τη μολυσματική του δράση. Κατά τη διαδικασία της μόλυνσης υπάρχουν πέντε διαφορετικά και ευδιάκριτα στάδια:



Εικόνα 5 : Βήματα αλληλεπίδρασης μεταξύ *Pseudomonas entomophila* και *Drosophila melanogaster*

- i. Δια στόματος πρόσληψη του *P. entomophila* από την *D. Melanogaster* και κατάποση της διαμέσου του οισοφάγου.
- ii. Ενεργοποίηση των βακτηριακών γονιδίων ανθεκτικότητας σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες που προκαλείται στον ξενιστή εξαιτίας της εισβολής του παθογόνου.
- iii. Μετανάστευση της *P. entomophila* στο έντερο του εντόμου-ξενιστή.
- iv. Ενεργοποίηση της πρωτογενούς ανοσοαπόκρισης του ξενιστή με την έκκριση παραγόντων για την αντιμετώπιση της εισβολής, όπως τα AMPs. Έκκριση της μεταλλοπρωτεάσης AprA από το βακτήριο ώστε να διαφύγει από την ανοσοαπόκριση του ξενιστή.
- v. Παθογένεια και θάνατος που προέρχεται από σημαντικές τροποποιήσεις της φυσιολογίας του μεσεντέρου, όπως καταστροφή των μικρολαχνών, των κυττάρων και την αποδιοργάνωση της περιτροφικής μήτρας (Vodovar N. et al 2006).

5. Ρυθμιστικό σύστημα GacS/ GacA

Σε πολλά γ-πρωτεοβακτήρια έχει βρεθεί ένα καλά διατηρημένο ρυθμιστικό σύστημα, το οποίο ρυθμίζει θετικά την έκφραση ενός έως πέντε γονιδίων

διαφορετικών οικογενειών που κωδικοποιούν sRNAs, τα οποία χαρακτηρίζονται από ένα επαναλαμβανόμενο μονόκλωνο μοτίβο GGA.

Το μοτίβο GGA είναι απαραίτητο για τη δέσμευση μικρών διμερών πρωτεϊνών που δεσμεύουν RNA και ανήκει σε μια μικρή συντηρημένη οικογένεια που ονομάζεται RsmA (CsrA). Αυτές οι πρωτεΐνες, που επίσης βρίσκονται και σε άλλα βακτηριακά είδη εκτός από τα γ-πρωτεοβακτήρια, λειτουργούν ως μεταφραστικοί καταστολείς αρκετών mRNAs, όταν αυτά περιέχουν ένα Rsm δεσμευτικό άκρο στην αλληλουχία ή κοντά στην αλληλουχία Shine-Dalgarno και επιπρόσθετα δεσμευτικά άκρα στην 5' μη μεταφραζόμενη οδηγό αλληλουχία του mRNA (Larouge K. et al 2007).

Αλληλεπιδράσεις με RsmA / CsrA πρωτεΐνες προάγουν σχηματισμό μιας ANGGAN θηλιάς. Αυτή η διαμόρφωση παρεμποδίζει τη δέσμευση των υπομονάδων 30S των ριβοσωμάτων στο mRNA και συνεπώς την έναρξη της μετάφρασης.

Τα βακτήρια αποκρίνονται στην αλλαγή του περιβάλλοντος με την προσαρμογή των κυτταρικών επιπέδων των mRNAs, tRNAs, rRNAs και sRNAs. Παρόλο που η ρύθμιση της έναρξης της μεταγραφής είναι κρίσιμη σε αυτήν την προσαρμογή, ένας επακόλουθος έλεγχος της έναρξης της μετάφρασης μπορεί να είναι εξίσου σημαντικός. Έχει αποδειχθεί πως δύο μεγάλες ομάδες από sRNAs επηρεάζουν τον ρυθμό της έναρξης της μετάφρασης στα βακτήρια (Majdalani et al 2005).

Τα sRNAs της πρώτης τάξης επιδρούν με την 5'-οδηγό αλληλουχία του mRNA στόχου και σχηματίζουν ζεύγη βάσεων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις παρεμβαίνουν στη δέσμευση του ριβοσώματος όταν λαμβάνουν χώρα κοντά ή στην αλληλουχία Shine-Dalgarno του mRNA.

Τα sRNAs της δεύτερης τάξης, τα οποία έχουν μια υψηλή συγγένεια για τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNA της οικογένειας RsmA / CsrA μπορούν να αποκαταστήσουν τη μεταφραστική καταστολή που προκαλείται από αυτές τις πρωτεΐνες με το διαχωρισμό τους (Majdalani et al 2005), (Storz et al 2005), (Babitzke et al 2007).

Στο γένος *Pseudomonas*, τα sRNAs τα οποία δεσμεύουν τις πρωτεΐνες RsmA/CsrA παράγονται κάτω από τον θετικό έλεγχο του ρυθμιστικού συστήματος GacS/GacA. Τα γονίδια στόχος που ρυθμίζονται μεταφραστικά από το σύστημα αυτό διαφέρουν σημαντικά μεταξύ διαφόρων βακτηρίων και στο γένος *Pseudomonas* είναι υπεύθυνα για την παραγωγή παραγόντων που εμπλέκονται στην παθογένεια (Kay E. et al 2006).

5.i. Ρυθμιστικό σύστημα GacS/GacA στην *Pseudomonas entomophila*

Όταν βακτήρια του γένους *Pseudomonas* αναπτύσσονται σε μεγάλες πληθυσμιακές πυκνότητες εκκρίνουν σηματοδοτικά μόρια τα οποία ενεργοποιούν το σύστημα GacS/GacA (Dubuis et al 2007). Τα σήματα αυτά φαίνεται να μη σχετίζονται με γνωστά αισθητικά σήματα, όπως η N-ακυλο-ομοσερίνη της λακτόνης και η χημική δομή τους δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Τα σήματα αυτά αλληλεπιδρούν με την κινάση-αισθητήρα GacS και λειτουργούν ως αυτοεπαγωγείς του συστήματος Gac /Rsm, μέσω ενός θετικού επανατροφοδοτικού ελέγχου (Zuber et al 2003).

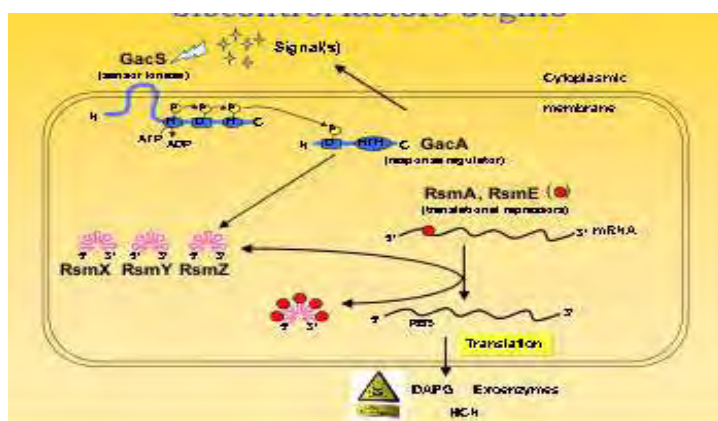
Μετά την ενεργοποίηση της η κινάση GacS φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το ρυθμιστή απόκρισης GacA. Η ενεργοποιημένη-φωσφορυλιωμένη μορφή της GacA φαίνεται πως δεσμεύεται σε ένα συντηρημένο στοιχείο, το GacA box, που βρίσκεται

ανοδικά των προαγωγέων των sRNA γονιδίων (Valdverve et al 2003), (Kay et al 2006), (Lenz et al 2005), (Kulkarni et al 2006). Μετά την ενεργοποίηση του το σύστημα GacS /GacA ενεργοποιεί την έκφραση των sRNA γονιδίων rsmX, rsmY και rsmZ στο *Pseudomonas*. Με την παραγωγή των sRNAs, το σηματοδοτικό μονοπάτι Gac/Rsm ρυθμίζει την παραγωγή πρωτεϊνών, των οποίων η έκφραση φυσιολογικά καταστέλλεται από τις πρωτεΐνες RsmA/CsrA. Τα sRNAs στη συνέχεια αναστέλλουν τη μεταγραφή των δικών τους γονιδίων με την αλλοστερική αναστολή της φωσφορυλίωσης της GacA ή την αναστολή της πρόσδεσης της στο GacA box (Valdverve et al 2003), (Kay et al 2006), (Heeb et al 2002).

Η εναλλακτική υπόθεση είναι ότι ο καταρράκτης Gac/Rsm καταστέλλει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή παραγόντων που συμβάλλουν στην παθογένεια (Wei et al 2001), (Sanchez-Contreras et al 2002).

Ωστόσο η κύρια υπόθεση είναι πως οι πρωτεΐνες RsmA/CsrA λειτουργούν ως ενεργοποιητές, οι οποίοι πιθανόν να ρυθμίζουν αρνητικά κάποιους αναστολείς ή ασκούν κάποια επιρροή στη σταθερότητα του mRNA (Wei et al 2001).

Μεταλλάγματα βακτηρίων που στερούνται του ρυθμιστικού συστήματος GacS/GacA εμφανίζουν μειωμένη παραγωγή παθογόνων παραγόντων και μειωμένη μολυσματικότητα σε σχέση με αυτά του αγρίου τύπου (Ahmer et al 1999), (Rahme et al 2000).



Εικόνα 6 : σηματοδοτικό μονοπάτι του ρυθμιστικού συστήματος GacS/GacA στην *Pseudomonas aeruginosa*

6. Πρωτεομική

Οι πρωτεΐνες είναι ζωτικά συστατικά των ζωντανών οργανισμών, αφού συμμετέχουν στα φυσιολογικά μεταβολικά μονοπάτια των κυττάρων. Κάθε πρωτεΐνη έχει τη δική της αλληλουχία αμινοξέων, συγκεκριμένο μοριακό μέγεθος και ηλεκτρικό φορτίο. Οποιαδήποτε αλλαγή σε αυτά τα χαρακτηριστικά επηρεάζει άμεσα τη βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης. Ωστόσο η γνώση και μόνο της αμινοξικής αλληλουχίας δε συνεπάγεται και γνώση της τρισδιάστατης δομής, της λειτουργίας και της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών.

Το πρωτέομα, όρος που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1994 από τον τότε φοιτητή διδακτορικού Marc Wilkins, δεν είναι στατικό χαρακτηριστικό των κυττάρων. Αντιπροσωπεύει τη λειτουργική έκφραση των πληροφοριών, τροποποιείται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, το αναπτυξιακό στάδιο και τις

συνθήκες του περιβάλλοντος. Δεν είναι στατικό, είναι μεγάλο και πολύπλοκο λόγω παραγόντων όπως το εναλλακτικό μάτισμα, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, η χρονική ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης και άλλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών (Wilkins et al 1996).

Η πρωτεομική, η νέα προσέγγιση μελέτης των βιολογικών συστημάτων, ασχολείται με την ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνών ενός οργανισμού, δηλαδή του πρωτεόματος. Χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό πολύπλοκων εξειδικευμένων τεχνικών πρωτεϊνικής βιοτεχνολογίας, βιοφυσικής και βιοπληροφορικής με κύριο σκοπό την ανίχνευση και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών σε κάθε τύπο κυττάρου, ιστού ή οργανισμού, την εξακρίβωση της αλληλεπίδρασης τους και την περιγραφή των δικτύων μεταγωγής μηνυμάτων και την εύρεση της τρισδιάστατης δομής τους.

6.1. Εφαρμογές πρωτεομικής

Η πρωτεομική βρίσκει εφαρμογές σε τέσσερις τομείς, την εξόρυξη πληροφορίας, το προφίλ πρωτεϊνικής έκφρασης, τη χαρτογράφηση δικτύου πρωτεϊνών και την χαρτογράφηση των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων.

Η εξόρυξη πληροφορίας αφορά την ταυτοποίηση όλων ή όσο το δυνατόν περισσότερων πρωτεϊνών σε ένα δείγμα.

Το προφίλ πρωτεϊνικής έκφρασης είναι η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών σε ένα συγκεκριμένο δείγμα σε σχέση με μια κατάσταση του οργανισμού ή του κυττάρου (διαφοροποίηση, ανάπτυξη, κατάσταση ασθένειας) ή σε σχέση με την έκθεση του σε χημικό, φυσικό ερέθισμα. Η πιο κοινή εφαρμογή είναι η διαφορική ανάλυση όπου συγκρίνονται δύο καταστάσεις ενός συστήματος. Για παράδειγμα φυσιολογικά και παθολογικά κύτταρα ή ιστοί συγκρίνονται για να καθοριστούν ποιες πρωτεΐνες εκφράζονται διαφορετικά στη μια κατάσταση σε σχέση με την άλλη, ιδιαίτερης σημασίας πληροφορία στη φαρμακοθεραπεία.

Η χαρτογράφηση δικτύου πρωτεϊνών, μια από τις πλέον φιλόδοξες και ισχυρές εφαρμογές της πρωτεομικής, επικεντρώνεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, όπως τη μετάδοση σημάτων και σύνθετων μονοπατιών, σε ζωντανά συστήματα οργανισμών.

Στην χαρτογράφηση των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων γίνεται προσπάθεια να οριστεί πώς και που τροποποιούνται οι πρωτεΐνες κυρίως από φορτισμένα ή μη μόρια που δημιουργούνται από περιβαλλοντικά και ενδογενή χημικά. Αυτή η προσέγγιση παρέχει στην επιστημονική κοινότητα νέους δρόμους για το ερώτημα του πώς η χημική τροποποίηση του πρωτεόματος επηρεάζει τη λειτουργία των ζωντανών οργανισμών.

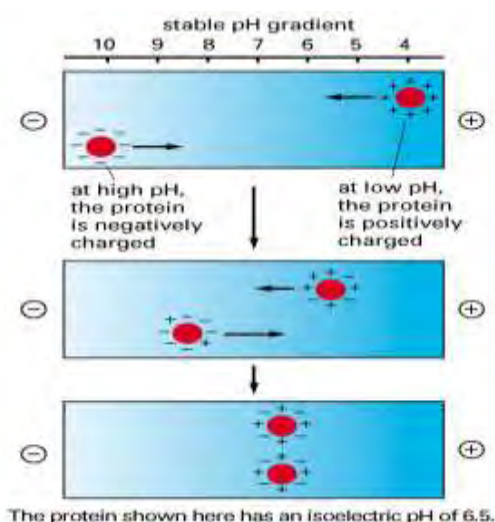
6.2. Εργαλεία πρωτεομικής

Η ανάλυση του πρωτεόματος είναι αρκετά πολύπλοκη υπόθεση δεδομένου των πολλαπλών τροποποιήσεων και διαφοροποιήσεων των πρωτεϊνών. Οπότε η χρήση ειδικών μεθόδων και εργαλείων είναι επιτακτική.

Το πρώτο εργαλείο είναι η τεχνολογία του πρωτεϊνικού διαχωρισμού που εξυπηρετεί δύο σκοπούς. Πρώτον, αναλύει τις σύνθετες πρωτεΐνες σε μικρότερες ομάδες πρωτεϊνών. Δεύτερον, επιτρέπει τη σύγκριση μεταξύ δύο δειγμάτων σε διαφορετικά πρωτεϊνικά επίπεδα. Δύο τέτοιες τεχνικές είναι η εστίαση

ισοηλεκτρικού σημείου (isoelectric focusing-IEF) και η SDS ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων ακριλαμιδίου (SDS-PAGE), ο συνδυασμός των οποίων αποτελεί ισχυρό εργαλείο της πρωτεομικής.

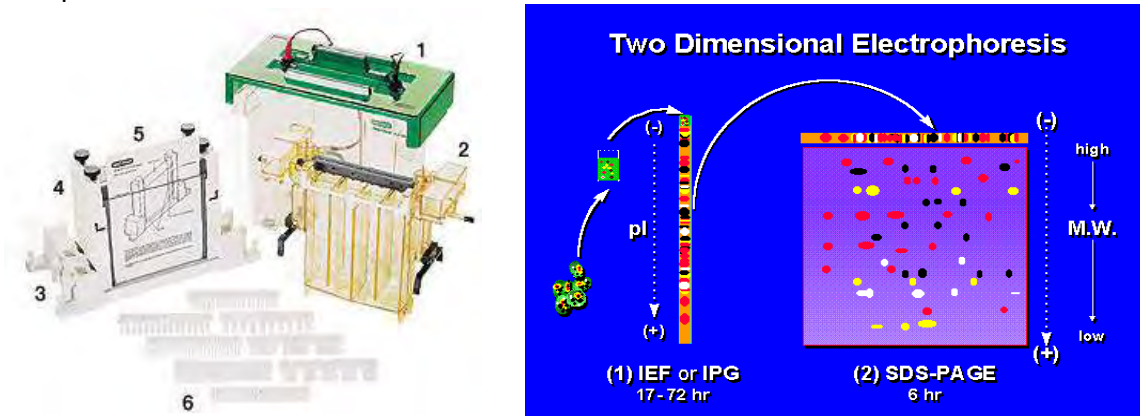
Αναλυτικά, στην ισοηλεκτρική εστίαση, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI), δηλαδή στο pH που το ολικό ηλεκτρικό φορτίο τους ισούται με μηδέν. Οι διαφορές στο pI των πρωτεϊνών, που καθορίζονται από τον αριθμό και τον τύπο των φορτισμένων ομάδων σε αυτές, είναι η βάση της ισοηλεκτρικής εστίασης. Υπάρχει μια σημαντική διακύμανση ανάμεσα στο pI διαφόρων πρωτεϊνών, αλλά συνήθως κυμαίνονται σε ένα εύρος pH 3-12, με την πλειοψηφία αυτών να κυμαίνονται μεταξύ pH 4-7. Το μέσο που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών είναι το IPG strip, μια στενή ταινία πηκτική πολυακρυλαμίδης με βαθμίδωση pH, που επιτυγχάνεται με αμφολύτες. Όταν τοποθετηθεί μια πρωτεΐνη σε αυτό το μέσο και εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο, τότε αρχικά θα κινηθεί προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο μέχρις ότου φτάσει στο σημείο εκείνο όπου η τιμή του pH ισούται με το pI της και σταματά να μετακινείται παραμένοντας σταθερή σε αυτό για αρκετά μεγάλο διάστημα. Ο ρυθμός μετακίνησης εξαρτάται από τη δύναμη του πεδίου, το ολικό φορτίο της πρωτεΐνης, το μέγεθος της, το σχήμα, καθώς και την ιοντική ισχύ, το ιζώδες και τη θερμοκρασία του μέσου.



