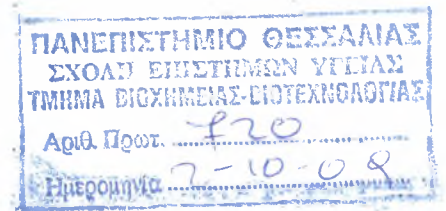


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΓΡΙΟΥ ΚΑΙ
ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ**

PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA



ΚΑΝΤΣΑΔΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7661/1
Ημερ. Εισ.: 09-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΚΑΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

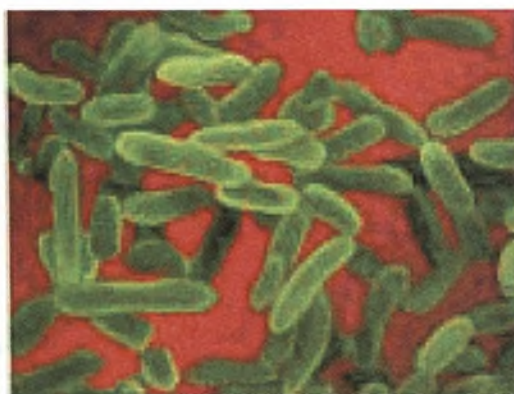


004000087167

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ




**ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΓΡΙΟΥ ΚΑΙ
ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ
*PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA***



ΚΑΝΤΣΑΔΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Κοντού Μαρία – Λέκτορας Κλινικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. 
- Μόσιαλος Δημήτρης – Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. 
- Σαμιωτάκη Μαρίνα – Ερευνήτρια Εργαστήριο Πρωτεϊνικής Χημείας Ερευνητικό κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών Αλέξανδρος Φλέμινγκ. 

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της λέκτορος κ.Κοντού Μαρίας. Αισθάνομαι υποχρεωμένη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην κ. Κοντού Μαρία και τον λέκτορα κ. Μόσιαλο Δημήτρη που μου έδειξαν εμπιστοσύνη προσφέροντάς μου τη δυνατότητα να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα. Η επιστημονική κριτική τους, οι πολύτιμες συμβουλές τους, η υπομονή τους, η ενθάρρυνση καθώς και η καθοδήγησή τους συνέβαλαν στη σωστή διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών. Επίσης την κ. Σαμιωτάκη Μαρίνα για την πολύτιμη συνεργασία της καθώς και το επιστημονικό προσωπικό στο ερευνητικό κέντρο Αλέξανδρος Φλέμινγκ για την φιλοξενία καθώς χωρίς την βοήθεια τους θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Καρούλια Ζωή για την άψογη συνεργασία

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Αναλυτικής Βιοχημείας και όλους όσους συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

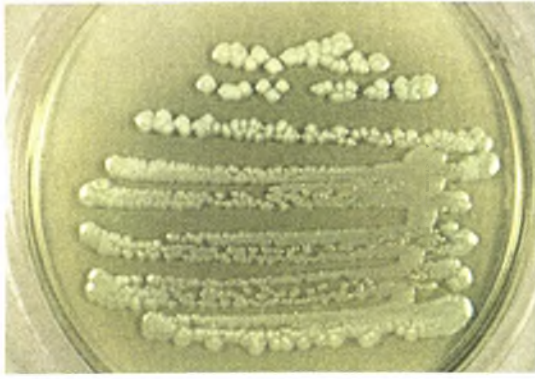
•*Pseudomonas entomophila*

1) Περιγραφή και σημασία.

Το *Pseudomonas entomophila* είναι ένα βακτηριακό στέλεχος που απομονώθηκε πολύ πρόσφατα, μόλις το 2001, και παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με το ήδη γνωστό στην επιστημονική κοινότητα βακτήριο *Pseudomonas putida*. Ανήκει στο γένος *Pseudomonas* στο οποίο συμπεριλαμβάνονται και ορισμένα στελέχη ιδιαίτερα παθογόνα, στον άνθρωπο όπως το *Pseudomonas aeruginosa*, τα φυτά όπως το *Pseudomonas syringae*, αλλά και τα έντομα όπως το *Pseudomonas putida*.

Πρόκειται για ένα gram αρνητικό, χημειοργανοτροφικό και αερόβιο βάκιλλο με πολικά μαστίγια. Κύρια χαρακτηριστικά ταυτοποίησης της ομάδας των ψευδομονάδων είναι η απουσία παραγωγής αερίου από τη γλυκόζη και η θετική δοκιμή οξειδάσης, τα αποτελέσματα των οποίων βοηθούν στη διάκρισή τους από τα εντερικά βακτήρια.

Οι ψευδομονάδες έχουν πολύ απλές διατροφικές ανάγκες και αναπτύσσονται χημειοργανοτροφικά σε ουδέτερο pH και σε μεσόφιλο εύρος θερμοκρασιών. . Ο μεταβολισμός του υπό μελέτη στελέχους, *Pseudomonas entomophila*, 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.



Εικόνα 1: καλλιέργεια βακτηρίου *Pseudomonas*

Το ενδιαφέρον που προκαλεί το στέλεχος *P.entomophila*, βασίζεται στην ικανότητα του να μολύνει δια στόματος την *Drosophila melanogaster* και να προκαλεί τον θάνατο τόσο στις ενήλικες όσο και στις προνύμφες, (λάρβες) μετά την κατάποσή της, σε ένα ποσοστό της τάξης του 70 % (Vodovar N. et al 2005). Αν και μέχρι σήμερα δεν είναι σαφής ο ακριβής τρόπος με τον οποίο σκοτώνει καθώς και το εύρος των ειδών των εντόμων που δύναται να θανατώσει, έχει ελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας ως νέο είδος και όλα δείχνουν ότι θα αποτελέσει αντικείμενο έρευνας.

Η ανάγκη αντιμετώπισης εντόμων, τα οποία είναι καταστροφικά για τις γεωργικές καλλιέργειες, καθώς επίσης και φορείς ασθενειών για ζωικούς οργανισμούς και τον άνθρωπο, ώθησε τους επιστήμονες από πολύ νωρίς στην παρασκευή διαφόρων ουσιών με εντομοκτόνες ιδιότητες για την καταπολέμησή τους.

Ωστόσο τα περισσότερα από αυτά είναι ιδιαίτερα τοξικά και δημιουργούν σημαντικά προβλήματα καθώς έχουν την δυνατότητα διείσδυσης στην τροφική αλυσίδα με επιδράσεις σε πληθώρα φυτικών και ζωικών οργανισμών αλλά και τον άνθρωπο. Η ανάγκη για απαλλαγή από τα παραδοσιακά χημικά προϊόντα καταπολέμησης παρασίτων γενικότερα, είναι εδώ και χρόνια επιτακτική, όπως επιτακτική πρέπει να θεωρείται και η εντατική έρευνα νέων ειδών οργανισμών.

Η ικανότητα λοιπόν της *P.entomophila* να θανατώνει την *D.melanogaster* καθώς και λάρβες από αρκετά είδη εντόμων (Vodovar N. et al 2005) , την καθιστά ένα πολύ υποσχόμενο μοντέλο για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων ξενιστή – παθογένειας καθώς και την ανάπτυξη βιοελέγχου κατά διαφόρων εντόμων.

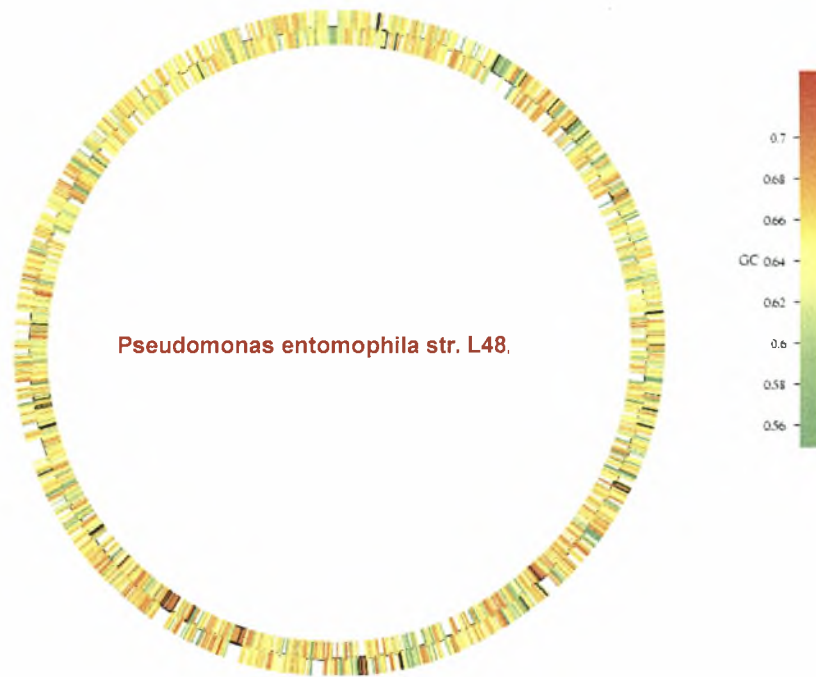
1) Δομή γονιδιώματος.

Σύγκριση της ακολουθίας του 16S rRNA της *P.entomophila* με 16S rRNA ακολουθίες στη βάση δεδομένων BLAST, έδειξε καθαρά ότι ανήκει στο γένος *Pseudomonas*. Επειδή το στέλεχος αυτό, είναι ένα μη χαρακτηρισμένο προηγούμενος είδος, με κάποιες μοναδικές εντομοπαθογόνες ιδιότητες, ονομάστηκε *Pseudomonas Entomophila*. (Vodovar et al 2005)

Η εξαιρετική μεταβλητότητα των ειδών *Pseudomonas*, αντανακλάται από την δυνατότητα τους να αποικίζουν πολυάριθμες οικολογικές θέσεις. Κατά συνέπεια είναι παθογόνα προς φυτά, έντομα και είναι σημαντική αιτία ευκαιριακών λοιμώξεων στον άνθρωπο.

Το γονιδίωμα της *P. entomophila* αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα με μήκος 5.888.780 νουκλεοτίδια. Ολόκληρη η αλληλουχία των 5,9 Mb συγκρίθηκε με τις προσδιορισμένες αλληλουχίες από 4 είδη *Pseudomonas*. Η *P. entomophila* έχει τα περισσότερα από τα καταβολικά γονίδια του στενά συγγενικού στελέχους *P. putida*, δικαιολογώντας έτσι τις ευπροσάρμοστες μεταβολικές του ιδιότητες καθώς και το οικολογικό του περιβάλλον, το νερό, το έδαφος και τη ριζόσφαιρα.

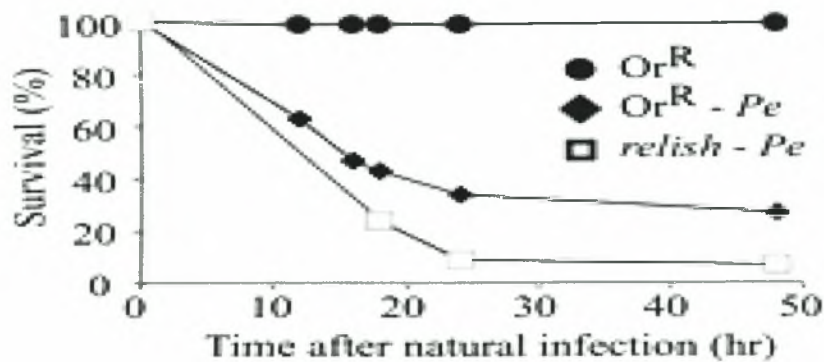
Ανάμεσα στις 5160 κωδικεύουσες αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν 3.446 γονίδια (67 %) στα οποία έχει αποδοθεί μια συγκεκριμένη λειτουργία. Σύγκριση του γενώματος, μέσω της βάσης δεδομένων BLAST, με 5 είδη *Pseudomonas* που έχουν ήδη ταυτοποιηθεί αποκάλυψε μια ομάδα 2.065 γονιδίων που αποτελούν το πυρηνικό γονιδίωμα της *Pseudomonas*. Βασιζόμενοι σε αυτήν την ανάλυση ταυτοποιήθηκαν 1.002 γονίδια, τα οποία είναι μοναδικά στην *P.entomophila*. (Vodovar et al 2006).



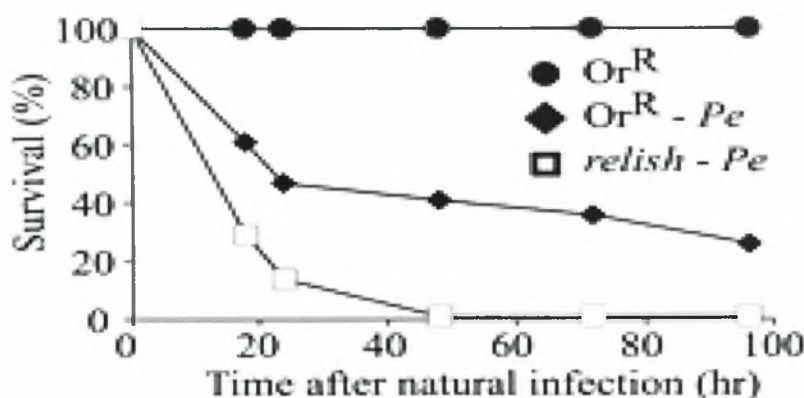
Εικόνα 2 : Το κυκλικό χρωμόσωμα της *Pseudomonas entomophila* (5.888.780 bp)

2) Παθογένεια

Η *P.entomophila* έχει την ικανότητα να μολύνει την *D. melanogaster* μετά από την δια στόματος πρόσληψή της. Η μόλυνση αυτή επάγει θνησιμότητα στο στάδιο της προνύμφης σε ένα ποσοστό περίπου 70 % μέσα σε 24 ώρες μετά την μόλυνση, ενώ το υπόλοιπο 30% τελικά υποκύπτει στο στάδιο της ενήλικης νύμφης. (Vodovar et al 2005). Έρευνες έχουν αποδείξει πως μπορεί να επάγει την πρωτογενή – τοπική αλλά και την δευτερογενή- συστηματική απόκριση στη *Drosophila*, με αποτέλεσμα να επάγει την συστηματική έκφραση παραγόντων του ανοσοποιητικού συστήματος που ενεργοποιούνται κατά την διάρκεια της απόκρισης του ξενιστή. (Liehl P. et al 2006).



Εικόνα 3 : Μόλυνση από την *P.entomophila* προκαλεί θνησιμότητα στις προνύμφες *D.melanogaster*. Η γραμμή με την • αναφέρεται στις προνύμφες που δεν έχουν μολυνθεί με το βακτηριακό στέλεχος. Η γραμμή με το ♦ αναφέρεται στις προνύμφες οι οποίες έχουν μολυνθεί από την *P.entomophila*. Η *P.e* προκαλεί τον θάνατο σε ποσοστό 70 % στις προνύμφες μέσα σε 48 ώρες από την μόλυνση. Η γραμμή με το □ αναφέρεται σε προνύμφες οι οποίες έχουν υποστεί μετάλλαξη στο γονίδιο *relish*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του *Imd* αμυντικού μονοπατιού και έχουν μολυνθεί από το βακτηριακό στέλεχος. Σε αυτήν την περίπτωση οι προνύμφες είναι ακόμα πιο ευαίσθητες στην μόλυνση από την *P.e*, η οποία προκαλεί θνησιμότητα σε ποσοστό 90% , 48 ώρες μετά την μόλυνση. (Vodovar N. et al 2005)



Εικόνα 4 : Μόλυνση από την *P.entomophila* προκαλεί θνησιμότητα στις ενήλικες *D.melanogaster*. Η γραμμή με την • αναφέρεται στις προνύμφες που δεν έχουν μολυνθεί με το βακτηριακό στέλεχος. Η γραμμή με το ♦ αναφέρεται στις προνύμφες οι οποίες έχουν μολυνθεί από την *P.entomophila*. Η *P.e* προκαλεί τον θάνατο σε ποσοστό 70 % στις ενήλικες μέσα σε 4 μέρες από την μόλυνση. Η γραμμή με το □ αναφέρεται σε προνύμφες οι οποίες έχουν υποστεί μετάλλαξη στο γονίδιο *relish*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του *Imd* αμυντικού μονοπατιού και έχουν

μολυνθεί από το βακτηριακό στέλεχος. Και εδώ φαίνεται πως είναι ακόμα πιο ευαίσθητες στην μόλυνση από την *P.e*, η οποία προκαλεί θνησιμότητα σε ποσοστό 100% μέσα σε 4 μέρες μετά την μόλυνση. (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, παρόλα αυτά οι ξενιστές υποκύπτουν στην μόλυνση και τελικά πεθαίνουν. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει πως η *P.entomophila* έχει αναπτύξει, πέρα από τις στρατηγικές μόλυνσης, και συγκεκριμένες στρατηγικές "διαφυγής" του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Έτσι η *P. entomophila* μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα ιδιαίτερα παθογόνο στέλεχος τόσο για την ενήλικη όσο και για την προνύμφη *Drosophila*.

Λόγω της δυνατότητας επιβίωσης και μετά την ανοσοαπόκριση η παρουσία του στελέχους στο έντερο του ξενιστή έχει ως αποτέλεσμα την μαζική καταστροφή των κυττάρων του εντέρου. Ηλεκτρονιακές και οπτικές μικρογραφίες του εγκάρσιου τμήματος του μεσεντέρου έδειξαν πως η μόλυνση με την *P.entomophila* προκαλεί μια ισχυρή διαταραχή στο επιθήλιο του εντέρου, τόσο στη βλέννη όσο και στις μικρολάχνες. Η παρουσία γονιδίων στο γένωμα της, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεάσες ,συστατικά της υπερτροφικής μήτρας, η οποία καλύπτει εσωτερικά το επιθήλιο, καθώς και άλλων που εμπλέκονται γενικά στο μεταβολισμό μπορεί να αντανακλά τις τροποποιήσεις στις οποίες υποβάλλονται τα κύτταρα του εντέρου εξαιτίας τις παρουσίας των βακτηρίων. Η *P.entomophila* επίσης επάγει πολλά γονίδια που κωδικοποιούν συστατικά του κυτταροσκελετού τα οποία ρυθμίζονται από το μονοπάτι JNK, αντανακλώντας τις σημαντικές τροποποιήσεις του εντερικού επιθηλίου. (Vodovar N et al 2005)

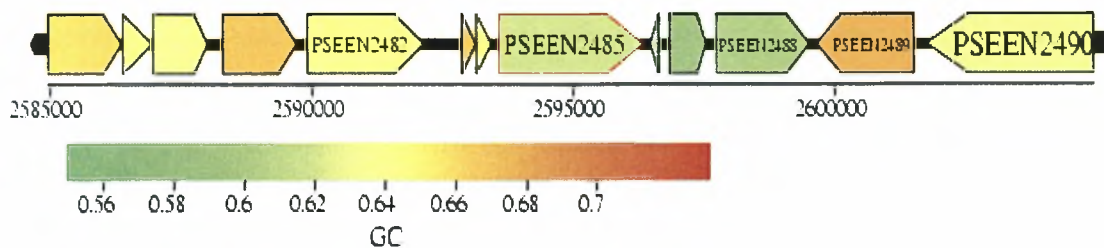
Ένα ακόμα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της μολυσματικότητας της *P. entomophila* είναι η παύση της πρόσληψης τροφής.(Liehl P et al 2006). Η παύση ή ο αποκλεισμός πρόσληψης τροφής στα έντομα είναι μια στρατηγική που χρησιμοποιείται από αρκετά εντομοπαθογόνα βακτήρια όπως *S.entomophila* και *Yersinia pestis*. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει πως οι περισταλτικές κινήσεις του εντέρου μπορεί να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη των βακτηρίων και

πως ορισμένα εντομοπαθογόνα βακτήρια έχουν αναπτύξει στρατηγικές για να εξαλείψουν αυτές τις κινήσεις.

