

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ



ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ
ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΑΠΟ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΕΙΣ
ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΤΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΚΟΥΣ
*Scenedesmus Obliquus***

ΚΑΝΤΖΙΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Γ. ΤΣΙΩΤΗΣ

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ - ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε υπό την επιστημονική επιμέλεια του Επίκουρου Καθηγητή κ. Τσιώτη Γεώργιου, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για αυτή τη δυνατότητα που μου παρείχε, όπως επίσης και για την καλή συνεργασία που είχαμε και τη βοήθειά που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριό του. Η επίλυση των δυσκολιών ή αποριών που παρουσιαζόταν κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης των πειραμάτων, υπήρξε σημαντικό βοήθημα για την πραγμάτωση της παρούσης εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αν. Καθηγητή κ. Κοτζάμπαση Κυριάκο από το Τμήμα Βιολογίας-Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την αξιόπαινη συνεργασία που είχαμε κατά το διάστημα αυτό σε επίπεδο συμβουλών, ενθάρρυνσης και πραγματοποίησης πειραμάτων στο εργαστήριό του. Επίσης, τον Καθηγητή κ. Γανωτάκη Δημήτριο από το Τμήμα Χημείας-Τομέα Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, που δέχτηκε με ευχαρίστηση να συμμετάσχει στην τριμελή εξεταστική επιτροπή μου, καθώς και τον Αν. Καθηγητή κ. Ρίζο Απόστολο (I.T.E.) για την καλή συνεργασία στο μέρος της σκέδασης του φωτός.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Κωτάκη Χρήστο από το εργαστήριό του κ. Κοτζάμπαση Κ. για την πολύτιμη βοήθεια, συνεργασία και φιλία που αναπτύχθηκε, καθώς και τον Μ. Αϊβαλιώτη (Πανεπιστήμιο Φρανκφούρτης) για την δυνατότητα που μου έδωσε για ανάλυση των πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας (MALDI και ESI).

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα του εργαστηρίου στο οποίο πραγματοποίησα την παρούσα εργασία, Δ. Παπασωτηρίου, Γ. Σαμοΐλη, Κ. Κουγιανού και σαφώς τα υπόλοιπα άτομα του εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία τους, την παροχή βοήθειας όποτε ήταν αναγκαίο και την ψυχολογική υποστήριξη τους. Επιπλέον, στα άτομα που συμπεριλαμβάνονται και τους ευχαριστώ θερμά είναι και τα άτομα από το εργαστήριο του κ. Δημήτρη Γανωτάκη και κ. Κυριάκου Κοτζάμπαση, για την πολύ καλή συνεργασία τους και προθυμία τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την συνεχή ενθάρρυνση και οικονομική υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια σπουδών μου.

Περίληψη

Η οξυγονική φωτοσύνθεση λαμβάνει χώρα στις μεμβράνες των θυλακοειδών των κυανοβακτηρίων, των πράσινων φυκών και των ανώτερων φυτών, όπου σύμπλοκα πρωτεϊνών/χρωστικών (φωτοσύστημα II, κυτόχρωμα b_6f , φωτοσύστημα I και ATP συνθετάση) μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια σε χημική. Η πρωτεομική ανάλυση των φωτοσυνθετικών αυτών πρωτεϊνικών συμπλόκων σε λειτουργική μορφή αποτελεί μία πειραματική προσέγγιση η οποία επιτρέπει τόσο δομική ταυτοποίηση όσο και λειτουργική ιχνηλάτηση σχετικά με την πλαστικότητα της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η λειτουργική ανάλυση καθώς και ο δομικός χαρακτηρισμός του φωτοσυνθετικού πρωτεόματος του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*.

Αρχικά, τα χλωροφυλλικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα μεμβρανών από τα πράσινα άλγη *Scenedesmus obliquus*, απομονώθηκαν οι θυλακοειδείς μεμβράνες μετά από διαλυτοποίηση με το μη ιοντικό απορρυπαντικό dodecyl- β -maltoside και χαρακτηρίστηκαν με τη χρήση της φασματοσκοπίας ορατού, SDS-Tricine PAGE, BN-PAGE και CN-PAGE. Οι δύο τελευταίες τεχνικές ηλεκτροφόρησης συγκρίθηκαν μεταξύ τους, σχετικά με τη διαχωριστική ικανότητα τους.

Στη συνέχεια, μετά από διαλυτοποίηση των θυλακοειδών μεμβρανών ακολούθησε κλασματοποίηση με διαβάθμιση ζάχαρης. Τα κλάσματα των χλωροφυλλικών πρωτεϊνών χαρακτηρίστηκαν από τη φασματοσκοπία ορατού, SDS-Tricine PAGE, BN-PAGE και τη δυναμική σκέδαση φωτός (DLS). Η μέθοδος BN-PAGE εμφάνισε την παρουσία επτά πρωτεϊνικών συμπλόκων με τα μοριακά βάρη στη σειρά 68, 118, 157, 320, 494, 828 και 955 kDa, αντίστοιχα. Περαιτέρω, η σκέδαση φωτός, αποκαλύπτει την ταυτόχρονη παρουσία μορίων διαφορετικών μεγεθών στα 3-4 nm και 6.0-7.5 nm σειράς, αντίστοιχα. Το μικρότερο μέγεθος συσχετίζεται με την υδροδυναμική ακτίνα της τριμερούς μορφής του LHCI, εκτιμώντας ότι το μεγαλύτερο μέγεθος συνδέεται με την παρουσία των κέντρων αντίδρασης του φωτοσυστήματος I και φωτοσυστήματος II. Επιπλέον, οι λειτουργικές πληροφορίες σχετικά με τις πρωτεΐνες μελετήθηκαν με τη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας (MALDI-TOF MS) από μιας

λεπτομερούς χαρτογράφησης 2-D_SDS-Tricine PAGE /BN-PAGE, διαλυτοποιημένων θυλακοειδών μεμβρανών του οργανισμού *Scenedesmus obliquus*.

Abstract

The oxygenic photosynthesis takes place in the thylacoid membranes of cyanobacteria, green algae and higher plants, where protein/pigments complexes (photosystem II, cytochrome b₆f, photosystem I, and ATP synthase) convert the light energy into chemical energy. The proteomic analysis of photosynthetic protein complexes constitutes an experimental approach which allows not only structural identification but also functional tracer with regard to the plasticity of molecular structure and function of photosynthetic apparatus.

The aim of the present study is the functional analysis as well as the structural characterization of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* photosynthetic proteome.

Firstly, the chlorophyll (*Chl*)-containing membrane protein complexes from the green alga *Scenedesmus obliquus* have been isolated from the thylakoid membranes by solubilization with the non-ionic detergent dodecyl-β-maltoside and characterized by absorptions spectroscopy, tricine SDS PAGE, BN-PAGE and CN-PAGE. The last two electrophoresis techniques compared each other, relatively to their separative capacity.

Secondly, after the solubilization of thylakoid membranes followed fractionation by a sucrose density gradient. The *Chl*-containing protein fractions were characterized by absorptions spectroscopy, tricine SDS PAGE, BN-PAGE, and dynamic light scattering (DLS). BN-PAGE showed the presence of seven protein complexes with molecular weights in the range of 68, 118, 157, 320, 494, 828 and 955 kDa, respectively. Further, light scattering reveals the simultaneous presence of particles of different sizes in the 3-4 nm and 6.0-7.5 nm range, respectively. The smaller size is related to the hydrodynamic radius of the trimer Light Harvesting Complex (LHCII), whereas the larger size is associated with the presence of photosystem I and photosystem II reaction centers. Additionally, functional information regarding protein-protein interactions was

assembled, by coupling 2-D BN-PAGE with MALDI-TOF MS and a detailed mapping of *Scenedesmus obliquus* photosynthetic proteome of the solubilized thylakoid membranes was presented.

Keywords: *Scenedesmus obliquus*; sucrose density gradient; light scattering; blue native; green native; molecular size; membrane proteins; photosynthetic apparatus.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	3
Κεφάλαιο 1^ο – ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1.Φωτοσύνθεση	4
1.1.1 Τα φωτοσυνθετικά σύμπλοκα και η φωτοχημική διαδικασία της φωτοσύνθεσης	5
1.2 Πρωτεομική Ανάλυση	9
1.3.Οργανισμός <i>Scenedesmus obliquus</i>	10
1.4 Πολυαμίνες	12
1.5 Σκοπός της εργασίας	13
Κεφάλαιο 2^ο –ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	14
2.1. Υλικά	14
2.2. Μέθοδοι	19
2.2.1. Καλλιέργεια οργανισμού	19
2.2.2. Απομόνωση μεμβρανών.....	20
2.2.3. Διαλυτοποίηση μεμβρανών	20
2.2.4. Διαβάθμιση ζάχαρης.....	21
2.2.5. Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (BN/PAGE και CN/PAGE).....	21
2.2.6. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-Tricine /PAGE).....	23
2.2.6.1 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (1D_SDS-Tricine /PAGE).....	25
2.2.7. Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (BN /SDS-Tricine PAGE).....	26
2.2.8. Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (Tricine/SDS-Tricine_UREA PAGE).....	27
2.2.9. Ποσοτικός προσδιορισμός Πρωτεϊνών -Μέθοδος Bradford	29
2.2.10. Ποσοτικός προσδιορισμός Χλωροφυλλών.....	30

2.2.11. Φασματοσκοπία ορατού.....	31
2.2.12. Σκέδαση Φωτός (Light Scattering).....	31
2.2.13. Ταυτοποίηση Πρωτεϊνών με Φασματοσκοπία Μάζας	32
A) MALDI	32
B) Electron spray	32
Κεφάλαιο 3^ο –ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34
3.1. Μελέτη με διαλυτοποίηση μεμβρανών.....	34
3.2. Φασματοσκοπία ορατού	35
3.2.1. Υπερκείμενα-ιζήματα διαφόρων λόγων	36
3.2.2. Διαβάθμιση ζάχαρης	38
3.2.3. Μεμβράνες σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού.....	40
3.3. Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση CN/PAGE	43
3.4. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (1D-SDS-Tricine /PAGE)	44
3.5. Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D- BN /SDS-Tricine PAGE και	
2D- CN /SDS-Tricine PAGE)	46
3.6. Διαβάθμιση ζάχαρης	50
3.6.1. Με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση BN/PAGE	50
3.6.2. Με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (1D-SDS-Tricine /PAGE)	51
3.7. Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-SDS UREA/SDS-Tricine PAGE) ...	52
3.8. Σκέδαση Φωτός (Light Scattering)	56
Κεφάλαιο 4^ο –ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

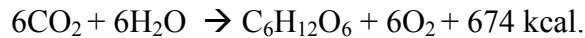
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

APS	: Υπερθειϊκό αμμώνιο
AB-mix S	: Standard Acrylamide-Bisacrylamide stock solution
BSA	: Αλβουμίνη ορού βοδιού
Bis	: N,N'-μεθυλενοδιακρυλαμίδιο
Bis-Tris	: Bis[2-hydroxymethyl]imino tris-[hydroxymethyl]methanio
BN	: B-native
CN	: Colorless
Chl	: Χλωροφύλλη
DDM	: Δωδεκύλ-β-D-μαλτοπυρανοσίδιο
ESI	: Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
EDTA	: Αιθυλο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
kDa	: Kilodalton
MW	: Μοριακό βάρος
MS	: Φασματοσκοπία μάζας
MALDI	: Ιονισμός με λέιζερ απόπτωση,υποβοηθούμενη με υπόστρωμα
PAGE	: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl-fluoride solution
SDS	: Δωδεκάκυλοθειϊκό νάτριο
TEMED	: N,N,N',N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη
Tricine	: N-τρικς(υδροξυμέθυλο-)μέθυλο-γλυκίνη
Tris	: Τρικς(υδροξυμέθυλο)αμινομεθάνιο

Κεφάλαιο 1^ο

1.1 Φωτοσύνθεση

Η Φωτοσύνθεση αποτελεί μία φυσιολογική λειτουργία, με την οποία τα πράσινα φυτά προμηθεύονται τον άνθρακα και παράγουν οξυγόνο, που είναι απαραίτητα για τη θρέψη τους. Τα φυτά έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας σε ανθρακούχες ενώσεις απαραίτητες για την ανάπτυξή τους. Η φωτοσυνθετική λειτουργία γίνεται παρουσία οξυγόνου και με την ενέργεια του ηλιακού φωτός. Η χημική αντίδραση της φωτοσύνθεσης είναι:



Στην πραγματικότητα όμως η φωτοσύνθεση γίνεται με μια σειρά πολύπλοκες χημικές αντιδράσεις. Ο τύπος όπου γίνονται οι αντιδράσεις αυτές είναι οι χλωροπλάστες, [1,2,3].

Ο ρόλος της φωτοσύνθεσης λοιπόν, είναι κάτι παραπάνω από την δέσμευση και την μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική. Πρόκειται για ένα σημείο κλειδί στην εισαγωγή ενέργειας στην τροφική αλυσίδα του πλανήτη. Οι αυτότροφοι οργανισμοί λοιπόν, οι οποίοι έχουν αναλάβει αυτόν τον ρόλο, είναι κατά βάση τα φυτά και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια. Οι ομάδες αυτές έχουν την εξαιρετικής σημασίας για την ζωή ιδιότητα, να δεσμεύουν την ηλιακή ενέργεια, που φτάνει στη γη με τη μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, και δια της φωτοσυνθετικής οδού να την μετατρέπουν σε χημική ενέργεια αξιοποιήσιμη τόσο από τους ίδιους όσο και από όλους του υπόλοιπους έμβιους οργανισμούς.

Η φυσική αρχή στην οποία βασίζεται όλος ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός είναι ότι τα ηλεκτρόνια των εξωτερικών στιβάδων των ατόμων σε επιλεγμένα μόρια (π.χ. φωτοσυνθετικές χρωστικές) μπορούν να απορροφούν φωτόνια από το ορατό φάσμα και να διεγείρονται ενεργειακά με αποτέλεσμα να μεταπηδούν σε στιβάδες μεγαλύτερης ενέργειας.

Η απόδοση της ενέργειας αυτής στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιείται για τη διάσπαση χημικών δεσμών και τη δημιουργία νέων. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία προϊόντων πλούσιων σε ενέργεια.