Εικόνα 7 : Απεικόνιση λειτουργίας ισοηλεκτρικής εστίασης και συσκευές που χρησιμοποιούνται για αυτή.

Στην SDS ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Η ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το ολικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα τους, καθώς και την ιοντική ισχύ, το ιζώδες και τη θερμοκρασία του μέσου στο οποίο τα μόρια κινούνται. Το μέσο αποτελείται από δύο πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) που είναι τοποθετημένο πάνω από το δεύτερο πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Περιέχουν τον αποδιατακτικό παράγοντα SDS (θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο), ο οποίος δεσμεύεται στην «ραχοκοκαλιά» της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με υδροφοβικούς δεσμούς, αποδιατάσσοντας την και δημιουργώντας ένα επίμηκες σύμπλοκο SDS-πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Έτσι η ηλεκτροφορητική ικανότητα του πηκτώματος

εξαρτάται μόνο από τα μοριακό βάρος του πεπτιδίου, ο προσδιορισμός του οποίου καθίσταται εφικτός με τον παραλληλισμό αποτελεσμάτων SDS-PAGE πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (μάρτυρες). Παρόλα αυτά υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί. Οι πολύ βασικές ή με μεγάλο βαθμό γλυκοσυλίωσης πρωτεΐνες, επειδή δεσμεύουν το SDS μόνο στο πρωτεϊνικό τους τμήμα, κινούνται πιο αργά στο πήκτωμα με αποτέλεσμα να ταυτοποιούνται λανθασμένα. Παρόμοιο πρόβλημα μπορεί να προκύψει και με ορισμένες πρωτεΐνες που δεν αποδιατάσσονται πλήρως παρουσία SDS.

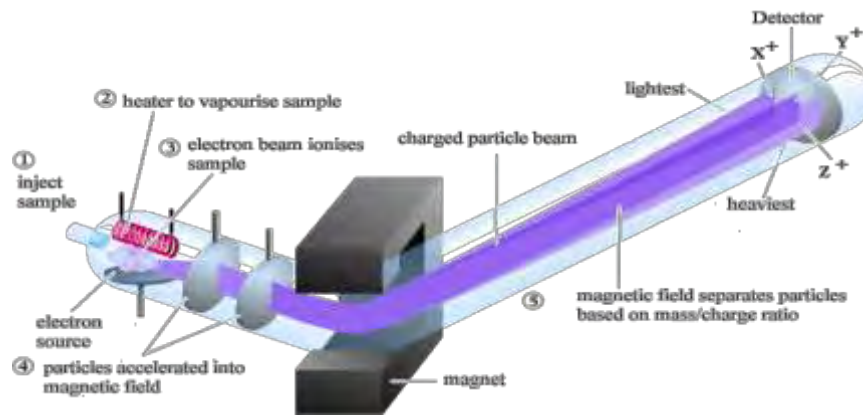


Εικόνα 8 : Συσκευές για την 2D ηλεκτροφόρηση και απεικόνιση διαδικασίας

Το δεύτερο εργαλείο είναι η φασματοσκοπία μάζας (mass spectrometry-MS). Η βασική ιδέα λειτουργίας είναι η αναγνώριση των μορίων βάσει μετρήσεων ακριβείας του λόγου μάζας (m)/φόρτισης τους (z). Η τεχνολογία για αυτό το εργαλείο έχει βελτιωθεί σημαντικά. Έχει αναπτυχθεί υψηλή ευαισθησία, ενώ αναλύεται με ακρίβεια το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών και ακόμα περισσότερο των πεπτιδίων. Αυτό το στοιχείο επαρκεί για την ταυτοποίηση της πρωτεΐνης, με την προϋπόθεση να έχει αλληλουχηθεί το γονιδίωμα από το οποίο προέρχεται. Εάν κάτι τέτοιο δε συμβαίνει τότε η απομονωμένη πρωτεΐνη είναι δυνατόν να αλληλουχηθεί με διαδοχικούς κύκλους φασματοσκοπίας μάζας. Σε αυτή την περίπτωση, μετά τον αρχικό προσδιορισμό του μοριακού βάρους, γίνεται πέψη με θρυψίνη προς σχηματισμό πεπτιδίων. Τα πεπτίδια αυτά διαχωρίζονται κατά τον πρώτο κύκλο της φασματοσκοπίας μάζας και στη συνέχεια το καθένα από αυτά διασπάται με ιονικό βομβαρδισμό. Τα θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται σε ένα δεύτερο κύκλο φασματοσκοπίας μάζας. Στη συνέχεια τα δεδομένα από τις μάζες των πεπτιδίων μπορούν να αναζητηθούν απευθείας στις Βάσεις Δεδομένων για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών.



Εικόνα 9 : Φασματογράφος μάζας



Εικόνα 10 : Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας του φασματογράφου μάζας

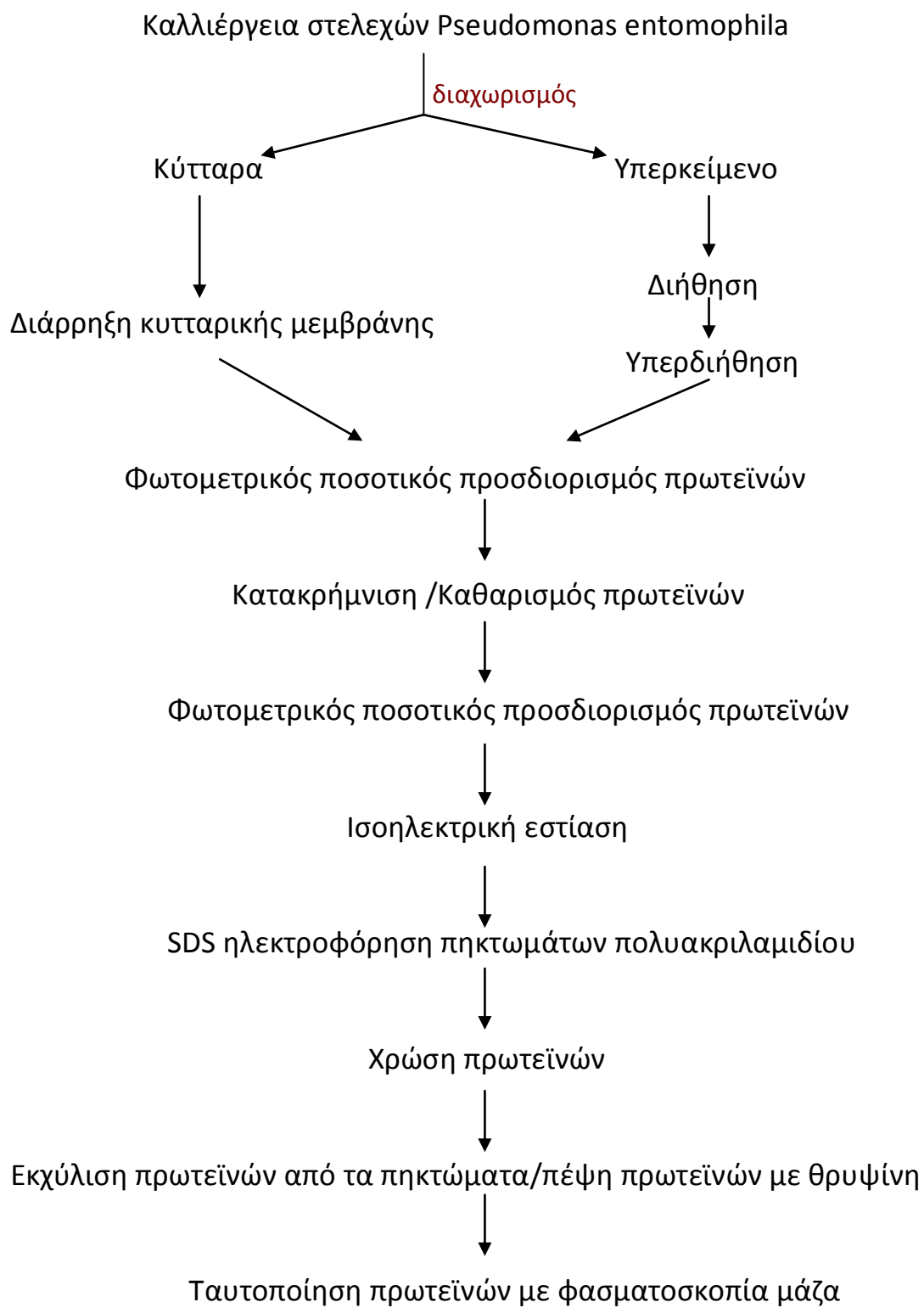
Το τρίτο εργαλείο είναι οι Βάσεις Δεδομένων, οι οποίες παρέχουν έναν πλήρη κατάλογο όλων των πρωτεϊνών που έχουν βρεθεί στους διάφορους οργανισμούς. Συγκρίνεται η μετρούμενη μάζα κάθε πεπτιδίου που προκύπτει από την πέψη των μελετούμενων πρωτεϊνών με τη μάζα των πεπτιδίων της Βάσης. Αν υπάρχει ταιρίασμα τότε από το πεπτίδιο της Βάσης μπορεί να προσδιοριστεί η πρωτεΐνη από την οποία προήλθε και με αυτόν τον τρόπο να ταυτοποιηθεί η άγνωστη πρωτεΐνη. Όμως ένα πεπτίδιο συνήθως δε συναντάται μόνο σε μια πρωτεΐνη, για το λόγο αυτό τα πολλαπλά ταιριάσματα από μια πρωτεΐνη είναι απαραίτητα για την ταυτοποίηση της. Επίσης εάν στη μετρούμενη μάζα του πεπτιδίου συνεκτιμηθεί και το εύρος λάθους τότε ο αριθμός των ταιριασμάτων αυξάνεται. Βέβαια ο όγκος των δεδομένων σε μια Βάση είναι μεγάλος και αυτό έχει σαν επακόλουθο την ανάγκη για ισχυρούς και γρήγορους αλγόριθμους που τμηματοποιούν τις πρωτεΐνες της Βάσης και υπολογίζουν τη μάζα των πεπτιδίων που προκύπτουν. Μετά την εισαγωγή απαραίτητων στοιχείων, το σύστημα φιλτράρει την Βάση και εκτελεί τους απαραίτητους υπολογισμούς στις πρωτεΐνες που απομένουν. Τα πεπτίδια της Βάσης που ταιριάζουν με τις μετρούμενες μάζες ταξινομούνται σύμφωνα με τη μάζα τους και αυτά που ανήκουν στο επιλεγμένο εύρος λάθους αποτελούν τα «hits». Στη συνέχεια για κάθε «hit» υπολογίζεται μια τιμή/σκορ η οποία χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της πρωτεΐνης που ταυτοποιείται.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των μηχανισμών παθογένειας ενός πρόσφατα χαρακτηρισμένου στελέχους του γένους *Pseudomonas*, το *Pseudomonas entomophila*. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ένα στέλεχος αγρίου τύπου το οποίο μολύνει και σκοτώνει την *Drosophila melanogaster* και ένα μεταλλαγμένο το οποίο έχει χάσει την ικανότητα μόλυνσης στο έντομο. Οι μηχανισμοί παθογένειας μελετήθηκαν με τη μέθοδο της πρωτεομικής, όπου μελετήθηκαν όλες οι ενδοκυττάρειες και εκκρινόμενες πρωτεΐνες των δύο στελεχών με στόχο την εύρεση διαφορών ανάμεσα τους που πιθανόν προσδίδουν την ικανότητα μολυσματικότητας.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Γενικό διάγραμμα ροής πειραμάτων



2. Υλικά

Κύτταρα

Στοκ γλυκερόλης κυττάρων *Pseudomonas entomophila* αγρίου τύπου

Στοκ γλυκερόλης κυττάρων *Pseudomonas entomophila* μεταλλάγματος *GacS /GacA*

Αντιδραστήρια

Acetone (ChemLab)

Acetic acid (ChemLab)

Acetonitrile (sds)

Agarose (Biorad)

Ammonium sulfate (SIGMA)

Ammonium bicarbonate (SIGMA)

APS (Panreac)

Bis acrylamide (Biorad)

Bromophenol blue (Panreac)

Bradford reagent (Biorad)

Chaps (AppliChem)

Coomassie R-250 (SIGMA)

DTT (MERCK)

Formic acid (ChemLab)

Glycerol (AppliChem)

Glycine (AppliChem)

HPLC H₂O (ChemLab)

Hydrochloric acid (ChemLab)

Iodioacetamide (SIGMA-ALDRICH)

IPG buffer (Biorad)

LB-medium (AppliChem)

Mercaptoethanol (SIGMA-ALDRICH)

Methanol (ChemLab)

Mineral oil (AppliChem)

Potassium chloride (SIGMA)

PMSF (AppliChem)

Potassium dihydrogen phosphate (SIGMA)

Potassium ferricyanide (AppliChem)

Silver nitrate (SIGMA)

Sodium carbonate (MERCK)

Sodium chloride (SIGMA)

SDS (MERCK)

Sodium hydrogen phosphate (SIGMA)

Sodium thiosulfate (AppliChem)

Temed (AppliChem)

Tetracycline (MERCK)

Thiourea (AppliChem)

TCA (MERCK)

Tris (MERCK)

Urea (AppliChem)

Water saturated phenol-mix (AppliChem)

Kit

2D clean-up (163-2130 Biorad)

Ένζυμα

Nuclease mix (80-6501-42 GE Healthcare)

Trypsin (T6567 SIGMA-ALDRICH)

Ειδικά αντιδραστήρια

IPG strips 17cm pH3-10 (163-2007), pH4-7(163-2008), pH5-8(163-2011) (Biorad)

IPG strips 7cm pH3-10 (163-2000), pH4-7(163-2001) (Biorad)

Unstained marker (161-0363 Biorad)

Αναλώσιμα

Protein concentrator VIVASPIN 20 10.000kD cut-off (Sartorius Stedim Biotech)

3. Μέθοδοι

3.1. Υγρή καλλιέργεια *Pseudomonas entomophila*

Σημείωση: Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η αποστείρωση του θρεπτικού υλικού και των αναλώσιμων που χρησιμοποιούνται, όπως falcon, tips, κωνικές φιάλες.

Οι υγρές καλλιέργειες γίνονται σε δύο βήματα. Πρώτα φτιάχνουμε τις λεγόμενες μικρές καλλιέργειες (preculture) και έπειτα εμβολιάζουμε μεγάλες καλλιέργειες με ποσότητα των μικρών.

Σημείωση: Ο λόγος των κυττάρων/ θρεπτικό υλικό (inoculum) πρέπει να είναι $\approx 1/1000$.

- Precultures (μικρές καλλιέργειες)

-Για το στέλεχος του αγρίου τύπου (wt) χρησιμοποιούμε 10ml LB-medium, στα οποία γίνεται ενοφθαλμισμός 10μl κυττάρων από stock γλυκερόλης*.

Επώαση στους 30 °C, 210 rpm για 20-24h.

-Για το στέλεχος του μεταλλάγματος (mut) χρησιμοποιούμε 10ml LB-medium, στα οποία γίνεται ενοφθαλμισμός 10μl κυττάρων από stock γλυκερόλης και επιπλέον **10μg/ml ή 30μg/ml tetracycline****

Επώαση στους 30 °C, 210 rpm για 24-48h.

Σημείωση: Εάν δε χρησιμοποιηθούν άμεσα οι μικρές καλλιέργειες (precultures) για τον εμβολιασμό των μεγάλων, τότε καλό θα ήταν να αποθηκευτούν στους 4°C. Συντηρούνται για διάστημα τεσσάρων ημερών.

- Μεγάλες καλλιέργειες

-Για το στέλεχος του αγρίου τύπου (wt) χρησιμοποιούμε 500 ml LB-medium, στα οποία γίνεται ενοφθαλμισμός 5ml κυττάρων από precultures.

Επώαση στους 30 °C, 210 rpm για 20-24h.

-Για το στέλεχος του μεταλλάγματος (mut) χρησιμοποιούμε 500ml LB-medium, στα οποία γίνεται ενοφθαλμισμός 5ml κυττάρων από precultures και επιπλέον **10μg/ml ή 30μg/ml tetracycline**

Επώαση στους 30 °C, 210 rpm για 24-48h.

Σημείωση: Για να μεγαλώσουν τα κύτταρα θα χρειαστούν και ικανοποιητικό αερισμό, οπότε καλό είναι να γεμίζουμε τις κωνικές φιάλες μόνο στο $\frac{1}{4}$ της χωρητικότητας τους.

***glycerol stock**

- 1,5ml preculture σε αποστειρωμένο erpendorf
- Φυγοκέντρηση στις >12000rpm για 2min - πετάω υπερκείμενο
- 1ml LB+20%glycerol (αποστειρωμένο)
- Vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα
- Επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου
- Αποθήκευση στους -80°C

****Tetracycline stock 30mg/ml**

- 120mg tetr σε 4ml methanol
- Vortex μέχρι να διαλυθεί
- Πέρασμα από φίλτρο 0,45cm
- Aliquots σε αποστειρωμένα erpendorfs

- Τυλίγω με αλουμινόχαρτο(φωτοευαίσθησία)
- Αποθήκευση στους -20°C

3.1.1. Μέτρηση μικροβιακής ανάπτυξης

Η αύξηση των αποικιών γίνεται ορατή με την εμφάνιση θολερότητας στην υγρή καλλιέργεια. Ο μικροβιακός πληθυσμός προσδιορίζεται παρακολουθώντας τις μετρήσεις της συγκέντρωσης της βιομάζας, η οποία εκφράζεται με την οπτική πυκνότητα του εναιωρήματος της καλλιέργειας των μικροοργανισμών ανά ml καλλιέργειας. Γίνεται μέτρηση της πυκνότητας του εναιωρήματος της καλλιέργειας σε ένα φασματοφωτόμετρο στα 600nm σε τακτά χρονικά διαστήματα (ανά 30min ή 1h) μετά από 12h με 16h επώασης και η βιομάζα εκφράζεται σε μονάδες οπτικής πυκνότητας OD. Κάθε φορά το δείγμα μας εξετάζεται με αραιώση 1/10 (100ml καλλιέργειας +900ml LB-medium), ενώ ως τυφλό 1ml LB-medium.