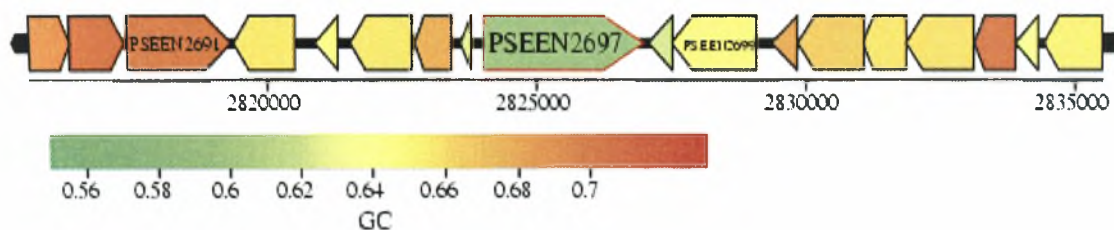
Τέλος παραμένει εντυπωσιακό το γεγονός ότι η μόλυνση από *P.entomophila* πυροδοτεί μια συστηματική ανοσοαπόκριση του ξενιστή, η οποία όμως δεν έχει κάποια εμφανή επίδραση ενάντια στα βακτήρια τα οποία φυσιολογικά παραμένουν στον αυλό του εντέρου. Αυτή η απόκριση μπορεί να ερμηνευτεί ως πρόληψη μιας πιθανής παραβίασης του εντερικού φραγμού. Εναλλακτικά, υπάρχει και η υπόθεση πως βακτήρια όπως η *P.entomophila*, μπορούν να ανατρέψουν τις άμυνες του εντόμου-ξενιστή με την πυροδότηση μιας συστηματικής- δευτερογενούς απόκρισης. (Liehl P. et al 2006). Αυτή η απόκριση μπορεί να συγκριθεί με παθογόνους μικροοργανισμούς του ανθρώπου, για τους οποίους η ενεργοποίηση μιας φλεγμονώδους απόκρισης, αντιπροσωπεύει ένα μέρος των στρατηγικών εισβολής τους. (Sansonetti PJ, 2004)

Η *P.entomophila* είναι το πρώτο βακτήριο αυτού του γένους που έχει αποδειχθεί πως είναι φυσικά παθογόνο για την *D. melanogaster*. Για να δοκιμαστεί αυτή η ιδιότητα των αλληλεπιδράσεων *P.entomophila*- *D.melanogaster*, αναλύθηκαν 28 στελέχη που καλύπτουν το είδος για την ικανότητα τους να μολύνουν την *D.melanogaster*. Από αυτά, μόνο τα 4 εκτός από την *P.entomophila* ήταν μολυσματικά. Ωστόσο κανένα από τα 28 δεν μπόρεσαν να προκαλέσουν ένα σημαντικό ποσοστό θνησιμότητας, δείχνοντας έτσι η σχέση μεταξύ *Drosophila* και *P.entomophila* είναι συγκεκριμένη και η θνησιμότητα που προκαλείται δεν είναι αποτέλεσμα των γενικών μεταβολικών ιδιοτήτων του είδους *Pseudomonas*. (Vodovar et al 2005)

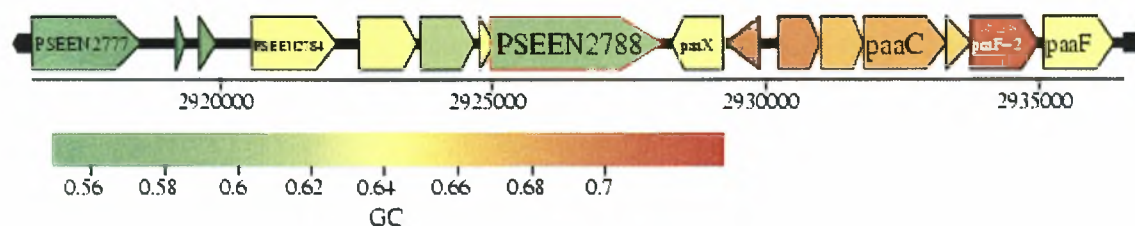
Ιδιαίτερα εντυπωσιακό στο γονιδίωμα του στελέχους, είναι η ύπαρξη τριών γονιδίων, τα οποία είναι απόντα από τα υπόλοιπα είδη *pseudomonas* και κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με εντομοκτόνες τοξίνες που έχουν βρεθεί μόνο σε εντομοπαθογόνα εντεροβακτήρια, όπως το *Serratia entomophila*, *Xenorhabdus nematophilus* και *Photorhabdus luminescens*. (Waterfield et al 1998), (Bowen et al 1998). Τα γονίδια αυτά, *PSEEN2485*, *PSEEN2697*, *PSEEN2788*, κωδικοποιούν τρεις εντομοκτόνες τοξίνες (τύπου TccC), οι οποίες παίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της *P.entomophila*. (Vodovar et al 2006).



Εικόνα 5. Σχηματική παράσταση του γονιδιακού τύπου που αντιστοιχεί στο PSEEN2485 (μήκος 2766 bp, 921 αμινοξέα) που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή εντομοκτόνου ουσίας



Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση του γονιδιακού τύπου που αντιστοιχεί στο PSEEN2697 (μήκος 2973 bp, 990 αμινοξέα) που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή εντομοκτόνου ουσίας .



Εικόνα 7. Σχηματική παράσταση του γονιδιακού τύπου που αντιστοιχεί στο PSEEN2788 (μήκος 3162 bp, 1053 αμινοξέα) που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή εντομοκτόνου ουσίας .

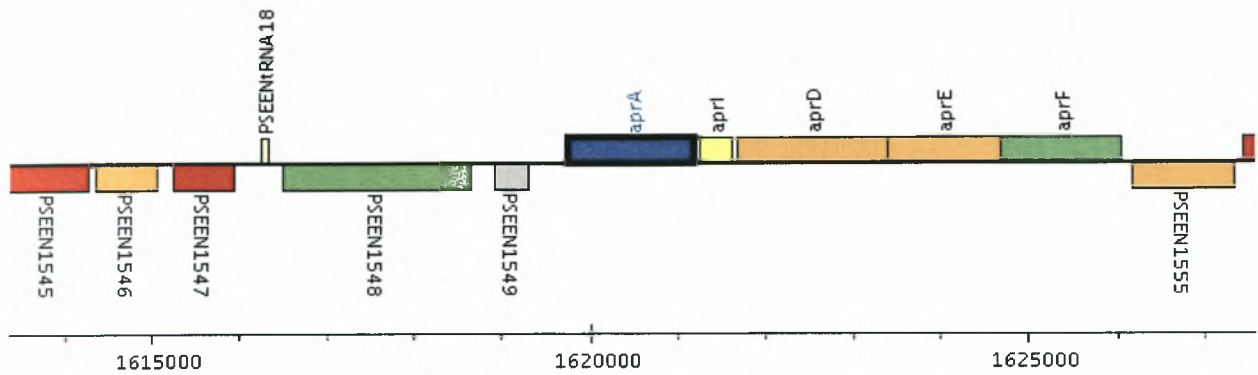
Επίσης η *P.entomophila* σε αντίθεση με άλλες *Pseudomonas*, εκκρίνει μια βακτηριακή αιμολυσίνη, η οποία είναι μια εξωτοξίνη που προκαλεί την λύση των κυττάρων, και μπορεί να εμπλέκεται στην παθογονικότητα έναντι της *D. melanogaster*. Έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια, τα οποία είναι μοναδικά στην *P.entomophila* και πιθανόν να είναι υπεύθυνα για αυτήν την λειτουργία.

Ένας αριθμός από λιπάσες έχουν επίσης δείξει ότι προσφέρουν αιμολυτική δραστηριότητα. Στο γονιδίωμα της *P.entomophila* έχουν ταυτοποιηθεί 4 γονίδια *PSEEN709*, *PSEEN1065*, *PSEEN2195*, *PSEEN3432*, τα οποία κωδικοποιούν λιπάσες που πιθανώς να συνεισφέρουν στην αιμολυτική δραστηριότητα. (Vodovar et al 2006).

Μια κοινή στρατηγική, που χρησιμοποιείται από παθογόνα βακτήρια είναι να εκκρίνουν τοξίνες και άλλους μολυσματικούς παράγοντες που καταστρέφουν ιστούς του ξενιστή. Οι πρωτεάσες αποτελούν μια σημαντική ομάδα των εξωκυττάρων, βιολογικά ενεργών, ουσιών οι οποίες θεωρείται πως συμμετέχουν στην παθογονικότητα των βακτηριακών ειδών. Στην *P.entomophila* ταυτοποιήθηκαν 3 γονίδια *PSEEN3027*, *PSEEN 3028*, *PSEEN4433* κωδικοποιούν πρωτεάσες της σερίνης, καθώς και ένα γονίδιο, *PSEEN1550* (εικ. 8), που κωδικοποιεί μια αλκαλική πρωτεάση. Αυτή είναι ομόλογη της αλκαλικής πρωτεάσης, **AprA**, η οποία έχει αποδειχθεί πως εμπλέκεται σε πολλές μολυσματικές διαδικασίες σε διάφορα είδη. (Miyoshi et al 2000).

Η μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου, AprA, έχει αποδειχθεί πως απαιτείται για την άμυνα της *P. entomophila* ενάντια στην εντερική επιθηλιακή ανοσοαπάντηση του ξενιστή. Ο ρόλος της AprA είναι η καταστροφή των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) της *Drosophila*, με αποτέλεσμα την προστασία της *Pseudomonas entomophila* και την διαφυγή της από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. (Liehl P. et al 2006).

Γενετικές αναλύσεις στον ξενιστή και τον βακτηριακό στέλεχος, έχουν αποδείξει πως η μολυσματικότητα της *P.entomophila* είναι πολυπαραγοντική με μια ξεκάθαρη διαφοροποίηση μεταξύ των παραγόντων εκείνων που ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα της *Drosophila*, και εκείνων που ευθύνονται για την παθογένεια.



Εικόνα 8 : Σχηματική παράσταση του γονιδιακού τόπου που αντιστοιχεί στο PSEEN1550 (μήκος 1457 bp,) που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της μεταλλοπρωτεάσης AprA, που συμμετέχει στους μηχανισμούς παθογένειας της *Pseudomonas entomophila* .

Τέλος το γονιδίωμα της *P. entomophila* δεν περιέχει γονίδια, τα οποία να 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).

4) Αλληλεπιδράσεις μεταξύ *Drosophila melanogaster*- *Pseudomonas entomophila*

4.1) Αμυντικοί μηχανισμοί της *D. melanogaster*

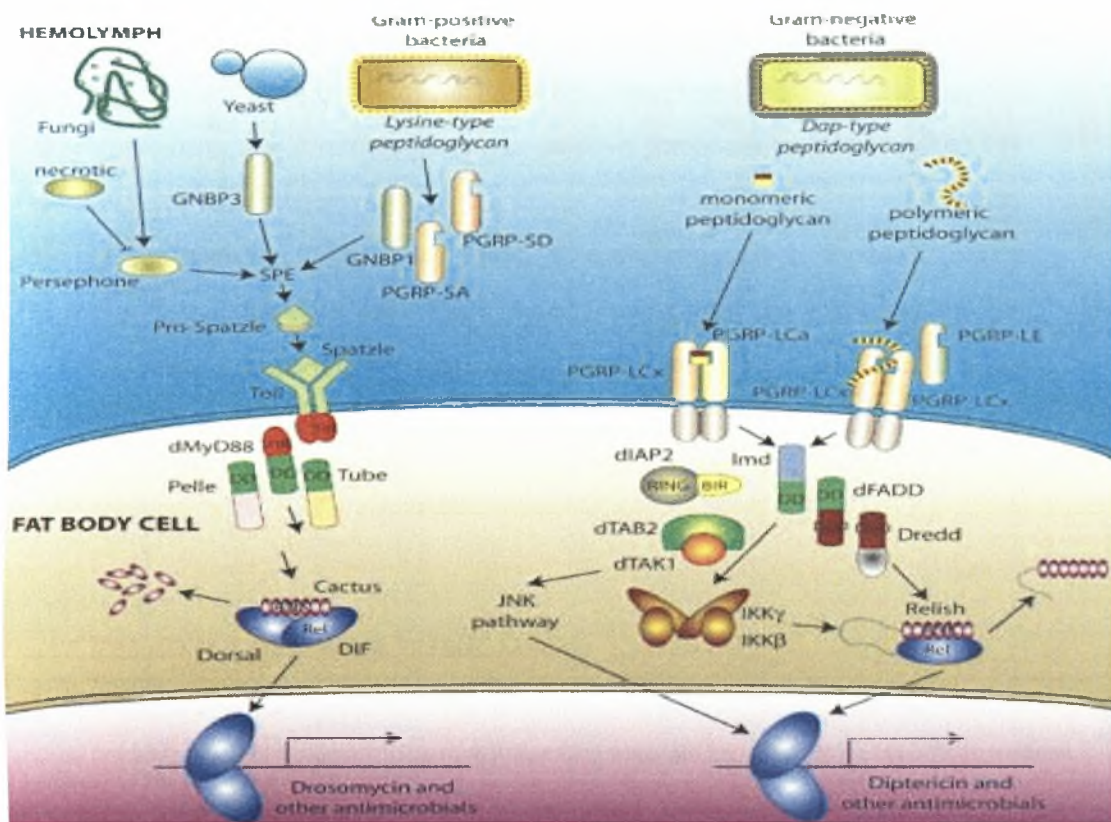
Η *D. melanogaster* έχει αναδειχθεί ένα δυναμικό μοντέλο για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων παθογόνου παράγοντα- ξενιστή. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό από το αμυντικό σύστημα της, είναι η ύπαρξη πολλαπλών στρατηγικών άμυνας που μοιράζεται με ανώτερους οργανισμούς. Αυτές οι στρατηγικές περιλαμβάνουν φυσικούς φραγμούς- εμπόδια μαζί με την πρωτογενή (τοπική) και δευτερογενή (συστημική) χημική ανοσοαπάντηση. Αρκετοί παράγοντες συμμετέχουν σε μια συντονισμένη άμυνα ενάντια στην μικροβιακή μόλυνση.

Αρχικά, το επιθήλιο, όπως για παράδειγμα του πεπτικού σωλήνα και της τραχείας, είναι η πρώτη γραμμή άμυνας και παράγουν **αντιμικροβιακά πεπτιδία (AMPs)** και **δραστικές μορφές οξυγόνου**. Κατά δεύτερο λόγο, ειδικά αιματοκύτταρα συμμετέχουν στην φαγοκυττάρωση και τον εγκλεισμό των ξένων εισβολέων σε κυστίδια. Τελικά το λιπαρό σώμα, ένα λειτουργικό ισοδύναμο του ήπατος των θηλαστικών είναι η θέση της χυμικής ανοσοαπάντησης και είναι η σημαντικότερη περιοχή σύνθεσης AMPs.

Η *P.entomophila* διαθέτει 40 γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται στο οξειδωτικό stress και στην αποτοξίνωση από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως 11 τρανσφεράσες της s- γλουταθειόνης (GSTs), 4 καταλάσες, 2 υπεροξειδικές δισμουτάσες, 3 υπεροξειδικές ρεδοκτάσες και κυτοχρώματα. (Vodovar et al 2006). Η παρατήρηση αυτή αποδεικνύει πως η ομοίωση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας είναι ένα κρίσιμος μηχανισμός άμυνας που επηρεάζει την επιβίωση του ξενιστή. Παρόλα αυτά η τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας που προκαλεί η *P.entomophila*, επιβεβαιώνουν πως μπορεί αποτελεσματικά να ξεπεράσει αυτόν τον μηχανισμό άμυνας. (Vodovar et al 2005).

Γενετικές αναλύσεις έχουν δείξει πως τα μονοπάτια **Toll** και **Imd** ρυθμίζουν την έκφραση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων AMPs. Το μονοπάτι Toll παίζει κύριο ρόλο στην άμυνα κατά Gram θετικών βακτηριακών και μυκητιακών μολύνσεων, ενώ το Imd μονοπάτι 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, περιλαμβάνοντας αυτά που κωδικοποιούν AMPs, και ειδικά 2 πεπτιδίων των Diptericin και Attacin, τα οποία συντίθενται κατά προτίμηση μετά από βακτηριακή μόλυνση του πεπτικού συστήματος της *Drosophila melanogaster*. (Tzou P. et al 2002). Υπέρ-έκφραση είτε του Diptericin είτε του Attacin προσφέρει προστασία ενάντια στη *Pseudomonas entomophila*. Το Diptericin παίζει ένα ουσιώδη ρόλο στην άμυνα ενάντια στα Gram αρνητικά βακτήρια και η έκφραση του στο πρόσθιο έντερο παρέχει πολύ γρήγορα έναν αποτελεσματικό φραγμό, επιτρέποντας στη *Drosophila* να εξουδετερώνει ταχύτατα τα περισσότερα βακτήρια μετά την κατάποσή τους. (Liehl P. et al 2006)



Εικόνα 9 : Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης των Toll (αριστερά) και Imd (δεξιά) μονοπατιών για την άμυνα κατά των gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων αντίστοιχα.

4.3) Διαδικασία μόλυνσης της *D.melanogaster* από την *P.entomophila*

Για να μπορέσει το βακτηριακό στέλεχος να εκδηλώσει τις παθογόνες ιδιότητες του, θα πρέπει πρώτα να προσληφθεί δια στόματος από τον ξενιστή, έτσι ώστε τελικά να φτάσει στο έντερο όπου και τελικά ασκεί την μολυσματική του δράση. Κατά την διαδικασία μόλυνσης, λοιπόν, υπάρχουν 5 διαφορετικά και ευδιάκριτα στάδια.

- 1) Πρόσληψη της *Pseudomonas entomophila* δια στόματος από την *Drosophila melanogaster* και κατάποσή της διαμέσου του οισοφάγου.
- 2) ενεργοποίηση στο βακτήριο των γονιδίων ανθεκτικότητας σε καταστάσεις οξειδωτικού stress, που προκαλείται στον ξενιστή λόγω της εισβολής του παθογόνου.
- 3) Μετανάστευση και τελικά παρουσία της *P.entomophila* στο έντερο του ξενιστή.

4) 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 μπορέσει να διαφύγει από την ανοσοαπόκριση του ξενιστή.