Σε γενικές γραμμές, ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης είναι ο ακόλουθος: το νερό διαλύει και μεταφέρει το διοξείδιο του άνθρακα μέχρι τα κύτταρα και τους χλωροπλάστες των φύλλων. Εκεί με την ενέργεια του φωτός ($h\nu$) που απορροφούν διάφορα μόρια χλωροφύλλης, διασπάται το νερό (φωτόλυση) στα στοιχεία του:



Το οξυγόνο απελευθερώνεται, ενώ τα πρωτόνια χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία ATP (σύμπλοκο ATPase), [4]. Στο δεύτερο στάδιο αντιδράσεων δε χρειάζεται ηλιακή ενέργεια, γι' αυτό οι αντιδράσεις αυτές ονομάζονται "σκοτεινές", [5]. Το άμυλο είναι μια από τις βασικές ενώσεις που σχηματίζονται. Αυτό μεταφέρεται σε άλλες θέσεις του φυτού κατά τη νύχτα, όταν σταματά το φαινόμενο της φωτοσύνθεσης.

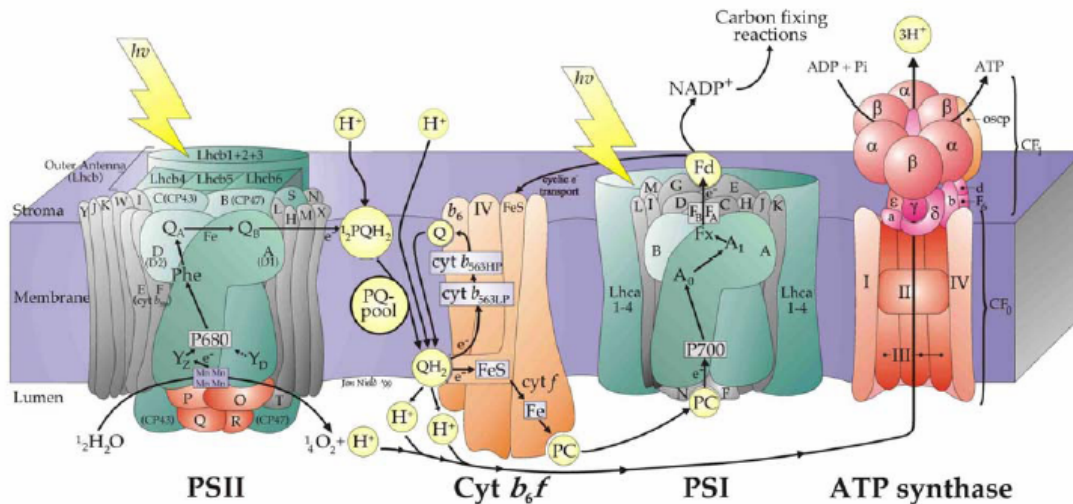
Εκτός από τα ανώτερα (πράσινα) φυτά, υπάρχουν και άλλοι κατώτεροι οργανισμοί χωρίς χλωροφύλλη, που χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας για την σύνθεση οργανικών μορίων. Οι λειτουργίες τους αυτές ονομάζονται χημειοσύνθεση και φωτοχημειοσύνθεση. Τέτοια φυτά είναι μερικά βακτήρια (σιδηροβακτήρια, θειοβακτήρια κ.λπ.).

1.1.1 Τα φωτοσυνθετικά σύμπλοκα και η φωτοχημική διαδικασία της φωτοσύνθεσης

Η οξυγονική φωτοσύνθεση λαμβάνει χώρα στις μεμβράνες των θυλακοειδών των κυανοβακτηρίων, των πράσινων φυκών και των ανώτερων φυτών, όπου πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια σε χημική. Τα τέσσερα βασικά μεμβρανικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα φωτοσύστημα I (PSI), φωτοσύστημα II (PSII), ATP-συνθετάση και το σύμπλοκο του κυτοχρώματος b6/f (Cyt. b6 /f) αποτελούνται από τουλάχιστον 70 διαφορετικές πρωτεΐνες, [6].

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία συμμετέχουν στη δέσμευση της ακτινοβολίας, στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και στο σχηματισμό πλούσιων σε ενέργεια

μεταβολικών ενδιάμεσων είναι κατά σειρά το φωτοσύστημα II (PSII), το κυτόχρωμα b_6/f (cyt b_6/f), το φωτοσύστημα I (PS I) και η ATP-συνθάση (ATP-synthase).



Εικόνα 1. Σχηματική περιγραφή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

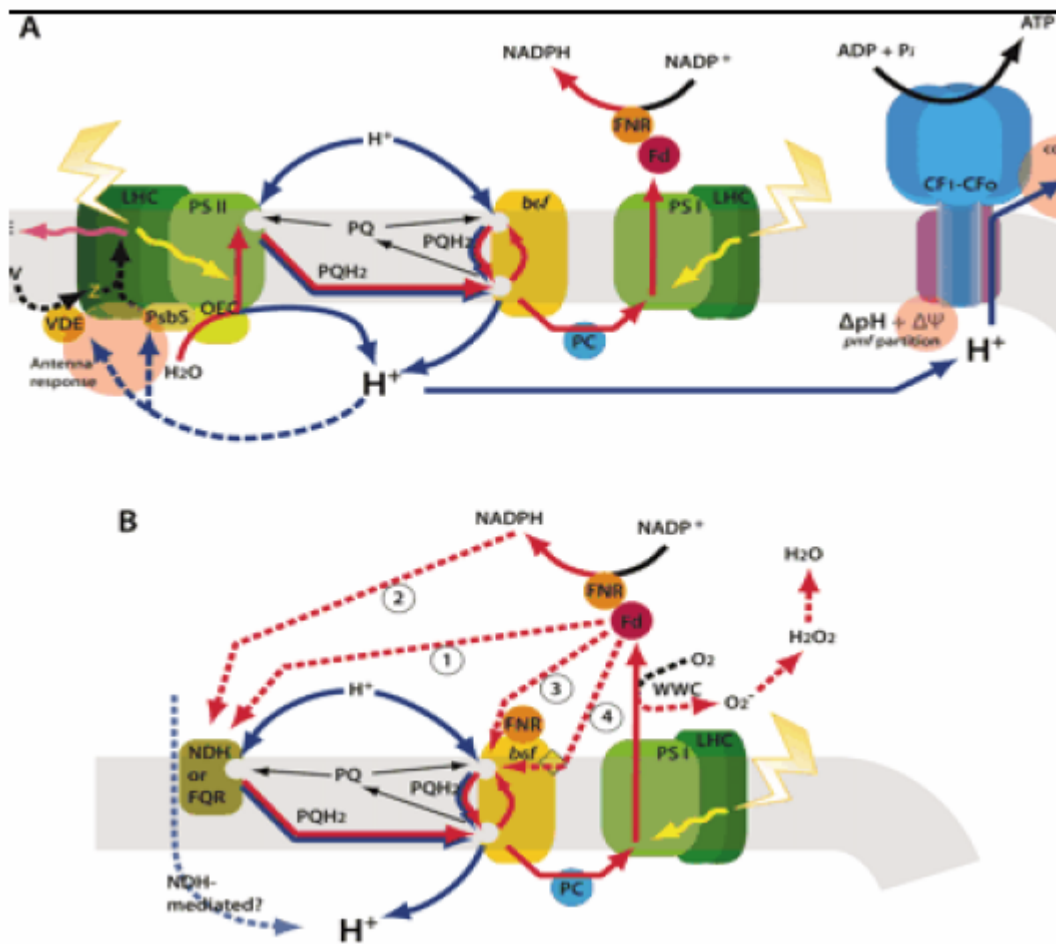
Το φωτοσύστημα II αποτελείται από τον πυρήνα, στον οποίο αποδίδεται η καταλυτική ενεργότητα του συμπλόκου και το σύμπλοκο συλλογής φωτός II (light harvesting complex II, LHC II), [7]. Ο επιμερισμός αυτός των δύο συμπλόκων εξυπηρετεί την ανάγκη να υπάρχει κάποια υποπεριοχή στην οποία να μπορεί να συλλέγεται η ενέργεια και κάποια άλλη, η οποία να μπορεί να διοχετεύει την ενέργεια αυτή σε άλλα χημικά ενδιάμεσα.

Το σύνολο του φωτοσυστήματος II αποτελείται από 16 διαφορετικές πρωτεΐνες γονίδια (PsbA-PsbO και PsbX) στα ανώτερα φυτά, ενώ στα κυανοβακτήρια υπάρχουν ακόμα οι υπομονάδες PsbU και PsbV. Ο ρόλος και η λειτουργία τους μέσα στον χλωροπλάστη είναι διαφορετικός. Για παράδειγμα, κάποιες είναι απαραίτητες για τον μεταβολισμό της ενέργειας, άλλες πάλι για τον μεταβολισμό του DNA και άλλες για την πρωτεϊνική σύνθεση. Από αυτές οι περισσότερες είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, διαθέτοντας μία ή περισσότερες α-έλικες και μόνο τα PsbO, PsbX, PsbU και PsbV στερούνται διαμεμβρανικών περιοχών, [8].

Το φωτοσύστημα II προσδένει συνολικά 45 συμπαράγοντες από τους οποίους οι 29 είναι οι χλωροφύλλες που συνδέονται με την κεραία (LHC II), οι 6 είναι χλωροφύλλες που βρίσκονται στον πυρήνα, οι 4 είναι Mn που προσδένονται στην D1 πρωτεΐνη του

πυρήνα, ενώ οι υπόλοιπες θέσεις πρόσδεσης καταλαμβάνονται από σιδήρους (αιμικούς και μη αιμικούς) στα κυτοχρώματα *cytb559* και *cytc550*, [9].

Το σύμπλοκο συλλογής φωτός αποτελείται από πρωτεΐνες συνδεδεμένες με μόρια χρωστικών (χλωροφύλλες *a* και *b*, καροτενοειδή), βρίσκεται στα θυλακοειδή των *grana* και διατάσσεται γύρω από τον πυρήνα (κέντρο αντίδρασης). Παίζει το ρόλο της συλλογής των φωτονίων και της διοχέτευσης ηλεκτρονίων στο κέντρο αντίδρασης, στον πυρήνα του PS II.



Εικόνα 2. Βραχυπρόθεσμοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης: (Α) Γραμμική ροή ηλεκτρονίων, (Β): Εναλλακτικοί δρόμοι ροής ηλεκτρονίων.

Ο πυρήνας του PS II περιέχει δύο λειτουργικές περιοχές, το κέντρο αντίδρασης (reaction center, RC), [10] όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του φορτίου και το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (oxygen evolving complex, OEC), [11,12] από όπου

παράγεται το οξυγόνο, ως το τελικό παραπροϊόν της φωτόλυσης του νερού, το οποίο αποτελεί τον αρχικό δότη ηλεκτρονίων. Μέσα στο χώρο που καταλαμβάνεται από τον πυρήνα εδράζονται και οι πρώτοι δέκτες ηλεκτρονίων [φαιοφυτίνη, κινόνη A, κινόνη B (που έχει τη δυνατότητα να εξέρχεται από το PS II και να μεταφέρει ηλεκτρόνια στον επόμενο αποδέκτη, το κυτόχρωμα b_6/f) και τα κυτοχρώματα b_{559} και c_{550}], [13]. Το PS II απορροφά μέγιστα στα 680 nm.

Το επόμενο κατά σειρά φωτοσυνθετικό σύμπλοκο είναι το κυτόχρωμα b_6/f (cyt b_6/f). Αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες: τα κυτοχρώματα b_6/f και την πρωτεΐνη Fe/S (πρωτεΐνη Rieske). Παίζει το ρόλο της μεταφοράς των ηλεκτρονίων από την κινόνη στην πλαστοκυανίνη (PC), η οποία μεσολαβεί στην ηλεκτρονική αλυσίδα μεταξύ του συμπλόκου b_6/f και του PS I, [14].

Τελικό σύμπλοκο-μεσολαβητής στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι το φωτοσύστημα I (PS I), το οποίο επίσης επιμερίζεται στο κέντρο αντίδρασης και στο LHC I. Ο λόγος ύπαρξης δύο φωτοσυστημάτων είναι ότι η διέγερση του P680 δεν είναι ηλεκτροχημικά επαρκής ώστε να ανάγει το NADP^+ , αλλά από την άλλη αυτό δεν είναι και αρκετά οξειδωμένο, ώστε να μπορεί να φωτολύει το νερό. Έτσι χρειάζεται απαραίτητως η μεσολάβηση του PS II, [9].

Το PS I εδράζεται στα θυλακοειδή του στρώματος στα φύκη και στα κυανοβακτήρια αποτελείται από 12 πρωτεϊνικές υπομονάδες, οι οποίες προσδένουν μη ομοιοπολικά 127 συμπράγοντες (χλωροφύλλες, καροτενοειδή, Fe, S και φυλλοκινόνες). Το PS I ονομάζεται και P700, λόγω του ότι απορροφά μέγιστα στα 700 nm. Αποτελεί το δέκτη ηλεκτρονίων από το προηγούμενο σύμπλοκο, το κυτόχρωμα b_6/f , μέσω της πλαστοκυανίνης, και καταλύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από την πλευρά του μικροχώρου προς το στρώμα του χλωροπλάστη. Εκεί είναι και ο χώρος στον οποίο τελικά θα πραγματοποιηθεί η αναγωγή του NADP^+ . Τα πεπτίδια που περιέχονται σε κάθε μονομερές PS I είναι τα PsaA έως PsaG, PsaI έως PsaL και PsaX. Σημαντικότερα από αυτά είναι τα PsaA και PsaB, τα οποία αποτελούν και τον πυρήνα. Το PS I των κυανοβακτηρίων οργανώνεται σε τριμερή. Οι πρωτογενείς πρωτονιοδότες του PS I είναι δύο μόρια χλωροφύλλης, που βρίσκονται μέσα στον πυρήνα στο ετεροδιμερές του PS I στην πλευρά των psaA και psaB του μικροχώρου, [9].