Οι μετρήσεις συνεχίζονται έως ότου σταθεροποιηθεί η οπτική πυκνότητα των καλλιέργειών, δηλαδή φτάσουν στο *rick* της εκθετικής φάσης, λίγο πριν τη στατική. Η τιμή αυτή για το στέλεχος του αγρίου τύπου κυμαίνεται από 3,4-4, ενώ για το στέλεχος του μεταλλάγματος από 2,4-2-8.

3.1.2. Απομόνωση κυττάρων από την καλλιέργεια

Μετά την καλλιέργεια των στελεχών θα πρέπει να απομονώσουμε τα κύτταρα από το υπερκείμενο, ώστε να μπορέσουμε να εξετάσουμε τις ενδοκυττάρια πρωτεΐνες και αυτές που εκκρίνει το βακτήριο, δηλαδή τις εξωκυττάρια, αντίστοιχα.

Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντρηση στις 3500rpm για 30min στους 4°C.

Τελικά προκύπτει ίζημα που αποτελεί τον βακτηριακό πληθυσμό και το υπερκείμενο που περιέχει τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες καθώς και προϊόντα μεταβολισμού των κυττάρων.

Έπειτα κάνουμε 4-5 πλύσεις του ιζήματος με PBS 1x, φυγοκεντρώντας για 15min κάθε φορά στις 3.500rpm και προσθέτουμε PMSF (αναστολέας πρωτεασών σερίνης) 1mM στο υπερκείμενο για να προστατευτούν οι πρωτεΐνες από την αποικοδόμηση.

Σημείωση: Εάν δε χρησιμοποιηθούν άμεσα τα κύτταρα ή το υπερκείμενο πρέπει να αποθηκευτούν στους -80 °C

3.2. Διάρρηξη κυτταρικής μεμβράνης

- Το ίζημα τοποθετείται σε πάγο και προστίθεται σε αυτό PMSF 5 mM και Tris-HCl pH 7,5
- Εκτίθεται σε υπέρηχους 10-12 φορές ανά 10sec για να επιτευχθεί η ρήξη της μεμβράνης

Σημείωση: Η κεφαλή του μηχανήματος δεν πρέπει να ακουμπάει στα τοιχώματα του falcon κατά τη διάρκεια του σπασίματος. Επιπλέον ο σχηματισμός υπερβολικού αφρού δεν είναι επιθυμητός.

- Φυγοκέντρηση στις 4.000rpm για 30min στους 4°C. Το υπερκείμενο αποτελεί το δείγμα μας που απαιτεί περαιτέρω καθαρισμό (3.5.)
- Πριν από οποιοδήποτε καθαρισμό ενδείκνυται η χρήση μείγματος νουκλεάσης για την απομάκρυνση του DNA και RNA που έχουν απελευθερωθεί από τα σπασμένα κύτταρα.

3.3.Επεξεργασία υπερκειμένου καλλιέργειας

Το υπερκείμενο που συλλέξαμε μετά την διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης, περιέχει τις εξωκυττάρειες πρωτεΐνες του βακτηρίου, προϊόντα μεταβολισμού του βακτηρίου, τμήματα της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς και συστατικά του κυττάρου, τα οποία απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον μετά την λύση της μεμβράνης. Γι' αυτό το λόγο η διαδικασία που ακολουθείται για τον καθαρισμό του πρωτεϊνικού δείγματος θα είναι πιο περίπλοκη, εξαιτίας της παρουσίας συστατικών, όπως λιπίδια, πολυσακχαρίτες, φωσφολιπίδια, τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν από το πρωτεϊνικό δείγμα διότι παρεμβαίνουν και ελαττώνουν την αποδοτικότητα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης.

Πρωτόκολλο

- Προσθέτουμε PMSF 1mM αμέσως μετά την απομόνωση κυττάρων-υπερκειμένου (3.1.2.)
- Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 1h στους 4°C

Σημείωση: Το ίζημα που σχηματίζεται είναι πολύ ασταθές και επαναδιαλύεται εύκολα, οπότε θα πρέπει να γίνει πολύ γρήγορα η συλλογή του υπερκειμένου.

- **Διήθηση** του πρωτεϊνικού δείγματος με ειδικά φίλτρα διαμέτρου 0,45μm και έπειτα 0,20μm για να απομακρυνθούν τα υπόλοιπα συστατικά του υπερκειμένου από τις πρωτεΐνες
- **Φυγοκεντρική υπερδιήθηση** για τη συμπύκνωση του δείγματος με ειδικά φίλτρα (protein concentrators) 10.000kD στις 5.000rpm στους 4°C. Ο χρόνος δεν είναι καθορισμένος καθώς ο ρυθμός απομάκρυνσης των διαφόρων μορίων ποικίλει, οπότε συνεχής έλεγχος είναι απαραίτητος
- Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας το πρωτεϊνικό δείγμα βρίσκεται πάνω από την επιφάνεια του φίλτρου, συλλέγεται και ακολουθεί κάποια διαδικασία κατακρήμνισης/καθαρισμού (3.5.)

3.4.Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός δείγματος σε πρωτεΐνες πραγματοποιείται με την μέθοδο Bradford. Οι πρωτεΐνες αντιδρούν με το αντιδραστήριο σε περίσσεια και σχηματίζεται μια έγχρωμη ένωση. Σε ορισμένο εύρος συγκεντρώσεων η ποσότητα της σχηματιζόμενης έγχρωμης ένωσης είναι ανάλογη της ποσότητας της αρχικής ουσίας. Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος, είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με την πρωτεϊνική συγκέντρωση, με την χρήση δειγμάτων γνωστής, διαβαθμισμένης, συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Πρωτόκολλο

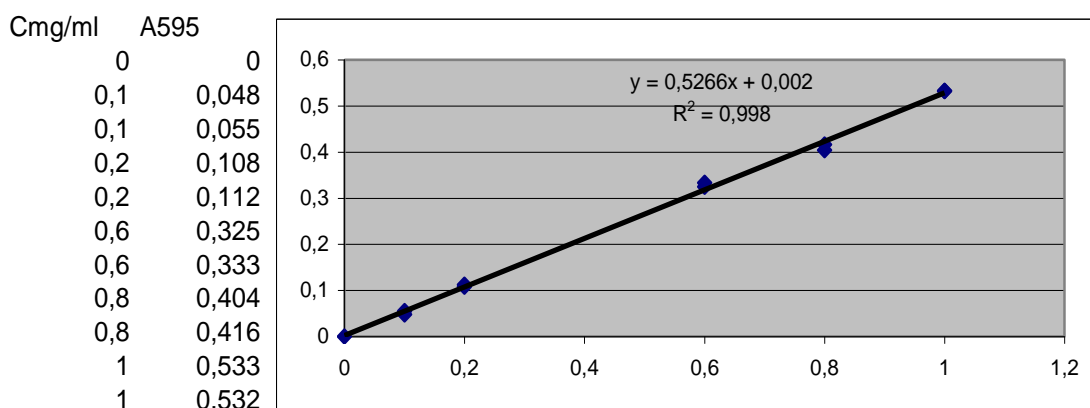
- Αρχικά κατασκευάζουμε μια πρότυπη καμπύλη με πρωτεΐνη BSA γνωστών συγκεντρώσεων. Προσέχουμε πάντα να συμπληρώνουμε με τα διαλύματα (για παράδειγμα U/Th, LB)στα οποία είναι κάθε φορά το προς μελέτη πρωτεϊνικό δείγμα. Παρακάτω δίνεται παράδειγμα κατασκευής πρότυπης

καμπύλης για δείγματα που έχουν υποστεί καθαρισμό και έχουν επαναδιαλυθεί σε U/Th 1,4/0,4

Παράδειγμα

| C (mg/ml) BSA | 2 mg/ml BSA- U/Th 1,4/0,4(μl) | U/Th1,4/0,4 (μl) | Διάλυμα Bradford (μl) |
|------------------|----------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 0 | 0 | 20 | 980 |
| 0,1 | 1 | 19 | 980 |
| 0,2 | 2 | 18 | 980 |
| 0,6 | 6 | 14 | 980 |
| 0,8 | 8 | 12 | 980 |
| 1 | 10 | 10 | 980 |

Πίνακας 1 : Προετοιμασία δειγμάτων BSA γνωστής συγκέντρωσης



Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη

Σημείωση: Για καλύτερα και πιο έγκυρα αποτελέσματα συνήθως φτιάχνουμε διπλά δείγματα από κάθε συγκέντρωση.

Σημείωση: Είναι απαραίτητη η δημιουργία πρότυπης καμπύλης κάθε φορά που μελετάμε καινούρια δείγματα.

Για τα ενδοκυττάρια δείγματα

- Τα ενδοκυττάρια δείγματα περιέχουν αρκετή ποσότητα πρωτεϊνών οπότε όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούμε για τη μέτρηση Bradford είναι αραιωμένα κατά πέντε φορές από αυτά που χρησιμοποιούνται κλασικά. Επίσης μειώνεται και το σφάλμα απορρόφησης που δημιουργείται από υψηλές συγκεντρώσεις διαλυμάτων U/Th.

Δηλαδή:

-400μl U/Th 7/2 +1600μl dH₂O, άρα U/Th 1, 4/0, 4

-200μl (10mg/ml BSA σε U/Th 7/2)+800μl dH₂O, άρα BSA 2mg/ml σε U/Th 1,4/0,4

-50μl άγνωστο πρωτεϊνικό δείγμα+200μl dH₂O, άρα άγνωστο δείγμα 1/5 σε U/Th 1,4/0,4

- Αραίωση με dH₂O των (αγνώστων δειγμάτων 1/5) προς 1/5 και 1/10 για να μην ξεφύγει η απορρόφηση από αυτές των προτύπων διαλυμάτων

Δηλαδή :

| | Άγνωστο πρωτεϊνικό δείγμα(1/5) | U/Th 1,4/0,4 | Bradford |
|--------------|--------------------------------|--------------|----------|
| Αραίωση 1/5 | 20μl | 0μl | 980μl |
| Αραίωση 1/10 | 10μl | 10μl | 980μl |

Πίνακας 2 : Προετοιμασία αγνώστων δειγμάτων για μέτρηση Bradford σε ενδοκυττάρια δείγματα

- Vortex, επώαση για 5min, φωτομέτρηση στα 595nm.
- Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με την πρότυπη εξίσωση

Για τα εξωκυττάρια δείγματα

Τα εξωκυττάρια δείγματα δεν περιέχουν μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών οπότε δεν μας εξυπηρετούν οι αραιώσεις που κάνουμε για τα ενδοκυττάρια.

- Ετοιμάζουμε τα διαλύματα, δηλαδή:

| Άγνωστο πρωτεϊνικό δείγμα | U/Th 7/2 ή LB | Bradford |
|---------------------------|---------------|----------|
| 20μl | 0μl | 980μl |

Πίνακας 3: Προετοιμασία αγνώστων δειγμάτων για μέτρηση Bradford σε εξωκυττάρια δείγματα

- Vortex, επώαση για 5min, φωτομέτρηση στα 595nm.
- Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με την πρότυπη εξίσωση

3.5. Κατακρήμιση/Καθαρισμός εξωκυττάρων πρωτεϊνών

1. TCA/Ice-cold acetone

Στο πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιείται TCA και ακετόνη μαζί για την κατακρήμιση των πρωτεϊνών. Ο συνδυασμός και των δυο χρησιμοποιείται συχνά για την προετοιμασία δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν με την δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση και είναι πιο αποτελεσματική από την χρήση των δυο αντιδραστηρίων ξεχωριστά.

Παρόλα αυτά μπορεί να είναι δύσκολη η επαναδιάλυση του πρωτεϊνικού ιζήματος και μπορεί να μην διαλυθεί τελείως. Επίσης παρατεταμένη διάρκεια έκθεσης του πρωτεϊνικού δείγματος σε αυτό το διάλυμα μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμηση μερικών πρωτεϊνών εξαιτίας του χαμηλού pH.

Πρωτόκολλο

Σημείωση: Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται ως πρώτο βήμα κατακρήμισης /καθαρισμού, καθώς και περαιτέρω μείωσης του όγκου του υπερκειμένου. Έπειτα, εάν και εφόσον κρίνεται απαραίτητο, προχωράμε σε επιπλέον κατακρήμιση /καθαρισμό με τη μέθοδο του 2D clean-up kit(3.6).

- Αναλογία 1:8:1-πρωτεϊνικό δείγμα:ice-cold acetone:TCA 100%
- Επώαση τουλάχιστον για 3h-ιδανικά O/N-στους -20°C
- Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 15min στους 4°C

- Αφαιρούμε υπερκείμενο
- Προσθέτουμε 1ml ice-cold acetone, vortex, φυγοκέντρωση στις 14.000 rpm για 15min στους 4°C
- Επαναλαμβάνουμε το παραπάνω βήμα για τουλάχιστον άλλες τρεις φορές
- Αφαιρούμε υπερκείμενο
- Στεγνώνουμε το ίζημα

Σημείωση: Το στέγνωμα θα πρέπει να διαρκέσει 5-10 min. Αν διαρκέσει περισσότερο θα είναι πολύ δύσκολο να επαναιωρηθεί το ίζημα .

- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 50μl rehydration sample buffer (Urea 7M / Thiourea 2M)

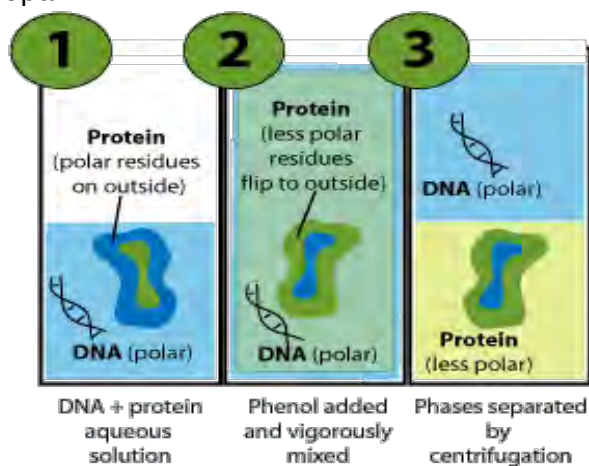
Σημείωση: Ο όγκος του rehydration sample buffer υπολογίζεται ανάλογα με το δείγμα μας και το τι θέλουμε να κάνουμε έπειτα.

2. Phenol/Ice-cold acetone

Αυτό το πρωτόκολλο χρησιμοποιείται πολύ συχνά σαν μέθοδος για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από ένα δείγμα DNA. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το δείγμα του DNA απομακρύνεται από το αρχικό μας δείγμα ώστε τελικά να παραμείνουν στο δείγμα μας οι μόνοι οι πρωτεΐνες.

Όταν στο περιβάλλον των πρωτεϊνών προστεθεί η φαινόλη, τότε οι υδρόφοβες αλυσίδες πρέπει να αλληλεπιδράσουν με την λιγότερο πολική φαινόλη, γι αυτό αναγκάζονται να «βγουν» προς τα έξω, ενώ οι πολικές αλυσίδες αντίστοιχα μετακινούνται στο εσωτερικό για να προστατευτούν από το ακατάλληλο περιβάλλον. Άρα οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται μόνιμα, από την αλλαγή στο περιβάλλον που προκαλεί η φαινόλη.

Έτσι λοιπόν διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες από το DNA στο δείγμα, με τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες να παραμένουν στην φάση φαινόλης που βρίσκεται στην κάτω πλευρά, ενώ το DNA και οι πολυσακχαρίτες παραμένουν στην υδατική φάση στην πάνω πλευρά.



Εικόνα 11 : Διαχωρισμός πρωτεϊνών- DNA στην υδατική φάση και φάση φαινόλης με την επίδραση της φαινόλης.

Η ακετόνη είναι ένας οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιείται συχνά στην κατακρήμνιση. Όμως μόνο με την χρήση ακετόνης γίνεται μερική ανάκτηση όλων

των πρωτεϊνών και υπάρχει η πιθανότητα διάφορες διαλυτές προσμίξεις να παραμείνουν στο δείγμα.

Πρωτόκολλο

Σημείωση: Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται ως πρώτο βήμα κατακρήμνισης /καθαρισμού, καθώς και περαιτέρω μείωσης του όγκου του υπερκείμενου. Έπειτα, εάν και εφόσον κρίνεται απαραίτητο, προχωράμε σε επιπλέον κατακρήμνιση /καθαρισμό με τη μέθοδο του 2D clean-up kit(3.6).

Προσοχή: Η φαινόλη είναι ιδιαίτερα τοξική, δηλητηριώδης και προκαλεί λευκές κηλίδες και εγκαύματα στο δέρμα.

- Αναλογία 1:1/2-υπερκείμενο:water-saturated phenol mix
- Θέρμανση στους 70° C για 10min
- Επώαση σε πάγο για 5min
- Φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm για 15min στους 4° C

Σημείωση: Σχηματίζονται η υδατική φάση στο πάνω μέρος, η φάση φαινόλης στο κάτω και χωρίζονται από την ενδιάμεση φάση. Η πρωτεΐνη έχει μαζευτεί στη φαινολική φάση οπότε θα πρέπει οι χειρισμοί μας κατά το διαχωρισμό των φάσεων να είναι ιδιαίτερα λεπτοί.

- Μαζεύουμε με προσοχή την υδατική φάση και ενδιάμεση σε άλλο erpendorf ενώ κρατάμε την φάση φαινόλης.
- Μετράμε πάλι αναλογία 1:1/2- υδατική/ενδιάμεση φάση: water-saturated phenol mix
- Θέρμανση στους 70° C
- Επώαση σε πάγο για 5min
- Φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm για 15min στους 4° C
- Χωρίζουμε και πάλι την υδατική-ενδιάμεση φάση με προσοχή από την φάση φαινόλης και κρατάμε την φάση φαινόλης
- Προσθέτουμε 2ml ice-cold acetone στη φάση φαινόλης
- Επώαση τουλάχιστον για 3h-ιδανικά O/N-στους -20° C
- Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 30min στους 4° C
- Αφαιρούμε υπερκείμενο
- Ξεπλένουμε το ίζημα με 200μl 80% ice-cold acetone
- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 min στους 4° C
- Επαναλαμβάνουμε το παραπάνω βήμα για τουλάχιστον άλλες πέντε φορές
- Ξεπλένουμε το ίζημα με 200μl 100% ice-cold acetone
- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 min στους 4° C
- Αφαιρούμε υπερκείμενο
- Στεγνώνουμε το ίζημα

Σημείωση: Το στέγνωμα θα πρέπει να διαρκέσει 5-10 min. Αν διαρκέσει περισσότερο θα είναι πολύ δύσκολο να επαναιωρηθεί το ίζημα .

- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 5μl rehydration sample buffer (Urea 7M / Thiourea 2M)

Σημείωση: Ο όγκος του rehydration sample buffer υπολογίζεται ανάλογα με το δείγμα μας και το τι θέλουμε να κάνουμε έπειτα.

3. Ammonium sulfate

Το ammonium sulfate δρα απομακρύνοντας τα μόρια του νερού από τα μη πολικά μέρη της πρωτεΐνης. Η μείωση των διαθέσιμων μορίων νερού αυξάνει την επιφανειακή τάση και βελτιώνει τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, επιτρέποντας έτσι την κατακρήμνιση της πρωτεΐνης από το διάλυμα ή την πρόσδεση της σε υδροφοβική στήλη.

Πρωτόκολλο

- Μετράμε τον όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος, το βάζουμε σε ποτήρι ζέσεως με μαγνητάκι και το τοποθετούμε σε μπανάκι πάγου ή στους 4°C πάνω σε έναν μαγνητικό αναδευτήρα.
- Υπολογίζουμε την απαιτούμενη ποσότητα ammonium sulfate σύμφωνα με τον πίνακα 4

Σημείωση: Συνήθως φτάνουμε κατευθείαν σε ποσοστό κορεσμού 85-90%, αλλά αρκετές φορές φτάνουμε σταδιακά σε δύο ή παραπάνω βήματα.

- Προσθέτουμε μικρές ποσότητες ammonium sulfate, αναδεύουμε σε χαμηλή ταχύτητα έως ότου το αλάτι διαλυθεί.
- Επαναλαμβάνουμε το παραπάνω βήμα μέχρι να προσθέσουμε όλο το αλάτι.
- Μόλις διαλυθεί όλο το ammonium sulfate, το απομακρύνουμε από τον μαγνητικό αναδευτήρα και το τοποθετούμε στους 4°C O/N.
- Φυγοκεντρούμε στα 5000 x g για 10 min στους 4°C
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά, προσπαθώντας να αφαιρέσουμε και την τελευταία σταγόνα ammonium sulfate.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα στον επιθυμητό όγκο σε κατάλληλο buffer και *dialyse* σε 100-200 όγκους του buffer.
- Αλλάζουμε 2-3 φορές το διάλυμα, αφήνοντας το τελευταίο O/N για πλήρη εξισορρόπηση.

Σημείωση: Μετά από 2 αλλαγές η συγκέντρωση του ammonium sulfate που έχει παραμείνει στο δείγμα μας αναμένεται να είναι της τάξεως 1-2mM, ενώ με την τρίτη αλλαγή πλησιάζει στο μηδέν.

| of ammonium sulfate | Solid ammonium sulfate (grams) to be added to 1 liter of solution | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 0 | 106 | 134 | 164 | 194 | 226 | 258 | 291 | 326 | 361 | 398 | 436 | 476 | 516 | 559 | 603 | 650 | 697 | |
| 5 | 79 | 108 | 137 | 166 | 197 | 229 | 262 | 296 | 331 | 368 | 405 | 444 | 484 | 526 | 570 | 615 | 662 | |
| 10 | 53 | 81 | 109 | 139 | 169 | 200 | 233 | 266 | 301 | 337 | 374 | 412 | 452 | 493 | 536 | 581 | 627 | |
| 15 | 26 | 54 | 82 | 111 | 141 | 172 | 204 | 237 | 271 | 306 | 343 | 381 | 420 | 460 | 503 | 547 | 592 | |
| 20 | 0 | 27 | 55 | 83 | 113 | 143 | 175 | 207 | 241 | 276 | 312 | 349 | 387 | 427 | 469 | 512 | 557 | |
| 25 | | 0 | 27 | 56 | 84 | 115 | 146 | 179 | 211 | 245 | 280 | 317 | 355 | 395 | 436 | 478 | 522 | |
| 30 | | | 0 | 28 | 56 | 86 | 117 | 148 | 181 | 214 | 249 | 285 | 323 | 362 | 402 | 445 | 488 | |
| 35 | | | | 0 | 28 | 57 | 87 | 118 | 151 | 184 | 218 | 254 | 291 | 329 | 369 | 410 | 453 | |
| 40 | | | | | 0 | 29 | 58 | 89 | 120 | 153 | 187 | 222 | 258 | 296 | 335 | 376 | 418 | |
| 45 | | | | | | 0 | 29 | 59 | 90 | 123 | 156 | 190 | 226 | 263 | 302 | 342 | 383 | |
| 50 | | | | | | | 0 | 30 | 60 | 92 | 125 | 159 | 194 | 230 | 268 | 308 | 348 | |
| 55 | | | | | | | | 0 | 30 | 61 | 93 | 127 | 161 | 197 | 235 | 273 | 313 | |
| 60 | | | | | | | | | 0 | 31 | 62 | 95 | 129 | 164 | 201 | 239 | 279 | |
| 65 | | | | | | | | | | 0 | 31 | 63 | 97 | 132 | 168 | 205 | 244 | |
| 70 | | | | | | | | | | | 0 | 32 | 65 | 99 | 134 | 171 | 209 | |
| 75 | | | | | | | | | | | | 0 | 32 | 66 | 101 | 137 | 174 | |
| 80 | | | | | | | | | | | | | 0 | 33 | 67 | 103 | 139 | |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | 0 | 34 | 68 | 105 | |
| 90 | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 34 | 70 | |
| 95 | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 35 | |
| 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | |

Πίνακας 4 : Η αρχική και τελική συγκέντρωση ammonium sulfate εκφρασμένη σε ποσοστό κορεσμού κάθετα και οριζόντια αντίστοιχα. Ανάμεσα αναγράφονται τα γραμμάρια του αλατιού που πρέπει να προστεθούν σε κάθε λίτρο διαλύματος από την αρχική συγκέντρωση για να φτάσουμε στην απαιτούμενη τελική.

4. TCA/DOC

Σημείωση : Το αντιδραστήριο DOC είναι ένα απορρυπαντικό και δεν είναι καλή η άμεση χρήση στο φασματογράφο μάζας. Είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται πριν από 1 and 2D ανάλυση πηκτωμάτων.

- Αναμειγνύουμε το δείγμα μας με 1/100 του όγκου του 2% DOC και επωάζουμε σε πάγο για 30min
- Προσθέτουμε 100% TCA μέχρι να έχει το δείγμα μας 15% τελική συγκέντρωση TCA, καλό vortex αμέσως για 30sec
- Αφήνουμε το κατακρημιζόμενο δείγμα για 1h-ιδανικά O/N
- Φυγοκεντρούμε στα 15.000 x g για 10min στους 4°C
- Πετάμε το υπερκείμενο
- Ξεπλένουμε το ίζημα με ice-cold ethanol ή acetone
- Κάνουμε vortex και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5min
- Φυγοκεντρούμε στα 15.000 x g για 10min στους 4°C
- Πετάμε το υπερκείμενο
- Ξεπλένουμε το ίζημα με ice-cold ethanol ή acetone
- Φυγοκεντρούμε στα 15.000 x g για 10min στους 4°C
- Πετάμε το υπερκείμενο
- Στεγνώνουμε το ίζημα για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό

5. Chloroform / Methanol

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται αντί της TCA/ acetone. Λειτουργεί καλά στην απομάκρυνση απορρυπαντικών από πρωτεϊνικά δείγματα.

- Προσθέτουμε στο δείγμα μας 4 όγκους μεθανόλης, καλό vortex
- Προσθέτουμε στο δείγμα μας 1 όγκο χλωροφορμίου, vortex
- Προσθέτουμε στο δείγμα μας 3 όγκους dH₂O, vortex
- Φυγοκεντρούμε στα 15.000 x g για 2min στους 4°C-οι πρωτεΐνες θα πρέπει να είναι στην υγρή μεσόφαση
- Αφαιρούμε την υδατική πάνω φάση και προσθέτουμε 4 όγκους μεθανόλης, vortex
- Φυγοκεντρούμε στα 15.000 x g για 2min στους 4°C
- Αφαιρούμε όσο πιο πολύ υγρό μπορούμε χωρίς να «τραυματίσουμε» το ίζημα
- Στεγνώνουμε το ίζημα για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό ή σε Speed-Vac

3.6. Κατακρήμνιση/Καθαρισμός ενδοκυττάρων πρωτεϊνών

2D cleanup-kit

Το kit αυτό παρέχει την δυνατότητα καθαρισμού των πρωτεϊνών που θα χρησιμοποιηθούν στην δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. Κατακρημνίζει, συγκεντρώνει και ποσοτικοποιεί τις πρωτεΐνες στο δείγμα, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνει ουσίες όπως ιονικά απορρυπαντικά, άλατα, νουκλεϊκά οξέα και φαινολικές ενώσεις τα οποία παρεμβαίνουν στην ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό σχεδόν οποιασδήποτε πρωτεΐνης και βελτιώνει τα αποτελέσματα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης μειώνοντας τις οριζόντιες γραμμώσεις στο φόντο του gel και παρεμποδίζουν την εστίαση των πρωτεϊνών κατά την ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών.

Πρωτόκολλο

Σημείωση: Απαραιτήτως τα δείγματα σε πάγο σε κάθε βήμα, εκτός αν υπάρχει διαφορετική οδηγία.

- Μεταφορά 1-500μg πρωτεΐνης σε τελικό όγκο 100μl

Σημείωση: Ποσότητες πρωτεΐνης >500μg ίσως μειώσουν την αποτελεσματικότητα του καθαρισμού οδηγώντας σε χαμηλής ποιότητας IEF.

- Προσθήκη 300μl precipitating agent 1 στο δείγμα, vortex, επώαση σε πάγο για 15min
- Προσθήκη 300μl precipitating agent 2 στο δείγμα, vortex

Σημείωση: Δεν πρέπει να ακουμπήσει το tip της πιπέτας το δείγμα, υπάρχει πιθανότητα απώλειας πρωτεΐνης.

- Φυγοκέντρηση 5min σε μέγιστη ταχύτητα >12000 x g ώστε να σχηματιστεί ίζημα
- Γρήγορη αφαίρεση του υπερκειμένου ώστε να μην διαλυθεί το ίζημα

Σημείωση: Τοποθετούμε τα tubes στη φυγόκεντρο πάντα με την ίδια φορά ώστε το ίζημα να μένει στο ίδιο σημείο.

- Προσθήκη 40μl wash reagent 1 στην κορυφή του ιζήματος, φυγοκέντρηση για 5min μέγιστη ταχύτητα >12000 x g

Σημείωση: Αν είχε σχηματιστεί ίζημα στα τοιχώματα του tube, πρέπει να γίνει πιπετάρισμα ή/και vortex του wash reagent πάνω στο ίζημα πολλές φορές, ώστε να καθαριστεί καλά.

- Απομάκρυνση υπερκειμένου
- Προσθήκη 25μl HPLC H₂O, vortex 10-20sec

Σημείωση: Το ίζημα μπορεί να διασκορπιστεί, αλλά δεν θα διαλυθεί στο H₂O.

- Προσθήκη 1ml wash reagent 2 και 5μl wash 2 additive, Vortex 1min

Σημείωση: Το wash reagent 2 πρέπει να έχει κρυώσει στους -20° C για τουλάχιστον μια ώρα. Αν αυτό έχει παγώσει καλά, τότε το ίζημα δεν θα διαλυθεί.

- Επώαση για 30min στους -20° C. Κάθε 10min κατά την διάρκεια της επώασης κάνουμε vortex για 30sec
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5min ώστε να σχηματιστεί ίζημα, απομάκρυνση υπερκειμένου. Το ίζημα σε αυτή την φάση θα πρέπει να εμφανίζεται άσπρο

- Στέγνωμα του ιζήματος μέσα στον απαγωγό σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το στέγνωμα το ίζημα θα πρέπει να φαίνεται διαφανές.

Σημείωση: Το στέγνωμα θα πρέπει να διαρκέσει το πολύ μέχρι 5 min. Αν διαρκέσει περισσότερο θα είναι πολύ δύσκολο να επαναιωρηθεί το ίζημα .

- Επαναιώρηση του ιζήματος σε Vml rehydration sample buffer (Urea 7M / Thiourea 2M)

Σημείωση: Ο όγκος του rehydration sample buffer υπολογίζεται ανάλογα με το δείγμα μας και το τι θέλουμε να κάνουμε έπειτα.

- Το πρωτεϊνικό διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την ηλεκτροφόρηση πρώτης διάστασης IEF

Σημείωση: Η αχρησιμοποίητη ή εναπομένουσα πρωτεΐνη μπορεί να αποθηκευτεί σε καθαρό tube στους -20°

3.7.Πρώτη διάσταση-Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)

Ενυδάτωση(rehydration)

Κάθε IPG strip ανάλογα με το μήκος του και τη διαβάθμιση του pH απορροφά διαφορετικό όγκο δείγματος και ποσότητα πρωτεΐνης, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

| | | |
|------------------------------|----------|-----------|
| Μήκος IPG strip(cm) | 7 cm | 17 cm |
| Ποσότητα πρωτεΐνης(μg) | 50-100μg | 200-400μg |
| Όγκος rehydration buffer(μl) | 125μl | 300μl |

Πίνακας 5 : Σχέση μήκους strip, ποσότητας πρωτεΐνης και ολικού όγκου rehydration buffer

Σημείωση: Στην παρούσα εργασία φορτώνουμε πάντα 350μg πρωτεΐνης στα 300μl rehydration buffer στα strip 17cm και 100μg πρωτεΐνης στα 125μl rehydration buffer στα strip 7cm.

Το διάλυμα ενυδάτωσης (rehydration buffer) του strip δεν περιέχει μόνο το πρωτεϊνικό δείγμα αλλά και πολλές άλλες ουσίες. Οπότε για την προετοιμασία του είναι απαραίτητοι οι παρακάτω υπολογισμοί:

- **Rehydration buffer**

-Vπρωτεΐνης (μl) = m(φορτώματος)μg / C (έχει υπολογιστεί από Bradford)(μg/μl)

-2% chaps: 0,04gr*V (rehydration buffer) μl/2000μl διαλυμένα σε U/Th 7/2

-10mg/ml DTT: 0,02gr* V (rehydration buffer) μl/2000μl διαλυμένα σε U/Th 7/2

-0,2%IPG buffer: 20μl* V (rehydration buffer) μl/2000μl

-Συμπληρώνουμε εάν χρειαστεί με U/Th 7/2 μέχρι τον επιθυμητό όγκο ανάλογα με το strip.

Σημείωση: Είναι πολύ σημαντικό κατά την ενυδάτωση του strip να φορτώνονται πάντα οι **ίδιες ποσότητες πρωτεϊνών** από τα δυο διαφορετικά στελέχη, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα και η παρουσία ή απουσία spot μετά την ηλεκτροφόρηση να μην οφείλεται σε διαφορετική ποσότητα των πρωτεϊνών.

- Ανακινούμε ελαφρά το διάλυμα και το απλώνουμε κατά μήκος ενός

διαδρόμου του tray με προσοχή για να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες, οι οποίες εμποδίζουν την ομοιόμορφη κατανομή του δείγματος πάνω στο strip.

- Βγάζουμε από τους -20°C τα IPG strips. Με μια λαβίδα αφαιρούμε με προσοχή το προστατευτικό πλαστικό κάλυμμα από την πλευρά του πηκτώματος στο strip.

- Τοποθετούμε το strip με την πλευρά του πηκτώματος πάνω στο δείγμα, με προσοχή ώστε να μην παγιδευτούν φυσαλίδες πάνω στην επιφάνεια του πηκτώματος. Το «+» που αναγράφεται πάνω στο strip πρέπει να είναι τοποθετημένο προς την αριστερή πλευρά του tray. Πρέπει επίσης το δείγμα να μην ακουμπάει στα πλαστικά άκρα του strip καθώς αυτή η ποσότητα δεν θα απορροφηθεί από το πήκτωμα του strip.

- Αφήνουμε το δείγμα να απορροφηθεί από το πήκτωμα για 20min και στη συνέχεια καλύπτουμε το strip με 2-3ml mineral oil ώστε να αποφύγουμε την εξάτμιση του δείγματος κατά την διάρκεια της διαδικασίας.

- Καλύπτουμε το tray με το πλαστικό καπάκι και το αφήνουμε σε επίπεδη επιφάνεια 11-16h ώστε να επιτευχθεί η ενυδάτωση και να απορροφηθεί το δείγμα στο strip.

Ηλεκτροφόρηση

- Χρησιμοποιούμε τη συσκευή «PROTEAN IEF focusing tray», το οποίο διαθέτει δυο ηλεκτρόδια σε κάθε διάδρομο. Πάνω σε κάθε ηλεκτρόδιο τοποθετούμε 2 χαρτάκια εμποτισμένα με ddH_2O για καλύτερη αγωγιμότητα.

- Απομακρύνουμε προσεκτικά το strip από το tray με την βοήθεια λαβίδας. Το κρατάμε για λίγο κάθετα πάνω σε μια επιφάνεια χαρτιού ώστε να απομακρυνθεί το mineral oil.

- Μεταφέρουμε το IPG strip στο focusing tray με την πλευρά του πηκτώματος προς τα κάτω, να ακουμπάει στην επιφάνεια του tray. Η πλευρά του strip με την ένδειξη “+” τοποθετείται στην αριστερή πλευρά του διαδρόμου.

- Καλύπτουμε το strip με 2-3ml mineral oil. Κλείνουμε το tray με το καπάκι και το τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Οι συνθήκες ισοηλεκτρικής εστίασης είναι:

Για strip 17 cm :

Step 1 RAPID, 250V, 2h-4h

Step 2 RAPID, 1000 V, 1h

Step 3 GRADIENT, 6000V, 4h

Step 4 RAPID, 6000V, 60000 Vhrs

Step 5 RAPID, 500V, 1min

Step 6 RAPID, 500V, 20h

Για strip 7 cm :

Step 1 LINEAR, 250V, 20min

Step 2 RAPID, 250V, 50min

Step 3 LINEAR, 4000 V, 2h

Step 4 RAPID, 4000V, 2h

Σημείωση : Μετά το τέλος του πρώτου βήματος η ένταση του ρεύματος πρέπει να **MHN** ξεπερνάει τα **10 μA / gel**. Αν δεν συμβεί αυτό σημαίνει πως δεν έχουν απομακρυνθεί τα άλατα από το δείγμα και θα πρέπει να αυξήσουμε την χρονική διάρκεια του πρώτου βήματος μέχρι η τάση να πέσει στο επιθυμητό όριο.