5) Παθογένεια και θάνατος που προέρχεται από σημαντικές τροποποιήσεις της φυσιολογίας του μεσεντέρου περιλαμβάνοντας καταστροφή των μικρολαχνών και των κυττάρων και σε μερικές περιπτώσεις 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, που κωδικοποιούν μικρά RNAs (sRNAs), τα οποία χαρακτηρίζονται από ένα επαναλαμβανόμενο μονόκλωνο μοτίβο GGA, αλλά ωστόσο φαίνεται να ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες.

Τα μοτίβα GGA είναι απαραίτητα για την δέσμευση μικρών διμερών πρωτεϊνών που δεσμεύουν RNA και ανήκουν 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 (Lapouge K. et al 2007).

Αλληλεπιδράσεις με RsmA/ CsrA πρωτεΐνες προάγουν τον σχηματισμό μιας ANGGAN θηλιάς. Αυτή η διαμόρφωση παρεμποδίζει την 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 των 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 δυο 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 στην 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 την μεταφραστική καταστολή που προκαλείται από αυτές τις πρωτεΐνες με τον 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).

5.1 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 μην 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 (Zuber et al 2003) και λειτουργούν ως αυτοεπαγωγείς του συστήματος Gac/ Rsm, μέσω ενός θετικού επανατροφοδοτικού ελέγχου.

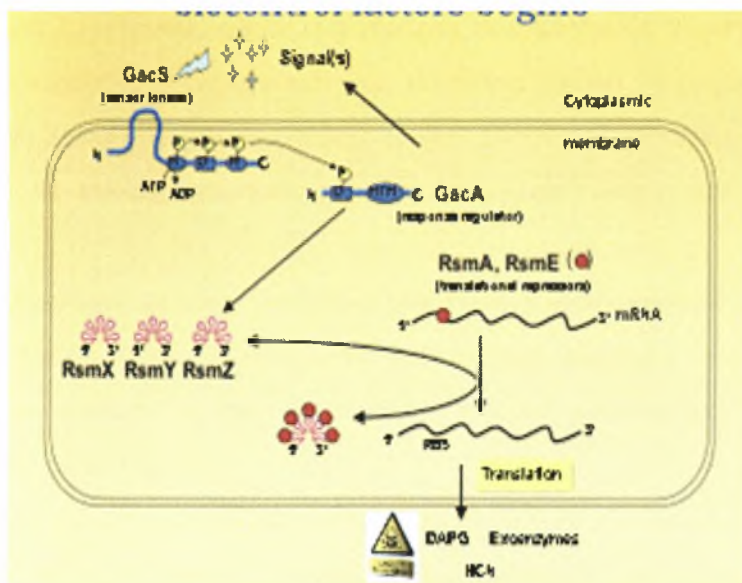
Μετά την ενεργοποίηση της, η κινάση GacS, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον ρυθμιστή απόκρισης GacA. Η ενεργοποιημένη – φωσφορυλιωμένη μορφή της GacA φαίνεται πως δεσμεύεται σε ένα συντηρημένο στοιχείο, το GacA box, που βρίσκεται ανοδικά των προαγωγέων των sRNAs γονιδίων. (Valdverve et al 2003, Kay et al 2005, Lenz et al 2005, Kulkani et al 2006). Μετά την ενεργοποίηση του το

σύστημα GacS/GacA ενεργοποιεί την έκφραση των sRNA γονιδίων rsmX, rsmY και rsmZ στην *Pseudomonas*. Με την παραγωγή των sRNAs, το σηματοδοτικό μονοπάτι Gac/ Rsm ρυθμίζει την παραγωγή πρωτεϊνών, των οποίων η έκφραση φυσιολογικά καταστέλλεται από τις πρωτεΐνες Rsm/ CsrA. (εικ10). Τα sRNAs στην συνέχεια αναστέλλουν την μεταγραφή των δικών τους γονιδίων με την αλλοστερική αναστολή της φωσφορυλίωσης της GacA ή την αναστολή της πρόσδεσής της στο GacA box. (Kay et al 2006, Valverde et al 2003, 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 καταστολείς ή ασκούν κάποια επιρροή στην 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 άγριου τύπου. (Ahmer et al 1999, Rahme et al 2000).



Εικ.10 : Σηματοδοτικό μονοπάτι του ρυθμιστικού συστήματος GacS/CacA στην *Pseudomonas entomophila*. (Lapouge K et al 2007)

6) ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ

Η πρωτεομική (proteomics) αποτελεί το ερευνητικό πεδίο το οποίο ασχολείται με την ανάλυση σε μεγάλη κλίμακα του πρωτεόματος, δηλαδή του συνόλου των πρωτεϊνών οι οποίες παράγονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού. Ο όρος «πρωτέωμα» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Marc Wilkins και αναφέρεται στο σύνολο των πρωτεϊνών που κωδικεύονται από συγκεκριμένο γονιδίωμα. Η πρωτεομική χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό περίπλοκων και εξειδικευμένων τεχνικών, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, η φασματομετρία μάζας και η βιοπληροφορική, με σκοπό το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες είναι τα δομικά και λειτουργικά συστατικά του οργανισμού, ενώ το γονιδίωμα είναι το αρχείο πληροφοριών που ρυθμίζει τη σύσταση και την παραγωγή τους. Η δομή και λειτουργία κάθε πρωτεΐνης καθορίζεται από τη σειρά των αμινοξέων στην πρωτεϊνική αλυσίδα, η οποία με τη σειρά της καθορίζει τη διάταξη που θα λάβει η αλυσίδα αυτή στο χώρο. Κάθε πρωτεΐνη έχει τη δική της μοναδική αλληλουχία αμινοξέων, η οποία και καθορίζεται από τα γονίδια των κυττάρων, συγκεκριμένο μοριακό μέγεθος και καθορισμένο ηλεκτρικό φορτίο. Οποιοσδήποτε παράγοντας, φυσικός ή χημικός, που επηρεάζει το μέγεθος, το φορτίο ή τη στερεοδιαμόρφωση της πρωτεϊνικής αλυσίδας, μπορεί να επηρεάσει άμεσα και τη βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής. Εντούτοις, η γνώση της αμινοξικής αλληλουχίας δε συνεπάγεται γνώση της τρισδιάστατης δομής μίας πρωτεΐνης, της λειτουργίας της και των αλληλεπιδράσεων της με άλλες πρωτεΐνες.

Το πρωτέωμα ωστόσο δεν είναι σταθερό χαρακτηριστικό των κυττάρων. Αντιθέτως επειδή αντιπροσωπεύει τη λειτουργική έκφραση των πληροφοριών, τροποποιείται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, το αναπτυξιακό στάδιο και τις συνθήκες του περιβάλλοντος.

Το πρωτέωμα είναι πολύ μεγαλύτερο και περίπλοκο από το γονιδίωμα λόγω της ύπαρξης παραγόντων όπως το εναλλακτικό μάτισμα των μεταγραφών, μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, η χρονική ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης και οι πολλές τροποποιούμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Σε αντίθεση λοιπόν με το γονιδίωμα, το πρωτέωμα δεν είναι στατικό. (Wilkins et al 1996)

Άρα η έννοια της πρωτεομικής περιλαμβάνει:

- την ανίχνευση και ταυτοποίηση όλων των πρωτεϊνών που δύναται να παράγει ένας συγκεκριμένος τύπος κυττάρου, ιστού ή οργανισμού
- την εξακρίβωση του τρόπου αλληλεπίδρασης τους και την περιγραφή των δικτύων μεταγωγής μηνυμάτων που απαρτίζονται από τις πρωτεΐνες
- την περιγραφή της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών

Οι πρωτεομικές αναλύσεις λοιπόν, εστιάζουν την δράση τους στο χαρακτηρισμό και τη μελέτη του συνόλου των πρωτεϊνών ενός βιολογικού υλικού (κύτταρα, ιστούς, βιολογικά υγρά, κλπ). Έχουν ως στόχο να αναγνωρίσουν, όχι μόνο τις αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση, αλλά και μετά- μεταφραστικές τροποποιήσεις, αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, την κυτταρική και υποκυτταρική διανομή τους και τα χρονολογικά πρότυπα έκφρασης. (Verrills 2006). Ο σκοπός της διαφορικής και λειτουργικής πρωτεομικής είναι η κατανόηση των κυτταρικών μονοπατιών και των μεταξύ τους σχέσεων στα κύτταρα και τους ζωντανούς οργανισμούς.

Η μελέτη των πρωτεϊνών, ειδικά της δομής και της λειτουργίας τους, έχει τις ρίζες της στις αναλυτικές βιοχημικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον πρωτεϊνικό διαχωρισμό. Οι τεχνικές που συνήθως χρησιμοποιούνται στις πρωτεομικές μελέτες είναι η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σε πολυακρυλαμίδιο (2DE ή 2- D ηλεκτροφόρηση) και η φασματοσκοπία μάζας (mass spectrometry), για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, την αναγνώριση αυτών και το χαρακτηρισμό της θέσης των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων.

Η πρωτεομική περιλαμβάνει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών, την αναγνώριση αυτών και τον χαρακτηρισμό της φύσης και της θέσης των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων. Η ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων (2-D ηλεκτροφόρηση) και η φασματοσκοπία μάζας (mass spectrometry, MS) αποτελούν τις κύριες τεχνικές της πρωτεομικής ανάλυσης. Η ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων είναι μια μορφή ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων που χρησιμοποιείται κατεξοχήν για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών σε δείγμα.

• 2-D ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η 2- D ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται, γενικά, ως μέσο για την απομόνωση των πρωτεϊνών και για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό τους με τη φασματοσκοπία μάζας. Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στην πρωτεομική ανάλυση είναι η αναπαραγώγιμη κλασμάτωση ενός μίγματος πρωτεϊνών διατηρώντας ταυτόχρονα τις μεταξύ τους ποιοτικές και ποσοτικές σχέσεις. Η 2- D ηλεκτροφόρηση είναι η μοναδική μέθοδος που μπορεί να χειριστεί αυτήν την πρόκληση. (Cuttler et al 1999). Εφόσον η τεχνική αυτή, έχει την ικανότητα να διαχωρίζει περισσότερες από 1800 πρωτεΐνες σε ένα μόνο πήκτωμα, την καθιστά πολύ σημαντικό εργαλείο σε πρωτεομικές έρευνες στις οποίες πολλαπλές πρωτεΐνες πρέπει να διαχωριστούν ταυτόχρονα σε μια ανάλυση.

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2D) επιτρέπει το διαχωρισμό μίγματος πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό τους κατά τη μία διάσταση και με βάση το μοριακό τους βάρος κατά τη δεύτερη διάσταση. Κάθε πρωτεΐνη επειδή χαρακτηρίζεται από το μέγεθος και το φορτίο της παρουσιάζεται ως διακριτή κηλίδα (spot). Αυτό επιτρέπει στο δείγμα να διαχωριστεί σε μια μεγαλύτερη περιοχή αυξάνοντας την ανάλυση κάθε συστατικού (Gorg et al 2000).

Η 2-D χρησιμοποιείται, γενικά, ως μέσο για την απομόνωση των πρωτεϊνών για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό τους με την φασματοσκοπία μάζας. Η τεχνική αυτή στο εργαστήριο χρησιμοποιείται για δυο κυρίως λόγους. Αρχικά για τον μεγάλης κλίμακας προσδιορισμό όλων των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Αυτό συμβαίνει όταν ερευνάται η ολική πρωτεϊνική έκφραση ενός οργανισμού ή ενός ιστού και διεξάγεται καλύτερα σε οργανισμούς μοντέλα των οποίων το γονιδίωμα έχει πλήρως αλληλουχηθεί. Η δεύτερη χρήση της μεθόδου, που εφαρμόστηκε και στην παρούσα εργασία, είναι η διαφορική έκφραση όπου συγκρίνονται δυο ή περισσότερα δείγματα για τον εντοπισμό διαφορών στην πρωτεϊνική τους έκφρασή τους.

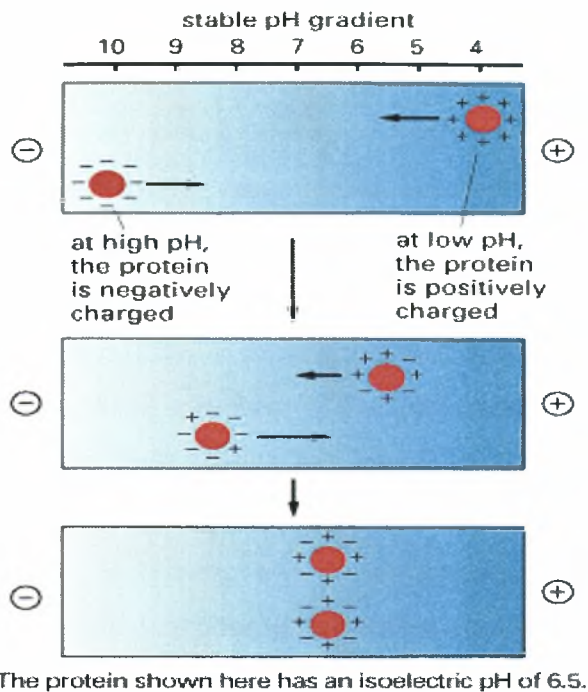
Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε δυο ξεχωριστά στάδια κατά τα οποία ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών οφείλεται σε δυο διαφορετικά χαρακτηριστικά τους, το ισοηλεκτρικό σημείο και το μοριακό βάρος.

6.2 Ισοηλεκτρική εστίαση – πρώτη διάσταση (*isoelectric focusing, IEF*) (Richetti 1983).

Σε αυτή τη φάση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI), το pH δηλαδή, στο οποίο έχουν ολικό ηλεκτρικό φορτίο 0. Οι διαφορές στο pI των πρωτεϊνών, που καθορίζονται από τον αριθμό και τον τύπο των φορτισμένων ομάδων σε αυτές, είναι η βάση της πρώτης διάστασης IEF. Οι πρωτεΐνες είναι βιολογικά επαμφοτερίζοντα μόρια και μπορεί να περιέχουν τόσο όξινες όσο και βασικές λειτουργικές ομάδες. Τα αμινοξέα, λοιπόν, από τα οποία αποτελούνται οι πρωτεΐνες μπορεί να είναι θετικά, αρνητικά ή και ουδέτερα φορτισμένα ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται. Για κάθε πρωτεΐνη υπάρχει ένα συγκεκριμένο pH στο οποίο το ολικό της φορτίο είναι 0. Σε ένα pH κάτω από το pI, οι πρωτεΐνες έχουν θετικό ολικό φορτίο, ενώ σε ένα pH πάνω από το pI τους έχουν αρνητικό ολικό φορτίο. Υπάρχει μια σημαντική διακύμανση ανάμεσα στο pI διαφόρων πρωτεϊνών, αν και οι τιμές των pI κυμαίνονται συνήθως σε ένα εύρος pH 3-12, με την πλειοψηφία αυτών να κυμαίνονται μεταξύ 4 και 7.

Αν μια πρωτεΐνη τοποθετηθεί σε ένα μέσο με βαθμίδωση στο pH και εφαρμοσθεί σε αυτό ηλεκτρικό φορτίο, τότε αρχικά θα κινηθεί προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο. Κατά την διάρκεια της μετακίνησης, διαμέσου της βαθμίδωσης του pH του μέσου, η πρωτεΐνη μπορεί να χάσει ή να πάρει πρωτόνια. Καθώς μετακινείται το ολικό φορτίο καθώς και η κινητικότητα της θα μειωθούν με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της μετακίνησης της. Τελικά η πρωτεΐνη θα φτάσει στο σημείο εκείνο όπου η βαθμίδωση του pH ισούται με το pI της. Στο σημείο αυτό έχει πλέον ολικό φορτίο 0 και σταματά να μετακινείται. Για παράδειγμα αν σε ένα διάλυμα με pH πάνω από το ισοηλεκτρικό σημείο της, η πρωτεΐνη φορτίζεται θετικά και μετακινείται προς την κάθοδο. Κατά τη διάρκεια της μετακίνησης προοδευτικά χάνει το θετικό της φορτίο ώσπου να φτάσει το pI της, δηλαδή το σημείο εκείνο που πλέον το ολικό της φορτίο είναι 0. Ο ρυθμός της μετακίνησης εξαρτάται από τη δύναμη του πεδίου, το ολικό φορτίο της πρωτεΐνης, το μέγεθος της, το σχήμα καθώς και ιοντική ισχύ, το ιξώδες και τη θερμοκρασία του μέσου.

Η ισοηλεκτρική εστίαση είναι ένας σταθερός μηχανισμός όσον αφορά το pH. Οι πρωτεΐνες προσεγγίζουν τις αντίστοιχες τιμές των pI τους και παραμένουν σχετικά σταθερές σε αυτά τα pH για μεγάλο χρονικό διάστημα. Σε αντίθεση, οι πρωτεΐνες στις τυπικές ηλεκτροφορήσεις συνεχίζουν να κινούνται διαμέσου του μέσου μέχρι να απομακρυνθεί το ηλεκτρικό πεδίο.



Εικόνα 11 : Ισοηλεκτρική εστίαση πρωτεϊνών με βάση το pI τους. Οι πρωτεΐνες μετακινούνται στο μέσο με βαθμίδωση pH με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου και σταματούν στο σημείο όπου το ολικό τους φορτίο ισούται με το 0.

Το μέσο που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών είναι μια στενή ταινία από πολυμερές υλικό η οποία έχει πάνω της μια βαθμίδωση pH. Η ταινία αυτή ονομάζεται IPG strip και είναι πολύ σημαντική για την επιτυχία της IEF επειδή έχει το σημαντικό πλεονέκτημα της σταθερής, γραμμικής και αναπαραγωγίμης βαθμίδωσης pH. Η βαθμίδωση στα IPG strip επιτυγχάνεται με ένα σύνολο ρυθμιστικών διαλυμάτων, τα οποία είναι παράγωγα του πολυμερούς υλικού ακρυλαμίδης και περιέχουν δραστικούς διπλούς δεσμούς και ρυθμιστικές ομάδες. Αυτά τα παράγωγα είναι ομοιοπολικά ενσωματωμένα μέσα σε gel πολυακρυλαμίδης και μπορούν να σχηματίσουν οποιοδήποτε βαθμίδωση pH. (Righetti 1990).

6.3 SDS ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδιου (SDS polyakrilamide gel electrophoresis, SDS – PAGE)- δεύτερη διάσταση.

Στη φάση αυτή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους (μοριακό βάρος, MB). Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες, όπως και άλλα μακρομόρια

(DNA, RNA) διαχωρίζονται καθώς κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, μέσα από τους πόρους ενός πηκτώματος. Η ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το ολικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα τους, καθώς και την ιοντική ισχύ, το ιξώδες και την θερμοκρασία του μέσου στο οποίο τα μόρια κινούνται.

Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή παρά σε υγρό, διότι η πηκτή καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας (απαραίτητη για τον σωστό διαχωρισμό) και λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Τα μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Το πήκτωμα μπορεί να είναι άμυλο ή αγαρόζη κυρίως όμως χρησιμοποιείται πολυακρυλαμίδιο, γιατί παρέχει μεγάλη επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων, είναι χημικά αδρανές, διαφανές, σταθερό σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασίας και ιοντική ισχύος και επιπλέον το μέγεθος των πόρων του μπορεί να ποικίλει σημαντικά.