1.2 Πρωτεομική Ανάλυση

Σε ζωντανό κύτταρο, οι περισσότερες λειτουργίες πραγματοποιούνται από πρωτεΐνες. Με τον όρο πρωτέωμα καλούμε το σύνολο όλων των πρωτεϊνών που εκφράζονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού. Η αύξηση της γενετικής πληροφορίας ανοίγει τον δρόμο στην πρωτεομική ανάλυση, παρέχοντας της ένα πλαίσιο εργασίας βασισμένο στην αλληλουχία βάσεων του γονιδιώματος, για την εξερεύνηση του πρωτεόματος. Τα τελευταία χρόνια η πρωτεομική ανάλυση αναπτύσσεται ραγδαία εξαιτίας εξαιτίας κυρίως στον διαρκώς αυξανόμενο ρυθμό των γονιδιωμάτων που αποκωδικοποιούνται πλήρως. Επίσης, η διαπίστωση ότι η αλληλουχία του γονιδιώματος και η πρωτεϊνική λειτουργία δεν μπορούν να συσχετισθούν άμεσα, άυξησε το ενδιαφέρον για την πρωτεομική ανάλυση. Το γεγονός αυτό, οφείλεται τόσο στην ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών κατά την μεταγραφή και την μετάφραση όσο και στις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών (δημιουργία τεταρτοταγούς δομής, φωσφορυλιώσεις, γλυκοζυλιώσεις, αφαίρεση σηματοδοτικών αλληλουχιών κ.ά.). Στην ανάπτυξη της πρωτεομικής ανάλυσης συνέτεινε και το γεγονός ότι η φασματοσκοπία μάζας απλοποίησε την ανάλυση και τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνών με την εισαγωγή διαφόρων σημαντικών καινοτομιών, [15,16,17] που επέκτειναν τις δυνατότητες της φασματοσκοπίας μάζας.

Το MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation), αναπτύχθηκε ταυτόχρονα από τους Karas & Hillenkamp 1988 and Tanaka et al. 1988 [15,16]. Έχει αποδειχθεί εξαιρετικά επιτυχής για την ανάλυση πολυμερών και βιοπολυμερών, όπως ενζύμων, πρωτεϊνών, DNA και φαρμάκων.

Τα υποστρώματα διαφέρουν στην ενέργεια που μεταφέρουν στο βιομόριο κατά την απόπτωση και τον ιονισμό και έτσι καθορίζουν το βαθμό θραυσματοποίησης του αναλυτή. Η διαδικασία ιονισμού που επιτυγχάνεται στο MALDI παραμένει ως ένα μεγάλο βαθμό ακόμα άγνωστη και η ένταση του σήματος εξαρτάται από την ποσότητα των πεπτιδίων στον κρύσταλλο, την δυνατότητα του βιομορίου να προσλάβει ή να δώσει ένα πρωτόνιο κατά τη διαδικασία της απόπτωσης και ένα μεγάλο αριθμό από άλλους παράγοντες γνωστούς και άγνωστους. Για το λόγο αυτό είναι δύσκολη η αντιστοιχία της

κορυφής του πεπτιδίου με την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται.

Όσο για την μέθοδο ιονισμού με *Electron spray*, [17], μπορούμε να αναφέρουμε ότι στο διάλυμα που εισάγεται στο τριχοειδή του ηλεκτροψεκασμού περιέχονται θετικά και αρνητικά ιόντα καθώς και ουδέτερα μόρια. Εφαρμόζοντας δυναμικό στον τριχοειδή τα θετικά με τα αρνητικά φορτία διαχωρίζονται με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται κάποιο από αυτά στην άκρη του τριχοειδούς ανάλογα με το πρόσημο του δυναμικού που εφαρμόζεται. Έτσι αν εφαρμοστεί θετική τάση τα θετικά ιόντα κατά κύριο λόγο θα συσσωρευτούν στην άκρη του τριχοειδούς και συγκεκριμένα στην επιφάνεια του κώνου και θα το εγκαταλείψουν πηγαίνοντας στην αέρια φάση.

1.3.Οργανισμός *Scenedesmus obliquus*

Ο οργανισμός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν ο άγριος τύπος του μονοκύτταρου ευκαρυωτικού χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* (στέλεχος D3), [18]. Φυλογενετικά ταξινομείται ως εξής:

- Βασίλειο: *Plantae*
- Φύλο: *Chlorophyta*
- Ομοταξία: *Chlorophyceae*
- Τάξη: *Sphaeropleales*
- Οικογένεια: *Scenedesmaceae*
- Γένος: *Scenedesmus*
- Είδος: *Scenedesmus obliquus*

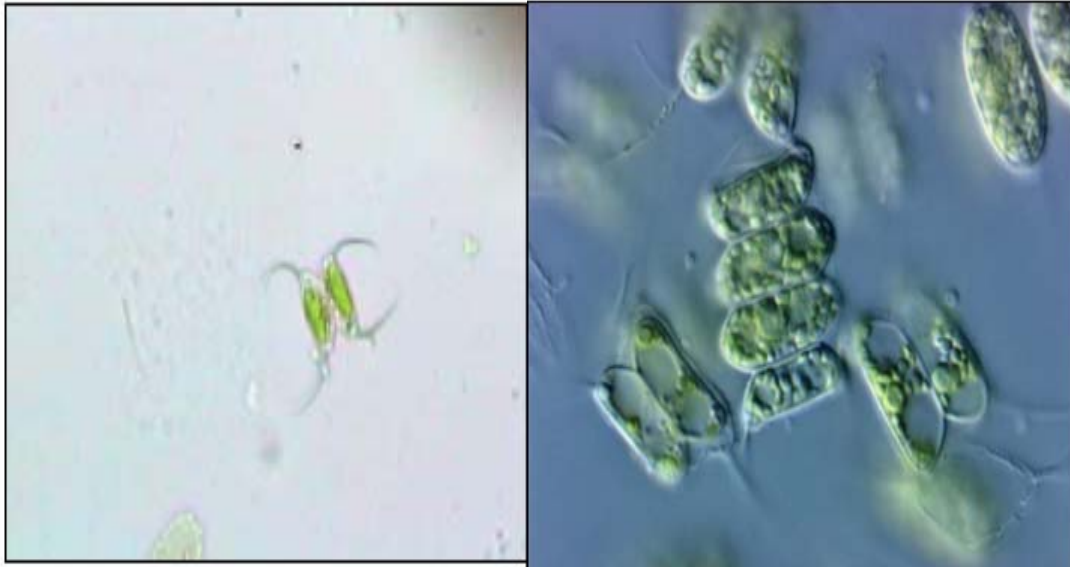
Πρόκειται για ένα μονοκύτταρο ευκαρυωτικό οργανισμό με διάμετρο κυττάρου περίπου 2μm. Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις είκοσι ώρες. Στο διάστημα αυτό διαιρείται μία φορά δίνοντας έξι θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως αποκόπτονται μεταξύ τους (δεν σχηματίζουν κοινόβια). Εξελικτικά βρίσκεται πολύ κοντά σε άλλα δύο γνωστά στο ερευνητικό πεδίο φύκη, τη *Chlamydomonas* και τη *Chlorella*.

Το γένος *Scenedesmus* είναι ευρέως διαδεδομένο σε πολλά και ποικίλα αεριζόμενα υδάτινα περιβάλλοντα. Παίζει ρόλο στην πρωτογενή παραγωγικότητα των

λιμνών και συχνά αποτελεί την κυρίαρχη ομάδα ευτροφικών υδάτινων συστημάτων. Το ευκαρυωτικό αυτό χλωροφύκος, εκτός απ' τις αυτότροφες, μπορεί να αναπτυχθεί τόσο σε μιξότροφες, όσο και σε ετερότροφες συνθήκες. Όσον αφορά στα χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού του μηχανισμού, μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά: ο άγριος τύπος (wt) έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης τόσο στο σκοτάδι όσο και στο φως. Αυτό σημαίνει πως ακόμα και στο σκοτάδι, σε ετερότροφες συνθήκες έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά PS I και PS II. Η ιδιότητά του αυτή, δικαιολογεί την ευρεία διάδοσή του και το καθιστά κατάλληλο για διάφορες εργαστηριακές μελέτες.

Ο *S. obliquus* αποτελεί ένα ιδανικό πειραματικό σύστημα, αφού μπορεί να αναπτύσσεται ταχύτατα (έχει συχνότητα διπλασιασμού περίπου ίση με 1 ημέρα) τόσο σε στερεές (τρυβλία petri), όσο και σε υγρές καλλιέργειες.

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές του *S. obliquus* είναι η χλωροφύλλη a, η χλωροφύλλη b, τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες. Αν και στα ανώτερα φυτά η σύνθεση της χλωροφύλλης εξαρτάται από το φως (φωτοεπαγόμενη διαδικασία) και απουσία φωτός σταματάει στο στάδιο του πρωτοχλωροφυλλιδίου, ο συγκεκριμένος οργανισμός – όπως και όλα τα χλωροφύκη έχει την ικανότητα να συνθέτει χλωροφύλλη και στο σκοτάδι. Υπάρχουν παρόλα αυτά μεταλλάγματα του *S. obliquus*, στα οποία η σύνθεση των χλωροφυλλών σταματάει στο στάδιο του πρωτοχλωροφυλλιδίου, όπως συμβαίνει και με τα υπόλοιπα φυτά.



Εικόνα 3: Ο *S. obliquus* (αριστερά) και διάφορα είδη *Scenedesmus* που έχουν δημιουργήσει συσσωματώματα (δεξιά) (πιθανόν μετά την κυτταρική διαίρεση), που τα βοηθούν να παραμένουν κοντά στην επιφάνεια του νερού.

1.4 Πολυαμίνες

Οι πολυαμίνες είναι μόρια δευτερογενούς μεταβολισμού κάθε οργανισμού και εντοπίζονται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. Πρόκειται για εξαιρετικής σημασίας σηματοδοτικά μόρια, που συνήθως υπάρχουν σε μικρές συγκεντρώσεις και κατέχουν βασικό ρόλο στην ρύθμιση πολλών αναπτυξιακών φαινομένων. Παρόλα αυτά, οι πολυαμίνες που βρέθηκε να έχουν κάποια βιολογική δραστηριότητα είναι τρεις: η πουτρεσίνη (*put*), η σπερμίνη (*spm*) και η σπερμιδίνη (*spd*). Στην παρούσα μελέτη οι πολυαμίνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η πουτρεσίνη και η σπερμίνη.

Ένας από τους βασικούς φυτικούς μηχανισμούς προστασίας των κυττάρων από αυξημένη συγκέντρωση ατμοσφαιρικό όζον είναι η συσσώρευση πολυαμινών, και ειδικότερα των επιπέδων της πουτρεσίνης που είναι δεσμευμένη στις θυλακοειδείς μεμβράνες), [19]. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι οι πολυαμίνες μειώνουν την καταστρεπτική επίδραση του όζοντος πάνω στα φυτά ,[20]. Η εξάρτηση του βαθμού ανεκτικότητας των φυτών σε ακραίες θερμοκρασίες από τις πολυαμίνες, αποτελεί ένα ακόμα παράδειγμα ,[21].

Ήδη από τη δεκαετία του 1990 είχε δειχθεί ότι οι πολυαμίνες ανιχνεύονται στα

φωτοσυνθετικά σύμπλοκα και ότι παίζουν ρόλο στη φωτοσυνθετική διαδικασία ,[22]. Αν και γνωρίζουμε ότι οι πολυαμίνες εμπλέκονται στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό, δεν έχουμε ακόμα καταλάβει πλήρως το πώς εμπλέκονται και το γιατί είναι σημαντικές για τη φωτοσύνθεση.

1.5 Σκοπός της εργασίας

Στα πλαίσια των ερωτημάτων γύρω από τη φυσιολογία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*, για πρώτη φορά γίνεται προσπάθεια λειτουργικής ανάλυσης και δομικού χαρακτηρισμού του «φωτοσυνθετικού πρωτεόματος» του. Έτσι στην εργασία αυτή αξιολογούνται:

α) τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις προσπάθειες διαλυτοποίησης των μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων όσον αφορά τόσο την απόδοση της διαλυτοποίησης τους .

β) την αναλυτική απεικόνιση μη αποδιατεταγμένων φωτοσυνθετικών συμπλόκων με τη χρήση μη αποδιατακτικής BN/PAGE ηλεκτροφόρησης.

γ) τα αποτελέσματα της δεύτερης διάστασης (αποδιατακτική SDS-Tricine PAGE ηλεκτροφόρηση) σχετικά με την υπομοναδική σύσταση των φωτοσυνθετικών πρωτεϊνικών συμπλόκων και

δ) συγκρίνοντας τα αποτελέσματα και με άλλες μεθόδους όπως διαβάθμιση ζάχαρης, ‘colorless’ και μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (2D SDS-Tricine πολυακρυλαμίδης με αποδιατακτική πρώτη διαστασης SDS-Tricine UREA).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των χλωροφυλλικών πρωτεϊνικών συμπλόκων, από τις θυλακοειδείς μεμβράνες του οργανισμού *Scenedesmus obliquus*.

Κεφάλαιο 2^ο

2.1 ΥΛΙΚΑ

I. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Pi).

Μονόξινα Φωσφορικά (Na_2HPO_4) 75 mM

Δισόξινα Φωσφορικά (NaH_2PO_4) 75 mM

Η αναλογία $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ είναι 5,25:1 και pH=7.5

II. Διαλύματα θρεπτικού για καλλιέργειες

Θρεπτικό μέσο , [23].