Σημείωση : Θα πρέπει επίσης να ελέγχουμε τα mA και κατά τη διάρκεια του τρίτου και τέταρτου βήματος για να σιγουρευτούμε ότι δεν ανέβηκαν πολύ.

Σημείωση : Η IEF τελειώνει με την ολοκλήρωση του 5^{ου} βήματος (strip 17 cm) και του 3^{ου} βήματος στο strip 7cm . Το 6^ο βήμα- 4^ο βήμα αντίστοιχα, συγκρατεί τις πρωτεΐνες εστιασμένες έως ότου να βγάλουμε το δείγμα από το μηχάνημα για να ξεκινήσουμε την ηλεκτροφόρηση δεύτερης διάστασης.

3.8. Δεύτερη διάσταση-SDS ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Προετοιμασία μεγάλου SDS gel πολυακρυλαμιδίου

- Τοποθετούμε αρχικά το μεγάλο τζάμι (larger outer plate) πάνω στον πάγκο
- Στις δυο παράλληλες κάθετες πλευρές τοποθετούμε τα spacers στα οποία έχουμε απλώσει ελάχιστη ποσότητα βαζελίνης, ώστε να αποφύγουμε διαρροές του πηκτώματος από τα πλάγια των τζαμιών
- Από πάνω τοποθετούμε το μικρό τζάμι (small inner plate)
- Στερεώνουμε ανάμεσα στα δυο clamps και τα δυο τζάμια
- Ευθυγραμμίζουμε τα δυο τζάμια στην επιφάνεια του πάγκου, βάζοντας την κάρτα ευθυγράμμισης (alignment card) ώστε να σπρώξουμε τα spacers προς τις άκρες
- Απλώνουμε αгарόζη 0,8% από άκρη σε άκρη στα σφουγγαράκια της οριζόντιας βάσης

Σημείωση: agarose 0,8% 100ml: running buffer 10x 10ml-agarose 0,8gr-dH₂O 90ml
Running buffer 10x 1lt: Tris 30gr-glycine 144gr-10%SDS 10gr ή 100ml-dH₂O έως 1lt

- Τοποθετούμε τα τζάμια πρώτα από την μια άκρη και μετά αργά προς την άλλη στην οριζόντια βάση. Συμπληρώνουμε και τις δυο πλευρές του τζαμιού με το διάλυμα αгарόζης
- Αφήνουμε να κρυώσει η αгарόζη
- Ελέγχουμε αν υπάρχει διαρροή ρίχνοντας σταδιακά dH₂O ανάμεσα στα τζάμια ώστε να μην σπάσει το «στεγανό» που έχει δημιουργηθεί από την αгарόζη
- Αφού βεβαιωθούμε πως δεν υπάρχει διαρροή απομακρύνουμε το dH₂O

Σημείωση: Το dH₂O δεν θα πρέπει να παραμείνει για αρκετή ώρα καθώς μπορεί να δημιουργηθεί διαρροή λόγω της αραίωσης της αгарόζης.

- Φτιάχνουμε τα πηκτώματα διαχωρισμού (separating gel) και συσσώρευσης (stacking gel)

Separating gel 12%

| | |
|-----------------------|----------|
| HPLC H ₂ O | 23,45ml |
| 1,5 M Tris pH 8,8 | 17,5ml |
| 10% SDS | 0,7ml |
| 30% bis acrylamide | 28ml |
| 10% APS | 0,35ml |
| Temed | 0,035ml |
| Σύνολο | 70,035ml |

Πίνακας 6 : Συνταγή separating gel

Stacking gel 4%

| | |
|-----------------------|---------|
| HPLC H ₂ O | 14,7ml |
| 1 M Tris pH 6,8 | 2,5ml |
| 10% SDS | 0,2ml |
| 30% bis acrylamide | 2,6ml |
| 10% APS | 0,1ml |
| Temed | 0,02ml |
| Σύνολο | 20,12ml |

Πίνακας 7 : Συνταγή stacking gel

Σημείωση: Κατά την παρασκευή των πηκτωμάτων διαχωρισμού και συσσώρευσης προστίθενται πάντα τελευταία το TEMED (διάδοση ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού του πολυακρυλαμιδίου) και APS (δημιουργία ελευθέρων ριζών).

- Προσθέτουμε το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) ανάμεσα στα δυο τζάμια έως περίπου 3cm κάτω από την επιφάνεια του μεγάλου τζαμιού.
- Προσθέτουμε αργά dH₂O από την μια άκρη ως την άλλη, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες και να ευθυγραμμιστεί η επιφάνεια του πηκτώματος
- Αφήνουμε να πήξει για 30min-1h
- Μόλις πήξει αφαιρούμε το dH₂O και σκουπίζουμε με διηθητικό χαρτί το εσωτερικό μέρος των τζαμιών
- Προσθέτουμε το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) μέχρι να ξεχειλίσει. Αμέσως μετά τοποθετούμε το ειδικό στενάκι ώστε να σχηματιστεί το ενιαίο πηγαδάκι που θα τοποθετηθεί το strip
- Αφήνουμε να πήξει για 30min
- Μόλις πήξει καλύπτουμε την επιφάνεια των τζαμιών με βρεγμένο χαρτί και στη συνέχεια με ζελατίνα και τοποθετούμε τα πηκτώματα στους 4° C για 16-18h ώστε να επιτευχθεί ο πολυμερισμός του πολυακρυλαμιδίου

Προετοιμασία IPG strips για τη δεύτερη διάσταση

- Ετοιμάζουμε το equilibration buffer (συνταγή για δύο μεγάλα strips)

| | |
|------------------------------|---------------|
| 1 M Tris pH 6,8 | 2ml |
| Urea | 14,414gr |
| 100% glycerol ή 50% glycerol | 12ml ή 24ml |
| 10 % SDS | 4ml |
| Bromophenol blue | 0,020ml |
| dH ₂ O | Μέχρι τα 40ml |

Πίνακας 8 : Συνταγή equilibration buffer

- Μετά την παρασκευή του διαλύματος το χωρίζουμε στα δυο από 20 ml.
Equilibration buffer I: Προσθήκη και 0, 15 gr DTT
Equilibration buffer II: Προσθήκη και 0, 9 gr iodoacetamide

Σημείωση: Το SDS ως απορρυπαντικό έχει την ιδιότητα να αφρίζει οπότε καλό θα ήταν να προστίθεται στο τέλος.

- Απομακρύνουμε το focusing tray από το μηχάνημα ισοηλεκτρικής εστίασης.
- Με λαβίδα απομακρύνουμε προσεκτικά το IPG strip. Στραγγίζουμε το mineral oil από το strip κάθετα σε ένα χαρτί και με προσοχή πλάγια από την πλευρά του πλαστικού
- Το τοποθετούμε στο equilibration buffer I, που βρίσκεται μέσα σε ένα τρυβλίο Petri, με την πλευρά όπου βρίσκεται το gel να βρίσκεται προς τα μέσα. Κλείνουμε με το καπάκι
- Αφήνουμε στον αναδευτήρα για 15min
- Με την βοήθεια λαβίδας απομακρύνουμε το strip από το equilibration buffer I και το τοποθετούμε σε ένα δεύτερο τρυβλίο που περιέχει το equilibration buffer II
- Αφήνουμε στον αναδευτήρα για 15min

Ένθεση strip στο SDS gel πολυακρυλαμιδίου

- Αφαιρούμε με προσοχή το χτενάκι από το πήκτωμα συσσώρευσης και σκουπίζουμε τα κομμάτια gel που πιθανόν να έχουν μείνει πάνω στο μεγάλο gel
- Προσθέτουμε περίπου 1ml running buffer 1x στο πηγάδι, έτσι ώστε να γλιστρά το gel του strip καθώς το τοποθετούμε εντός του πηγαδιού
- Με την βοήθεια λαβίδας, παίρνουμε το strip, κόβουμε με προσοχή τα πλαστικά άκρα, τοποθετούμε με προσοχή το strip ανάμεσα στα δυο τζάμια, με την πλευρά του πηκτώματος να είναι προς το μικρό τζάμι. Η πλευρά που φέρει το «+» τοποθετείται προς την πλευρά όπου βρίσκεται το πηγαδάκι για τον μάρτυρα

Σημείωση: Σε αυτό το βήμα πρέπει να προσέξουμε πολύ τους χειρισμούς μας καθώς υπάρχει ο κίνδυνος κατά την διαδικασία μεταφοράς του strip να σπάσει το πήκτωμα που βρίσκεται πάνω του. Επίσης μετά την τοποθέτηση πρέπει να προσέξουμε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες ανάμεσα στο strip και την επιφάνεια του πηγαδιού

- Προσθέτουμε 10-15μl μάρτυρα στο πηγαδάκι του
- Προσθέτουμε αгарόζη 0,8% πάνω από το strip και τον μάρτυρα, με προσοχή ώστε να μην περάσει ο marker στο strip. Περιμένουμε λίγα λεπτά να κρυώσει η αгарόζη
- Μεταφέρουμε τα τζάμια μέσα στο tank
- Γεμίζουμε με φρέσκο running buffer 1x το upper buffer chamber
- Γεμίζουμε με running buffer 1x το lower buffer chamber περίπου 10-15cm από την κάτω πλευρά έως ότου να καλυφθεί η κάτω πλευρά του gel

Σημείωση: Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το ίδιο buffer 2-3 φορές.

- Αρχικά η ηλεκτροφόρηση τρέχει στα 8mA / gel για λίγα λεπτά για να παρακολουθήσουμε εάν υπάρχει κάποια διαρροή.
Έπειτα τρέχει στα 30mA /gel για 6-7h

Σημείωση: Εναλλακτικά μπορούμε να το τρέξουμε στα 10mA /gel για 16-18h

3.9. Χρώση πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο (Silver Stain)

Η χρώση με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών μετά από ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Συνδυάζει την εξαιρετική ευαισθησία (σε χαμηλό εύρος νανογραμμαρίων), με πολύ απλό και φθινό εξοπλισμό και χημικές ουσίες. Επίσης είναι συμβατό με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας μάζας μετά από την πέψη των πρωτεϊνών. Οι διαδοχικές φάσεις της χρωστική αργύρου είναι η μονιμοποίηση της πρωτεΐνης, η ευαισθητοποίηση, ο εμποτισμός με νιτρικό άργυρο και τέλος η ανάπτυξη της εικόνας.

Πρωτόκολλο

| ΒΗΜΑ | ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ | ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ Δ/ΤΩΝ | ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ | ΧΡΟΝΟΣ |
|------|-----------|-----------------|------------|--------|
|------|-----------|-----------------|------------|--------|

| | | | | |
|-----------|---|--|---|---|
| Fixation | 50% MeOH 5% AcOH | MeOH 300ml acetic acid 30 ml dH ₂ O 270ml | Ανάδευση | 20min |
| Wash | 50% MeOH | 300 ml MeOH 300 ml dH ₂ O | Ανάδευση | 10min |
| Wash | dH ₂ O | | 4-5 πλύσεις ή 2-3 πλύσεις O/N | ανά 10min |
| Sensitize | 0,02% Na ₂ S ₂ O ₃ sodium thiosulphate | Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O 0,1g dH ₂ O 500ml | Ανάδευση | 20sec-1min |
| Wash | dH ₂ O | | 2-3 πλύσεις | ανά 1min |
| Stain | 0,1% AgNO ₃ (4°C) | AgNO ₃ 0,5gr dH ₂ O 500ml (4°C) | Ανάδευση | 20min |
| Wash | dH ₂ O | | 2-3 πλύσεις | ανά 1min |
| Developer | 2% Na ₂ CO ₃ 0.04 % HCHO | Na ₂ CO ₃ 10 gr dH ₂ O 500ml φορμαλδεΐδη**200μl | Απαλή ανακίνηση | μέχρι την εμφάνιση των spots |
| Stopper | 5 % AcOH | acetic acid 25 ml dH ₂ O 475 ml | 1 ^ο : 2 πλύσεις 2 ^ο : προσθήκη | -ανά 1min -1h |
| Storage | dH ₂ O | | | |

Πίνακας 9 : Πρωτόκολλο silver stain

- Αφαιρούμε με προσοχή το μικρό τζάμι από πάνω και κόβουμε το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel). Στη συνέχεια ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία για το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel).

** Η φορμαλδεΐδη **πρέπει** να προστεθεί αμέσως πριν τη χρήση του developer solution.

Σημείωση :Εάν υπάρχει πρόβλημα με την ανάπτυξη του χρώματος μπορούμε να κάνουμε το DEVELOPMENT σε δυο βήματα με το ίδιο διάλυμα (1 min, αλλαγή και ξανά φρέσκο διάλυμα) ή να βάλουμε περισσότερο από 200 μl φορμαλδεΐδη.

- Τέλος πακετάρουμε τα gel σε ειδικές μεμβράνες και τα αποθηκεύουμε στους 4°C.

Σημείωση :Είναι πολύ σημαντικό στα sensitize και developer solution να κρατηθεί ο ίδιος χρόνος και για τα δυο δείγματα, άγριου και μεταλλαγμένου στελέχους ώστε να είναι συγκρίσιμα.

Σημείωση : Ο νιτρικός άργυρος βάφει τις επιφάνειες και το δέρμα γι αυτό απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά την μεταχείριση του.

Σημείωση : **ΔΕΝ** πιάνουμε ποτέ το πήκτωμα με τα χέρια, και τα διαλύματα **ΔΕΝ** τα ρίχνουμε απ' ευθείας πάνω στο πήκτωμα.

3.10. Χρώση με Coomassie

Η χρώση με Coomassie βασίζεται στην ικανότητα των μορίων της χρωστικής να ενώονται με τις πρωτεΐνες μέσω ιονικών αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται ανάμεσα σε ομάδες σουλφονικών οξέων και θετικών πρωτεϊνικών αμινομάδων,

όπως επίσης και μέσω έλξεων Van der Waals. Η χρωστική Coomassie **R**-250, η πιο κοινή από τις δύο, μπορεί να ανιχνεύσει μικρές ποσότητες πρωτεϊνών της τάξεων των μg ($\geq 0.1 \mu\text{g}$).

Πρωτόκολλο

- Αφαιρούμε με προσοχή το μικρό τζάμι από πάνω και κόβουμε το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel). Στη συνέχεια ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία για το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel).
- Προσθέτουμε το διάλυμα βαφής Coomassie και ανακινούμε ελαφρά για 15-30min

Σημείωση: Διάλυμα βαφής Coomassie: 40% methanol-10% acetic acid-Coomassie **R** 250- dH₂O.

- Αφαιρούμε τη χρωστική
- Ξεπλένουμε με λίγο dH₂O για να φύγει η περίσσεια της χρωστικής
- Προσθέτουμε το διάλυμα αποχρωματισμού (destain), αφήνουμε μέχρις ότου εμφανιστούν οι μπάντες ή τα spots των πρωτεϊνών

Σημείωση: Διάλυμα αποχρωματισμού: 40% methanol-10% acetic acid- dH₂O. Τουλάχιστον μια αλλαγή του διαλύματος αποχρωματισμού είναι απαραίτητη, ενώ για πιο γρήγορη εμφάνιση χρειάζονται παραπάνω και πιο συχνά.

3.11. In-gel digestion

Η μέθοδος *in-gel digestion* είναι απαραίτητη για την προετοιμασία των δειγμάτων πριν τη φασματοσκοπία μάζας. Βασίζεται σε τέσσερα κρίσιμα βήματα: αποχρωματισμός, αναγωγή/αλκυλίωση των κυστεϊνών των πρωτεϊνών, πρωτεολυτικό κόψιμο των πρωτεϊνών και τέλος την εξαγωγή των παραγόμενων πεπτιδίων, τα οποία επιτρέπουν την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με τη χαρακτηριστική τους μάζα και μοτίβο.

Το βήμα της πρωτεόλυσης γίνεται κατά κύριο λόγο θρυψίνη πρωτεάση της σερίνης. Η θρυψίνη κόβει συγκεκριμένα τον πεπτιδικό δεσμό στο καρβοξυτελικό άκρο των βασικών αμινοξέων αργινίνη και λυσίνη. Εάν υπάρχει αμινοξύ όπως ασπαρτικό οξύ ή γλουταμινικό οξύ σε άμεση γειτονία με τη θέση κοψίματος, τότε ο ρυθμός της υδρόλυσης μειώνεται, ενώ ένα καρβοξυτελικό άκρο προλίνης σε αυτή τη θέση αναστέλλει τελείως την υδρόλυση. Λειτουργεί άριστα σε συνθήκες pH 8 και θερμοκρασία 37°C.

Μη θεμιτή παρενέργεια της χρήσης πρωτεολυτικών ενζύμων είναι η αυτοπρωτεόλυση τους. Για την αποφυγή της, οι εταιρείες προσφέρουν τροποποιημένες θρυψίνες με επιλεκτικές μεθυλιώσεις οι οποίες ελαχιστοποιούν την αυτολυτική δραστηριότητα στις θέσεις κοψίματος αργινίνης.

Πρωτόκολλο

Σημείωση: Πρώτα από όλα θα **ΠΡΕΠΕΙ** να καθαρίσουμε πάρα πολύ καλά το χώρο εργασίας. Να φοράμε ποδιά, γάντια και να είναι πιασμένα τα μαλλιά για την αποφυγή κερατινών στα δείγματα.