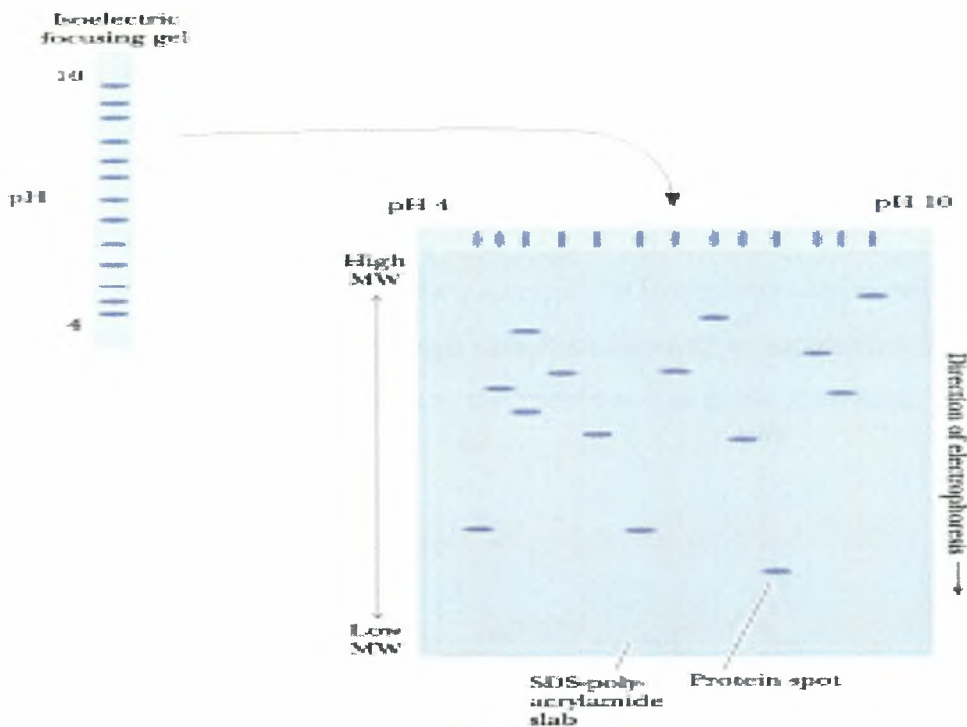
Το σύστημα ηλεκτροφόρησης μπορεί να είναι συνεχές ή ασυνεχές. Στο συνεχές σύστημα χρησιμοποιείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα στην πηκτή και στα δοχεία ηλεκτροδίων και έχει ένα μόνο ενιαίο πήκτωμα διαχωρισμού. Στο ασυνεχές σύστημα, ένα μη περιοριστικό πήκτωμα με μεγάλους πόρους αποκαλούμενο πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) είναι τοποθετημένο σε στρώσεις πάνω από ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Κάθε πήκτωμα γίνεται με ένα διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα και τα ρυθμιστικά των δεξαμενών είναι διαφορετικά από τα ρυθμιστικά των πηκτωμάτων. Η σύσταση, το pH και το μέγεθος των πόρων των δυο πηκτών είναι τέτοια, ώστε στην πηκτή συσσώρευσης τα δείγματα να συμπυκνώνονται και στο τέλος οι πρωτεΐνες να συσσωρεύονται σε στενές ζώνες μεγάλης συγκέντρωσης. Στην πηκτή διαχωρισμού επιτελείται ο διαχωρισμός τους, λόγω διαφορετικής κινητικότητας κάθε πρωτεΐνης. Έτσι επιτυγχάνεται πολύ καλύτερα ο διαχωρισμός τους από ότι στο συνεχές σύστημα και η καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τέλος η ηλεκτροφόρηση δύναται να γίνει παρουσία ή απουσία αποδιατακτικών μέσων, όπως του απορρυπαντικού SDS (θειικό δωδεκανικό νάτριο) ή της ουρίας. Στην πρώτη περίπτωση (κάτω από μη-μετουσιωτικές συνθήκες), τα πρωτεϊνικά μόρια διατηρούν άθικτες τις ανώτερες διαμορφώσεις τους και παραμένουν κατά

κανόνα δραστικά, Στη δεύτερη περίπτωση (ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες) αποδιατάσσονται οι τυχόν υπομονάδες των πρωτεϊνών λαμβάνοντας τυχαίες διαμορφώσεις και διαχωρίζονται.

Το θειικό άλας νατρίου (Sodium dodecyl sulphate, SDS) είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται πάνω στην ραχοκοκαλιά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με υδρόφοβους δεσμούς. Το SDS δεσμεύεται αρκετά εξειδικευμένα με σταθερό ποσό SDS ανά μονάδα βάρους πρωτεΐνης (1,4 go SODS : 1 go πρωτεΐνης) και έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση όλων των μη ομοιοπολικών δεσμών στο μόριο της πρωτεΐνης, την αποδιάταξή της και τη δημιουργία ενός επιμήκους συμπλόκου SDS- πολυπεπτιδικής αλυσίδας με καθαρό αρνητικό φορτίο και περίπου σταθερό λόγο φορτίου ανά μονάδα μάζας πολυπεπτιδίου. Συνεπώς το ολικό φορτίο του συμπλόκου εξαρτάται μόνο από το μέγεθος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του στο πήκτωμα αποκλειστικά από το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου.

Έτσι, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών ή των υπομονάδων αυτών, με τον παραλληλισμό των αποτελεσμάτων της SDS-PAGE των πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (μάρτυρες) σε σχέση με αυτά των υπό χαρακτηρισμό πρωτεϊνών .Γραμμική σχέση υπάρχει μεταξύ του λογαρίθμου του μοριακού βάρους ενός SDS-μετουσιωμένου πολυπεπτιδίου ή ενός νουκλειικού οξέος και του Rf του. Το Rf ορίζεται ως η αναλογία της απόστασης μετανάστευσης ενός μορίου προς αυτή που μετανάστευσε ένας χρωματισμένος μάρτυρας. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ταυτοποίηση, διαχωρισμό και χαρακτηρισμό πρωτεϊνών, καθώς επίσης για τον έλεγχο της ομοιογένειας ενός πρωτεϊνικού κλάσματος. Παρουσιάζει όμως ορισμένους περιορισμούς. Έτσι, πολύ βασικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες με μεγάλο βαθμό γλυκοσυλίωσης (επειδή δεσμεύουν απορρυπαντικό μόνο στο πρωτεϊνικό τμήμα τους) κινούνται πιο αργά στην πηκτή με αποτέλεσμα να ταυτοποιούνται λανθασμένα. Επίσης λανθασμένο μοριακό βάρος μπορεί να προκύψει και για ορισμένες περιπτώσεις πρωτεϊνών που δεν αποδιατάσσονται πλήρως με το SDS.



Εικόνα 12: τρόπος διαχωρισμού πρωτεϊνών στα πηκτώματα. Οριζόντια διαχωρίζονται ως προς το ισοηλεκτρικό τους σημείο, ενώ κατακόρυφα ως προς το μοριακό τους βάρος. Ακολούθως η πρωτεΐνη (spot) που παρουσιάζει ενδιαφέρον αποκόπτεται από το πήκτωμα και ταυτοποιείται με φασματοσκοπία

6.4 Φασματομετρία μάζας (*mass spectrometry MS*)

Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών μετά την διδιάστατη ηλεκτροφόρηση γίνεται με την τεχνική της φασματοσκοπίας μάζας. Σε ένα φασματόμετρο μάζας η υπό ανάλυση ουσία ιονίζεται, καθίσταται πτητική και στη συνέχεια προσδιορίζεται ο χρόνος που απαιτείται για να προωθηθεί, μετά από επιτάχυνση σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, σε έναν ανιχνευτή.

Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του υπο ανάλυση μορίου με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Σε περίπτωση που το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί ο ακριβής προσδιορισμός του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης επαρκεί για να γίνει η ταυτοποίηση της, διότι το μοριακό βάρος όλων των πολυπεπτιδίων που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα είναι γνωστό.

Εάν το γονιδίωμα του οργανισμού δεν είναι γνωστό, η απομονωμένη πρωτεΐνη είναι δυνατόν να αλληλουχηθεί με διαδοχικούς κύκλους φασματομετρίας

μάζας. Στην περίπτωση αυτή, μετά τον αρχικό προσδιορισμό του μοριακού βάρους γίνεται μερική πέψη με θρυψίνη, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πεπτιδίων. Τα πεπτίδια αυτά διαχωρίζονται κατά τον πρώτο κύκλο της φασματομετρίας μάζας και στη συνέχεια το καθένα από αυτά διασπάται με ιονικό βομβαρδισμό. Τα θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται σε ένα δεύτερο κύκλο φασματομετρίας μάζας. Με την χρήση προηγμένου λογισμικού είναι δυνατόν να ταυτοποιηθεί η αμινοξική αλληλουχία κάθε πεπτιδίου από το χαρακτηριστικό πρότυπο που προκύπτει από ανάλυση του προτύπου των θραυσμάτων του.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των μηχανισμών παθογένειας ενός πρόσφατα χαρακτηρισμένου στελέχους του γένους *Pseudomonas*, το *Pseudomonas entomophila*.

Χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος αγρίου τύπου, το οποίο μετά από πρόσληψη δια στόματος, μολύνει και σκοτώνει την *Drosophila melanogaster* καθώς και ένα μεταλλαγμένο στέλεχος από το οποίο ο γονιδιακός τόπος του ρυθμιστικού συστήματος GacS/GacA έχει αντικατασταθεί από ένα τρανσποζόνιο Tn5, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη. Το μεταλλαγμένο στέλεχος έχει χάσει την ικανότητα μόλυνσης της *D.melanogaster*.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ώστε να μελετηθούν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεια του *Pseudomonas entomophila* ήταν η πρωτεομική (proteomics) όπου μελετήθηκε το σύνολο των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων πρωτεϊνών των δυο στελεχών ώστε να βρεθούν διαφορές ανάμεσα τους που πιθανόν να προσδίδουν την ικανότητα μολυσματικότητας.

Η επιλογή μελέτης των πρωτεϊνών των δυο στελεχών, και όχι τιμημάτων του γονιδιώματος έγινε διότι το ρυθμιστικό σύστημα που υπάρχει στο άγριο στέλεχος είναι υπεύθυνο για την έκφραση ενός αριθμού γονιδίων που κωδικοποιούν sRNAs τα οποία είναι υπεύθυνα για την δέσμευση πρωτεϊνών που λειτουργούν ως **μεταφραστικοί καταστολείς** αρκετών mRNA γονιδίων. Επομένως ο έλεγχος που ασκεί το ρυθμιστικό σύστημα είναι μεταφραστικός, καθώς όλα τα γονίδια των δυο στελεχών μπορεί να μεταγραφούν, αλλά η μετάφραση και η παραγωγή των γονιδιακών προϊόντων είναι δυνατόν να κατασταλεί από τους μεταφραστικούς

καταστολείς. Ο ρόλος δηλαδή του συστήματος αυτού 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 mRNAs γονιδίων που παράγουν μολυσματικούς παράγοντες ενώ στο μεταλλαγμένο στέλεχος η παραγωγή αυτών των μολυσματικών παραγόντων να καταστέλλεται λόγω απουσίας αυτού του θετικού ελέγχου.

Κεφάλαιο 2

Υλικά και μέθοδοι

2.1 Καλλιέργεια μικροοργανισμού

Αρχικά για την επεξεργασία των πρωτεϊνών του κάθε στελέχους έγινε καλλιέργεια τους σε θρεπτικό μέσο. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα για την ανακαλλιέργεια τους από ήδη υπάρχουσες ανεπτυγμένες καλλιέργειες από stock γλυκερόλης που φυλάσσεται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.. Χρησιμοποιήσαμε στέρεο θρεπτικό υπόστρωμα LB agar μέσα σε τρυβλία Petri στο οποίο επιστρώσαμε τα κύτταρα για την δημιουργία αμιγών καλλιεργειών.

Στο θρεπτικό υπόστρωμα, για την ανάπτυξη του μεταλλαγμένου στελέχους προσθέσαμε και το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, ώστε να αναπτυχθούν μόνο εκείνα τα στελέχη στα οποία έχει ενσωματωθεί το τραπεζόζονιο Tn5. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού ήταν $10\text{ }\mu\text{g/ml}$. Ακολούθησε επώαση των τριβλίων στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24-48h μέχρι την εμφάνιση διάκριτων αποικιών.

Οι αποικίες που αυξάνονται στην επιφάνεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια σε νέα θρεπτικά υποστρώματα για προετοιμασία νέων καθαρών μικροβιακών καλλιεργειών.

Στη συνέχεια αφού εξασφαλίσαμε ότι έχουμε αναπτύξει αμιγείς καλλιέργειες και των δυο στελεχών αναπτύξαμε τα στελέχη σε υγρές καλλιέργειες.

Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήσαμε ήταν το LB broth. Ο όγκος των καλλιεργειών ήταν 5 ml και για τα δυο στελέχη. Στο θρεπτικό υπόστρωμα έγινε ενοφθαλμισμός αποικιών, από τα τριβλία τα οποία είχαμε αναπτύξει την προηγούμενη μέρα. Για την καλλιέργεια του μεταλλαγμένου στελέχους προστέθηκε και πάλι αντιβιοτικό τετρακυκλίνη συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ μέσα στο θρεπτικό μέσο πριν την μεταφορά των αποικιών. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση των καλλιεργειών σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 30 °C για 24h.

Έπειτα φτιάξαμε και πάλι υγρές καλλιέργειες με το θρεπτικό υλικό LB broth όγκου 100 ml και για τα δυο στελέχη. Ακολούθησε εμβολιασμός 1 ml καλλιέργειας από τις αρχικές καλλιέργειες που αναπτύξαμε την προηγούμενη μέρα σε μεγαλύτερες καλλιέργειες όγκου 100 ml. Και πάλι στην καλλιέργεια του μεταλλαγμένου στελέχους χρησιμοποιήθηκε τετρακυκλίνη συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 30 °C για 24h.

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 και η βιομάζα εκφράζεται σε μονάδες οπτικής πυκνότητας (Optical Density= OD). Για την καλλιέργεια του στελέχους *P. entomophila* θέλαμε η οπτική πυκνότητα μετά την μέτρηση να είναι περίπου 4 διότι αυτή η τιμή αντιπροσωπεύει την εκθετική φάση ανάπτυξης του οργανισμού. Το δείγμα μας εξετάζεται κάθε φορά με αραιώση 1/10 χρησιμοποιώντας 100 μl καλλιέργειας αραιωμένη σε 900 μl LB broth.

2.2 Απομόνωση κυττάρων από την καλλιέργεια

Μετά την καλλιέργεια των αποικιών θα πρέπει να απομονώσουμε τα βακτηριακά κύτταρα που υπάρχουν μέσα στην καλλιέργεια ώστε να μπορέσουμε να εξετάσουμε τις ενδοκυττάρια πρωτεΐνες του, καθώς και τις πρωτεΐνες τις οποίες εκκρίνει το βακτήριο, τις εξωκυττάρια πρωτεΐνες του. Για να απομονώσουμε τα

βακτηριακά κύτταρα κάναμε φυγοκέντρηση των καλλιιεργειών για 30 min, στις 3500 rpm σε θερμοκρασία 4 °C.

Μετά την φυγοκέντρηση προκύπτει ένα ίζημα που αποτελεί το βακτηριακό πληθυσμό. Στο υπερκείμενο έχουν συγκεντρωθεί οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες καθώς και προϊόντα μεταβολισμού των κυττάρων. Το υπερκείμενο αυτό θα το εξετάσουμε μαζί με τα βακτηριακά κύτταρα, διότι περιέχει πρωτεΐνες που εκκρίνει το βακτήριο και πιθανόν να εμπλέκονται στους μηχανισμούς παθογένειας του.

Ακολούθως κάνουμε 4-5 πλύσεις του ιζήματος με PBS (Phosphate buffered saline) συγκέντρωσης 10 %, αναδεύοντας κάθε φορά καλά ώστε να διαλυθεί το ίζημα και κάνοντας φυγοκέντρηση 15 min στις ίδιες συνθήκες με προηγουμένως.

2.3 Διάρρηξη κυτταρικής μεμβράνης

Στην επόμενη φάση ακολούθησε το σπάσιμο των κυττάρων ώστε να μπορέσουν να απελευθερωθούν τα συστατικά του κυττάρου. Αρχικά προστέθηκε στο ίζημα **PMSF** (phenylmethylsulphonyl fluoride) συγκέντρωσης 5 mM και **Tris Hcl** pH 7,5 συγκέντρωσης 50 mM. Όταν γίνεται η λύση των κυττάρων απελευθερώνονται ή ενεργοποιούνται πρωτεάσες. Το PMSF είναι αναστολέας πρωτεασών σερίνης που χρησιμοποιείται κατά την διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών και τις προστατεύει από την αποικοδόμηση τους από πρωτεάσες, μετά την κυτταρική λύση. Είναι ιδιαίτερα τοξικό γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιείται με μεγάλη προσοχή! Επίσης οι πρωτεάσες είναι λιγότερο δραστικές σε χαμηλή θερμοκρασία και γι' αυτό το λόγο θα πρέπει όλη η διαδικασία να γίνεται μέσα σε πάγο.

Η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης επιτυγχάνεται με την χρήση υπερήχων. Το κύτταρο εκτίθεται στους υπερήχους περίπου 10-12 φορές για 10 sec την κάθε φορά. Μεγάλη προσοχή πρέπει να δοθεί ώστε η κεφαλή του μηχανήματος να μην ακουμπάει στα τοιχώματα του falcon καθώς σπάμε τα κύτταρα, όπως επίσης και τον σχηματισμό αφρού.

Μετά από την διάρρηξη της μεμβράνης κάνουμε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 30 min στους 4 °C έτσι ώστε να διαχωριστούν τα μεμβρανικά συστατικά που προέκυψαν. Το υπερκείμενο μετά την φυγοκέντρηση αποτελεί το δείγμα μας για τον περαιτέρω καθαρισμό του. Στην παρούσα εργασία θα εξεταστούν οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες του βακτηρίου καθώς και οι εξωκυττάριας, δηλαδή αυτές που το βακτήριο

εκκρίνει στο εξωκυττάριο περιβάλλον του χρησιμοποιώντας διαφορετικά πρωτόκολλα κατακρήμνισης και καθαρισμού πρωτεϊνών.

2.4 Κατακρήμνιση και Καθαρισμός των Ενδοκυττάρων πρωτεϊνών.

• Πρωτόκολλο 1

Για τον χειρισμό του δείγματος μας χρησιμοποιήθηκε το 2D- cleanup kit της εταιρίας BIO-RAD. Το kit αυτό παρέχει την δυνατότητα καθαρισμού των πρωτεϊνών που θα χρησιμοποιηθούν στην δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. Το kit 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. Τα βήματα της διαδικασίας περιγράφονται παρακάτω :

- 1) Μεταφορά 1-500 mg πρωτεΐνης, σε τελικό όγκο 100μl.
- 2) Προσθήκη 300μl agent 1 στο δείγμα.
- 3) Προσθήκη 300μl precipitating 2 στο δείγμα.