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (g/l)	ΜΟΡΙΑΚΟΤΗΤΑ
<u>δ/μα Α</u>		
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	$1,50 \times 10^{-2}$	1×10^{-4}
KNO_3	$80,0 \times 10^{-2}$	8×10^{-3}
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	$24,6 \times 10^{-2}$	1×10^{-3}
NaCl	$47,0 \times 10^{-2}$	8×10^{-3}
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	$17,8 \times 10^{-2}$	1×10^{-3}
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$	$40,5 \times 10^{-2}$	3×10^{-3}
<u>δ/μα Γ</u>		
$\text{Na- Citrate} \times 2\text{H}_2\text{O}$	$16,5 \times 10^{-3}$	$5,5 \times 10^{-4}$
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 1\text{H}_2\text{O}$	$0,40 \times 10^{-3}$	$7,5 \times 10^{-6}$
$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \times 5\text{H}_2\text{O}$	$18,025 \times 10^{-3}$	
<u>Ιχνοστοιχεία</u>		
<u>δ/μα Β</u>		
H_3BO_3	$2,86 \times 10^{-3}$	
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	$1,81 \times 10^{-3}$	
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$0,222 \times 10^{-3}$	
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	$0,079 \times 10^{-3}$	
MoO_3 (85%-99,5%)	$0,0177 \times 10^{-3}$	

Ετερότροφο (1lt)

Glucose	5gr
Yeast extract	2.5gr
Agar	18gr
Δ/μα Α	10ml
Δ/μα Β	1ml
Δ/μα Γ	1ml

Συμπλήρωση με νερό μέχρι το 1lt.

Αυτότροφο (1lt)

Δ/μα Α	10ml
Δ/μα Β	1ml
Δ/μα Γ	1ml

Συμπλήρωση με νερό μέχρι το 1lt.

III. Ρυθμιστικό διάλυμα διαλυτοποίησης θυλακοειδών μεμβρανών.

Aminicaproic acid	400 mM
glycerol	10% (w/v)
Bis-Tris pH=7.0 /HCl	50mM
EDTA	0.5mM
PMSF	1mM
Dodecyl-β-Dmaltoside	2 % (w/v)

Για ομογενοποίηση των μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε το ίδιο δ/μα χωρίς απορρυπ/κό.

IV. Ρυθμιστικό διάλυμα για διαβάθμιση ζάχαρης , [24].

Aminicaproic acid	1mM
Bis-Tris pH=7.0 /HCl	50mM
EDTA	0.5mM

PMSF	1mM
Dodecyl-β-Dmaltoside	0.05 % (w/v)
Sucrose	0.1-0.7M

V. Ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευής μη αποδιατακτικής πηκτής (BN/PAGE και CN/PAGE), [25]:

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

Acrylamide	48 gr/100 ml
Bisacrylamide	1.5 gr/100 ml

Gel Buffer (3x)

Aminocaproic acid	1.5M
Bis-Tris , pH=7.0/HCl	150mM

Στο colorless υπάρχει και Dodecyl-β-Dmaltoside 0.03 % (w/v)

Sample Buffer

Bis-Tris ,pH=7.0 /HCl	50mM
Aminocaproic acid	400mM
Sucrose	30% (w/v)
Serva blue G 250	5% (w/v)

Anode Buffer

Bis-Tris ,pH=7.0 /HCl	15mM
-----------------------	------

Cathode Buffer

Tricine	50mM
Bis-Tris ,pH=7.0 /HCl	15mM
Serva blue G 250	0.02% (w/v)

Στο colorless δεν υπάρχει Serva blue G 250.

VI. Ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευής αποδιατακτικής πηκτής (SDS-Tricine /PAGE): , [26].

Το AB-mix είναι το ίδιο με παραπάνω.

Gel Buffer (3x)

Tris 3M
SDS 0.3% (w/v)
pH=8.45 (ρύθμιση με HCl)

Sample Buffer

SDS 12% (w/v)
Glycerol 30% (w/v)
Mercaptoethanol 6%
Serva blue G 250 0.02%(w/v)
Tris-HCl, pH=7.0 150 mM

Anode Buffer (10x)

Tris 1M
pH=8.9 (ρύθμιση με HCl)

Cathode Buffer (10x)

Tris 1M
Tricine 1M
SDS 1.0% (w/v)
pH=8.25 (ρύθμιση με HCl)

VII. Διαλύματα Χρώσης-Αποχρωματισμού, [27].

Απλή γρώση coomassie blue

Διάλυμα γρώσης

Serva blue G 250	0.03% (w/v)
Μεθανόλη	25% (v/v)
Οξικό Οξύ	10% (v/v)

Διάλυμα αποχρωματισμού

Μεθανόλη	5% (v/v)
Οξικό Οξύ	7% (v/v)

Κολλοειδή Χρώση

Διάλυμα για Gel Fixation

Μεθανόλη	45% (v/v)
Οξικό Οξύ	1% (v/v)
H ₂ O	54%

Διάλυμα γρώσης

Serva blue G 250	0.1% (w/v)
Μεθανόλη	34% (v/v)
Οξικό Οξύ	0.5% (v/v)
Θειϊκό Αμμώνιο	17% (w/v)

Διάλυμα αποχρωματισμού

Οξικό Οξύ	1% (v/v)
-----------	----------

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Καλλιέργεια οργανισμού

Αρχικά ο οργανισμός *Scenedesmus obliquus* αναπτύχθηκε σε τρυβλία ,(Εικόνα 4), όπου και χρησιμοποιήθηκε ετερότροφο θρεπτικό υπόστρωμα (βλ§2.1.II). Αυτά χρησιμοποιήθηκαν σαν πρώτη ύλη (stock) για τα περαιτέρω πειράματα.



Εικόνα 4: Καλλιέργεια οργανισμού.

Στη συνέχεια, αυτότροφες καλλιέργειες του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό (αυτότροφο,βλ§2.1.II), [23] για 3-4 μέρες σε σταθερή θερμοκρασία 30 °C και σε συνθήκες λευκού φωτός (~100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; L-40W, Osram , Munich, Germany) σε μια φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία (PAR, 400-700 nm). Όσο για τις αυτότροφες καλλιέργειες με τις πολυαμίνες αναπτύχθηκαν για 2.5-3 μέρες σε σταθερή θερμοκρασία 30 °C και σε συνθήκες εντάσεως λευκού φωτός για τις συνθήκες υψηλού φωτισμού και υψηλού φωτισμού με σπερμίνη (HL,HLsper) ήταν ~200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ενώ η αντίστοιχη ένταση για τις συνθήκες χαμηλού φωτισμού και χαμηλού φωτισμού με πουτρεσίνη (LL, LLputr) ήταν ~50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Συγχρόνως οι καλλιέργειες αερίζονταν για την παροχή του απαραίτητου CO₂ και την αποφυγή αυτοσκιασμού των κυττάρων (ομοιογενή ανάπτυξη).Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν κατόπιν φυγοκέντρησης για 20 min στα 2041g στους 25 °C ,[28] και φυλάχθηκαν στην κατάψυξη στους -80°C.

2.2.2 Απομόνωση μεμβρανών

Για την απομόνωση θυλακοειδών, ακολούθησε μηχανική ρήξη των κυτταρικών τοιχωμάτων με γυάλινα σφαιρίδια (διαμέτρου 0.2mm) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) (βλ. §2.1.I). Η διαδικασία σπασίματος των κυττάρων στο mixer έγινε 5 φορές διάρκειας 1 min και διαλείματος μεταξύ τους 5 min. Το αιώρημα που προέκυψε διηθήθηκε μέσα από γυάλινο φίλτρο σε κενό αέρος, για την απομάκρυνση των σφαιριδίων. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στα 8164g για 45 min, στους 4 °C και στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Η υπερκείμενη στοιβάδα του ιζήματος (θυλακοειδή) συλλέχθηκε προσεχτικά, ώστε να μην αναμιχθεί με την υποκείμενη στοιβάδα (άμυλο, κυτταρικά τοιχώματα, άσπαστα κύτταρα κ.α.) και επαναδιαλύθηκε σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ιόντων (Pi) (βλ. §2.1.I). Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε περιβάλλον πράσινου φωτισμού και χαμηλής φωτονιακής ροής προκειμένου να αποφευχθεί η φωτοοξείδωση των χλωροφυλλών. Οι απομονωμένες μεμβράνες φυλάσσονταν στους -80 °C, έως ότου χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω μεταχειρίσεις.

2.2.3 Διαλυτοποίηση μεμβρανών

Οι θυλακοειδής μεμβράνες (ποσότητας 500 µg Chl) φυγοκεντρήθηκαν για 15 min στα 2180g, στους 4 °C για απομάκρυνση των φωσφορικών. Το ίζημα, επαναδιαλυτοποιήθηκε, (πιπετάροντας για ~20 min στον πάγο) σε διάλυμα ομογενοποίησης (βλ. §2.1.III), αραιώνοντας το έτσι έως 1 µg χλωροφύλλης ή πρωτεΐνης ανά µl θυλακοειδών. Έπειτα οι ομογενοποιημένες πλέον μεμβράνες διαλυτοποιήθηκαν (πιπετάροντας καθώς και με τη χρήση vortex για περίπου 15 min μέσα σε πάγο) με τη προσθήκη διαλύματος διαλυτοποίησης (βλ. §2.1.III), [29,30,31,51,52].

Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αναλογίες απορρυπαντικού/Chl, μέχρι την τελική επιλογή του καλύτερου λόγου. Αυτές ήταν 0.8, 2, 3.5, 5, 10, 15, 20 και 40. Η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε τελικά για τα πειράματα είναι ίση με 15/1, ενώ για πρωτεΐνη είναι 1.5/1. Το αδιάλυτο υλικό απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση για 30 min στα 14737g, στους 4 °C. Ακολούθησε η συλλογή του υπερκειμένου.

2.2.4 Διαβάθμιση ζάχαρης

Για την απομόνωση των φωτοσυνθετικών συμπλόκων ακολουθήθηκε η διαδικασία από το πρωτόκολλο του Bassi (2001), [24] με τις ακόλουθες τροποποιήσεις, όπως στο ρυθμιστικό δ/μα (βλ. §2.1.IV), στις συνθήκες φυγοκέντρησης και χρησιμοποιήθηκαν μικροί αντί για μεγάλους σωλήνες. Η συγκέντρωση της Chl στο δείγμα (θυλακοειδείς μεμβράνες) προσαρμόστηκε σε μια συγκέντρωση της τάξεως των 500μg, έτσι ώστε κανένα ίζημα να μην διαμορφώνεται στο κατώτατο σημείο των σωλήνων. Οι θυλακοειδείς μεμβράνες μετά την διαλυτοποίησή τους (αναλογία απορρυπαντικού/Chl ίση με 15/1) φορτώθηκαν 800μl δείγματος στην επιφάνεια διαβάθμισης ζάχαρης συγκέντρωσης 0,1–0,7M σε ρυθμιστικό δ/μα (βλ. §2.1.IV) μέσα σε μικρούς σωλήνες. Η επίτευξη της διαβάθμισης ζάχαρης έγινε μέσω μίας περισταλτικής αντλίας μικρής ροής, ενώ ο συνολικός όγκος σακχαρόζης μέσα στους σωλήνες ήταν 10ml. Οι συνθήκες υπερφυγοκέντρησης ήταν 22hr στις 208000g και σε θερμοκρασία 4°C. Πριν την υπερφυγοκέντρηση έγινε πρόψυξη του ρότορα και ισοζύγηση των σωλήνων.

Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρησης, το περιεχόμενο των σωλήνων συλλέχθηκε αρχίζοντας από το αραιότερο προς το πυκνότερο κλάσμα και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

2.2.5 Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση

Η μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση Blue-Native και CN /Page, [25] (πρώτη διάσταση), έγινε σε πηκτή διαχωρισμού πολυακρυλαμιδίου διαβάθμισης 4% έως 13%. Η πηκτή παρασκευάστηκε σε υάλινες πλάκες διαστάσεων 19.5cm x 16.5cm x 0.13cm.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της συγκεκριμένης πηκτής δίνεται στον παρακάτω πίνακα 1.

	Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού 4%	Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού 13%
AB-mix (49.5% T, 3% C)	1.72 ml	5.6 ml
Gel buffer (3x)	7.1 ml	7.1 ml
Γλυκερόλη	-	4.77 gr/3.78 ml
Νερό (ddH ₂ O)	12.43 ml	4.77 ml
APS (10%)	200 μl	94 μl
TEMED	20 μl	9,4 μl
Τελικός όγκος	21.25 ml	21.25 ml

Πίνακας 1: Σύσταση των διαλυμάτων πηκτών διαχωρισμού 4% και 13% πολυακρυλαμίδης.

Τα παραπάνω διαλύματα απαερώθηκαν για 10-15 min πριν τη προσθήκη των APS και TEMED. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στη συσκευή ανάμιξης, όπου μετά τη προσθήκη των APS και TEMED, τα διαλύματα ανακινούνταν ελαφρά, έτσι ώστε ο καταλύτης και ο εκκινητής να δράσουν σε όλο τον όγκο διαλύματος με αποτέλεσμα ο πολυμερισμός να γίνει ομοιόμορφα. Παράλληλα, γινόταν και η διαβάθμιση της πηκτής διαχωρισμού. Μετά το πέρας του πολυμερισμού, το gel αποθηκεύτηκε στους 4°C, τυλιγμένο με υγρό χαρτί.

Η σύσταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων ανόδου και καθόδου που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση, φαίνονται παραπάνω (βλ. §2.1.V). Ο πρωτεϊνικός μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο HMW Native Protein Molecular Weight Marker (Amersham Pharmacia Biotech) σε ρυθμιστικό διάλυμα Bis-Tris/HCl (pH=7) και περιείχε τις εξής πρότυπες πρωτεΐνες:

- 669 kDa : θυροσφαιρίνη από θυροειδή
- 440 kDa : χοίρου φερριτίνη από σπλήνα αλόγου
- 232 kDa : καταλάση από συκώτι βοδιού

- 140 kDa : γαλακτική δεϋδρογενάση από καρδιά βοδιού
66 kDa : αλβουμίνη από ορό βοδιού

Σε κάθε ηλεκτροφορητική διαδικασία χρησιμοποιούνταν 10 μl του παραπάνω μάρτυρα (2.5 μg πρωτεΐνης/μl).

Ο όγκος του υπερκειμένου (διαλυτοποιημένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα) που φορτώθηκε στην πηκτή, αναμίχθηκε πριν τη φόρτωση με τόσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης (sample buffer, βλ. §2.1.V), έτσι ώστε ο λόγος απορρυπαντικού/χρωστική Coomassie (μg/μg) στο προκύπτον διάλυμα μετά την ανάμιξη να είναι 4:1.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετήθηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού (βλ. §2.1.VII) για περίπου 15 h.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, στο “colorless” native/Page, δεν χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης, ενώ στο δείγμα προστέθηκε σκόνη Ponceau διαλυμένη σε νερό συγκεντρώσεως 0.001% για κάθε πηγαδάκι και το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μέτωπο για παρακολούθηση των δειγμάτων βάση του κόκκινου χρώματος.