1^η μέρα

- Κόβω τα spots και τα βάζω σε eppendorf (A)

- Προσθέτω σε κάθε spot:για silver stain: 150μl $K_3Fe(CN)_6$ 60mM
150μl $Na_2S_2O_3$ 200Mm
για Coomassie: 300μl (50%methanol+100mM AmBic)
- Vortex μέχρι τα spots να αποχρωματιστούν
- Αφαιρώ το υπερκείμενο.
- Προσθέτω 200μl HPLC H_2O και κάνω πολλές πλύσεις μέχρις ότου φύγει το κίτρινο χρώμα
- Αφαιρώ το HPLC H_2O
- Κόβω σε μικρά κομμάτια τα spots, πάνω σε μικρή γυάλινη πλάκα καλυμμένη με ζελατίνη **OXI** parafilm
- Προσθέτω 400μl HPLC H_2O , spin για να κάτσουν τα κομματάκια του gel, αφαιρώ το HPLC H_2O
- Προσθέτω 500μl 50% ACN, shaker για 5min
- Spin, πετάω υπερκείμενο
- Προσθέτω 500μl 100% ACN, shaker για 5min
- Spin, πετάω υπερκείμενο
- Προσθέτω 250μl 100mM AmBic, shaker για 5min, **ΔEN** πετάω υπερκείμενο
- Προσθέτω 250μl 100% ACN, shaker για 5min, αφαιρώ υπερκείμενο
- Speed Vac για 30min (setting low pressure-30min check)
- Προσθέτω 20μl(μέχρι να σκεπαστούν τα spots) διάλυμα θρυψίνης 20μg/μl[100μl HCl 1mM+900 μl AmBic 40 mM σε 9% ACN], spin για λίγα sec
- 15min σε πάγο, δεν αφαιρώ θρυψίνη
- Προσθέτω 50μl AmBic 40 mM σε 9% ACN
- O/N στους 37°C (4h-20h)

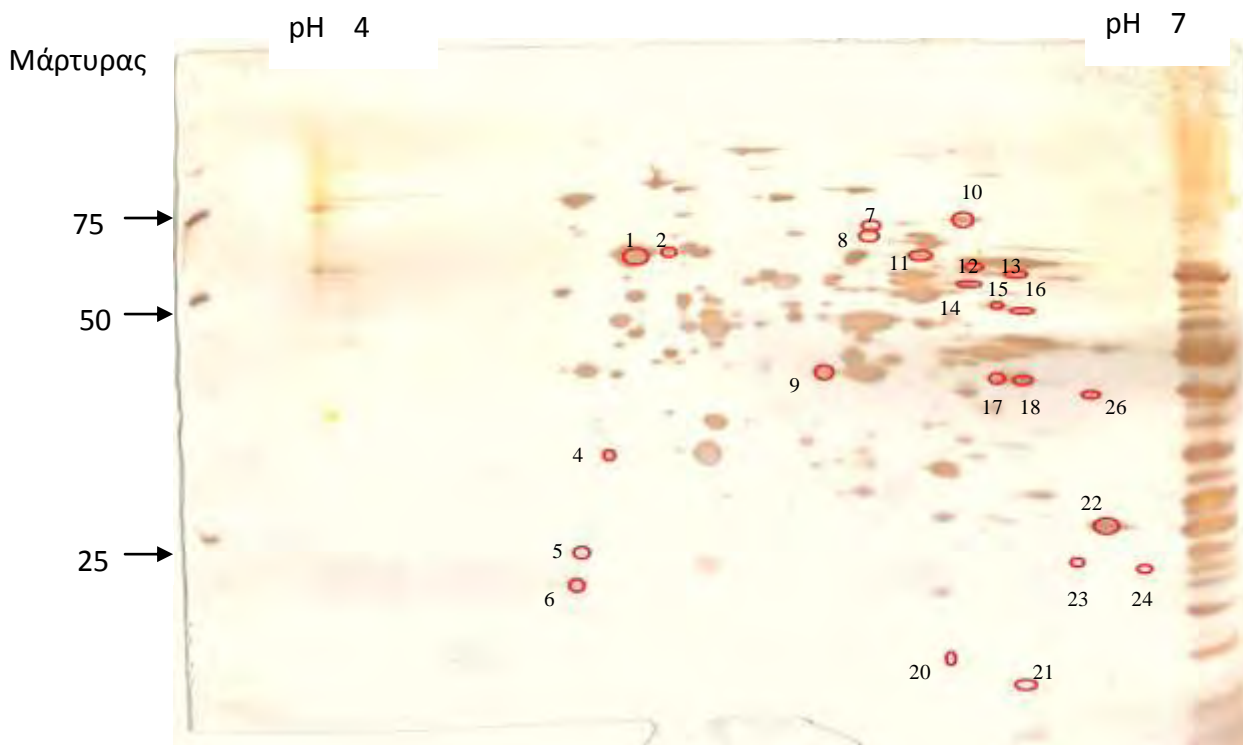
2^η μέρα

- Spin στα eppendorf (A), μαζεύω υπερκείμενο (προσοχή μην πάρω gel) σε low binding PCR tubes (B)
- Προσθέτω στα (A) 50 (μέχρι να σκεπαστούν τα κομματάκια) AmBic 50 mM
- Spin, μαζεύω υπερκείμενο στα (B)
- Προσθέτω 100% ACN 50μl στα (A), shaker για 15min, μαζεύω υπερκείμενο στα (B)
- Προσθέτω 5% Formic Acid 50μl στα (A), shaker για 15min, μαζεύω υπερκείμενο στα (B)
- Προσθέτω 100% ACN 50μl στα (A), shaker για 15min, μαζεύω υπερκείμενο στα (B)
- Speed Vac στα (B) μέχρι να εξατμιστεί όλο το διάλυμα.
- Προσθέτω 15μl MS buffer (ACN 2% / Formic Acid 0,1% / HPLC H_2O), αποθήκευση στους -80°C

Γ) Αποτελέσματα

1. Ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες

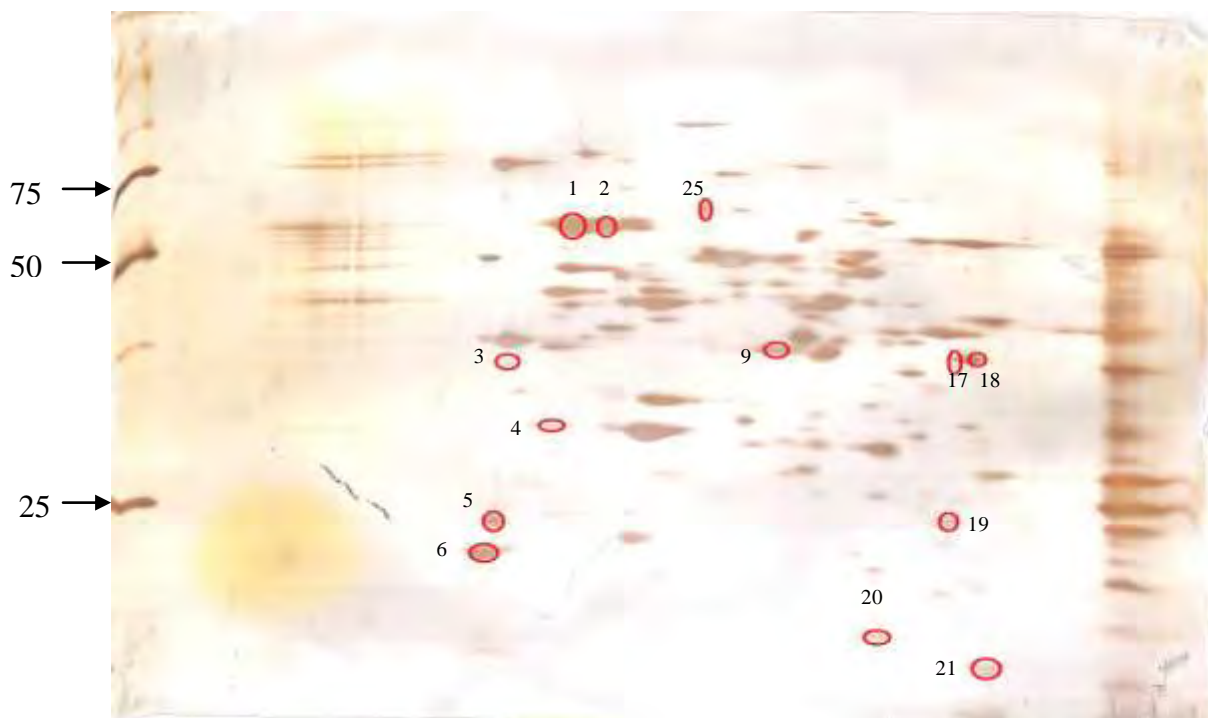
Οι εικόνες 12, 13 και 14, 15 είναι αποτελέσματα 2D ηλεκτροφορήσεων αγρίου και μεταλλαγμένου στελέχους σε εύρος pH 4-7 και 5-8 αντίστοιχα. Τα πηκτώματα με ίδιο εύρος pH συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Τα spots που είναι σημειωμένα αποφασίστηκε ότι θα κοπούν εξαιτίας είτε μοναδικής ύπαρξης σε ένα από τα δύο στελέχη (κυρίως στου αγρίου τύπου αφού αυτές πιθανόν να εμπλέκονται στη μολυσματικότητα του) είτε σε υπερέκφραση αυτών σε ένα από τα δύο στελέχη. Οι πίνακες 10,11 δείχνουν τις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μετά από συνδυασμό ανάλυσης των δειγμάτων με φασματοσκοπία μάζας (Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών Αλέξανδρος Φλέμινγκ) και σύγκριση τους με ήδη γνωστές πρωτεΐνες στη βάση δεδομένων BLAST.



Εικόνα 12 : Αποτελέσματα 2D ηλεκτροφόρηση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών αγρίου στελέχους

pH 4

pH 7

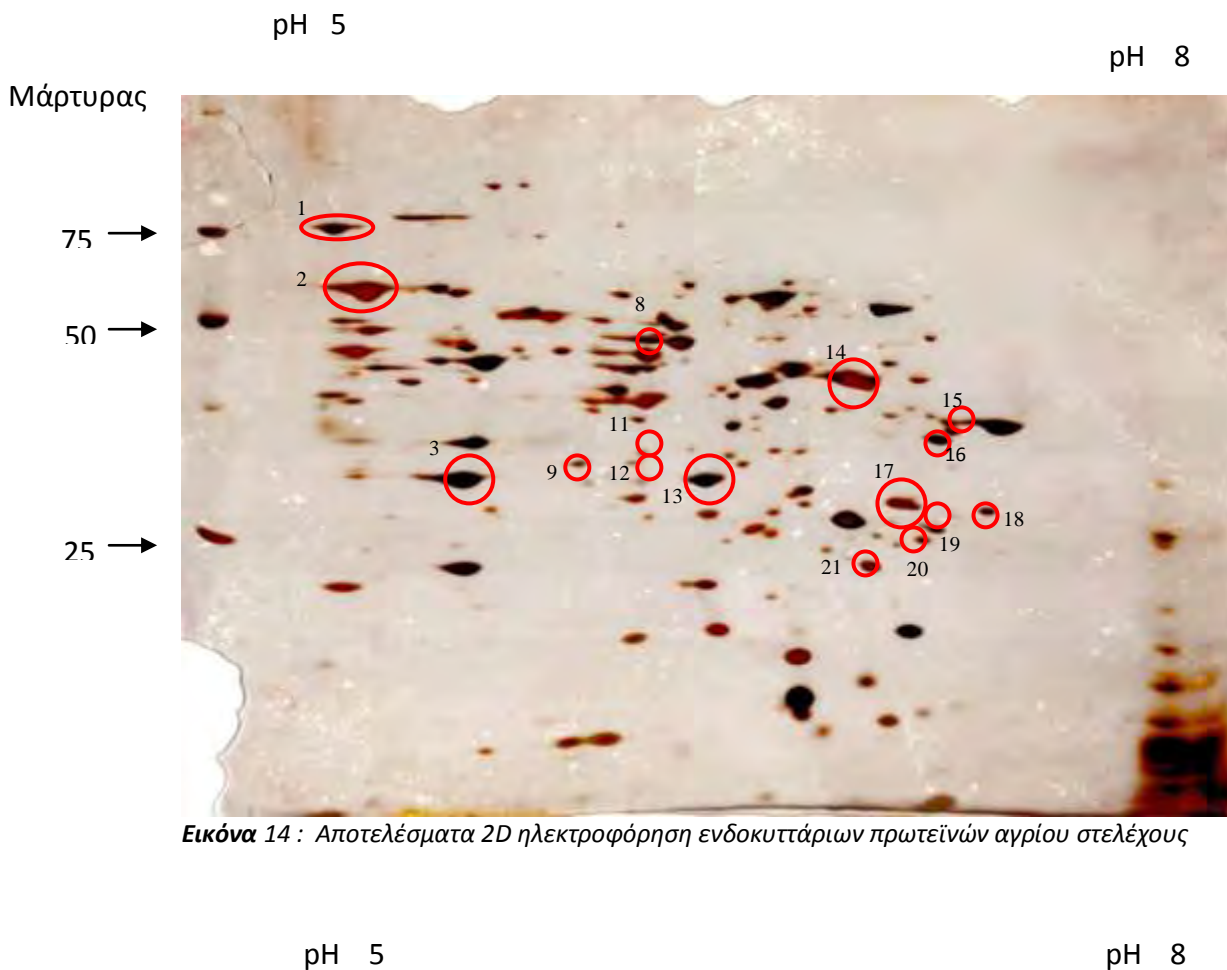


Εικόνα 13 : Αποτελέσματα 2D ηλεκτροφόρηση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών μεταλλαγμένου στελέχους

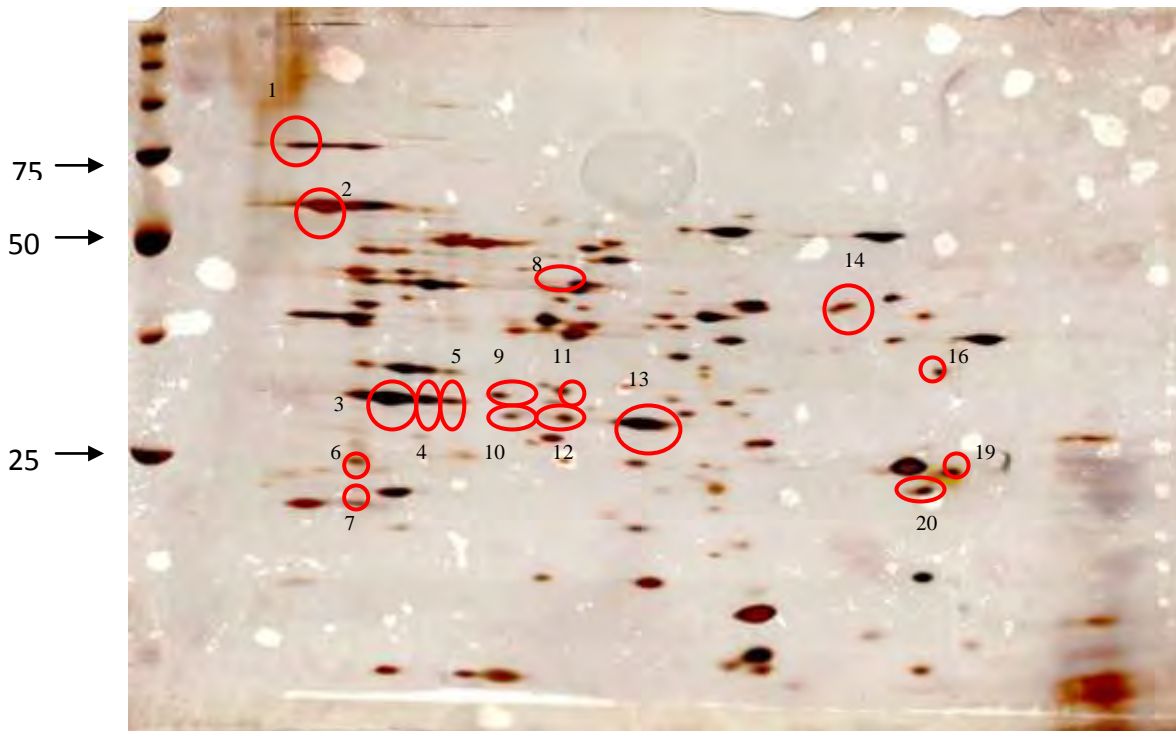
| Αριθμός spot | Άγριο στέλεχος | Πρωτεΐνη | Μεταλλαγμένο στέλεχος | Πρωτεΐνη |
|--------------|----------------|---|-----------------------|--|
| 1 | | Chaperonin GroEL (YP_609927.1) | | Chaperonin GroEL (YP_609927.1) |
| 4 | Υπερέκφραση | Chaperone protein HchA (YP_608440.1) | | Weak spot |
| 5 | | Heat shock protein GrpE (YP_606509.1) | υπερέκφραση | Heat shock protein GrpE (YP_606509.1) |
| 6 | | Inorganic pyrophosphatase (YP_606382.1) | υπερέκφραση | Το δείγμα χάθηκε κατά την επεξεργασία |
| 9 | Υπερέκφραση | Alcohol Dehydrogenase II (YP_608524.1) | | Alcohol Dehydrogenase II (YP_608524.1) |
| 11 | | NAD ⁺ dependent aldehyde dehydrogenase (YP_606389.1) | | - |
| 12 | | Histidine ammonia-lyase (YP_610510.1) | | - |
| 18 | | Putrescine ABC | | Putrescine ABC |

| | | | | |
|----|--|---|--|---|
| | | Transporter (YP_610699.1) | | Transporter (YP_610699.1) |
| 19 | | - | | 3-ketoacyl- reductase (YP_607282.1) |
| 20 | | Weak spot | | Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase precursor (PPIase) (YP607718.1) |
| 21 | | Weak spot | | <i>Outer membrane protein H1</i> (YP_607031.1) |
| 22 | | 50 S ribosomal protein L25 (YP_606582.1S) | | - |
| 24 | | <i>Outer membrane protein H1</i> (YP_607031.1) | | - |

Πίνακας 10 : Αποτελέσματα φασματοσκοπίας μάζας των αριθμημένων spots 2D ηλεκτροφορήσεων σε εύρος pH 4-7
(Τα spot 2,3,7,8,10,13,14,15,16,17,23,25,26 είτε είχαν αδύναμο σήμα είτε επιμολύνθηκαν με κερατίνες)



Εικόνα 14 : Αποτελέσματα 2D ηλεκτροφόρηση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών αγρίου στελέχους