Προσοχή!! Όταν προσθέτουμε το διάλυμα το tip της πιπέτας δεν πρέπει να ακουμπήσει το δείγμα. Η πρωτεΐνη μπορεί να κατακρημνιστεί πάνω του και να έχουμε απώλεια πρωτεΐνης.

- 4) Φυγοκέντρηση 5min σε μέγιστη ταχύτητα >12000g ώστε να σχηματιστεί ίζημα.
- 5) Γρήγορη αφαίρεση του υπερκείμενου ώστε να μην διαλυθεί το ίζημα.
- 6) Φυγοκέντρηση ξανά για 15-30 sec ώστε να μαζέψουμε το υπερκείμενο που έχει απομείνει.
- 7) Προσθήκη 40μl wash reagent 1 στην κορυφή του ιζήματος.
- 8) Φυγοκέντρηση για 5min μέγιστη ταχύτητα >12000g.

Προσοχή!! 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.

- 9) Απομάκρυνση υπερκείμενου.
- 10) Προσθήκη 25μl ddH₂O. Vortex 10-20sec. Το ίζημα μπορεί να διασκορπιστεί, αλλά δεν θα διαλυθεί στο H₂O.
- 11) Προσθήκη 1ml wash reagent 2 και 5 μl wash 2 additive. Vortex 1min.
Προσοχή!!!! Το wash reagent 2 πρέπει να έχει κρυώσει στους -20⁰ C για τουλάχιστον μια ώρα. Αν αυτό έχει παγώσει καλά, τότε το ίζημα δεν θα διαλυθεί.
- 12) Επώαση για 30min στους -20⁰ C. Κάθε 10 min κατά την διάρκεια της επώασης κάνουμε vortex για 30 sec.
- 13) Φυγοκέντρηση των δειγμάτων ώστε να σχηματιστεί ίζημα. Απομάκρυνση υπερκείμενου. Το ίζημα σε αυτή την φάση θα πρέπει να εμφανίζεται άσπρο.
- 14) Στέγνωμα του ιζήματος μέσα στον απαγωγό σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το στέγνωμα το ίζημα θα πρέπει να φαίνεται διαφανές.
Προσοχή!!! Το στέγνωμα θα πρέπει να διαρκέσει το πολύ μέχρι 5 min. Αν διαρκέσει περισσότερο το ίζημα θα είναι πολύ δύσκολο να επανααιωρηθεί.
- 15) Επαναιώρηση του ιζήματος σε 200μl rehydration sample buffer που αποτελείται από Urea 7M και Thiourea 2M.
* όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση παρατίθενται στο παράρτημα της εργασίας.
- 16) Vortex το λιγότερο για 30sec. Επώαση μέχρι να επαναδιαλυθεί το ίζημα.
- 17) Φυγοκέντρηση 2-5 min σε θερμοκρασία δωματίου σε μέγιστη ταχύτητα >12000g.
- 18) Το υπερκείμενο μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την ηλεκτροφόρηση πρώτης διάστασης IEF.

Αν και αυτό το πρωτόκολλο είναι αρκετά γρήγορο και αρκετά αποδοτικό για την κατακρήμνιση και τον καθαρισμό των πρωτεϊνών, ωστόσο δεν είναι κατάλληλο για εξαιρετικά ασταθείς και υδρόφοβες πρωτεΐνες που είναι διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες.

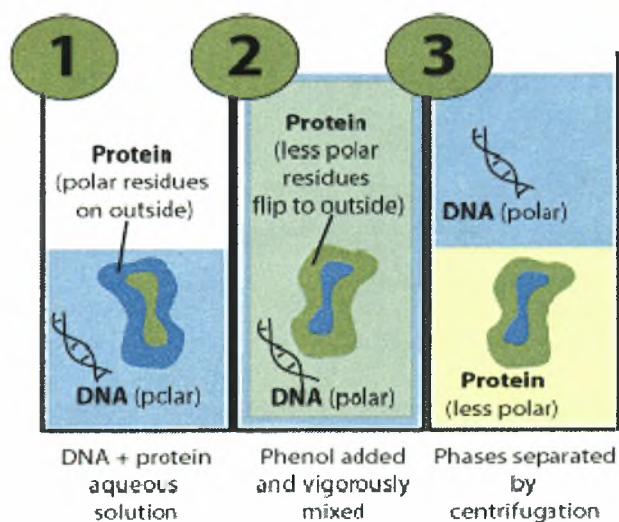
Phenol extraction

Αρχή της μεθόδου

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 πρωτείνες.

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

ΠΡΟΣΟΧΗ!!!! Η φαινόλη είναι ιδιαίτερα τοξική, δηλητηριώδης και προκαλεί λευκές κηλίδες και εγκαύματα στο δέρμα.

Πειραματική διαδικασία

- 1) Μετά την διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης μετράμε ακριβώς τον όγκο του υπερκειμένου.
- 2) Προσθήκη μισής ποσότητας (0,5 volumes) water saturated phenol- mix.
- 3) Θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 70° C. Επώαση σε πάγο για 5min.
- 4) Φυγοκέντρηση 15min, σε ταχύτητα 5000g , 4° C.
- 5) Σχηματίζονται δυο ευδιάκριτες φάσεις, η υδατική στο πάνω μέρος και η φάση φαινόλης στο κάτω. Οι δυο φάσεις χωρίζονται μεταξύ τους με μια στοιβάδα, την ενδιάμεση φάση. Μαζεύουμε με προσοχή την υδατική φάση και ενδιάμεση σε άλλο erpendorf ενώ κρατάμε την φάση φαινόλης.
- 6) Μετράμε πάλι τον όγκο της υδατικής – ενδιάμεσης φάσης και προσθέτουμε 0,5 volumes water saturated phenol- mix.
- 7) Θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 70° C. Επώαση σε πάγο για 5min.
- 8) Φυγοκέντρηση 15min, σε ταχύτητα 5000g , 4° C.
- 9) Χωρίζουμε και πάλι την υδατική-ενδιάμεση φάση με προσοχή από την φάση φαινόλης και κρατάμε την φάση φαινόλης.

Προσοχή !!! Ιδιαίτερα προσεχτικοί χειρισμοί πρέπει να γίνουν στο βήμα 5 καθώς όλο το πρωτεϊνικό μας δείγμα έχει μαζευτεί στην φαινολική φάση. Όταν θα προσπαθήσουμε να διαχωρίσουμε τις δυο φάσεις σε αυτό το βήμα, θα ήταν πιο καλό να μαζέψουμε και λίγη από την φάση φαινόλης μαζί, για να είμαστε σίγουροι πως η υδατική και ενδιάμεση φάση έχουν απομακρυνθεί. Καθώς το ίδιο βήμα επαναλαμβάνεται και παρακάτω δεν θα έχουμε απώλεια των πρωτεϊνών που πιθανόν θα παρασύρουμε μαζί.

Αφού έχουμε απομονώσει το πρωτεϊνικό δείγμα από το DNA θα πρέπει να ακολουθήσει η κατακρήμνιση και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών ώστε να χρησιμοποιηθούν στην δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορα πρωτόκολλα για τον σκοπό αυτό, τα οποία παρατίθενται παρά

2.A) Phenol-Ammonium acetate- TCA- Acetone

Το ammonium acetate χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών μετά την απομόνωση τους με την φαινόλη. Το διάλυμα παρασκευάζεται με διάλυση του στερεού ammonium acetate σε μεθανόλη.

- Επίσης παρασκευάζουμε και 50% TCA .

Το TCA κατακρημνίζει πολύ αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες και περιορίζει την πρωτεόλυση και άλλες τροποποιήσεις των πρωτεϊνών. Ωστόσο μπορεί να είναι δύσκολο να επαναδιαλυθεί το πρωτεϊνικό ίζημα μετά από τον χειρισμό του με TCA.

ΠΡΟΣΟΧΗ!!! Είναι ιδιαίτερα τοξικό, καρκινογόνο και προκαλεί εγκαύματα στο δέρμα.

- Η ακετόνη προστίθεται για να απομακρύνει το εναπομείναν TCA. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως μεγάλη έκθεση του ιζήματος στο TCA δυσκολεύει την επαναδιάλυση του, όπως επίσης μπορεί να προκαλέσει αποικοδόμηση των πρωτεϊνών διότι το διάλυμα TCA έχει πολύ χαμηλό pH.

Αφού έχουμε παρασκευάσει τα διαλύματα

- 1) Προσθέτουμε 2,5 volumes ammonium acetate στην φάση φαινόλης αφού πρώτα έχουμε μετρήσει με ακρίβεια τον όγκο της.
- 2) Αφήνουμε O/N στους -20°C .
- 3) Φυγοκέντρηση 30 min στους 4°C , 14000g
- 4) Απομάκρυνση υπερκλειμένου
- 5) Προσθήκη 400 μl H_2O ώστε να διαλυθεί το ίζημα.
- 6) Προσθήκη 133 μl 50 % TCA.
- 7) Επώαση 1h στους 4°C
- 8) Φυγοκέντρηση 15 min, 14000 g, 4°C .
- 9) Απομάκρυνση υπερκλειμένου
- 10) Ξέπλυμα ιζήματος με 200 μl 1% TCA (40 μl TCA 50 % + 1960 μl H_2O)
- 11) Ξέπλυμα του ιζήματος με 200 μl 100% παγωμένης ακετόνης. Η διαδικασία αυτή θα πρέπει να επαναληφθεί τουλάχιστον 5 φορές με φυγοκέντρηση κάθε φορά για 10 min, 14000g.

- 12) Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση αφήνουμε το πρωτεϊνικό ίζημα στον απαγωγό για 30- 35 min μέχρι να στεγνώσει καλά από την ακετόνη.
- 13) Επανααιώρηση του ιζήματος σε 400μl rehydration sample buffer που αποτελείται από Urea 7M και Thiourea 2M.

2B) Phenol- Ammonium acetate- TCA in Acetone

Στο πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιείται TCA και ακετόνη μαζί για την κατακρήμνιση 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 διαλυτοποιηθεί τελείως. Επίσης παρατεταμένη διάρκεια έκθεσης του πρωτεϊνικού δείγματος σε αυτό το διάλυμα μπορεί να προκαλέσει την αποκοιδόμηση μερικών πρωτεϊνών, εξαιτίας του χαμηλού pH.

- 1) Προσθέτουμε 2,5 volumes ammonium acetate στην φάση φαινόλης αφού πρώτα έχουμε μετρήσει με ακρίβεια τον όγκο της.
- 2) Αφήνουμε O/N στους -20°C .
- 3) Φυγοκέντρηση 30 min στους 4°C , 14000g
- 4) Απομάκρυνση υπερκειμένου
- 5) Προσθήκη 200 μl H_2O ώστε να διαλυθεί το ίζημα
- 6) Ανακατεύουμε 1600 μl 100% ακετόνη μαζί με 200 μl 100 % TCA (10gr TCA σε 10 ml H_2O).
- 7) Προσθήκη του διαλυμένου ιζήματος στο διάλυμα TCA- ακετόνη.
- 8) Επάωση 1h στους -20°C .
- 9) Φυγόκεντρης 15 min, 14000 g, 4°C .
- 10) Απομάκρυνση υπερκειμένου
- 11) Ξέπλυμα του ιζήματος με 200 μl 90% παγωμένης ακετόνης (1ml H_2O + 9 ml ακετόνη) . Η διαδικασία αυτή θα πρέπει να επαναληφθεί τουλάχιστον 5 φορές με φυγοκέντρηση κάθε φορά για 10 min, 14000g.

- 12) Την τελευταία φορά κάνουμε την πλύση με 100% ακετόνη.
- 13) Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση αφήνουμε το πρωτεϊνικό ίζημα στον απαγωγό για 30- 35 min μέχρι να στεγνώσει καλά από την ακετόνη.
- 14) Επανααιώρηση του ιζήματος σε 400μl rehydration sample buffer που αποτελείται από Urea 7M και Thiourea 2M.

2C) Phenol- ice cold acetone

Στο πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε μόνο ακετόνη για την κατακρήμιση των πρωτεϊνών. Η ακετόνη είναι ένας οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιείται συχνά στην κατακρήμιση. Όμως μόνο με την χρήση ακετόνης γίνεται μερική ανάκτηση όλων των πρωτεϊνών και υπάρχει η πιθανότητα διάφορες διαλυτές προσμίξεις να παραμείνουν στο δείγμα.

- 1) Προσθέτουμε 2 ml παγωμένης ακετόνης στην φάση φαινόλης.
- 2) Αφήνουμε O/N στους -20°C . (Ο ελάχιστος χρόνος επώασης είναι 3h)
- 3) Φυγοκέντρηση 30 min στους 4°C , 14000g
- 4) Απομάκρυνση υπερκειμένου
- 5) Ξέπλυμα του ιζήματος με 200 μl 80% παγωμένης ακετόνης (2ml H₂O + 8 ml ακετόνη) ώστε να απομακρυνθούν οι υδατάνθρακες που τυχόν έχουν παραμείνει στο δείγμα. Η διαδικασία αυτή θα πρέπει να επαναληφθεί τουλάχιστον 5 φορές με φυγοκέντρηση κάθε φορά για 10 min, 14000g.
- 6) Την τελευταία φορά κάνουμε την πλύση με 100% ακετόνη
- 7) Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση αφήνουμε το πρωτεϊνικό ίζημα στον απαγωγό για 30- 35 min μέχρι να στεγνώσει καλά από την ακετόνη.
- 8) Επανααιώρηση του ιζήματος σε 400μl rehydration sample buffer που αποτελείται από Urea 7M και Thiourea

2D) Phenol- ammonium acetate- ice cold acetone

- 1) Προσθέτουμε 2,5 volumes ammonium acetate στην φάση φαινόλης αφού πρώτα έχουμε μετρήσει με ακρίβεια τον όγκο της.
- 2) Αφήνουμε O/N στους -20°C .
- 3) Φυγοκέντρηση 30 min στους 4°C , 14000g
- 4) Απομάκρυνση υπερκείμενου
- 5) Προσθήκη 200 μl H_2O ώστε να διαλυθεί το ίζημα
- 6) Προσθήκη 800 μl παγωμένη ακετόνη.
- 7) Επώαση 4h στους -20°C .
- 8) Φυγοκέντρηση 30 min στους 4°C , 14000g.
- 9) Απομάκρυνση υπερκείμενου.
- 10) Ξέπλυμα του ιζήματος με 200 μl 80% παγωμένης ακετόνης (2ml H_2O + 8 ml ακετόνη) ώστε να απομακρυνθούν οι υδατάνθρακες που τυχόν έχουν παραμείνει στο δείγμα. Η διαδικασία αυτή θα πρέπει να επαναληφθεί τουλάχιστον 5 φορές με φυγοκέντρηση κάθε φορά για 10 min, 14000g.
- 11) Την τελευταία φορά κάνουμε την πλύση με 100% ακετόνη.
- 12) Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση αφήνουμε το πρωτεϊνικό ίζημα στον απαγωγό για 30- 35 min μέχρι να στεγνώσει καλά από την ακετόνη.
- 13) Επανααιώρηση του ιζήματος σε 400 μl rehydration sample buffer που αποτελείται από Urea 7M και Thiourea 2M.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ!!

Στο τέλος από κάθε πρωτόκολλο, πάντα στο έτοιμο προς ηλεκτροφόρηση δείγμα προσθέταμε **σπερμίνη** συγκέντρωσης 10 mM. Η σπερμίνη είναι μια πολυαμίνη που εμπλέκεται στον κυτταρικό μεταβολισμό και βρίσκεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η σπερμίνη συνδέεται με τα νουκλεϊκά οξέα και συμβάλλει στην αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής.

Μετά από την προσθήκη της σπερμίνης ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 2h, 14000g, στους 4°C . Έτσι το DNA που πιθανόν να έχει παραμείνει στο πρωτεϊνικό δείγμα αναδιατάσσεται και εμφανίζεται μετά την φυγοκέντρηση σαν ίζημα στα τοιχώματα του erpendorf. Το υπερκείμενο που συλλέγεται είναι το

πρωτεϊνικό δείγμα, έτοιμο προς ηλεκτροφόρηση.

2.5 Κατακρήμιση και Καθαρισμός των Εξωκυττάρων πρωτεϊνών

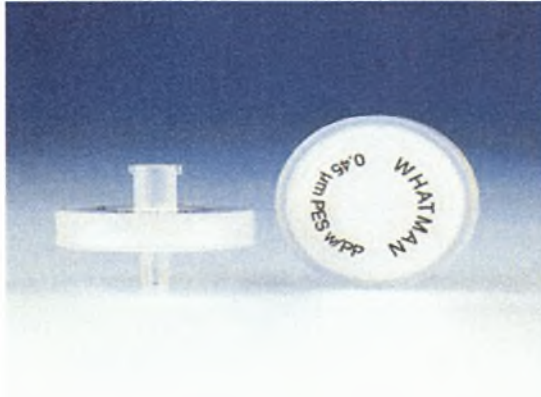
Το υπερκείμενο που συλλέξαμε μετά την διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης, περιέχει τις εξωκυττάρια πρωτεΐνες του βακτηρίου, προϊόντα μεταβολισμού του βακτηρίου, τμήματα της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς και συστατικά του κυττάρου, τα οποία απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον μετά την λύση της μεμβράνης. Γι' αυτό το λόγο η διαδικασία που θα ακολουθήσουμε 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.

Πειραματική διαδικασία

- 1) Αρχικά στο υπερκείμενο προσθέτουμε PMSF, που είναι αναστολέας των πρωτεασών σερίνης και προστατεύει τις πρωτεΐνες από την αποικοδόμηση. Η τελική συγκέντρωση του PMSF που χρησιμοποιήσαμε είναι 1mM.
- 2) Φυγοκέντρωση 1h , 4° C, 12000g
- 3) **Συλλογή υπερκείμενου πολύ γρήγορα.** Το ίζημα που σχηματίζεται είναι εξαιρετικά ασταθές και μπορεί να επαναδιαλυθεί!
- 4) Ακολουθεί η **διήθηση** του πρωτεϊνικού δείγματος, ώστε να μπορέσουμε να διαχωρίσουμε τις πρωτεΐνες από τα υπόλοιπα συστατικά τα οποία περιέχονται στο υπερκείμενο. Η διήθηση γίνεται σε ειδικά φιλτράκια τα οποία έχουν μια μεμβράνη που φέρει πολύ μικρούς πόρους με συγκεκριμένο μέγεθος. Όταν το υγρό δείγμα διοχετεύεται μέσα στα φιλτράκια, τα συστατικά του δείγματος με μέγεθος μεγαλύτερο από αυτό των πόρων κατακρατούνται στην επιφάνεια του φίλτρου, ενώ αυτά που έχουν μικρότερο μέγεθος περνούν από αυτούς.