Αφού, τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, η πηκτή του άχρωμου native/Page “σκανάρεται” και ακολουθεί κολλοειδή χρώση coomassie.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε και για τις δύο μεθόδους υπό σταθερή τάση (~100V) για περίπου 1-1.5 h μέχρι το ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου να εισέλθει στα κανάλια φόρτωσης των δειγμάτων, στη πηκτή διαχωρισμού, οπότε και η τάση αυξήθηκε έως τα 250 Volt και αφήθηκε για περίπου 6-7 h, έως ότου το μέτωπο του διαλύτη φτάσει λίγο πριν το κατώτερο άκρο των ειδικών πλακών ηλεκτροφόρησης. Καθόλη τη διάρκεια της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας παρεχόταν ψύξη, με τη χρήση ειδικών μεταλλικών πλακών μέσα στις οποίες κυκλοφορούσε νερό θερμοκρασίας στους 8 °C.

2.2.6 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση

Η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-Tricine /Page, [26,50] (δεύτερη διάσταση), παρασκευάστηκε σε υάλινες πλάκες διαστάσεων 24cm x 23cm x 0.1cm.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και στοίβαξης για 1 gel δίνεται στον παρακάτω πίνακα 2.

	Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού 10%	Διάλυμα πηκτής στοίβαξης 3%
AB-mix (49.5% T, 3% C)	12 ml	3 ml
Gel buffer (3x)	20 ml	9 ml
Γλυκερόλη	6 ml	-
Νερό (ddH ₂ O)	20 ml	24 ml
APS (10%)	300 μl	270 μl
TEMED	30 μl	27 μl
Τελικός όγκος	~58 ml	~36 ml

Πίνακας 2: Σύσταση των διαλυμάτων πηκτής στοίβαξης 4% πολυακρυλαμίδης και πηκτής διαχωρισμού 10% πολυακρυλαμίδης για αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-Tricine Page.

Κατά την διάρκεια της προσθήκης των APS και TEMED, τα διαλύματα ανακινούνταν ελαφρά, για καλύτερο πολυμερισμό της πηκτής μέσα στις υάλινες πλάκες. Πρώτα προστέθηκε το διάλυμα της πηκτής στοίβαξης στις ειδικές υάλινες πλάκες και ακολούθως μικρή ποσότητα n-βουτανόλης στην ελεύθερη επιφάνεια του διαλύματος της πηκτής στοίβαξης, προκειμένου ο πολυμερισμός της πηκτής στοίβαξης να γίνει ομοιόμορφα και να ακολουθήσει ομοιογενώς η προσθήκη του διαλύματος πηκτής διαχωρισμού, αφού προηγουμένως η n-βουτανόλη είχε αφαιρεθεί.

Η σύσταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων ανόδου και καθόδου που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση, φαίνονται παραπάνω (βλ. §2.1.VI). Ο πρωτεϊνικός μάρτυρας (Fluka) που χρησιμοποιήθηκε στη SDS-Tricine PAGE ηλεκτροφόρηση, διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνών (βλ. §2.1.VI), με αναλογία 1 mg μάρτυρας προς 1 ml sample buffer και περιείχε τις εξής πρότυπες πρωτεΐνες:

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

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών (αναλυμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα πρώτης διάστασης) στην αποδιατακτική πηκτή (δεύτερη διάσταση) ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικοί τρόποι. Έτσι στην αποδιατακτική πηκτή φορτώθηκαν είτε μεμονωμένες πρωτεϊνικές ζώνες (spots) ξεχωριστά είτε ολόκληρες λωρίδες (strips) οι οποίες περιείχαν όλες τις πρωτεϊνικές ζώνες που είχαν αναλυθεί στη πρώτη διάσταση.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε υπό χαμηλή τάση (~60V) έως ότου τα δείγματα περάσουν από την πηκτή στοίβαξης, στην πηκτή διαχωρισμού, μία διαδικασία με διάρκεια ~2 h, οπότε και η τάση στη συνέχεια αυξήθηκε έως τα ~ 140 Volt και αφέθηκε για περίπου 15 ώρες, έως ότου το μέτωπο του διαλύτη φτάσει λίγο πριν το κατώτερο άκρο των ειδικών πλακών ηλεκτροφόρησης. Καθόλη τη διάρκεια της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας παρέχόταν ψύξη στους 8 °C.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, πραγματοποιήθηκε κολλοειδής χρώση Coomassie, [27]. Έτσι αρχικά πραγματοποιήθηκε σταθεροποίηση (fixation) της πηκτής, για ~ 4-12h, προκειμένου τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα να σταθεροποιηθούν. Έπειτα ακολούθησε η διαδικασία της χρώσης για ~12-18h, σε διάλυμα χρώσης. Η σύσταση των παραπάνω διαλυμάτων φαίνεται στην παράγραφο 2.1.VII.

2.2.6.1 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (1D_SDS-Tricine /PAGE)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα της διαβάθμισης ζάχαρης, όπου πήραμε 75μl δείγματος από κάθε ζώνη αυτής και προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (βλ. §2.1.VI), δηλ. αναλογία 1:1. Το δείγμα μας μετά από ανακίνηση, επώαστηκε στους 42°C για 30min περίπου και στη συνέχεια φορτώθηκε στα πηγαδάκια

του gel.

Η ίδια διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για μεμβράνες καθώς και σε υπερκείμενο και ίζημα από διαλυτοποιημένες μεμβράνες, για διάφορες αραιώσεις. Η αναλογία του δείγματος με διάλυμα μετουσίωσης και η επώαση ήταν η ίδια με την διαβάθμιση ζάχαρης. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν 240 μg στην περίπτωση των μεμβρανών και υπερκειμένων.

Η σύσταση της πηκτής ακρυλαμιδίου, οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης, καθώς και τα διαλύματα ανόδου, καθόδου και χρώσης-αποχρωματισμού παραμένουν τα ίδια με την παράγραφο 2.2.6.

2.2.7 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση

Αρχικά, τα πρωτεϊνικά στίγματα κόπηκαν από την πηκτή BN/Page με τη βοήθεια νυστεριού και πολτοποιήθηκαν μηχανικά. Στη συνέχεια η πολτοποιημένη μάζα εισήχθη σε erpendorf και καλύφθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνών (sample buffer) προς αποδιάταξη των πρωτεϊνικών συμπλόκων. Ακολούθως τα δείγματα πριν φορτωθούν, εισήχθησαν σε λουτρό υπερήχων (προς μεγιστοποίηση του βαθμού της αποδιάταξης του συμπλόκου στις υπομονάδες του (Bransonic Ultrasonic Cleaner/ model: B-1200 EI/frequency: 47 kHz \pm 6%/power supply 95 W/220/240 volt ~50-60 Hz) για 30 min. Η μέθοδος αυτή εγκαταλείφθηκε λόγω της δυσκολίας φορτώματος του δείγματος στο gel (παραμονή δείγματος στο erpendorf), δυσκολία στη πολτοποίηση των ζωνών και στο ακριβές κόψιμο αυτών, αφού υπήρχε δυνατότητα να χαθούν σύμπλοκα πρωτεϊνών συνεπώς και πρωτεΐνες, σε περίπτωση μη διακριτών ζωνών.

Στην δεύτερη περίπτωση, κόπηκε λωρίδα από την μη αποδιατακτική πηκτή BN/Page, [32] και αναλύθηκε σε δεύτερη διάσταση SDS-Tricine/Page, με πηκτή διαχωρισμού 10%(T) ακρυλαμιδίου και 3%(C) δις-ακρυλαμιδίου, ενώ η πηκτή στοιβάξης 4% συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου. Η λωρίδα, αναλύθηκε, με τρεις τρόπους:

- α) Μετά από αποχρωματισμό,
- β) Μετά από ψύξη στους -40°C και
- γ) κατευθείαν από τη πηκτή BN/PAGE.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν, βγήκε το συμπέρασμα ότι λαμβάνονται περισσότερα στίγματα στη πηκτή όταν χρησιμοποιείται η λωρίδα αμέσως μετά το πέρας της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης. Ενώ με τους άλλους δύο τρόπους χάνονταν πρωτεΐνες ή σημειώνονταν υπολείμματα με τη μορφή ακίδων πάνω στη λωρίδα.

Η λωρίδα επώαστηκε για 2h σε διάλυμα 1% w/v SDS και 1% v/v β-μερκαπτοαιθανόλης και αφού απαλλάχθηκε με απορροφ/κό χαρτί από την περίσσεια β-μερκαπτοαιθανόλης (λόγω του ότι η β-μερκαπτοαιθανόλη δρα ανασταλτικά του πολυμερισμού του πολυακρυλαμιδίου) στερεώθηκε ανάμεσα στα τζάμια και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη συσκευή πήξης της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο πολυμερισμός της πηκτής διαχωρισμού και στοίβαξης αντίστοιχα, καλύπτοντας η δεύτερη καλά την λωρίδα μέχρι επάνω. Η λωρίδα τοποθετήθηκε με μία μικρή κλίση, για αποφυγή φυσαλίδων ανάμεσα στη λωρίδα και τη πηκτή στοίβαξης, οι οποίες μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα κατά την ηλεκτροφόρηση.

Η σύσταση του gel για την δεύτερη διάσταση είναι ίδια με παραπάνω (βλ. §2.2.6), καθώς και τα διαλύματα ανόδου, καθόδου και αποχρωματισμού. Οι πρότυπες πρωτεΐνες παραμένουν σταθερές και οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης επίσης, (βλ. §2.2.6).

2.2.8 Διαγώνιος -Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση

Αρχικά η μέθοδος, εφαρμόστηκε σε διαλυτοποιημένες θυλακοειδών μεμβράνες. Στη συνέχεια, έγιναν μελέτες για διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης των διαλυτοποιημένων μεμβρανών). Αυτό, έγινε προσθέτοντας ίση ποσότητα (αναλογία 1:1) ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης (βλ. §2.1.VI) .Μετά από ανακίνηση, επώάζονται στους 42°C για 30min. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, τα δείγματα φορτώθηκαν σε gel ουρίας, [33] το οποίο χρησιμοποιείται ως πρώτη διάσταση (1D) διαχωρισμού των πρωτεϊνών και του οποίου η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και στοίβαξης για 2 gel δίνεται στον πίνακα 3.

	Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού 10%, 6M Urea	Διάλυμα πηκτής στοίβαξης 3%
AB-mix (49.5% T, 3% C)	48 ml	6 ml
Gel buffer (3x)	80 ml	18 ml
Urea	88 gr	-
Νερό (ddH ₂ O)	Συμπληρώνω μέχρι τα 240 ml	48 ml
APS (10%)	1200 μl	540 μl
TEMED	120 μl	54 μl
Τελικός όγκος	~240 ml	~72 ml

Πίνακας 3: Σύσταση των διαλυμάτων πηκτής στοίβαξης 3% πολυακρυλαμίδης και πηκτής διαχωρισμού 10% πολυακρυλαμίδης, 6M ουρίας για αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-Tricine Page.

Αφού τελειώσει η ηλεκτροφόρηση της πρώτης διάστασης, κόβονται οι λωρίδες, αφήνοντας πάντα πρότυπες λωρίδες ,οι οποίες θα βαφτούν και θα χρησιμοποιηθούν ως μέτρο σύγκρισης αργότερα για την δεύτερη διάσταση. Οι λωρίδες επωάζονται σε δ/μα 100mM Tris-HCl, pH~2 για 30min. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης στερεώνονται ανάμεσα στα τζάμια και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη συσκευή πήξης της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης. Τέλος, πραγματοποιείται ο πολυμερισμός της πηκτής διαχωρισμού και στοίβαξης αντίστοιχα, καλύπτοντας η δεύτερη καλά την λωρίδα μέχρι επάνω. Η λωρίδα τοποθετήθηκε με μία μικρή κλίση, για αποφυγή φυσαλίδων ανάμεσα στη λωρίδα και τη πηκτή στοίβαξης, οι οποίες μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα κατά την ηλεκτροφόρηση.

Για την δεύτερη διάσταση, [33] χρησιμοποιήθηκε πηκτή διαχωρισμού 16.5% συνολική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου (T), ενώ η πηκτή στοίβαξης είχε 3% συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου. Η σύσταση των διαλυμάτων για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και στοίβαξης για 4 gel δίνεται από τον πίνακα 4.

	Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού 16.5%	Διάλυμα πηκτής στοίβαξης 3%
AB-mix (49.5% T, 3% C)	100 ml	12 ml
Gel buffer (3x)	100 ml	36 ml
Γλυκερόλη	30 gr	-
Νερό (ddH ₂ O)	Συμπληρώνω μέχρι τα 300 ml	96 ml
APS (10%)	1000 μl	1080 μl
TEMED	100 μl	108 μl
Τελικός όγκος	~300 ml	~145 ml

Πίνακας 4: Σύσταση των διαλυμάτων πηκτής στοίβαξης 3% πολυακρυλαμίδης και πηκτής διαχωρισμού 16.5% πολυακρυλαμίδης για αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-Tricine Page.

Στο διάλυμα της πηκτής στοίβαξης προσθέτουμε λίγη ποσότητα bromophenol blue (1-2 κόκους), για να δημιουργηθεί ένα μέτωπο κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, ώστε να μπορέσουμε να το παρακολουθήσουμε.

Τα διαλύματα ανόδου, καθόδου, αποχρωματισμού, καθώς και οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης παραμένουν τα ίδια και για τις δύο διαστάσεις, (βλ. §2.2.6).

2.2.9 Ποσοτικός προσδιορισμός Πρωτεϊνών -Μέθοδος Bradford

Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής πυκνότητας σε διάφορα δείγματα απομονωμένων θυλακοειδών καθώς και σε δείγματα τόσο υπερκειμένων όσο και ιζημάτων, τα οποία προέκυψαν μετά τη διαλυτοποίηση των μεμβρανών, καθώς και μετά από απομονωμένες ζώνες διαβάθμισης ζάχαρης, έγινε φωτομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford, [34] όπως προτείνεται από τους Jones et al., (1989), [35].

Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης σε συνάρτηση με την μάζα, σε μg της BSA. Για τη μέτρηση της απορρόφησης του προς εξέταση δείγματος

τοποθετούνται x μl δείγματος, (800-x) μl νερού και 200 μl αντιδραστηρίου Bradford. Οι μετρήσεις γίνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα και μετά το πέρας 10 min από την παρασκευή των δειγμάτων. Ενώ, οι μετρήσεις των απορροφήσεων γίνονται στα 595nm.

Σημειώνεται επίσης, ότι τα ιζήματα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα ομογενοποίησης (βλ. §2.1.III) προκειμένου να ληφθούν φάσματα και να μετρηθούν επίσης χλωροφύλλες και πρωτεΐνες. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στον πάγο καθώς και σε περιβάλλον χαμηλού φωτονιακού φωτισμού.

2.2.10 Ποσοτικός προσδιορισμός Χλωροφυλλών

Η χλωροφύλλη του δείγματος αναμίχθηκε με δ/μα που αποτελείται από 80% (v/v) ρυθμιστικού δ/ματος υδατικής ακετόνης και 20% δ/τος 2,5mM HEPES- NaOH, pH 7.5. Βάζουμε x μl δείγματος σε υάλινους σωλήνες φυγοκέντρωσης και 1ml από το παραπάνω διάλυμα αραιωμένο με νερό σε αναλογία 1:1. Στη συνέχεια το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε για 15 min, στις 3000rpm στους 25 °C και από το υπερκείμενο που προέκυψε ποσοτικοποιήθηκαν οι χλωροφύλλες (χλωροφύλλη a, χλωροφύλλη b και ολικές χλωροφύλλες), όπως περιγράφεται από τους Porra et al., (1989), [36]. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες χαμηλής φωτονιακής ροής προκειμένου να αποφευχθεί φωτοοξειδωση των χλωροφυλλών.

Οι μετρήσεις των απορροφήσεων έγιναν στα 663,6 nm και στα 646,6 nm, ενώ οι τύποι που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των χλωροφυλλών a, b και ολικών είναι:

$$Chla = 12.25 * A_{663.6} - 2.55 * A_{646.6}$$

$$Chlb = 20.31 * A_{646.6} - 4.91 * A_{663.6}$$

$$Chl(a+b) = 17.76 * A_{646.6} + 7.34 * A_{663.6}$$

,όπου A είναι η απορρόφηση στο αντίστοιχο μήκος κύματος και οι μονάδες είναι μg chl/ml θυλακοειδών.

2.2.11 Φασματοσκοπία ορατού

Τα φάσματα απορρόφησης λήφθηκαν με τη χρησιμοποίηση ενός SLM-AmincoDW-2000 φασματοφωτόμετρου, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα

(διαλυτοποιημένες μεμβράνες, απομονωμένες ζώνες διαβάθμισης ζάχαρης) αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης (βλ. §2.1.III) για το πρώτο, ενώ για το δεύτερο χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα (βλ. §2.1.IV) χωρίς ζάχαρη. Η αναλογία για τα πρώτα ήταν 1:19, δηλ. 50μl δείγματος και 950μl δ/μα ομογεν/σης, ενώ στη δεύτερη περίπτωση ήταν 1:4, δηλ. 200μl από τη ζώνη και 800μl ρυθ/κού δ/τος. Οι μετρήσεις των φασμάτων έγιναν σε μήκος κύματος 350-750nm.

2.2.12 Σκέδαση φωτός (Light Scattering), [37].

Η μέτρηση με την τεχνική της σκέδασης φωτός απαιτεί τη διήθηση των μετρούμενων διαλυμάτων από κατάλληλα φίλτρα και την τοποθέτηση των δειγμάτων σε καθαρές κυψελίδες, για την αποφυγή παρουσίας σκόνης, οι οποίες θα επηρεάσουν την ποιότητα των μετρήσεων μας. Επίσης, είναι απαραίτητη η ανακίνηση των διαλυμάτων μετά την παρασκευή τους, για να επιτευχθεί ομογενοποίηση και μετά από αυτό το στάδιο τα διαλύματα πρέπει να αφεθούν αρκετές ώρες, ώστε επέλθει θερμοδυναμική ισορροπία.

Οι δυναμικές μετρήσεις που έγιναν από ζώνες της διαβάθμισης ζάχαρης, πραγματοποιήθηκαν σε γωνίες σκέδασης (θ) 45° , 70° , 90° , 120° και 140° για την πρώτη σειρά πειραμάτων. Ενώ για τη δεύτερη έγιναν σε γωνίες σκέδασης 120° , 90° , 70° , 45° και 30° . Η γεωμετρία σκέδασης σε όλες τις μετρήσεις είναι η πολωμένη (VV).

Όσο για τις στατικές μετρήσεις, έγιναν σε ένα εύρος γωνιών από 30° έως 150° με βήμα 5° για την πρώτη σειρά πειραμάτων, ενώ για τη δεύτερη σειρά πειραμάτων έγιναν σε ένα εύρος γωνιών από 150° έως 30° με βήμα 5° .

Τα δείγματα αραιώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα πριν τη μέτρηση τους, (βλ. §2.1.IV). Ενώ ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων φαίνεται παρακάτω:

$$q = (4\pi n / \lambda) \sin(\theta/2), \quad (1)$$

όπου το q καθορίζει ένα διάνυσμα κυμάτων, το λ είναι το μήκος κύματος του συναφούς φωτός (εισερχόμενη-σκεδαζόμενη ακτινοβολία) σε ένα κενό, θ είναι η γωνία σκέδασης, και το n είναι ο διαθλαστικός δείκτης του μέσου.

2.2.13 Ταυτοποίηση Πρωτεϊνών με Φασματοσκοπία Μάζας

Η φασματοσκοπία μάζας έχει ξεχωριστή θέση λόγω του ότι μετράει μία φυσική ιδιότητα του μορίου, τη μάζα του, με μεγάλη ακρίβεια. Η αναλυτική τεχνική αυτή, άργησε να βρει εφαρμογή στα βιολογικά συστήματα κυρίως λόγω της δυνατότητας ανάλυσης μόνο φορτισμένων και πτητικών μορίων. Επίσης, τα βιομόρια είναι μεγάλα και πολικά, που δεν μεταφέρονται και δεν ιονίζονται εύκολα στην αέρια φάση.

Οι δύο τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τον ιονισμό των πεπτιδίων είναι οι παρακάτω:

A) MALDI, [15,16].

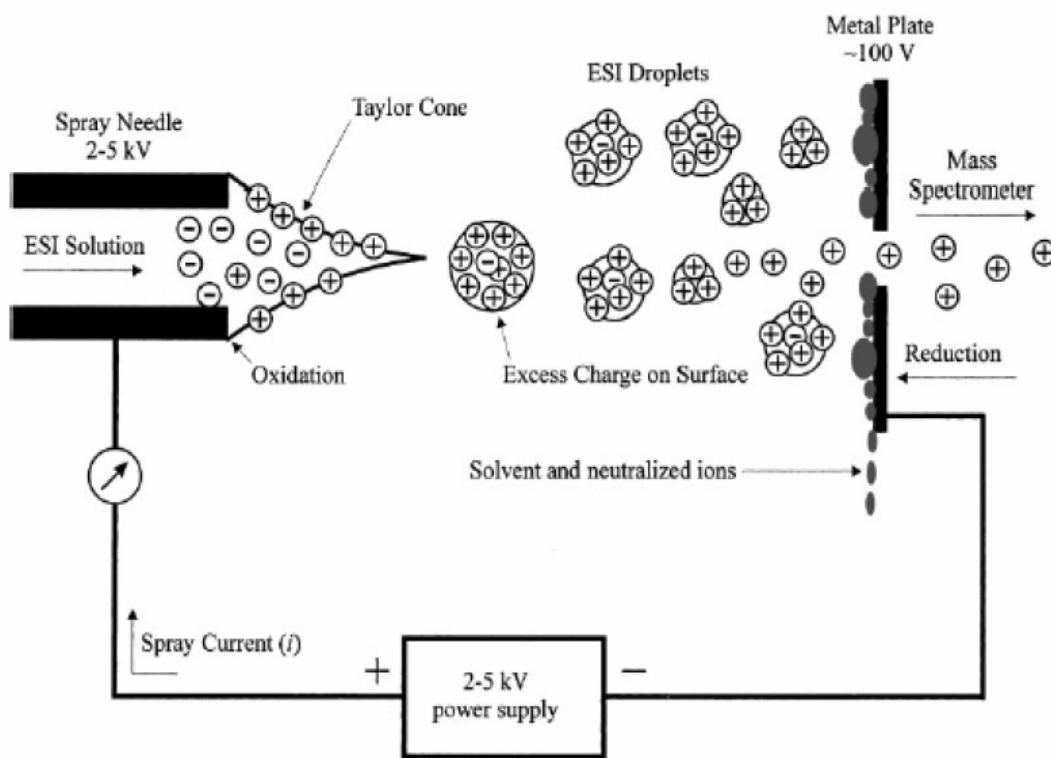
Στη μέθοδο αυτή, για να δημιουργηθεί η απαραίτητη αέρια φάση, τα πρωτονιομένα βιομόρια και μεγάλη ποσότητα υποστρώματος συνκρυσταλλώνονται με μόρια του αναλυτή πάνω σε μεταλλική επιφάνεια. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι ακτινοβολούνται από παλμό laser, συνήθως αζώτου με μήκος κύματος 337nm. Κατά την ακτινοβόληση του μείγματος, η ουσία εξέρχεται στην αέρια κατάσταση με ελάχιστη διάσπαση και κατόπιν χρησιμοποιείται η φασματοσκοπία μάζας για τη γρήγορη ταυτοποίηση της ουσίας. Το υπόστρωμα είναι συνήθως μικρό οργανικό μόριο που εμφανίζει απορρόφηση στο μήκος κύματος του laser που χρησιμοποιείται. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα είναι το α-κυάνο-4-κιναμινικό οξύ και το διϋδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB).

B) ELECTRON SPRAY (ESI)

Κατά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού, αραιό διάλυμα δείγματος εισάγεται σε έναν μεταλλικό τριχοειδή σωλήνα. Μεταξύ αυτού του τριχοειδούς και ενός αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού από 2-5 kV, τιμή ικανή να παράγει το ηλεκτρικό πεδίο που επιδρά στα φορτία του διαλύματος διαχωρίζοντας τα και συσσωρεύοντας τα θετικά ή τα αρνητικά φορτία στην άκρη του τριχοειδούς σχηματίζοντας τον “κώνο του Taylor”, [17].

Στην πράξη, το δυναμικό που εφαρμόζεται στον τριχοειδή είναι μια διαφορά

δυναμικού που εφαρμόζεται μεταξύ του τριχοειδούς και του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου και αυτό επιτυγχάνεται συνδέοντας μία ηλεκτρική πηγή μεταξύ του τριχοειδούς και του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου (εικόνα 5). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός ολοκληρωμένου ηλεκτρικού κυκλώματος που αποτελείται από τον θετικό πόλο της ηλεκτρικής πηγής που μέσω ενός αγωγού συνδέεται με τον τριχοειδή, το κενό μεταξύ του τριχοειδούς και του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου, και τέλος το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο που συνδέεται μέσω ενός αγωγού με τον αρνητικό πόλο της ηλεκτρικής πηγής.



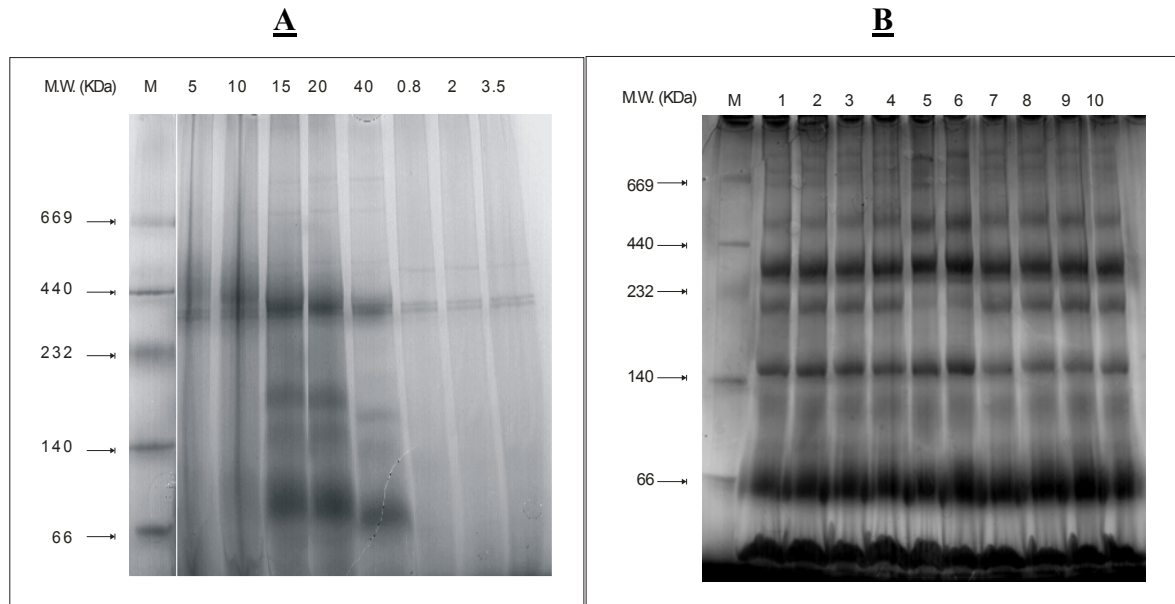
Εικόνα 5: Αναπαράσταση της διάταξης ηλεκτροψεκασμού για την παραγωγή θετικών ιόντων, [38].

Κεφάλαιο 3^ο

3.1. Μελέτη με διαλυτοποίηση μεμβρανών.