Εικόνα 15 : Αποτελέσματα 2D ηλεκτροφόρηση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών μεταλλαγμένου στελέχους

| Αριθμός spot | Άγριο στέλεχος | Πρωτεΐνη | Μεταλλαγμένο στέλεχος | Πρωτεΐνη |
|--------------|----------------|-------------------------------------|-----------------------|--|
| 1 | Υπερέκφραση | Chaperone hsp70 (YP_606510.1) | | Chaperone hsp70 (YP_606510.1) |
| 2 | | Chaperonin GroEL (YP_609927.1) | | Chaperonin GroEL (YP_609927.1) |
| 3 | | Elongation factor Ts (YP_609692.1) | | Elongation factor Ts (YP_609692.1) |
| 4, 5 | | - | | Elongation factor Ts (YP_609692.1) |
| 6 | | - | | Ribose 5-phosphate isomerase A (YP_610651.1) |
| 7 | | - | | Inorganic pyrophosphatase (YP_606382.1) |
| 8 | Υπερέκφραση | Arginine deiminase (YP_609895.1) | | Weak spot |
| 9 | | Thioredoxin reductase (YP_606644.1) | | Weak spot |
| 10 | | Weak spot | | Weak spot |
| 11 | | Flagellin | Υπερέκφραση | Flagellin (YP_6093281) |

| | | | | |
|----|-------------|--|-------------|---|
| | | (YP_6093281) | | |
| 12 | | <i>Oxidoreductase</i> (YP_610072) | Υπερέκφραση | <i>3-oxoacyl (acyl-carrier-protein) synthase III</i> (YP_609329.1) |
| 13 | | Succinyl-CoA synthase subunit alpha (YP_609155.1) | | Succinyl-CoA synthase subunit alpha (YP_669155.1) |
| 14 | Υπερέκφραση | Ornithine carbamoyl transferase (YP_609896.1) | | Ornithine carbamoyl transferase (YP_609896.1) |
| 15 | | Quinone oxidoreductase (YP_605840.1) | | - |
| 16 | Υπερέκφραση | Branched chain a.a. aminotransferase (YP_607723.1) | | Branched chain a.a. aminotransferase (YP_607723.1) |
| 17 | | Non-heme chloroperoxidase (YP_608387.1) | | - |
| 18 | | D-methionine binding lipoprotein (YP_605877.1) | | - |
| 19 | | Molybdate ABC transporter (YP_607903.1) | | Molybdate ABC transporter (YP_607903.1) |
| 20 | | 3- Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (YP_609074.1) | | 3 -Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (YP_609074.1) |
| 21 | | Hypothetical protein PSEEN2905 YP_608474.1 | | - |

Πίνακας 11 : Αποτελέσματα φασματοσκοπίας μάζας των αριθμημένων spots 2D ηλεκτροφορήσεων σε εύρος pH 5-8

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται όλες οι ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν και στα δύο στελέχη χωρίς όμως να παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο αντικείμενο μελέτης μας και αυτές που υπερεκφράζονται ή υπάρχουν μόνο σε ένα από τα δύο στελέχη.

Περαιτέρω ανάλυση του ρόλου εκείνων που ταυτοποιήθηκαν και σε άλλα στελέχη και εμπλέκονται στη μολυσματικότητα αυτών ή ακόμα και πρωτεϊνών με υποθετική δράση θα συζητηθούν παρακάτω.

| Σύνολο ενδοκυττάρειων πρωτεϊνών | Κωδικός γονιδίου |
|---------------------------------|------------------|
| Άγριο στέλεχος | |
| 50S ριβοσωμική πρωτεΐνη L25 | PSEEN0856 |
| 3-υδροξυακετυλ-CoA αφυδρογονάση | PSEEN3548 |

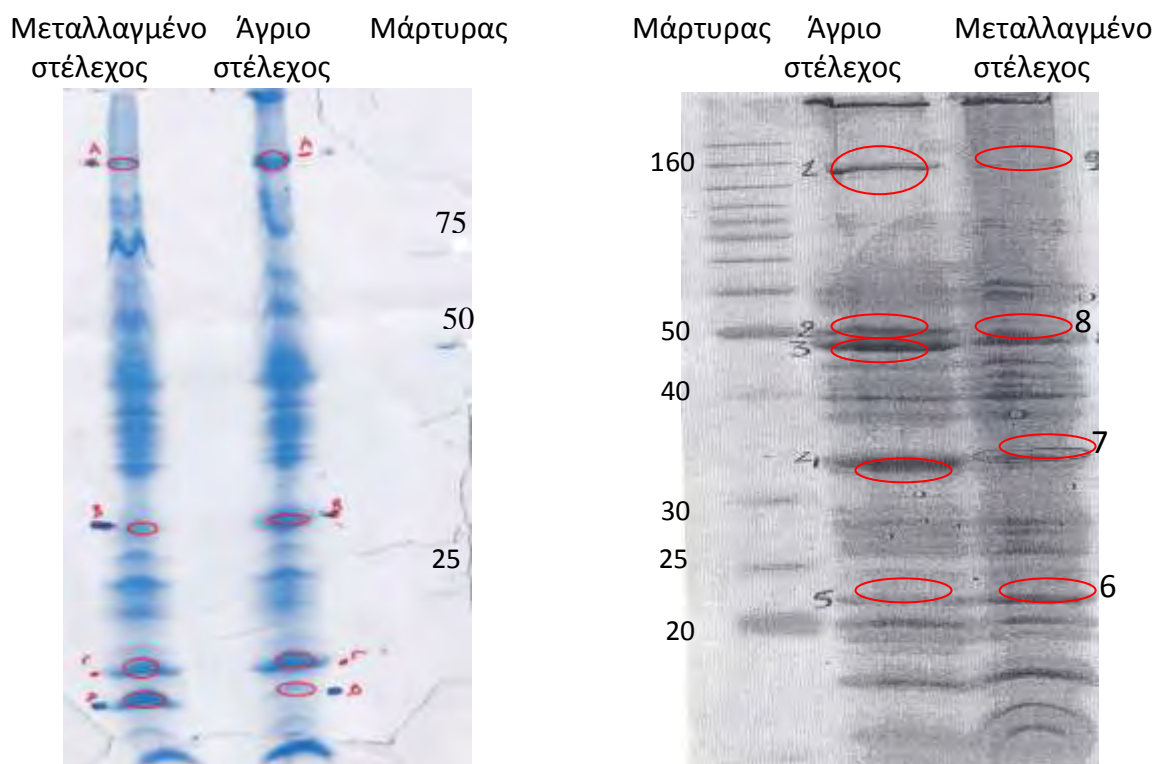
| | |
|--|-----------|
| ABC μεταφορέας πουτρεσίνης | PSEEN5295 |
| ABC μεταφορέας μολύβδου | PSEEN2286 |
| D-μεθειονίνη συνδεόμενη λιποπρωτεΐνη | PSEEN0066 |
| NAD+ εξαρτώμενη αλδεϋδική δεϋδρογονάση | PSEEN0634 |
| Succinyl-CoA synthase subunit alpha | PSEEN3635 |
| Αλκοολική αφυδρογονάση II | PSEEN2959 |
| Αμινοτρανσφεράση διακλαδισμένων α.α. | PSEEN2090 |
| Αμμωνιακή λυάση ιστιδίνης | PSEEN5096 |
| Ανόργανη πυροφωσφατάση | PSEEN0626 |
| Απιμινάση αργινίνης | PSEEN4428 |
| Εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη H1 | PSEEN1343 |
| Καρβαμοϋλοτρανσφεράση ορνιθίνης | PSEEN4429 |
| Μη αιμική χλωροπεροξειδάση | PSEEN2814 |
| Οξειδοοξειδάση κινόνης | PSEEN0029 |
| Πρωτεΐνη θερμικού σοκ GrpE | PSEEN0777 |
| Ρεδοκτάση θειοοξειδίνης | PSEEN0924 |
| Τσαπερονίνη HchA | PSEEN1014 |
| Τσαπερονίνη hsp70 | PSEEN0778 |
| Τσαπερονίνη GroEL | PSEEN4460 |
| Υποθετική πρωτεΐνη | PSEEN2905 |
| Φλαγελίνη | PSEEN3826 |
| Μεταλλαγμένο στέλεχος | |
| 3-κετοακυλο ρεδοκτάση | PSEEN1618 |
| 3-υδροξυακετυλ-CoA αφυδρογονάση | PSEEN3548 |
| ABC μεταφορέας πουτρεσίνης | PSEEN5295 |
| ABC μεταφορέας μολύβδου | PSEEN2286 |
| PPIase | PSEEN2085 |
| Succinyl-CoA synthase subunit alpha | PSEEN3635 |
| Αλκοολική δεϋδρογονάση II | PSEEN2959 |
| Αμινοτρανσφεράση διακλαδισμένων α.α. | PSEEN2090 |
| Ανόργανη πυροφωσφατάση | PSEEN0626 |
| Εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη H1 | PSEEN1343 |
| Καρβαμοϋλοτρανσφεράση ορνιθίνης | PSEEN4429 |
| Παράγοντας επιμήκυνσης Ts | PSEEN4219 |
| Πρωτεΐνη θερμικού σοκ GrpE | PSEEN0777 |
| Ριβοσωμική 5-φωσφορική ισομεράση A | PSEEN5243 |
| Τσαπερονίνη hsp70 | PSEEN0778 |
| Τσαπερονίνη GroEL | PSEEN4460 |
| Φλαγελίνη | PSEEN3826 |

Πίνακας 12 : Συνολικά αποτελέσματα ενδοκυττάρων πρωτεϊνών των δύο στελεχών: με κόκκινο είναι αυτές που εμφανίζονται μόνο στο ένα στέλεχος, ενώ με πράσινο αυτές που υπερεκφράζονται σε ένα από τα δύο στελέχη.

2. Εξωκυττάρειες πρωτεΐνες

Η εικόνα 16 είναι αποτέλεσμα 1D ηλεκτροφορήσεων αγρίου και μεταλλαγμένου στελεχούς. Οι μπάντες που είναι σημειωμένες κρίθηκαν ενδιαφέρουσες είτε λόγω

μοναδικότητας είτε λόγω υπερέκφρασης(πιο έντονη μπάντα) σε ένα από τα δύο στελέχη. Ο πίνακας δείχνει τα αποτελέσματα μετά από ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας και σύγκριση στη βάση δεδομένων BLAST.



Εικόνες 16-17: Αποτελέσματα 1D ηλεκτροφόρηση εξωκυττάρων πρωτεϊνών αγρίου και μεταλλαγμένου στελέχους

| Αριθμός spot | Άγριο στέλεχος | Πρωτεΐνη | Μεταλλαγμένο στέλεχος | Πρωτεΐνη |
|--------------|----------------|--|-----------------------|---|
| A | υπερέκφραση | Surface colonization protein (YP_607805.1) | | Surface colonization protein (YP_607805.1) |
| B | υπερέκφραση | Flagellin (YP_609328.1) | | Flagellin (YP_609328.1) |
| Γ | | Outer membrane protein OprG (YP_606336.1) 15 | | Outer membrane protein OprG (YP_606336.1) |
| Δ | υπερέκφραση | Hemolysin co-regulated protein 2A(YP_609116.1) | | Hemolysin co-regulated protein 2A (YP_609116.1) |
| 1 | υπερέκφραση | Surface colonization protein (YP_607805.1) | | |
| 2 | | Flagellar cap protein FliD (YP_609326.1) | - | |
| 3 | υπερέκφραση | Alkaline metalloprotease precursor | | |

| | | | | |
|---|--|---|--|---|
| | | (YP_607222.1) | | |
| 4 | | Flagellin (YP_609328.1) | | |
| 5 | | Outer membrane protein OprG (YP_606336.1) | | |
| 6 | | | | Outer membrane protein OprG (YP_606336.1) |
| 7 | | | | Flagellin (YP_609328.1) |
| 8 | | | | Alkaline metalloprotease precursor (YP_607222.1) |
| 9 | | | | Surface colonization protein (YP_607805.1) |

Πίνακας 13 : Αποτελέσματα φασματοσκοπίας μάζας των αριθμημένων spots 1D ηλεκτροφορήσεων

Ουσιαστικά και τα δύο 1D πηκτώματα δίνουν τα ίδια αποτελέσματα, γεγονός που αποδεικνύει την επαναληψιμότητα αυτών. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται όλες οι εξωκυττάριες πρωτεΐνες που υπάρχουν και στα δύο στελέχη ή υπερεκφράζονται σε ένα από τα δύο.

Περαιτέρω ανάλυση του ρόλου εκείνων που ταυτοποιήθηκαν και σε άλλα στελέχη και εμπλέκονται στη μολυσματικότητα αυτών θα συζητηθούν παρακάτω.

| Σύνολο εξωκυττάριων πρωτεϊνών και στα δύο στελέχη | Κωδικός γονιδίου |
|---|------------------|
| Αιμολυσίνη συν-ρυθμιστική πρωτεΐνη 2A | PSEEN3595 |
| Αλκαλική μεταλλοπρωτεάση AprA | PSEEN1550 |
| Επιφανειακή πρωτεΐνη αποικισμού | PSEEN2177 |
| Εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη oprG | PSEEN0578 |
| Φλαγελίνη | PSEEN3826 |
| Flagellar cap protein FlhD | PSEEN3824 |

Πίνακας 14 : Συνολικά αποτελέσματα εξωκυττάριων πρωτεϊνών των δύο στελεχών: με ροζ είναι αυτές που υπερεκφράζονται στον άγριο τύπο, ενώ με πράσινο στο μετάλλαγμα.

Δ. Συζήτηση

Στη συγκεκριμένη εργασία επιδιώχθηκε η ταυτοποίηση πρωτεϊνών σε δείγματα αγρίου και μεταλλαγμένου στελέχους *Pseudomonas entomophila*, που εμπλέκονται σε μηχανισμούς παθογένειας κατά της *Drosophila melanogaster*. Χρησιμοποιήθηκαν εργαλεία πρωτεομικής, όπως η ισοηλεκτρική εστίαση και η SDS ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου, με αποτέλεσμα τον εντοπισμό πρωτεϊνών που παρουσίαζαν διαφορετικό προφίλ έκφρασης ανάμεσα στα δύο στελέχη με επαναλήψιμο τρόπο.

Μελετήθηκαν ξεχωριστά οι ενδοκυττάρειες και εξωκυττάρειες πρωτεΐνες που προέρχονται μετά από επεξεργασία των κυττάρων και του υπερκειμένου των βακτηριακών καλλιιεργειών αντίστοιχα.

Η απομόνωση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών επήλθε γενικώς ομαλά με μικρά προβλήματα στην ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών και στο πρώτο βήμα της ισοηλεκτρικής εστίασης από ουσίες-προσμίξεις που μπορεί να παρέμβουν σε αυτό.

Από την άλλη η απομόνωση των εξωκυττάρων ή εκκρινόμενων πρωτεϊνών αποδείχθηκε πολύ δύσκολη υπόθεση μιας και είχαμε να αντιμετωπίσουμε πολλά θέματα. Κλασικό πρόβλημα αποτελούσε η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών, ενώ δεν καταφέραμε ποτέ να έχουμε έναν ικανοποιητικό καθαρισμό τους χωρίς όμως μεγάλες απώλειες της τελικής ποσότητας. Τελικά καταλήξαμε στα πρωτόκολλα TCA/ice-cold acetone, Phenol/ice-cold acetone, 2D clean up kit με τα οποία είχαμε καλά, αν και όχι άριστα, αποτελέσματα. Δυστυχώς υπήρχε και πάλι απώλεια ποσότητας, αλλά το βασικότερο ήταν η επίμονη παραμονή ουσιών-προσμίξεων στα δείγματα μας. Τα παραπάνω προβλήματα είχαν αντίκτυπο στην ισοηλεκτρική εστίαση και στην SDS ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου με αποτέλεσμα να μην έχουμε ούτε μία ικανοποιητική εικόνα για να συνεχίσουμε στις περαιτέρω αναλύσεις των δειγμάτων. Ωστόσο, καταφέραμε να τρέξουμε 1D πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου και μετά από αναλύσεις φασματοσκοπίας μάζας και συγκρίσεις με τη βάση δεδομένων BLAST να πάρουμε τα πρώτα μας αποτελέσματα που είχαν μεγάλο ενδιαφέρον (Γ.2).

Προβλήματα κατά την 2D ηλεκτροφόρηση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω αντιμετωπίσαμε πολλά προβλήματα στην 2D ηλεκτροφόρηση ως συνέπεια προβλημάτων στα προηγούμενα βήματα προετοιμασίας των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, η ισοηλεκτρική εστίαση είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε χαμηλού μοριακού βάρους ιοντικές προσμίξεις. Οποιοσδήποτε μη-πρωτεϊνικές προσμίξεις στο δείγμα μπορεί να επέμβουν στο διαχωρισμό και να εμφανιστούν αποτελέσματα των πηκτωμάτων.