Για την διήθηση του πρωτεϊνικού μας δείγματος χρησιμοποιήσαμε φιλτράκια με δυο διαφορετικά μεγέθη πόρων. Το πρώτο φιλτράκι στο οποίο διοχετεύσαμε το δείγμα μας με την βοήθεια σύριγγας, έχει μέγεθος πόρων 0,45 μm. Στην επιφάνεια του κατακρατούνται όσα μόρια έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από αυτό, όπως είναι οι

πολυσακχαρίτες. Στην συνέχεια το διήθημα που συλλέξαμε το διοχετεύαμε σε ένα δεύτερο φιλτράκι με μέγεθος πόρων μικρότερο του πρώτου, 0,2 μm. Έτσι διασφαλίζουμε ότι, μόρια τα οποία μπόρεσαν να διέλθουν από το πρώτο φιλτράκι παγιδεύονται στην μεμβράνη του δεύτερου.



Εικόνα 14 : Φιλτράκια για την διήθηση του πρωτεϊνικού δείγματος

- 5) Ακολουθεί η **φυγοκεντρική υπερδιήθηση** του διηθήματος που χρησιμοποιείται συχνά για την συμπύκνωση των δειγμάτων. Η μέθοδος βασίζεται στην χρήση ειδικών φίλτρων που περιέχουν μια ειδική μεμβράνη που επιτρέπει σε μόρια με συγκεκριμένη μοριακή μάζα να διέλθουν μέσω αυτής, ενώ αυτά που έχουν μεγαλύτερη μοριακή μάζα παραμένουν στην επιφάνεια της μεμβράνης. Το διήθημα τοποθετείται μέσα στο φίλτρο, το οποίο βρίσκεται τοποθετημένο μέσα σε falcon και φυγοκεντρείται . Μόρια με μικρότερη μοριακή μάζα από τις πρωτεΐνες διαφεύγουν από την μεμβράνη προς το falcon ενώ οι πρωτεΐνες παραμένουν στο φίλτρο από το οποίο δεν μπορούν να διαπεράσουν την μεμβράνη.
- Τα φίλτρα που χρησιμοποιήσαμε είχαν μεμβράνη με πόρους που επέτρεπαν μόρια με μοριακό βάρος < **5000 kD** να διέλθουν από αυτή. Μετά την τοποθέτηση μιας ποσότητας διηθήματος μέσα στο φίλτρο, ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4° C, 3000g. Ο χρόνος της φυγοκέντρησης δεν είναι καθορισμένος διότι ο ρυθμός απομάκρυνσης των διαφόρων μορίων μπορεί να ποικίλλει!! Η διαδικασία ολοκληρώνεται μετά την υπερδιήθηση όλου του διηθήματος μετά από αρκετές φυγοκεντρήσεις.
- ΠΡΟΣΟΧΗ!!!** Κατά την διαδικασία της υπερδιήθησης επειδή ο χρόνος κάθε φυγοκέντρησης δεν είναι καθορισμένος πρέπει να ελέγχουμε κάθε

φορά τον ρυθμό απομάκρυνσης του διηθήματος ώστε να ρυθμίζουμε τον χρόνο της φυγοκέντρωσης κάθε φορά.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας το πρωτεϊνικό μας δείγμα βρίσκεται πάνω από την επιφάνεια της μεμβράνης και συλλέγεται ώστε να συνεχιστεί η διαδικασία κατακρήμνισης και καθαρισμού.



Εικόνα 15: Φιλτράκια για την φυγοκεντρική υπερδιήθηση.

Μετά την ολοκλήρωση της υπερδιήθησης, στο πρωτεϊνικό δείγμα εφαρμόστηκαν τα ίδια πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν και στην επεξεργασία των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών.

2.6 Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών –Μέθοδος 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.

Αρχικά, λοιπόν μετράται η απορρόφηση μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων BSA (Bovine Serum Albumin) σε διάλυμα ουρίας- θειουρίας (Urea- Thiourea). Επειδή το πρωτεϊνικό μας δείγμα είναι διαλυμένο σε ουρία- θειουρία πρέπει και η πρότυπη καμπύλη να κατασκευαστεί με πρότυπα διαλύματα που περιέχουν και αυτά Urea- Thiourea. Η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων γίνεται ως εξής :

Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων	Ποσότητα BSA	Ποσότητα Ουρίας-Θειουρίας	Διάλυμα Bradford
0	0	50 μl	950 μl
0,25	1,25μl	48,75 μl	950 μl
0,5	2,5 μl	47,5 μl	950 μl
0,6	3 μl	47 μl	950 μl
0,75	3,75 μl	46,25 μl	950 μl
1	5 μl	45 μl	950 μl

Πίνακας 2: Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων στη μέθοδο Bradford

Ακολουθεί καλή ανάδευση, επώαση για 5min και μέτρηση απορρόφησης στα 595 nm. Από τις τιμές απορρόφησης των πρότυπων δειγμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, από την οποία βρίσκουμε την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης. Στη συνέχεια ετοιμάζουμε το προς ανάλυση δείγμα, το οποίο πριν το φωτομετρήσουμε πρέπει να το αραιώσουμε, για να μην ξεφύγει η απορρόφηση πάνω από τις απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων.

Η αραιώση που συνήθως εκτελούμε είναι 1/10 και 1/20 για το δείγμα των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών καθώς έχει αρκετά υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών.

1/10 : 5μl δείγματος + 45 μl Urea-Thiourea + 950 μl Bradford

1/20 : 2,5 μl δείγματος + 47,5 μl Urea-Thiourea + 950 μl Bradford

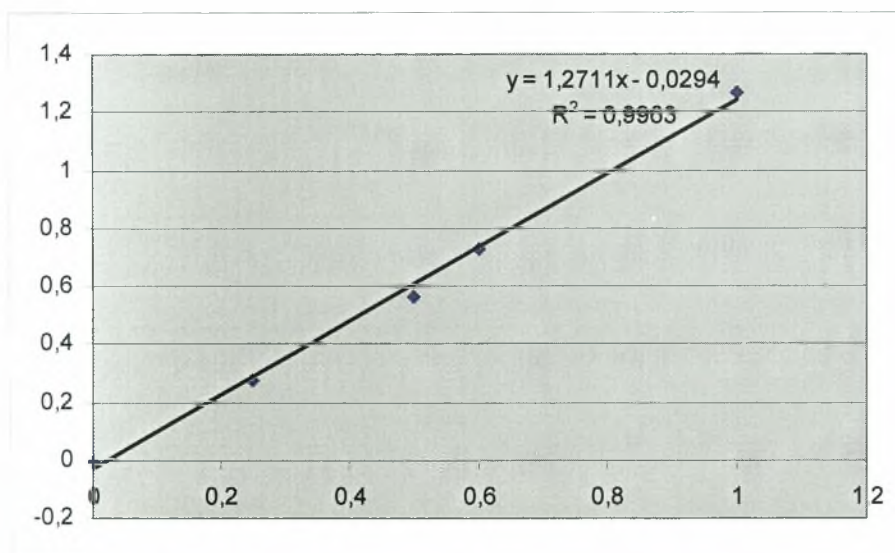
Η αραιώση που συνήθως εκτελούμε είναι 1/5 και 1/10 για το δείγμα των εξωκυττάρων πρωτεϊνών.

Μετρώντας την απορρόφηση των δειγμάτων και αντικαθιστώντας τις τιμές αυτές στην πρότυπη εξίσωση γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.

Μετά την φωτομέτρηση όλων των δειγμάτων προέκυψαν οι εξής τιμές απορρόφησης.

Συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος	Απορρόφηση
0	0
0,25	0,280
0,5	0,564
0,6	0,728
0,75	1,152
1	1,268

Πίνακας 3: Απορρόφηση πρότυπων διαλυμάτων



Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη

- **Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης**

Στη συνέχεια από τις τιμές της απορρόφησης που βρέθηκαν στα δείγματα γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα του άγριου και μεταλλαγμένου στελέχους.

Μετά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών είναι δυνατόν να ξεκινήσει το πρώτο βήμα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης, η ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών.

2.7 Ισοηλεκτρική εστίαση – πρώτη διάσταση (isoelectric focusing, IEF) (Richetti 1983).

Βήμα 1^ο Rehydration (ενυδάτωση)

Σε αυτό το βήμα γίνεται η διανομή του πρωτεϊνικού δείγματος κατά μήκος του strip. Τα strip διατίθενται σε διάφορα μήκη, όπου το καθένα απαιτεί την “φόρτωση” συγκεκριμένης ποσότητας πρωτεΐνης και μπορεί απορροφήσει συγκεκριμένο όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος ενυδάτωσης (rehydration buffer).

Μήκος IPG strip	7 cm	11 cm	17 cm	18 cm	24 cm
Ποσότητα πρωτεΐνης	50-100 µg	100-200 mg	200-400 µg	200-400 µg	400-800 µg
Όγκος rehydration buffer	125 µl	200µ l	300 µl	315 µl	450 µl

Πίνακας 4 : Σχέση μήκους strip , ποσότητας πρωτεΐνης, και ολικού όγκου rehydration buffer

Γνωρίζοντας την συγκέντρωση της πρωτεΐνης από την ποσοτικοποίηση με την μέθοδο Bradford και με βάση την απαιτούμενη ποσότητα πρωτεΐνης για κάθε strip μπορούμε να υπολογίσουμε τον όγκο του πρωτεϊνικού δείγματος που θα χρησιμοποιήσουμε στο διάλυμα ενυδάτωσης.

•Υπολογισμός όγκου πρωτεΐνης στο διάλυμα ενυδάτωσης

Για την ενυδάτωση ενός strip 17 cm απαιτείται ποσότητα πρωτεΐνης 200-400 µg.

Στην παρούσα εργασία η ποσότητα που θέλαμε να φορτώσουμε ήταν 350 µg.

ΠΡΟΣΟΧΗ!!! Είναι πολύ σημαντικό κατά την φόρτωση 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!!

Στο **διάλυμα ενυδάτωσης** προστίθενται και άλλες ουσίες με διαφορετικό ρόλο η καθεμιά. Στον πίνακα παρακάτω αναφέρονται τα συστατικά καθώς και ο ρόλος. (αναλυτικά οι συγκεντρώσεις του καθενός βρίσκονται στο παράρτημα της εργασίας)

*Μην ξεχνάμε πως το δείγμα μας είναι διαλυτοποιημένο σε διάλυμα ουρίας-θειουρίας άρα σε αυτό το βήμα προσθέτουμε μόνο τα υπόλοιπα συστατικά.

Συστατικά	Ρόλος
Ουρία (Urea)	Είναι ουδέτερη χαστροπική ουσία που διαλυτοποιεί και μετουσιώνει τις πρωτεΐνες
Θειουρία (Thiourea)	Χρησιμοποιείται επιπρόσθετα με την Urea για την βελτίωση της διαλυτοποίησης, ιδιαίτερα των υδροφοβικών πρωτεϊνών.
Chaps	Είναι απορρυπαντικό που έχει μηδενικό ηλεκτρικό φορτίο. Διαλυτοποιεί τις υδροφοβικές πρωτεΐνες και ελαττώνει την συσσωμάτωση διαφορετικών πρωτεϊνών.
Διθειοθρεϊτόλη (DTT)	Είναι αναγωγική ουσία που χρησιμοποιείται για την διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών και την διατήρηση των πρωτεϊνών στην ανηγμένη τους κατάσταση μέσω της ενυδάτωσης τους. Πρέπει να προστίθεται ακριβώς πριν την διανομή του δείγματος στο strip.
Αμφολύτες (IPG Buffer)	Βελτιώνει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, αυξάνει την διαλυτότητα τους, και βοηθάει στην ομοιόμορφη κατανομή της αγωγιμότητας κατά

	μήκος του strip
Κυανό της βρωμοφαινόλης	Χρωστική που επιτρέπει την παρακολούθηση της εξέλιξης της IEF. Καθώς το strip διαπερνάτε από ρεύμα η χρωστική μετακινείται προς την άνοδο.

Πίνακας 5 : Συστατικά του διαλύματος ενυδάτωσης.

- Αφού προσθέσουμε όλα τα συστατικά του διαλύματος ενυδάτωσης στο δείγμα , ανακινούμε ελαφρώς και μεταφέρουμε όλο το διάλυμα κατά μήκος της μιας πλευράς του διαδρόμου του tray με **ιδιαίτερη προσοχή** ώστε να μην σχηματιστούν φυσαλίδες, οι οποίες εμποδίζουν την ομοιόμορφη κατανομή του δείγματος πάνω στο strip.
- Αφού φορτώσουμε το δείγμα κατά μήκος του tray, βγάζουμε από τους -20° C όπου φυλάσσονται, τα IPG strips. Με την βοήθεια λαβίδας αφαιρούμε σιγά- σιγά το προστατευτικό πλαστικό κάλυμμα από την πλευρά που βρίσκεται το πήκτωμα στο strip.
- Τοποθετούμε το strip με την πλευρά του πήκτωματος πάνω στο δείγμα με **ιδιαίτερη προσοχή** ώστε να μην παγιδευτούν φυσαλίδες πάνω στην επιφάνεια του πήκτωματος. Το “+” που αναγράφεται πάνω στο strip πρέπει να είναι τοποθετημένο προς την αριστερή πλευρά του tray. Πρέπει επίσης να φροντίσουμε το δείγμα να μην ακουμπάει στα πλαστικά άκρα του strip καθώς αυτή ποσότητα δεν θα απορροφηθεί από το πήκτωμα του strip.
- Αφήνουμε το δείγμα να απορροφηθεί από το πήκτωμα για 20 min και στη συνέχεια καλύπτουμε το strip με 2-3 ml 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 11-16 h ώστε να επιτευχθεί η ενυδάτωση και να απορροφηθεί το δείγμα στο strip.

Βήμα 2^ο Ηλεκτροφόρηση Πρώτης Διάστασης IEF.

- Χρησιμοποιούμε το σκεύος " PROTEAN IEF focusing tray", το οποίο διαθέτει δυο ηλεκτρόδια σε κάθε διάδρομο. Πάνω σε κάθε ηλεκτρόδιο τοποθετούμε 2 χαρτάκια εμποτισμένα με dd H₂O 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 2-3 ml mineral oil.
- Κλείνουμε το tray με το καπάκι και το τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Οι συνθήκες της ισοηλεκτρικής εστίασης αναφέρονται στο παράρτημα

ΠΡΟΣΟΧΗ!!! Μετά το τέλος του πρώτου βήματος η ένταση του ρεύματος πρέπει να ΜΗΝ ξεπερνάει τα **10μΑ/ 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.

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.

2.8 SDS ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου (SDS polyakrilamide gel electrophoresis, SDS – PAGE)- δεύτερη διάσταση.

Αφού λοιπόν έχει γίνει ο ισοηλεκτρικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών κατά την πρώτη διάσταση το strip τοποθετείται πάνω σε μια πλάκα πηκτής SDS- πολυακρυλαμιδίου και ακολουθεί κάθετη ηλεκτροφόρηση. Έτσι κάθε πρωτεΐνη

κινείται και διαχωρίζεται ανάλογα με το μοριακό της βάρος σχηματίζοντας μια κηλίδα (spot).

Βήμα 1ο

- Απλώνουμε στον πάγκο διηθητικό χαρτί και τοποθετούμε αρχικά το μεγάλο τζάμι (larger outer plate) πάνω σε αυτό.
- Στις δυο παράλληλες κάθετες πλευρές απλώνουμε βαζελίνη και κατά μήκος αυτών τοποθετούμε τα spacers.
- Κατά μήκος των spacers απλώνουμε λίγη 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. Προσέχουμε να μην τα σφίξουμε πάρα πολύ και ελέγχουμε αν τα τζάμια έχουν ενωθεί σωστά ώστε να μην προεξέχει κάποιο από τα δυο και δημιουργήσει διαρροή του πηκτώματος.
- Ανάμεσα στα δυο τζάμια βάζουμε μια alignment card ώστε να σπρώξουμε τα spacers προς τις άκρες.
- Στερεώνουμε τα τζάμια στη οριζόντια βάση αφού πρώτα έχουμε απλώσει αγαρόζη 0,8 % από την μια άκρη ως την άλλη. Τοποθετούμε τα τζάμια πρώτα από την μια άκρη και μετά σιγά σιγά προς την άλλη. Συμπληρώνουμε και τις δυο πλευρές του τζαμιού με το διάλυμα αγαρόζης.
- Αφήνουμε να κρυώσει λίγο η αγαρόζη και ελέγχουμε αν υπάρχει διαρροή ρίχνοντας σταδιακά dd H₂O ανάμεσα στα τζάμια ώστε να μην σπάσει το "στεγανό" που έχει δημιουργηθεί.
- Αφού βεβαιωθούμε πως δεν υπάρχει διαρροή απομακρύνουμε το dd H₂O και σκουπίζουμε την εσωτερική πλευρά των τζαμιών με διηθητικό χαρτί. Το dd H₂O δεν θα πρέπει να παραμείνει για αρκετή ώρα καθώς μπορεί να δημιουργηθεί διαρροή λόγω της αραίωσης της αγαρόζης.
- Προσθέτουμε το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) ανάμεσα στα δυο τζάμια έως περίπου 3 cm κάτω από την επιφάνεια του μεγάλου τζαμιού.
- Προσθέτουμε αργά αργά dd H₂O από την μια άκρη ως την άλλη, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες και να ευθυγραμμιστεί η επιφάνεια του πηκτώματος ώστε όλες οι πρωτεΐνες να αρχίσουν να κινούνται από το ίδιο ύψος.
- Αφήνουμε να πήξει για 30min-1h.

- Μόλις πήξει αφαιρούμε το dd H₂O και σκουπίζουμε με διηθητικό χαρτί το εσωτερικό μέρος των τζαμιών.
- Προσθέτουμε και το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel). Αμέσως μετά τοποθετούμε το ειδικό στενάκι ώστε να σχηματιστεί το ενιαίο πηγαδάκι που θα τοποθετηθεί το strip. Αφήνουμε να πήξει για 1h.
- Μόλις πήξει καλύπτουμε την επιφάνεια των τζαμιών με βρεγμένο χαρτί και στη συνέχεια με ζελατίνη και τοποθετούμε τα πηκτώματα στους 4° C για 16-18 h ώστε να επιτευχθεί ο πολυμερισμός του πολυακριλαμιδίου.

ΠΡΟΣΟΧΗ!! Κατά την παρασκευή των πηκτωμάτων διαχωρισμού και συσσώρευσης προστίθενται πάντα στο τέλος APS και TEMED.

Το APS (υπερθειικό αμμώνιο) προκαλεί την δημιουργία ελευθέρων ριζών. Ως εκκινήτης του πολυμερισμού προστίθεται πάντα τελευταίο.

Το TEMED καταλύει την διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού του πολυακριλαμιδίου και προστίθεται πάντα πριν το APS.

Και τα δυο μαζί συμβάλλουν στον πολυμερισμό του πολυακριλαμιδίου.

Βήμα 2^ο

- Ετοιμάζουμε το equilibration buffer. Παρακάτω αναφέρονται τα συστατικά καθώς και ο ρόλος καθενός.