Αρχικά, έγιναν προσπάθειες για την αύξηση της διακριτικής ικανότητας στη διαβάθμιση της πηκτής BN/PAGE. Τα καλύτερα αποτελέσματα τα πήραμε με διαβάθμιση πολυακρυλαμίδης 4%-13%, με τα δύο διαλύματα παρασκευής της πηκτής να έχουν ακριβώς τον ίδιο όγκο, σε σύγκριση με διαβαθμίσεις πολυακρυλαμίδης 5%-13%, 6%-13% και 4%-13% με διαφορετικούς όγκους των δύο διαλυμάτων. Η διαχωριστική ικανότητα αυξήθηκε επιτρέποντας έναν ικανοποιητικό διαχωρισμό και σε μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 669 kDa, χωρίς το υπόλοιπο ανιχνεύσιμο εύρος μοριακών βαρών να μεταβληθεί.

Στη συνέχεια, θυλακοειδείς μεμβράνες του μονοκύτταρου οργανισμού *Scenedesmus obliquus*, διαλυτοποιήθηκαν με διαφορετικούς λόγους απορρυπαντικού προς χλωροφύλλη και αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά προς το διαχωρισμό των φωτοσυνθετικών πρωτεϊνικών συμπλόκων (εικόνα 6).



Εικόνα 6: Μη αποδιατακτική πηκτική πολυακρυλαμίδης (Blue-Native Page/πρώτη διάσταση). Η διαβάθμιση της πηκτής πολυακρυλαμίδιου είναι 4%-13%.

A: με M συμβολίζεται ο μάρτυρας, και 5,10,15,...είναι οι λόγοι απορρ./χλωρ. , B: πάλι με M είναι ο μάρτυρας και τα 1,2,3...είναι ο καλύτερος λόγος απορρ./χλωρ ,δηλαδή 15.

Τα δείγματα πριν φορτωθούν στα πηγαδάκια, αναμίχθηκαν με sample buffer (βλ. §2.1.V) και η τελική αναλογία απορρυπαντικού/χρωστική Coomassie ήταν είναι 4:1 (μg/μg). Πράγμα που είχε ως αποτέλεσμα ,καλύτερο διαχωρισμό και καλύτερη οπτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών.

Όπως παρατηρούμε στην μη αποδιατακτική πρώτη διάσταση (Blue-Native PAGE) της εικόνας 6 και συγκεκριμένα στην αριστερή, λωρίδες της πηκτής που αφορούν λόγους απορρυπαντικού/χλωροφύλλης, αυξανόμενου του λόγου περνάμε από λεπτές και καλά διαχωρισμένες πρωτεϊνικές ζώνες σε διάχυτες ζώνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από μειωμένη διακριτική και διαχωριστική ακεραιότητα. Για παράδειγμα οι λόγοι 15 και 20 εμφανίζουν τα καλύτερα αποτελέσματα με τις περισσότερες ζώνες, αφού διακρίνονται περίπου 10 στο σύνολο τους, όπως φαίνεται και στην εικόνα Β και μάλιστα με επαναληψιμότητα. Ενώ, για λιγότερη ή περισσότερη ποσότητα απορρυπαντικού αρχίζουν να χάνονται τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα και να αρχίζει να παρουσιάζεται το παραπάνω πρόβλημα των μη διακριτών και διάχυτων ζωνών.

Αναλυτικότερα, οι λόγοι 0.8 έως 3.5 (εικόνα 6Α), δεν παρέχει ικανοποιητική ποσότητα απορρυπαντικού για μία αποδοτική διαλυτοποίηση έχοντας ως αποτέλεσμα την φτωχή διαχωριστική ικανότητα. Αντίθετα οι λόγοι 5 και 10 (εικόνα 6Α), δρουν αποδιατακτικά στα διαλυτοποιημένα σύμπλοκα, αφού τείνουν να διασπάσουν τα διαχωριζόμενα σύμπλοκα και τελικά επιλέχθηκε ως ο καταλληλότερος λόγος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μία αποδοτική διαλυτοποίηση θυλακοειδών του *Scenedesmus*, ο λόγος 15, αφού όπως φαίνεται και από την εικόνα Β έχουμε πολύ καλό διαχωρισμό των πρωτεϊνικών συμπλόκων.

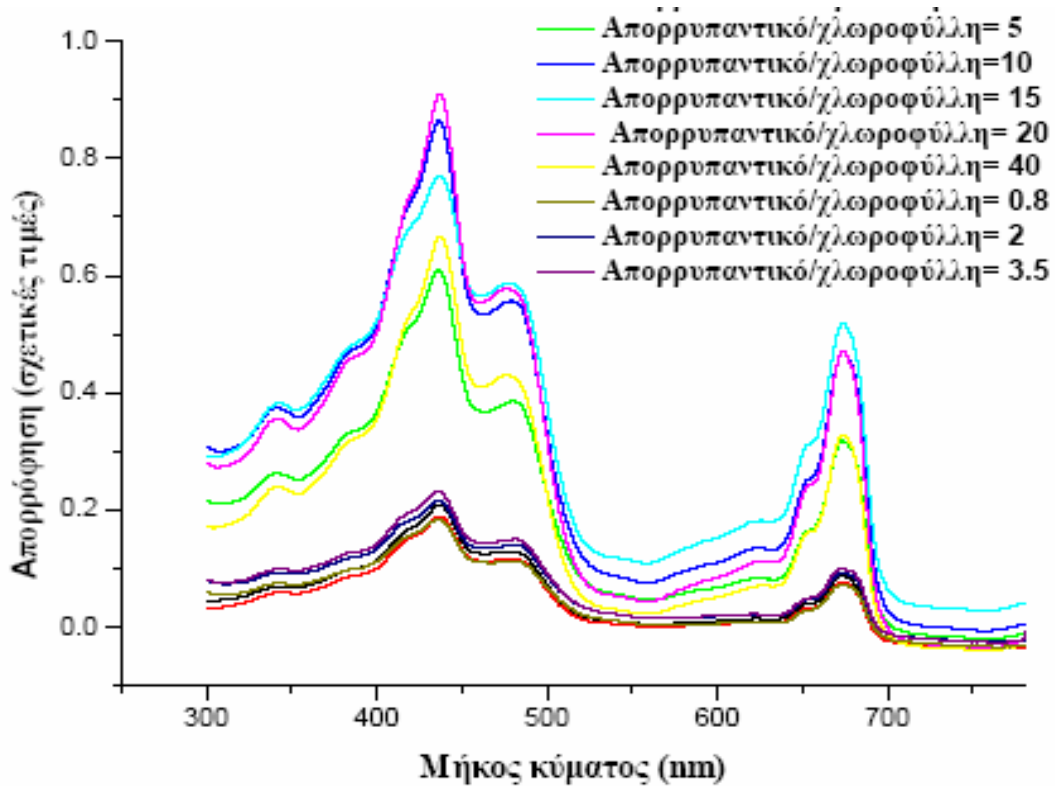
3.2. Φασματοσκοπία ορατού

Ο σκοπός της λήψης φασμάτων ήταν να χαρακτηρίσουμε τα υπερκείμενα στις διάφορες αναλογίες του απορρυπαντικού. Αυτό έγινε αρχικά σε υπερκείμενα-ιζήματα για διάφορους λόγους, ενώ στη συνέχεια λήφθηκαν φάσματα από δείγματα ζωνών διαβάθμισης ζάχαρης και τέλος από μεταχειρήσεις HL, LL, HLsper, LLputr με λόγο στα δύο τελευταία απορρ./χλωρ. ίσο με 15.

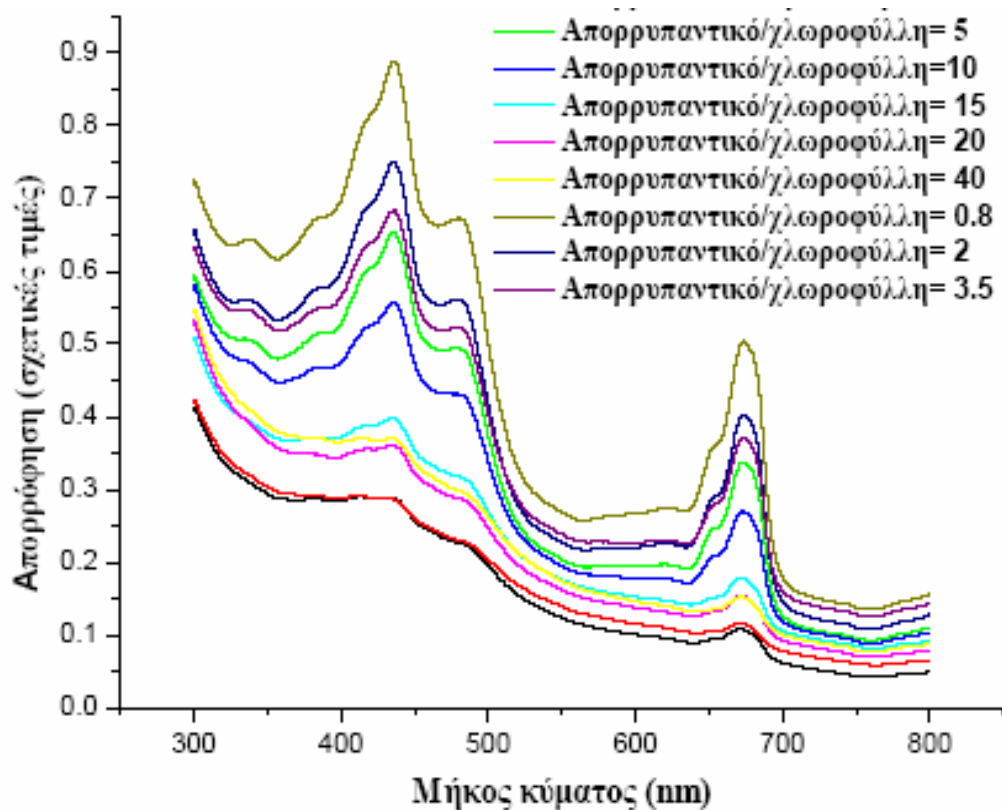
3.2.1. Υπερκείμενα-ιζήματα διαφόρων λόγων

Τα φάσματα που ελήφθησαν στο ορατό, χρησιμοποιήθηκαν για να αξιολογηθεί η απόδοση των διαλυτοποιήσεων, στις οποίες η ποσότητα του απορρυπαντικού που χρησιμοποιήθηκε υπολογίστηκε με βάση τις ολικές χλωροφύλλες που περιέχονταν στο προς διαλυτοποίηση δείγμα μεμβρανών.

Παρακάτω παρατηρούμε φάσματα που ελήφθησαν στο ορατό φως, σε υπερκείμενα και σε ιζήματα, αντίστοιχα, σε ένα εύρος διαφορετικών τιμών απορρυπαντικού προς χλωροφύλλη.



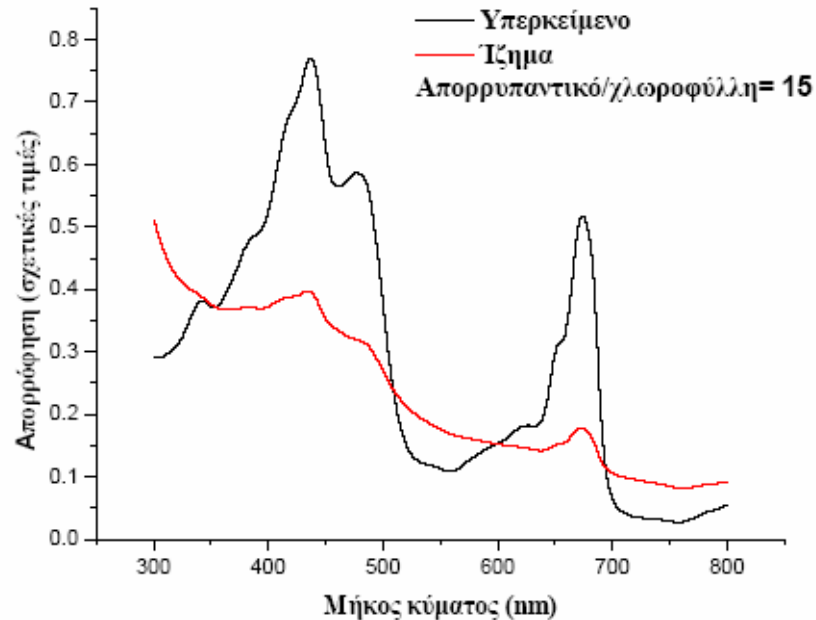
Σχήμα 1: Λήψη φασμάτων στο ορατό από υπερκείμενα.



Σχήμα 2: Λήψη φασμάτων στο ορατό από ιζήματα.

Ένα σημαντικό στοιχείο που πρέπει να τονιστεί είναι η σαφής διαφοροποίηση της μορφής των φασμάτων μεταξύ υπερκειμένων και ιζημάτων. Στην περίπτωση των υπερκειμένων (σχήμα 1), οι χαρακτηριστικές κορυφές κοντά στα 435nm και 680nm για τη χλωροφύλλη α και στα 480nm και 645nm για τη χλωροφύλλη β, των φασμάτων ξεχωρίζουν έντονα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες κορυφές των φασμάτων των ιζημάτων. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω της αυξανόμενης ισχύς της διαλυτοποίησης (λόγος απορρυπαντικού/χλωροφύλλης), περιμένουμε περισσότερο υλικό να βρίσκεται στο υπερκείμενο, δηλαδή περισσότερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, άρα και περισσότερες χλωροφύλλες που είναι προσδεμένες σε αυτά, σε σχέση με το ίζημα. Κάτι ανάλογο παρατηρούμε και στην περίπτωση σύγκρισης φασμάτων υπερκείμενων μεταξύ τους καθώς και στην περίπτωση φασμάτων ιζημάτων μεταξύ τους, τα οποία αναφέρονται σε διαφορετικές συνθήκες διαλυτοποίησης (λόγος απορρυπαντικού/χλωροφύλλης).

Στην περίπτωση των ιζημάτων (σχήμα 2), αυξανόμενης της ποσότητας της διαλυτοποίησης, τα αντίστοιχα δείγματα έχουν μικρότερη απορρόφηση. Στην περίπτωση των υπερκειμένων (σχήμα 1) ισχύει ακριβώς η αντίστροφη σχέση.