Παραδείγματα αυτών είναι:

| Προσμίξεις | Προβλήματα που προκαλούν |
|---|--|
| Άλατα- άλλα φορτισμένα μικρού μοριακού βάρους μόρια | Εμποδίζουν τη διαδικασία της ισοηλεκτρικής εστίασης και πρέπει να απομακρύνονται ή να παραμένουν σε όσο το δυνατόν χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Άλατα στο IPG strip έχουν ως αποτέλεσμα την υψηλή αγωγιμότητα του. Η εστίαση των πρωτεϊνών δεν είναι δυνατή μέχρι τα ιόντα να μετακινηθούν στο τέλος του strip, αυξάνοντας έτσι τον απαιτούμενο χρόνο της IEF. Η παρουσία των αλάτων γίνεται εμφανής στα πηκτώματα με τη μορφή οριζόντιων ραβδώσεων στο φόντο(horizontal streaking). |
| Νουκλεοτίδια- μεταβολίτες- φωσφολιπίδια | Είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα μόρια και μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα τη δυσκολία εστίασης των πρωτεϊνών προς την άνοδο. |
| Πολυσακχαρίτες | Μπορούν να φράξουν τους πόρους του πηκτώματος |

| | |
|-----------------------|---|
| | προκαλώντας κατακρήμιση των πρωτεϊνών ή αύξηση του απαιτούμενου χρόνου για την ισοηλεκτρική εστίαση. Ορισμένοι πολυσακχαρίτες είναι αρνητικά φορτισμένοι και σχηματίζουν συμπλέγματα με πρωτεΐνες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα τη δυσκολία εστίασης των πρωτεϊνών προς την άνοδο. Στα 2D πηκτώματα εμφανίζονται με οριζόντιες ραβδώσεις στο φόντο(horizontal streaking). |
| Λιπίδια | Συμπλέγματα πρωτεϊνών-λιπιδίων μειώνουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών επηρεάζοντας το pI και το μοριακό τους βάρος. |
| Φαινολικές ενώσεις | Τροποποιούν τις πρωτεΐνες μέσω μιας ενζυμικά καταλυόμενης οξειδωτικής αντίδρασης. |
| DNA-RNA | Υψηλού μοριακού βάρους νουκλεϊκά οξέα μπορούν να φράξουν τους πόρους του πηκτώματος. Επίσης δεσμεύονται στις πρωτεΐνες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων εμποδίζοντας την εστίαση τους. Τέλος αυξάνουν το ιξώδες του δείγματος και εμφανίζονται στα πηκτώματα ως ραβδώσεις στο φόντο(streaking). |
| Ιοντικά απορρυπαντικά | Το πιο συνηθισμένο είναι το SDS που σχηματίζει συμπλέγματα με τις πρωτεΐνες φορτίζοντας έτσι όλο το σύμπλεγμα αρνητικά, με αποτέλεσμα να μην εστιάζονται οι πρωτεΐνες σύμφωνα με το pI τους. |

Πίνακας 15 : Προσμίξεις που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της 2D ηλεκτροφόρησης

Μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν (Γ.1, Γ.2) παρουσίασαν επαναλήψιμο πρότυπο εμφάνισης κατά την πειραματική διαδικασία στην πλειοψηφία του συνόλου των πηκτωμάτων. Ορισμένες από αυτές παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη συμμετοχή τους σε μηχανισμούς παθογένειας και ο ρόλος τους εξετάζεται παρακάτω.

➤ **Ρόλος ενδοκυττάρων πρωτεϊνών**

3-κετοακυλο ρεδουκτάση

Η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται με την υπερπαραγωγή PHAs και ραμνολιπιδίων. Εντοπίστηκε μόνο στο μεταλλαγμένο στέλεχος και φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την μυξώδη υφή που παρουσιάζουν τα κύτταρα κατά την απομόνωση τους από την καλλιέργεια και την περίσσεια πολυσακχαριτών κατά την επεξεργασία του δείγματος (Qun Ren 2000).

D-μεθειονίνη συνδεόμενη λιποπρωτεΐνη

Αυτή η πρωτεΐνη είναι συστατικό μιας D-μεθειονίνης περμεάσης, μιας εξαρτώμενης πρωτεΐνης από ATP-οδηγούμενο σύστημα (ABC) μεταφορέων, και εμπλέκεται στην πρόσληψη της D-μεθειονίνης. Βρέθηκε στο στέλεχος του αγρίου τύπου, οπότε συμπεραίνουμε ότι μπορεί να εκμεταλλευτεί σε μεγαλύτερο βαθμό το

συγκεκριμένο αμινοξύ προς όφελος του. Έμμεσα, λοιπόν, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το άγριο στέλεχος πλεονεκτεί σε σχέση με το μετάλλαγμα όσον αφορά την ανάπτυξη του στον ξενιστή, εφόσον έχει την ικανότητα πρόσληψης μετ D που μπορεί να αποτελεί συστατικό των κυττάρων του εντόμου (Christophe Merlin 2002).

Αμινοτρανσφεράση διακλαδισμένων αμινοξέων

Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μεταφορά των αμινομάδων από διακλαδισμένα αμινοξέα στο 2-οξογλουταρικό. Σε άλλα στελέχη *Pseudomonas* συμμετέχει τόσο σε βιοσυνθετικά όσο και σε καταβολικά μονοπάτια των διακλαδισμένων αμινοξέων. Βρέθηκε στο στέλεχος του αγρίου τύπου, γεγονός που αποδεικνύει την αυξημένη μεταβολική του δραστηριότητα. Έμμεσα, λοιπόν, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το άγριο στέλεχος πλεονεκτεί σε σχέση με το μετάλλαγμα όσον αφορά την ανάπτυξη του στον ξενιστή, εφόσον έχει την ικανότητα σύνθεσης και μεταβολισμού διακλαδισμένων αμινοξέων, συστατικά των κυττάρων του εντόμου (John Norton, John Sokatch 1970).

Αμμωνιακή λυάση ιστιδίνης (histidine ammonia lyase)

Αποτελεί το πρώτο ένζυμο στο μη οξειδωτικό μονοπάτι καταβολισμού της L-ιστιδίνης. Φαίνεται να υπερεκφράζεται στο στέλεχος του αγρίου τύπου, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πιο αυξημένου μεταβολισμού από ότι στο μεταλλαγμένο στέλεχος. Έμμεσα, λοιπόν, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το άγριο στέλεχος πλεονεκτεί σε σχέση με το μετάλλαγμα όσον αφορά την ανάπτυξη του στον ξενιστή, εφόσον έχει την ικανότητα καταβολισμού ιστιδίνης που μπορεί να βρίσκεται ως συστατικό των κυττάρων του εντόμου.

Καρβαμοϋλοτρανσφεράση της ορνιθίνης

Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas syringae* εκκρίνει μια τοξίνη, η οποία δεν εμφανίζει ειδικότητα για συγκεκριμένους ξενιστές και ονομάζεται φασεολοτοξίνη (phaseolotoxin). Αυτή η τοξίνη είναι ένας αντιστρεπτός αναστολέας του ενζύμου καρβαμοϋλοτρανσφεράση της ορνιθίνης, το οποίο καταλύει το σχηματισμό της κιτρουλίνης από την ορνιθίνη και το καρβαμοϋλοφωσφορικό στο έκτο βήμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού της αργινίνης (Aguilera S. et al 2007).

Ο ίδιος μηχανισμός θα μπορούσε να συμβαίνει και στην *Pseudomonas entomophila* με το στέλεχος του αγρίου τύπου να υπερεκφράζει το ένζυμο καρβαμοϋλοτρανσφεράση της ορνιθίνης ώστε να μπορεί να ανταποκριθεί στη δράση μιας άγνωστης τοξίνης που λειτουργεί ως αναστολέας του, ώστε τελικά να μην «αυτοκτονεί» από την τοξίνη που το ίδιο παράγει.

Φλαγελίνη

Η φλαγελίνη είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των νηματίων του βακτηριακού μαστιγίου. Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas entomophila* κινείται με μαστίγια και αυτή η πρωτεΐνη αποτελεί δομικό συστατικό τους.

Επίσης λειτουργεί και ως παθογόνος παράγοντας που αναγνωρίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα πολλών διαφορετικών οργανισμών, όπως τα φυτά, τα θηλαστικά και τη *Drosophila melanogaster*. Αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς Toll 5 (TLR5) του μονοπατιού Toll και επάγει την έκφραση προφλεγμονοδών γονιδίων στο εντερικό επιθήλιο. Η υπερέκφραση της στο μετάλλαγμα πιθανότατα αυξάνει την ανοσοαπόκριση αυτή με αποτέλεσμα την πιο εύκολη εξόντωση του βακτηρίου (Gewirtz AT et al 2001).

Υποθετική πρωτεΐνη PSEEN2905

Είναι μια πρωτεΐνη η λειτουργία της οποίας, μετά από σύγκριση στη βάση δεδομένων BLAST, δεν εμφάνισε κάποια ομοιότητα με ήδη ταυτοποιημένες. Φαίνεται πως είναι μια ολοκαίνουρια ανακάλυψη, η λειτουργία της οποίας ίσως σχετίζεται άμεσα με την εντομοπαθογένεια του στελέχους *Pseudomonas entomophila*.

➤ **Ρόλος εξωκυττάρων πρωτεϊνών**

Αιμολυσίνη συν-ρυθμιστική πρωτεΐνη 2A

Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί απόδειξη ότι στο βακτήριο υπάρχει το εκκριτικό σύστημα τύπου 6 (T6SS), διότι εκκρίνεται από αυτό. Ο ακριβής ρόλος της πρωτεΐνης αυτής δεν είναι γνωστός, αλλά έχει βρεθεί σε διάφορα Gram-βακτήρια και παθογόνα βακτήρια των ευκαρυωτικών πως η έκφραση της Hcp επάγει απόπτωση των κυττάρων. Εφόσον λοιπόν η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής είναι αυξημένη στο άγριο στέλεχος, η έκκριση της πιθανόν να εμπλέκεται στην παθογένεια με την απόπτωση των κυττάρων που αποτελούν στόχο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Αλκαλική μεταλλοπρωτεάση ArgA

Η πρωτεάση αυτή ανήκει στους πιο σημαντικούς μολυσματικούς παράγοντες που εκκρίνει το βακτηριακό στέλεχος. Ομόλογες της πρωτεΐνης αυτής έχουν ταυτοποιηθεί και σε άλλα ήδη χαρακτηρισμένα μολυσματικά βακτηριακά είδη. Η μεταλλοπρωτεάση αυτή απαιτεί για την ενεργοποίηση της ιόντα ψευδαργύρου. Ο ιδιαίτερα σημαντικός ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι η καταστροφή των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) της *Drosophila melanogaster*, με αποτέλεσμα την προστασία της *Pseudomonas entomophila* και τη διαφυγή της από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Liehl P. et al 2006).

Επιφανειακή πρωτεΐνη αποικισμού

Εκκρίνεται από το βακτήριο και προσκολλάται στην επιφάνεια του ξενιστή βοηθώντας το να προσεγγίσει τον ξενιστή και να αποικίσει την επιφάνεια του. Επομένως λαμβάνει μέρος κατά την πρώτη φάση της διαδικασίας μόλυνσης του ξενιστή με το μηχανισμό προσκόλλησης στην κυτταρική επιφάνεια του. Η πρωτεΐνη αυτή υπερεκφράζεται στο άγριο στέλεχος, γεγονός που αποδεικνύει τον κρίσιμο ρόλο της στον μηχανισμό παθογένειας.

Flagellar cap protein (FliD)

Η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στον πολυμερισμό της φλαγκελίνης για το σχηματισμό των νηματίων των μαστιγίων.

Το άγριο στέλεχος στη φύση δημιουργεί βιοφίλμ ώστε να αναπτυχθεί πάνω σε στερεές επιφάνειες του ξενιστή. Ως βιοφίλμ χαρακτηρίζεται μια μικροβιακή κοινότητα που αποτελείται από ένα ή περισσότερα βακτηριακά είδη τα οποία παράγουν εξωκυττάρια πολυσακχαρίτες που δημιουργούν μια προστατευτική κάψα γύρω από τα βακτήρια και επιπλέον τα βοηθά να προσκολληθούν σε στερεές επιφάνειες. Τα βακτήρια σχηματίζουν μικροαποικίες μέσα στο στρώμα των πολυσακχαριτών.

Το μεταλλαγμένο στέλεχος μπορεί να αποικίσει τον ξενιστή μέσω της υπερέκφρασης της FliD πρωτεΐνης, διότι αυτή αποτελείται από μια πληθώρα ουδέτερων και όξινων ολιγοσακχαριτών, συστατικά της βλεννίνης, που προσκολλώνται στα κύτταρα του ξενιστή και δίνουν τη δυνατότητα πρόσφυσης του μεταλλαγμένου στελέχους πάνω σε αυτά (Ramphal R. et al 2001). Επιπλέον, όπως και η φλαγκελίνη αναγνωρίζεται και αυτή από τον υποδοχέα Toll5 της *Drosophila melanogaster* επάγοντας την ανοσοαπόκριση του εντόμου-ξενιστή. Η υπερέκφραση της στο μέταλλαγμα πιθανότατα αυξάνει την ανοσοαπόκριση αυτή με αποτέλεσμα την πιο εύκολη εξόντωση του βακτηρίου.

Βιβλιογραφία

- Ahmer, B.M., van Reeuwijk, J., Watson, P.R., Wallis, T.S., and Heffron, F.(1999) Salmonella SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. Mol Microbiol 31: 971-982
- Babizke, P., and Romeo, T., (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. Curr Opin Microbiol 10: 156-163
- Bohn, C., Rigoulay, C., and Bouloc, P., (2007) No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in Staphylococcus aureus. BMC Microbiol 10: 189-198
- Bowen, D. et al. (1998) Insecticidal toxins from the bacterium Photorhabdus luminescens. Science 280:2129-2132
- Bowen DJ, Rocheleau TA, Grutzmacher CK, Meslet L, Valens M, (2003) Genetic and biochemical characterization of PrtA, an RTX-like metalloprotease from Photorhabdus. Microbiol 149: 1581-1591
- Christophe Merlin, Gregory Gardiner, Sylvain Durand, and Millicent Masters (2002), The *Escherichia coli metD* Locus Encodes an ABC Transporter Which Includes Abc (MetN), YaeE (MetI), and YaeC (MetQ)
- Cutler R. (1993) Antioxidants, aging and longevity. In: Pryor W A (ed) Free Radicals in Biology, vol 6. Orlando, FL: Academic Pres, Inc. pp 381-395
- Devine, D.A. (2003) Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. Mol Immunol 40: 431-443
- Dubuis, C., and Haas, D. (2007) Cross species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. Appl Environ Microbiol 73: 650-654
- Dubuis, C., Keel, C., and Haas, D. (2007) Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. Eur J Plant Pathol 119: 311-328
- Duong, F., Lazdunski, A., Cami, B., Murgier, M., (1992) Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in Pseudomonas aeruginosa: Relationships to other secretory pathways. Gene 121: 47-54
- Duong, F., Lazdunski, A., Murgier, M., (1996) Protein secretion by heterologous expressed at 50% and 33% of the level observed in 6h- bacterial challenged (by injection) wild-type flies, respectively. AMP gene expression was monitored by RT-qPCR. The levels of AMP genes expression were normalized by the corresponding values of the rp49 signal. Found at DOI : 10.1371/journal. Ppat.0020056.sg003
- Fedhila, S., Nel, P., Lereclus, D.(2002) The inhA2 metalloprotease of Bacillus thuringiensis strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. J Bacteriol 184: 3296-3304
- Fedhila, S., Gohar, M., Slamti, L., Nel, P., Lereclus, D.(2003) The Bacillus thuringiensis PlcR-regulated gene inhA2 is necessary, but not sufficient, for virulence. J Bacteriol 184: 2820-2825
- Flyg, C., Kenne, K., Boman, HG.(1980) Insect pathogenic properties of Serratia marcescens: Phage-resistant mutants with a decreased resistance to Cecropia immunity and a decreased virulence to Drosophila. J Gen Microbiol 120: 173-181
- Gorg A, Obarmier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. Electrophoresis. 2000; 21(6): 1037-1053

- Heeb, S., Kuehne, S.A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M.D., Haas, D., (2006) Functional analysis of the post transcriptional regulator RmsA reveals a novel RNA-binding site. *J Mol Biol* 355: 1026-1036
- Hrabak, E.M., and Wilkins, D.K., (1992) The lemA gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* on bean is a member of a family of two component regulators. *J Bacteriol* 174:3011-3020
- Isabelle Vallet-Gely, Alexey Novikov, Luis Augusto, Peter Liehl, Gerard Bolbach, Maria Pechy-Tarr, Pierre Cosson, Christoph Keel, Martine Caroff, and Bruno Lemaitre : Association of Hemolytic Activity of *Pseudomonas entomophila*, a Versatile Soil Bacterium, with Cyclic Lipopeptide Production
- John E. Norton and John R. Sokatch (1970), Purification and partial characterization of the branched chain amino acid transaminase of *Pseudomonas aeruginosa*
- Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., (2006) Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188:6026-6033
- Kristoffer Kiil, Tim T. Binnewies, Hanni Willenbrock, Susse Kirkelund Hansen, Lei Yang, Lars Jelsbak, David W. Ussery, and Carsten Friis : Comparative Genomics of *Pseudomonas*
- Lally, E.T., Hill, R.B., Kieba, I.R., Korostoff, J., (1999) The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol* 7 : 356-361
- Lapouge, K., Schubert, M., Frederic, H.T., Haas, D.A., (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of γ - proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behavior. *Molecular Microbiology* 67: 241-253
- Liehl, P., Blight, M., Vodovar, N., Boccard F., Lemaitre, B., (2006) Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. *PLoS Pathog* 2: e56
- Majdalani, N., Vanderpool, C.K., and Gottesman, S., (2005) Bacterial small RNA regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40: 93-113
- Method and product manual, 2-D Electrophoresis for Proteomics- Biorad
- Miyoshi, S., and Shinoda, S., (2000) Microbial metalloproteases and pathogenesis, *Microbes Infect* 2:91-98
- PROTEAN® II xi Cell and PROTEAN II xi 2-D Cell Instruction Manual- Biorad
- QUN REN, NICOLAS SIERRO, BERNARD WITHOLT, AND BIRGIT KESSLER (2000), FabG, an NADPH-Dependent 3-Ketoacyl Reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, Provides Precursors for Medium-Chain-Length Poly-3-Hydroxyalkanoate Biosynthesis in *Escherichia coli*
- Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau, G.W., (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8815-8821
- ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit Instruction Manual Catalog #163-2130-Biorad
- ReadyStrip™ IPG Strip Instruction Manual Catalog # 163-2099- Biorad
- Richetti, P.G., (1983) Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, vol.11 Eds Work, T.S., & Burdon, R.H Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Netherlands
- Sansonetti PJ (2004) War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 4: 953-964

- Silver staining of proteins in polyacrylamide gels
Mireille Chevallet, Sylvie Luche, and Thierry Rabilloud,
Published in final edited form as: *Nat Protoc.* 2006 ; 1(4): 1852–1858.
- Storz, G., Altuvia, S., and Wassarman, K.M., (2005) An abundance of RNA regulators, *Annu Rev Biochem* 74: 199-217
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., and Haas, D., (2003) RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol* 50: 1361-1379
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F., and Lemaitre B., (2005) *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *PNAS* 32: 11414-11419
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico L., Jubin C., Lazus A., Segurens B., Vacherie B., Wincker P., Lemaitre B., Boccard F, (2006) Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nature Biotechnology*, 24 : 673-679
- Waterfield, N.R., Bowen, D.J., Fetherston, J.D., Perry, R.D., & French Constant, R.H., (2001) The 1c genes of *Photorhabdus*: a growing family. *Trends Microbiol* 9: 185-191

Χρήσιμα links

- Entomophila Database Genome, <http://www.pseudomonas.com>
- PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- SwissProt, <http://expasy.org/sprot>