Συστατικό	Ρόλος
Ουρία	Μαζί με την γλυκερόλη, αυξάνει το ιξώδες από το buffer, μειώνοντας έτσι την δράση της ηλεκτρόσμωσης που μπορεί να παρεμποδίσει την μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel του strip στο gel συσσώρευσης.
Tris – HCL, pH 6,8	Διατηρεί το strip σε ένα εύρος pH κατάλληλο για την ηλεκροφόρηση.
Γλυκερόλη	Περιγράφηκε παραπάνω ο συνεργατικός της ρόλος μαζί με την Urea.

Διθειοθρεϊτόλη (DTT)	Διατηρεί τους ανηγμένους δεσμούς S-S των πρωτεϊνών.
Ιωδοακεταμίδιο (Iodoacetamide)	Αλκυλιώνει τις θειολικές ομάδες των πρωτεϊνών, προστατεύοντας τις έτσι από την οξείδωση κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, που έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ραβδώσεων στο gel. Επίσης αλκυλιώνει το εναπομείναν DTT, που και αυτό μπορεί να συμβάλλει στην δημιουργία ραβδώσεων. Τέλος ελαττώνει τις μη επιθυμητές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυστεϊνών όταν θα ακολουθήσει η φασματοσκοπία μάζας (mass spectrometry).
θειικό άλας νατρίου (SDS)	Μετουσιώνει τις πρωτεΐνες
Κυανό της βρωμοφαινόλης	Επιτρέπει την παρακολούθηση της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης

- Όταν η ισοηλεκτρική εστίαση ολοκληρωθεί απομακρύνουμε το focusing tray από το μηχάνημα.
- Έπειτα, με την βοήθεια λαβίδας απομακρύνουμε το IPG strip, το κρατάμε κάθετα σε μια επιφάνεια χαρτιού ώστε να απομακρυνθεί το mineral oil και 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.

Βήμα 3^ο

- Αφαιρούμε με προσοχή το χτενάκι από το πήκτωμα συσσώρευσης και σκουπίζουμε τα κομμάτια gel που πιθανόν να έχουν μείνει πάνω στο μεγάλο gel.
- Προσθέτω περίπου 300μl running buffer 1x (100 μl running buffer 10x + 900 μl H₂O) 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, και 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.

ΠΡΟΣΟΧΗ!!! 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 μl μάρτυρα στο πηγαδάκι του.
- Προσθέτουμε 0,8 αγαρόζη πάνω από το strip και τον μάρτυρα, με προσοχή ώστε να μην περάσει ο marker στο strip. Περιμένουμε λίγα λεπτά να κρυώσει η αγαρόζη.
- Μεταφέρουμε τα τζάμια μέσα στο tank.
- Γεμίζουμε με running buffer 1x το upper buffer chamber.
- Γεμίζουμε με running buffer 1x το lower buffer chamber περίπου 10-15 cm από την κάτω πλευρά έως ότου να καλυφθεί η κάτω πλευρά του gel. (Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το ίδιο buffer 2-3 φορές)
- Η ηλεκτροφόρηση τρέχει στα 30 mA / gel για 6-7 h. (Εναλλακτικά μπορούμε να τρέξουμε στα 10 mA /gel για 16-18h)

2.9 Χρώση πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο (Silver Nitrate Staining)

- Αφού η ηλεκτροφόρηση ολοκληρωθεί τοποθετούμε τα τζάμια πάνω σε διηθητικό χαρτί. Αφαιρούμε με προσοχή το μικρό τζάμι από πάνω και κόβουμε το πήκτωμα συσσώρευσης.

- Τοποθετούμε το πήκτωμα διαχωρισμού στο διάλυμα καθήλωσης (fixation) πάνω στον αναδευτήρα για 20 min.

- Αφαιρούμε το fixation και προσθέτουμε 50 % μεθανόλη για 10 min.

- Αφαιρούμε την μεθανόλη και βάζουμε dd H₂O μέχρι να καλυφθεί το gel. Αφήνουμε στον αναδευτήρα O/N.

- Αφαιρούμε το dd H₂O και προσθέτουμε το sensitize διάλυμα για **20-30 sec !!**

- Αφαιρούμε γρήγορα και ξεπλένουμε το gel με dd H₂O 2- 3 φορές από 1 min την κάθε φορά.

- Προσθέτουμε το διάλυμα νιτρικού αργύρου για 20 min. Το μπουκάλι με το dd H₂O, πριν την προσθήκη του νιτρικού αργύρου, το έχουμε βάλει στους 4° C από το προηγούμενο βράδυ.

- Αφαιρούμε τον νιτρικό άργυρο, και προσθέτουμε το διάλυμα ανάπτυξης χρώματος (developer). Ανακινούμε πολύ ελαφρά το gel μέχρι να εμφανιστούν τα spots.

- Μόλις εμφανιστούν τα spots αφαιρούμε το developer διάλυμα και προσθέτουμε το διάλυμα τερματισμού (stopper) . Κάνουμε αρχικά 2 πλύσεις του gel με αυτό και μετά το αφήνουμε τουλάχιστον για 2h.

ΠΡΟΣΟΧΗ !!!!!

- ◆ Είναι πολύ σημαντικό στο διάλυμα ευαισθητοποίησης να κρατηθεί ο ίδιος χρόνος και για τα δυο δείγματα, άγριου και μεταλλαγμένου στελέχους.

- ◆ Είναι πολύ σημαντικό στο διάλυμα ανάπτυξης χρώματος να κρατηθεί ο ίδιος χρόνος παραμονής και στα δυο δείγματα, ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.

- ◆ Όταν θα προσθέσουμε το διάλυμα τερματισμού, να κάνουμε πρώτα τις πλύσεις, διότι υπάρχει πιθανότητα να μαυρίσουν τα gel, δυσχεραίνοντας έτσι την ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

- ◆ Ο νιτρικός άργυρος βάφει τις επιφάνειες και το δέρμα γι'αυτό απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά την μεταχείριση του.

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

Κεφάλαιο 3

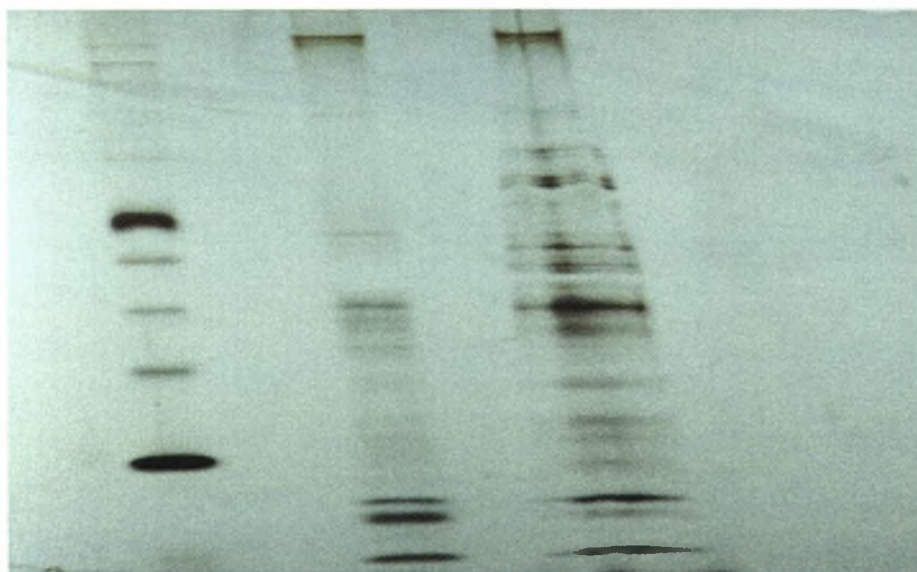
Αποτελέσματα

Οι εικόνες 16-18 είναι αποτέλεσμα δυο ηλεκτροφορήσεων 2-D άγριου και μεταλλαγμένου στελέχους και αποτελούν δείγματα για το σύνολο των 2-D ηλεκτροφορήσεων σε εύρος pH 3-10, 4-7 και 5-8 , καθώς και δυο ηλεκτροφορήσεων 1-D άγριου και μεταλλαγμένου στελέχους που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

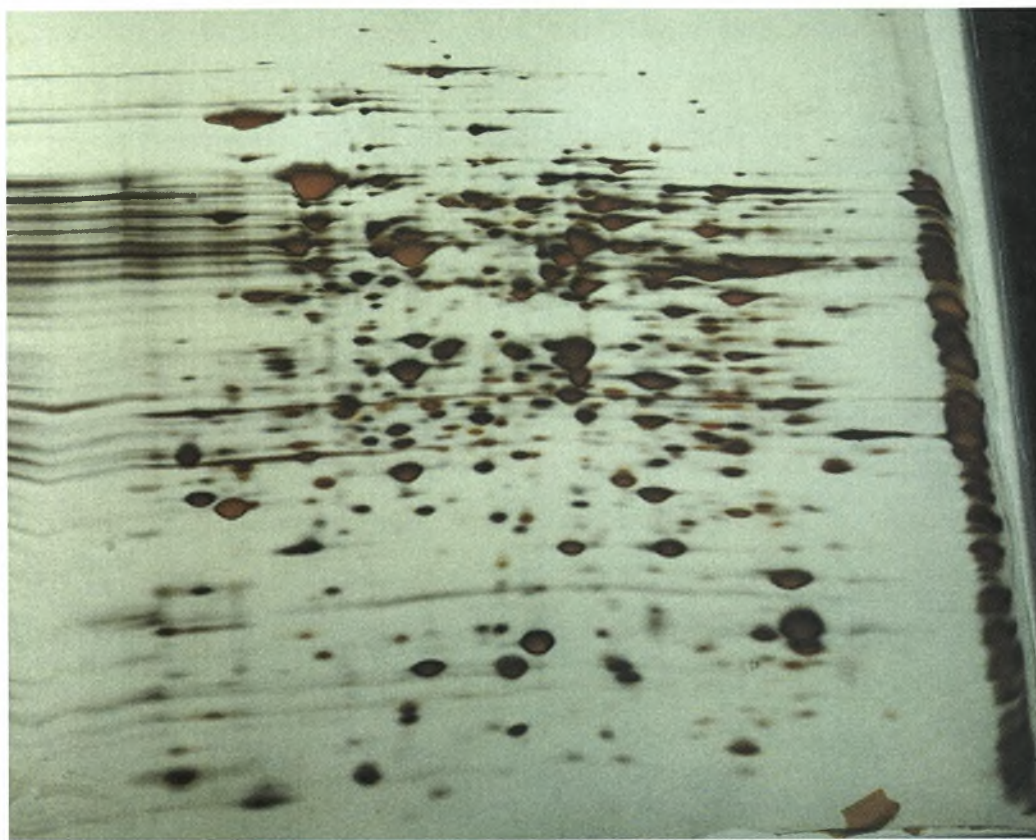
Η έκφραση των πρωτεϊνών στο σύνολο των πηκτωμάτων παρουσίασε επαναλαμβανόμενο πρότυπο, γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη διαφορετικών προτύπων έκφρασης πρωτεϊνών ανάμεσα στα δυο στελέχη. Βάση αυτής της παρατήρησης μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τον ρόλο διαφόρων πρωτεϊνών σε μηχανισμούς παθογένειας.

Στις παρακάτω εικόνες παρατίθενται ενδεικτικά παραδείγματα πηκτωμάτων που έχουν αναλυθεί στη συνέχεια με την φασματομετρία μάζας. Στην εικόνα 16 παρουσιάζεται ένα πήκτωμα 1-D ηλεκτροφόρησης εξωκυττάριων πρωτεϊνών, ενώ στις εικόνες 17, 18 τα πηκτώματα 2-D ηλεκτροφόρησης με εύρος pH 4-7 ενδοκυττάριων πρωτεϊνών και των δυο στελεχών.

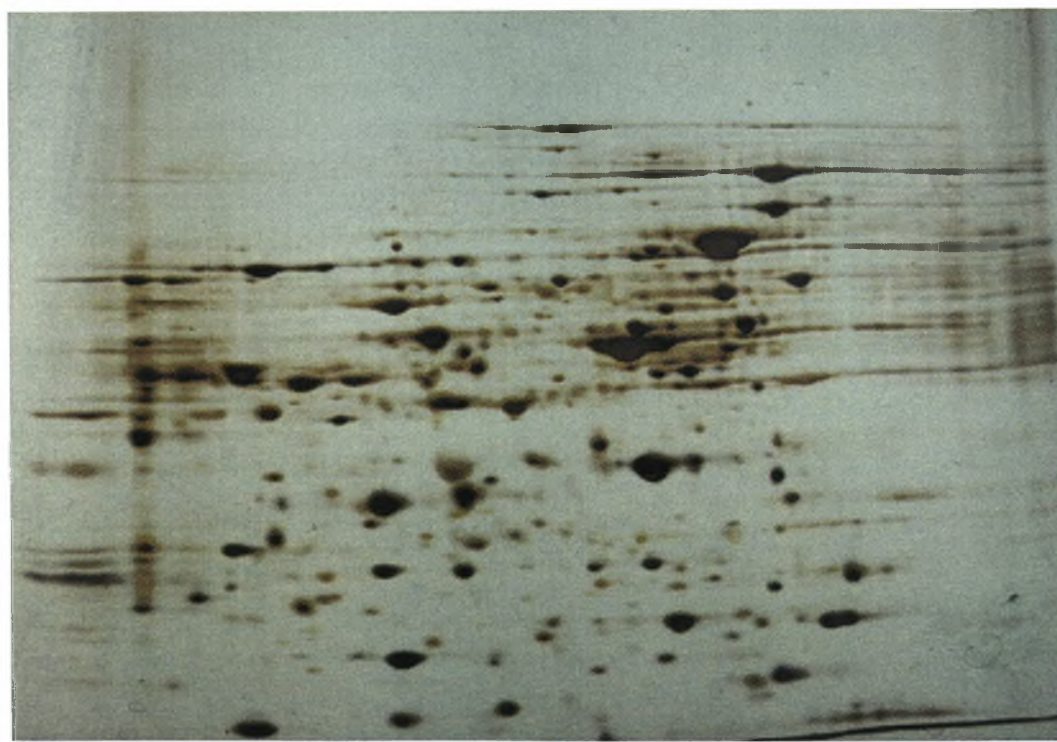
μάρτυρας άγριο στέλεχος μεταλλαγμένο στέλεχος



Εικ 16: Αποτελέσματα 1-D ηλεκτροφόρησης εξωκυττάριων πρωτεϊνών



Εικ 17 : Αποτελέσματα 2D ηλεκτροφόρησης ενδοκυττάρων πρωτεϊνών μεταλλαγμένου στελέχους



Εικ 18 : Αποτελέσματα 2D ηλεκτροφόρησης ενδοκυττάρων πρωτεϊνών άγριου στελέχους

Στη συνέχεια μετά τις ηλεκτροφορήσεις ακολούθησε ανάλυση των spots που παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης ανάμεσα στα δυο στελέχη με την μέθοδο της φασματομετρίας μάζας δίνοντας έμφαση κυρίως στις πρωτεΐνες που εκφράζονταν στο άγριο στέλεχος και δεν εμφανίζονταν στο μεταλλαγμένο στέλεχος, καθώς αυτές πιθανόν να εμπλέκονται στην μολυσματικότητα του άγριου στελέχους.

Η φασματοσκοπία μάζας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο πρωτεϊνικής χημείας του ερευνητικού κέντρου βιοϊατρικών επιστημών Αλέξανδρος Φλέμινγκ. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των πρωτεϊνών συγκρίθηκαν με την βάση δεδομένων BLAST για τις πρωτεΐνες που έχουν ήδη ταυτοποιηθεί σε άλλα στελέχη *Pseudomonas* και παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα. Καθώς η πειραματική διαδικασία βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη στον πίνακα παρατίθενται μερικές πρωτεΐνες που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα, ενώ θα αναλυθούν μόνο εκείνες που έχουν ταυτοποιηθεί και σε άλλα στελέχη και εμπλέκονται στην μολυσματικότητα αυτών των παθογόνων στελεχών. Πρωτεΐνες με υποθετική ή άγνωστη δράση θα αναλυθούν στην παρούσα εργασία.

Εξοκυττάρειες πρωτεΐνες 1-D πηκτωμάτων
Επιφανειακή πρωτεΐνη αποικισμού
Αλκαλική μεταλλοπρωτεάση
Αιμολυσίνη συνεκφραζόμενη πρωτεΐνη
Φλαγελίνη
Flagellar cap protein FliD

Πίνακας 6 : Αποτελέσματα φασματοσκοπία μάζας εξοκυττάρων πρωτεϊνών

Ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες 2-D πηκτωμάτων
Εξωτερική μεμβρανική πορίνη oprE
Καρβαμοϋλοτρανσφεράση της ορνιθίνης
Γλουταμινάση- ασπαραγινάση
Νουκλεοσιδική διφωσφορική κινάση
Υπεροξειδική δισμουτάση
Μοριακός συνοδός <u>GroES</u>

Αφυδατάση της πτερίνης 4-αλφα καρβυνολαμίνης
Χλωροϋπεροξειδάση
50S ριβοσωμικές πρωτείνες
Φωσφονικός μεταφορέας ABC
Δεϋδρογονάση της φορμαλδεϋδης
4-υδροξυφαινυλπυροσταφυλική διοξυγονάση

Πίνακας 7 : Αποτελέσματα φασματοσκοπία μάζας ενδοκυττάρων πρωτεϊνών

Κεφάλαιο 4

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών σε ένα δείγμα άγριου και μεταλλαγμένου στελέχους *P.s entomophila*, που εμπλέκονται σε μηχανισμούς που προσδίδουν την ικανότητα μολυσματικότητας. Με την χρήση δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που παρουσίασαν διαφορετικό προφίλ έκφρασης ανάμεσα στα δυο στελέχη με επαναλήψιμο τρόπο σε όλα το εύρος pH που χρησιμοποιήθηκε.

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν αρκετά πρωτόκολλα, έτσι ώστε να αποφανθούμε για το καταλληλότερο, τόσο για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών, ώστε να μην έχουμε απώλεια της τελικής ποσότητας, όσο και για την εστίαση των πρωτεϊνών στο πρώτο βήμα της ισοηλεκτρικής εστίασης, καθώς πολλές ουσίες- προσμίξεις μπορεί να παρέμβουν σε αυτό το βήμα.

Μετά την χρήση όλων των πρωτοκόλλων και την επακόλουθη ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, για την εξαγωγή συμπεράσματος ως προς την απόδοση του καθενός, αποφανθήκαμε πως το καταλληλότερο πρωτόκολλο για την επεξεργασία των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών είναι το 2-D cleanup kit, ενώ στην απομόνωση των εξωκυττάρων πρωτεϊνών, καθώς το δείγμα περιέχει πολλές προσμίξεις, χρειάστηκε περαιτέρω επεξεργασία. Συγκεκριμένα, το αποδοτικότερο πρωτόκολλο είναι αρχικά με την χρήση φαινόλης- παγωμένης ακετόνης, ενώ στη συνέχεια χρήση του 2-D cleanup kit. Τα υπόλοιπα πρωτόκολλα εμφάνισαν μειωμένη αποδοτικότητα, καθώς είχαμε απώλεια μεγάλης ποσότητας πρωτεϊνών όπως επίσης και προβλήματα στην

ισοηλεκτρική εστίαση, αφού δεν ήταν δυνατή η απομάκρυνση των πολυσακχαριτών από το πρωτεϊνικό δείγμα. Άρα μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας καταφέραμε να αποφανθούμε για την χρήση πρωτοκόλλων, τόσο για τις ενδοκυττάριας όσο και για τις εξωκυττάριας πρωτείνες, που είναι τα πιο αποδοτικά για την επεξεργασία τους.

• ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ 2D ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Κατά το πρώτο στάδιο της 2-D ηλεκτροφόρησης, η ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε χαμηλού μοριακού βάρους ιοντικές προσμίξεις. Οποιοσδήποτε μη- πρωτεϊνικές προσμίξεις στο δείγμα μπορεί να επέμβουν στο διαχωρισμό και να εμφανιστούν στα αποτελέσματα των πηκτωμάτων.

Έτσι λοιπόν, αντιλαμβανόμαστε πως το πιο σημαντικό βήμα για την μεγαλύτερη απόδοση της μεθόδου και την υψηλότερη ανάλυση των αποτελεσμάτων, είναι η σωστή προετοιμασία των δειγμάτων. Παρακάτω αναφέρονται κάποιες από τις ουσίες- προσμίξεις που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της 2-D ηλεκτροφόρησης.

Προσμίξεις	Προβλήματα που δημιουργούν
Άλατα , και άλλα φορτισμένα μικρού μοριακού βάρους μόρια	Τα άλατα παρεμποδίζουν την διαδικασία της ισοηλεκτρικής εστίασης και πρέπει να απομακρύνονται ή να παραμένουν σε όσο το δυνατό 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 την μορφή οριζόντιων ραβδώσεων στο φόντο.(horizontal streaking)
Ενδογενή μικρά ιοντικά μόρια (νουκλεοτίδια, μεταβολίτες, φωσφολιπίδια)	Είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα μόρια και μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα την δυσκολία εστίασης των πρωτεϊνών προς την άνοδο.

<p>Ιοντικά απορρυπαντικά</p>	<p>Τα ιοντικά απορρυπαντικά (συνήθως SDS) χρησιμοποιούνται συχνά κατά την εκχύλιση των πρωτεϊνών και την διαλυτοποίηση τους, αλλά μπορούν να παρέμβουν πολύ ισχυρά στην ισοηλεκτρική εστίαση. Το SDS σχηματίζει συμπλέγματα με τις πρωτεΐνες φορτίζοντας έτσι ολόκληρο το σύμπλεγμα αρνητικά. Οι πρωτεΐνες δεν μπορούν να εστιαστούν σύμφωνα με το pI τους εάν δεν απομακρυνθεί το ιοντικό απορρυπαντικό.</p>
<p>Νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA)</p>	<p>Υψηλού μοριακού βάρους νουκλεϊκά οξέα μπορούν να φράξουν τους πόρους του πηκτώματος. Επίσης δεσμεύονται στις πρωτεΐνες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, εμποδίζοντας την εστίασή τους. Τέλος τα νουκλεϊκά οξέα αυξάνουν το ιξώδες του δείγματος και εμφανίζονται στα πηκτώματα ως ραβδώσεις στο φόντο. (streaking)</p>
<p>Πολυσακχαρίτες</p>	<p>Οι πολυσακχαρίτες μπορεί να φράξουν τους πόρους του πηκτώματος προκαλώντας κατακρήμνιση των πρωτεϊνών ή αύξηση του απαιτούμενου χρόνου για την ισοηλεκτρική εστίαση (IEF). Ορισμένοι πολυσακχαρίτες είναι αρνητικά φορτισμένοι και σχηματίζουν συμπλέγματα με πρωτεΐνες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα την δυσκολία εστίασης των πρωτεϊνών προς την άνοδο. Οι πολυσακχαρίτες εμφανίζονται στο 2D πηκτώμα δημιουργώντας οριζόντιες ραβδώσεις στο φόντο (horizontal streaking).</p>
<p>Λιπίδια</p>	<p>Πολλές πρωτεΐνες, ειδικά οι μεμβρανικές, σχηματίζουν συμπλέγματα με λιπίδια. Αυτό μειώνει την διαλυτότητά τους επηρεάζοντας το pI και το μοριακό τους βάρος.</p>
<p>Φαινολικές ενώσεις</p>	<p>Φαινολικές ενώσεις είναι παρούσες σε πολλούς φυτικούς ιστούς και μπορούν να τροποποιήσουν τις πρωτεΐνες, μέσω μιας ενζυμικά καταλυόμενης οξειδωτικής αντίδρασης.</p>

Πίνακας 1: Προσμίξεις που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της 2-D ηλεκτροφόρησης.

Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν παρουσίασαν επαναλήψιμο πρότυπο εμφάνισης κατά την πειραματική διαδικασία στην πλειοψηφία του συνόλου των πηκτωμάτων. Ορισμένες από αυτές παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την συμμετοχή τους σε μηχανισμούς που ίσως να προσδίδουν την ικανότητα μολυσματικότητας στο βακτηριακό στέλεχος.

Από τις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν θα γίνει εξέταση του ρόλου, ορισμένων από αυτών, οι οποίες συμμετέχουν σε μηχανισμούς παθογένειας και σε άλλα βακτηριακά στελέχη και έχουν ένα σαφή και κρίσιμο ρόλο στην μολυσματικότητα.

4.1 Ρόλος εξωκυττάρων πρωτεϊνών

- Επιφανειακή πρωτεΐνη αποικισμού (surface colonization protein)

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

- Αλκαλική μεταλλοπρωτεάση (Alkaline metalloprotease)

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 αυτή είναι καταστροφή των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) της *Drosophila* , με αποτέλεσμα την προστασία

της *P. entomophila* και την διαφυγή της από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. (Liehl P. et al 2006).

• Αιμολυσίνη συν-ρυθμιστική πρωτεΐνη (Hemolysin co-regulated protein, Hcp)

Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί μια απόδειξη ότι στο βακτήριο υπάρχει το εκκριτικό σήμα 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 ευκαρυωτών πως η έκφραση της Hcp επάγει την απόπτωση των κυττάρων. Εφόσον λοιπόν η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής παρουσιάζεται μόνο στο άγριο στέλεχος, η έκκριση της πιθανόν να εμπλέκεται στην παθογένεια με την απόπτωση των κυττάρων που αποτελούν στόχο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

• Φλαγελίνη (Flagellin)

Η πρωτεΐνη αυτή εκκρίνεται από το άγριο στέλεχος και οργανώνεται σε μια κυλινδρική μορφή έτσι ώστε να σχηματίσει τα νημάτια του βακτηριακού μαστιγίου. Το βακτηριακό στέλεχος *pseudomonas entomophila*, όπως αναφέρθηκε κινείται με μαστίγια και αυτή η πρωτεΐνη αποτελεί δομικό συστατικό τους. Μπορεί να συνδεθεί έμμεσα με την παθογένεια του βακτηρίου, αφού λόγω της έκφρασης της, τα βακτηριακά στελέχη έχουν την δυνατότητα μετακίνησης και αποικισμού των ιστών του ξενιστή.

Επίσης έχει βρεθεί πως η φλαγελίνη, λειτουργεί και ως παθογόνος παράγοντας που αναγνωρίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα πολλών διαφορετικών οργανισμών, όπως τα φυτά, θηλαστικά και τη *drosophila melanogaster*. Αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς Toll 5 (TLR5) του μονοπατιού Toll και επάγει την έκφραση προφλεγμονοδών γονιδίων στο εντερικό επιθήλιο. Ένα από τα γονίδια που ενεργοποιούνται από την φλαγελίνη είναι και ο πυρηνικός παράγοντας NF – kappaB, ο οποίος διεγείρει την έκφραση του παράγοντα νέκρωσης των όγκων. (Gewirtz AT et al 2001).

- Flagellar cap protein (FliD)

Η πρωτεΐνη αυτή υπάρχει στο άγριο στέλεχος αλλά υπερεκφράζεται στο μεταλλαγμένο στέλεχος. Η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στον πολυμερισμό της φλαγελίνης για τον 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 εξωκυτταρικούς 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.

Όπως, αναφέρθηκε πριν το μεταλλαγμένο στέλεχος δεν μπορεί να υπερεκφράσει την πρωτεΐνη φλαγελίνη που δίνει την δυνατότητα μετακίνησης στα βακτηριακά στελέχη. Παρόλα αυτά μπορεί να αποικίσει τον ξενιστή μέσω της έκκρισης της FliD πρωτεΐνης, διότι αυτή αποτελείται από μια πληθώρα ουδέτερων και όξινων ολισακχαριτών, συστατικά της βλεννίνης, που προσκολλώνται στα κύτταρα του ξενιστή, και δίνουν την δυνατότητα πρόσφυσης του μεταλλαγμένου στελέχους πάνω σε αυτά. (Ramphal R. et al 2001)

4.2 Ρόλος ενδοκυττάρων πρωτεϊνών

- Εξωτερική μεμβρανική πορίνη oprE (outer membrane porin oprE)

Η πρωτεΐνη αυτή υπέρ-εκφράζεται στο άγριο στέλεχος. Ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες προσκολλώνται πάνω σε μόρια προσκόλλησης, όπως η φμπρονεκτίνη. Τα μόρια αυτά προσκολλώνται πάνω στην επιφάνεια των ιστών του ξενιστή και βοηθάνε στον αποικισμό του από τον παθογόνο μικροοργανισμό, συμμετέχοντας έτσι σε μηχανισμούς μόλυνσης του ξενιστή.

- Καρβαμοϋλοτρανσφεράση της ορνιθίνης. (ornithine carbamoyltransferase)

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

Θα μπορούσε να συμβαίνει ο ίδιος μηχανισμός και στην *pseudomonas entomophila* με το ίδιο το βακτήριο άγριου τύπου μόνο να υπέρ-εκφράζει το ένζυμο καρβαμοϋλοτρανσφεράση της ορνιθίνης ώστε να μπορεί να ανταποκριθεί στην δράση μιας άγνωστης τοξίνης που λειτουργεί ως αναστολέας του, ώστε τελικά να μην " αυτοκτονεί " από την τοξίνη που το ίδιο παράγει.

- Γλουταμινάση- ασπαραγινάση (glutaminase- asparaginase)

Η πρωτεΐνη αυτή υπερεκφράζεται στο άγριο στέλεχος και του δίνει την δυνατότητα να αξιοποιεί τα αμινοξέα ασπαραγίνη και γλουταμινικό από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται. Συμβάλλει έτσι στην μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα και επιβίωση του βακτηρίου σε αλλαγές του περιβάλλοντος κατά διαδικασία της μόλυνσης.

- Νουκλεοσιδική διφωσφορική κινάση (nucleoside diphosphate kinase)

Το ένζυμο αυτό το υπερεκφράζεται στον άγριο τύπο και έχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην παραγωγή τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων (NTPs) ή τα δεόξυ-παράγωγά τους με την μεταφορά φωσφορικών δεσμών υψηλής ενέργειας από τριφωσφορικά νουκλεοτιδία όπως το ATP ή το GTP σε οποιοδήποτε διφωσφορικό νουκλεοτιδίο. Τα τριφωσφορικά νουκλεοτιδία είναι απαραίτητα για την κυτταρική σύνθεση μακρομορίων και μηχανισμούς σηματοδότησης, αντίστοιχα και η νουκλεοσιδική διφωσφορική κινάση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των

βακτηρίων, στην μεταγωγή σήματος στα σηματοδοτικά μονοπάτια, και την παθογένεια. (A.M. Chakrabarty 1998).

Κεντρικής σημασίας δραστηριότητα των παθογόνων κατά την διάρκεια αλληλεπίδρασης με τα κύτταρα του ξενιστή είναι η διατήρηση του μεταβολισμού τους και η παραγωγή ενέργειας όχι μόνο για την παραγωγή των παθογόνων παραγόντων αλλά κυρίως για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους.

Η παραγωγή των NTPs, από τα παθογόνα στελέχη, είναι από τις πιο σημαντικές διαδικασίες κατά την πορεία της μόλυνσης διότι αυτά δρουν ως πρόδρομα μόρια του DNA, RNA και των πολυσακχαριτών ή είναι στενά συνδεδεμένα με την πρωτεϊνσύνθεση και τον μεταβολισμό. Για παράδειγμα αποτελούν πρόδρομα μόρια του λιποσακχαρίτη LPS της μεμβράνης ενός gram – βακτηρίου, ο οποίος είναι μια ενδοτοξίνη που διεγείρει την ανοσοαπόκριση του ξενιστή. (A.M. Chakrabarty 1998).

● Υπεροξειδική δισμουτάση

Το ένζυμο αυτό εκφράζεται μόνο στον άγριο τύπο και σχετίζεται με την επιβίωση του βακτηριακού στελέχους στο περιβάλλον του ξενιστή και κατ'επέκταση την ικανότητα του για μόλυνση. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή *Drosophila melanogaster* είναι η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Το ένζυμο αυτό βοηθάει στην αποτοξίνωση από τις δραστικές μορφές οξυγόνου με την διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Έτσι το βακτηριακό στέλεχος αποκτά ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό stress, διαφεύγει από έναν σημαντικό μηχανισμό άμυνας του ξενιστή και μπορεί να συνεχιστεί η διαδικασία της μόλυνσης.

● Τσαπερονίνη (co-chaperonin GroES)

Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας μοριακός συνοδός, που δεσμεύεται στις ενεργές επιφάνειες των πρωτεϊνών καθώς αυτές εξέρχονται από τις υπομονάδες του ριβοσώματος αμέσως μετά την σύνθεσή τους. Ο ρόλος τους είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς με την σύνδεση τους αποτρέπουν τις λανθασμένες αλληλεπιδράσεις των ενεργών επιφανειών των πρωτεϊνών που οδηγούν σε λανθασμένες στερεοδιαμορφώσεις. Έτσι ο ρόλος τους δεν θα μπορούσαμε να πούμε

πως είναι η προώθηση της σωστής στερεοδιαμόρφωσης αλλά η αποτροπή της λανθασμένης.

Η ύπαρξη της πρωτεΐνης αυτής μόνο στο άγριο στέλεχος υποδηλώνει πως πρωτεΐνες που ίσως εμπλέκονται στην παθογένεια χρειάζονται την βοήθεια του μοριακού συνοδού ώστε να αποκτήσουν την σωστή στερεοδιαμόρφωση για να είναι λειτουργικές. Απουσία της τσαπερονίνης από το μεταλλαγμένο στέλεχος έχει ως αποτέλεσμα πρωτεΐνες που πιθανόν να μπορούσαν να εμπλακούν στην παθογένεια να μην είναι λειτουργικές λόγω λανθασμένης στερεοδιαμόρφωσης.

Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν ένα μικρό δείγμα, ενός μεγάλου συνόλου υπό ανάλυση πρωτεϊνών που έχουν εξαχθεί κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και ο ρόλος τους αναμένεται να ταυτοποιηθεί ώστε να έχουμε μια σαφή και ολοκληρωμένη εικόνα του μηχανισμού παθογένειας του βακτηριακού στελέχους *P.entomophila*

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

• Διάλυμα ενυδάτωσης 2 ml

7M Urea	0,841 gr
2M Thiourea	0,304
2% CHAPS	0,04gr
10 mg/ ml DTT	0,02 gr
IPG buffer (συνήθως 0,2%)	4 μ l
Bromophenol blue	3 μ l

• Equilibration buffer 40 ml

1 M Tris pH 6,8	2 ml
Urea	14,414
100% glycerol	12 ml
10 % SDS	4 ml
Bromophenol blue	20 μ l
dd H ₂ O	Μέχρι τα 40 ml

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.

• Πήκτωμα διαχωρισμού - Separating gel

dd H ₂ O	23,45 ml
1,5 M Tris pH 8,8	17,5 ml
10% SDS	0,7 ml
30 % bis acrylamide	28 ml
10% APS	0,35 ml
Temed	35 μl

• Πήκτωμα συσσώρευσης - Stacking gel

dd H ₂ O	14,7 ml
1 M Tris pH 6,8	2,5 ml
10% SDS	0,2 ml
30 % bis acrylamide	2,6 ml
10% APS	100 μl
Temed	20 μl

• Αγαρόζη 0,8%

Running buffer 10x	10 ml
agarose	0,8 gr
dd H ₂ O	90 ml

• Running buffer 10x

Tris	30 gr
glycine	144 gr
SDS	10 gr

• **Διάλυμα καθήλωσης- Fixation**

50 % μεθανόλη	300 ml
5 % acetic acid	30 ml
dd H ₂ O	μέχρι τα 600 ml

• **Διάλυμα ευαισθητοποίησης - Sensitize**

Na ₂ S ₂ O ₃	0,155 gr
dd H ₂ O	500 ml

• **Νιτρικός άργυρος**

Νιτρικός άργυρος	0,5 gr
dd H ₂ O	500 ml

• **Διάλυμα ανάπτυξης χρώματος - Developer**

Na ₂ CO ₃	0,5 gr
dd H ₂ O	500 ml
Φορμαλδεΰδη αμέσως πριν την χρήση του διαλύματος	200 μl

• **Διάλυμα τερματισμού - Stopper**

Acetic acid	25μl
dd H ₂ O	500 ml

• Συνθήκες ισοηλεκτρικής εστίασης

Για strip 17 cm :

- Step 1 RAPID, 250V, 2h
- Step 2 RAPID, 250 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, 20 min
- Step 2 LINEAR, 4000 V, 2h
- Step 3 RAPID, 4000V, 2h
- Step 4 RAP

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ:

- 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
- Babitzke, 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 *Photorehabdus 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 *Photorehabdus*. *Microbiology* **149**: 1581-1591.
- Cutler R. (1993) Antioxidants, aging and longevity. In : Pryor W A (ed) *Free Radicals in Biology*, vol 6. Orlando, FL : Academic Press, Inc. pp 381-395.
- Devine, D.A. (2003) Antimicrobial peptides in defense 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 6 h bacterial challenged (by injection) wild-type flies, respectively. AMP

gene expression was monitored by RT-qPCR. The levels of AMP gene 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)**: 1037-53
- Heeb, S., Kuehne, S.A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M.D., Haas, D., (2006) Functional analysis of the post transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J Mol Biol* **355**: 1026-1036.
- Hrabak, E.M., and Willis, 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.
- 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.
- 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 behaviour. *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.
- Miyoshi, S., and Shinoda, S. (2000) Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* **2**: 91-98.
- 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.
- Richetti, P.G (1983) Isoelectric focusing : theory, methodology and applications. *Laboratry 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.
- 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 *Pseudomonads 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 *Pseumomonas entomophila*. *Nature Biotechnology*, **24**: 673-679.
- Waterfield, N.R., Bowen, D.J., Fetherston, J.D., Perry, R.D., & ffrench-Constant, R.H. (2001) The *lc* genes of *Photorhabdus*: a growing family. *Trends Microbiol* **9**: 185-191.