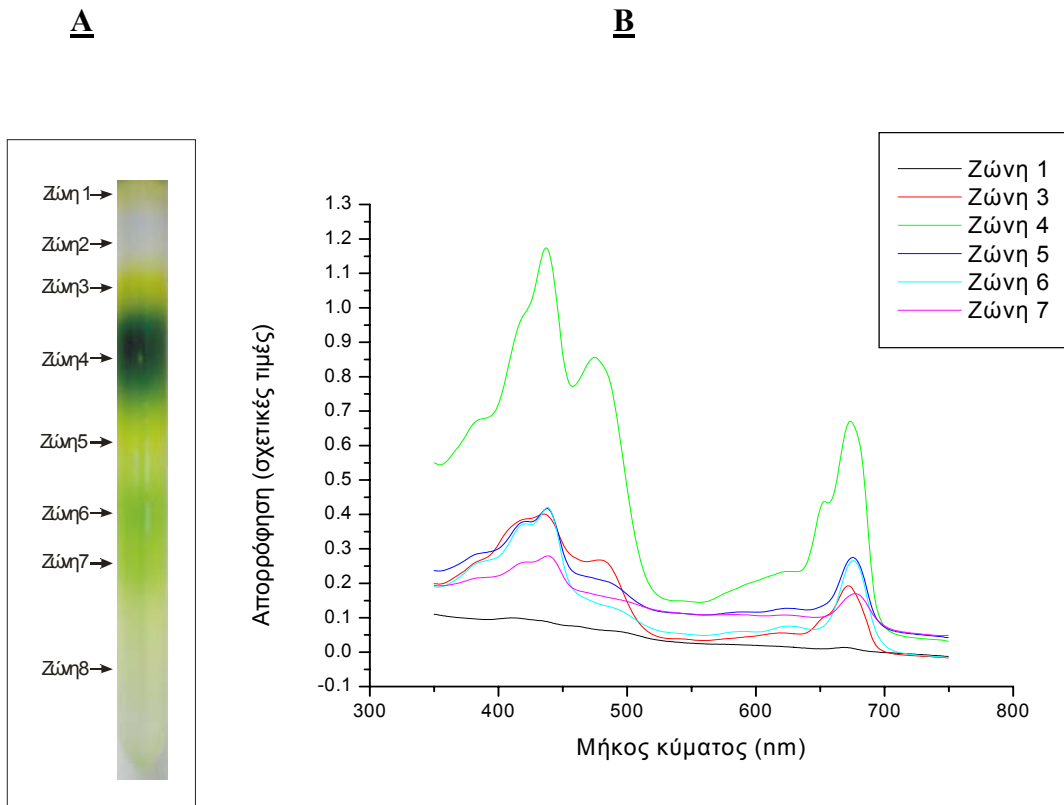
Σχήμα 3: Σύγκριση φασμάτων ορατού μεταξύ υπερκειμένου και ιζήματος αναφορικά με τον λόγο απορρυπαντικού/χλωροφύλλης ίσο με 15.

Σύμφωνα με τα φάσματα του σχήματος 3 μπορούμε να διαπιστώσουμε από τη σύγκριση μεταξύ υπερκειμένου και ιζήματος, το πόσο καλή είναι η διαλυτοποίηση, με τον λόγο απορρ./χλωρ. 15, εφόσον στο ίζημα δεν παραμένει σχεδόν καθόλου ποσότητα χλωροφύλλης, ενώ το μεγαλύτερο μέρος από αυτή βρίσκεται στο υπερκειμένο. Η επιλογή του συγκεκριμένου λόγου έγινε με βάση τα αποτελέσματα σύγκρισης των φασμάτων (βλέπε παραπάνω) καθώς και με βάση τα αποτελέσματα της πρώτης μη αποδιατακτικής διάστασης BN/PAGE (βλ. §3.1).

3.2.2. Διαβάθμιση ζάχαρης

Η διαβάθμιση ζάχαρης είχε ως σκοπό την κλασματοποίηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων.

Στο σχήμα 4, φαίνονται τα φάσματα από τις ζώνες διαβάθμισης ζάχαρης εύρους 0,1-0,7M. Από τα φάσματα προκύπτει ότι η ζώνη 4 έχει την περισσότερη ποσότητα χλωροφύλλης α και β, όπως φαίνεται από τις κορυφές στο φάσμα στα 435nm και 680nm για τη χλωροφύλλη α και στα 480nm και 645nm για τη χλωροφύλλη β. Σε σύγκριση με τις άλλες ζώνες που δεν παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο και το οποίο μπορεί να διαπιστωθεί και με το έντονα χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα που διακατέχει την ζώνη 4 (εικόνα 11A). Επίσης η ζώνη 1 που περιέχει καροτενοειδή και ξανθοφύλλες, λόγω της απορρόφησης παρατηρείται ότι είναι σχεδόν ευθεία γιατί δεν περιέχει σχεδόν καθόλου χλωροφύλλη (πολύ μικρό ποσό).



Σχήμα 4: **A:** σχηματική απεικόνιση διαβάθμισης ζάχαρης, **B:** Σύγκριση φασμάτων ορατού μεταξύ ζωνών από διαβάθμιση ζάχαρης 0,1-0,7M, με λόγο απορρυπαντικού/χλωροφύλλης ίσο με 15.

Ο πίνακας 5, επιβεβαιώνει την αύξηση των εντάσεων των κορυφών (ζώνη 4) στα παραπάνω μήκη κύματος που αναφέρθηκαν, καθώς οι ζώνες 3 και ειδικά η 4 χαρακτηρίζονται από μεγάλα ποσά χλωροφύλλης. Επίσης, είναι αξιοσημείωτο το

αυξανόμενο κλάσμα chl_a/chl_b (αναλογία χλωροφύλλης α προς χλωροφύλλη β), το οποίο παρατηρείται στις ζώνες 5,6 και 7 σε αντίθεση με τις ζώνες 3 και 4, όπου το ποσοστό της χλωροφύλλης α υπερσχύει σε σύγκριση πάντα με τη χλωροφύλλη β.

Ζώνη	chl_a (μg)	chl_b (μg)	chl(a+b) (μg)	chl_a/chl_b
1	1.52	2.09	3.61	0.73
3	8.34	11.05	19.39	0.75
4	98.52	60.08	158.60	1.64
5	12.01	5.60	17.61	2.14
6	14.68	4.70	19.38	3.12
7	12.06	6.10	18.16	1.98

Πίνακας 5: Αναλογία χλωροφύλλης α και β ,καθώς και ολικών χλωροφυλλών σε κάθε ζώνη, απομονωμένες από τη διαβάθμιση ζάχαρης.

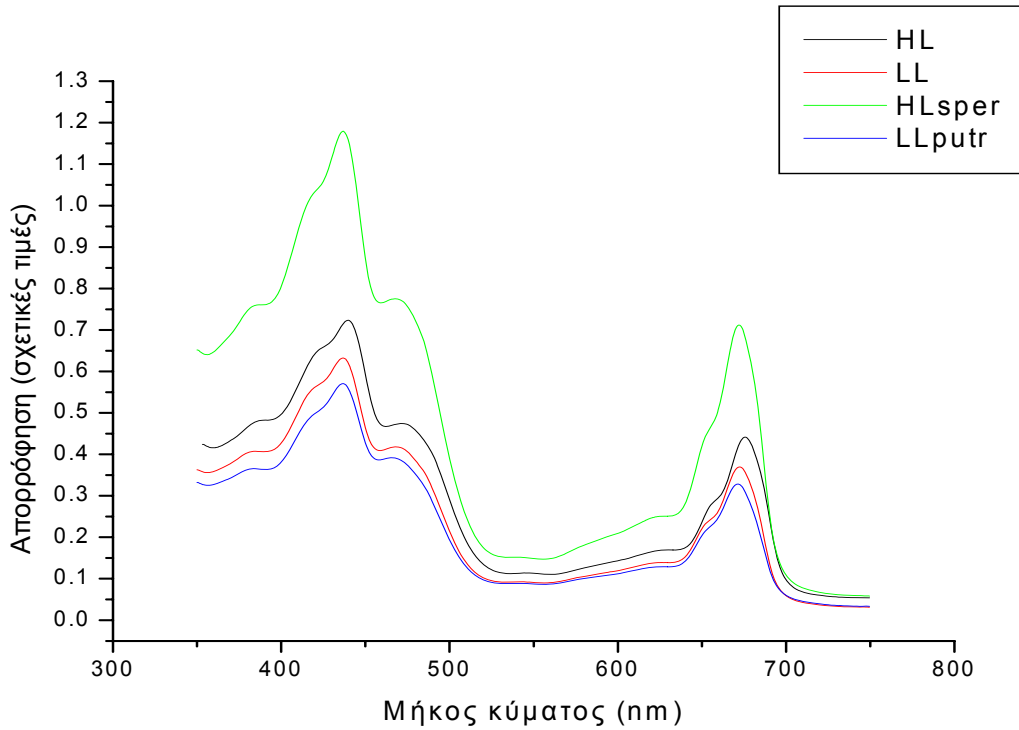
3.2.3. Μεμβράνες σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού, με λόγο απορρ./χλωρ.15.

Στόχος μας ήταν να παρατηρήσουμε την συμπεριφορά των μεμβρανών σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και την επιρροή που εμφανίζουν μέσω πολυαμινών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία περιμένουμε την εμφάνιση παρόμοιας συμπεριφοράς στα ζεύγη των εντάσεων υψηλού φωτισμού (HL) και χαμηλού φωτισμού με τη πολυαμίνη πουτρεσίνη (LLputr) , καθώς και του χαμηλού φωτισμού (LL) με τον υψηλό φωτισμό με σπερμίνη (HLsper), [21,22].

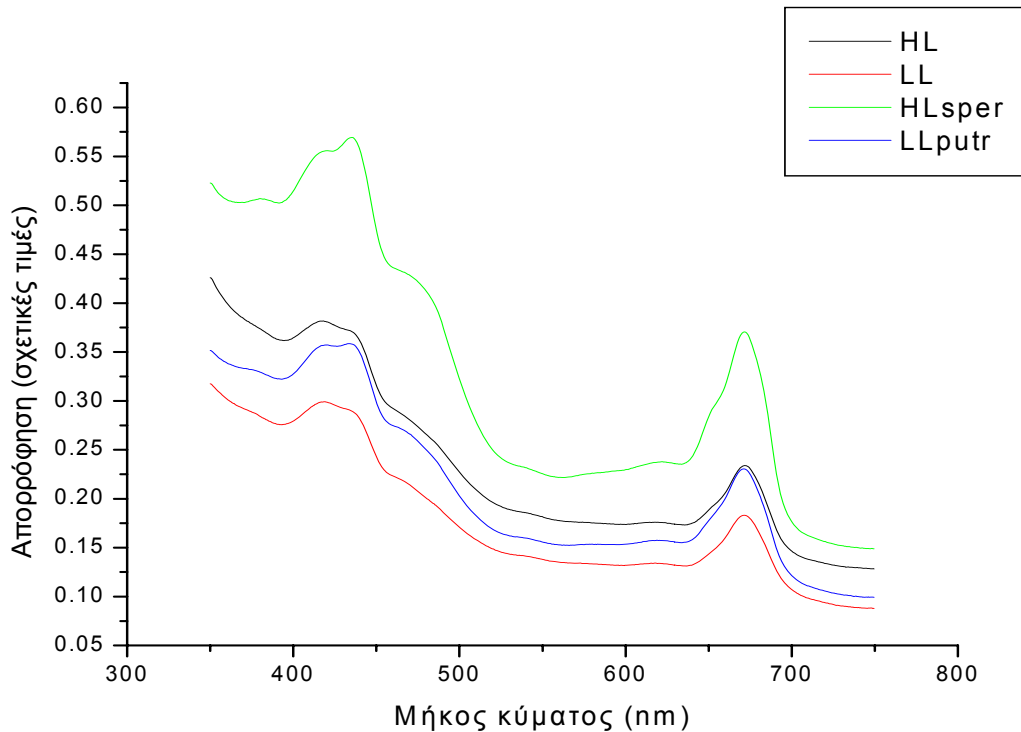
Και εδώ όπως και στην παράγραφο 3.2.1, είναι σαφής η διαφοροποίηση της μορφής των φασμάτων μεταξύ υπερκειμένων και ιζημάτων. Στην περίπτωση των υπερκειμένων (σχήμα 5A), οι χαρακτηριστικές κορυφές των φασμάτων ξεχωρίζουν έντονα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες κορυφές των φασμάτων των ιζημάτων. Συνεπώς, η απομόνωση της χλωροφύλλης μετά την διαλυτοποίηση μέσα στο υπερκείμενο ήταν επιτυχής. Επίσης, παρατηρείται μια αλλαγή στη διπλή κορυφή μεταξύ των μεταχειρήσεων στα 435nm, όπου αυτή η διπλή κορυφή εμφανίζεται να είναι όμοια στις εντάσεις υψηλού και χαμηλού φωτισμού με τις πολυαμίνες σπερμίνη και πουτρεσίνη αντίστοιχα_(HLsper,LLputr) και διαφέρει από την διπλή κορυφή των εντάσεων υψηλού και χαμηλού φωτισμού χωρίς πολυαμίνες (HL,LL) που και εδώ τυγχάνει να είναι όμοια. Βέβαια αυτή η διαφορά πιθανότατα να οφείλεται στις ιδιότητες των πολυαμινών, [39].

Συνεπώς, από τα πρώτα αποτελέσματα που έγιναν, έρχεται σε αντιπαράθεση η αναμενόμενη ομοιότητα μεταξύ του υψηλού φωτισμού (HL) και του χαμηλού φωτισμού με πουτρεσίνη (LLputr), καθώς και του χαμηλού φωτισμού (LL) με τον υψηλό φωτισμό με σπερμίνη (HLsper).

A



B



Σχήμα 5: **A:** Λήψη φασμάτων στο ορατό από υπερκείμενα., **B:** Λήψη φασμάτων στο ορατό από ιζήματα, με τον λόγο απορρυπαντικού/χλωροφύλλης ίσο με 15 για μεμβράνες HL,LL,HLsper,LLputr.

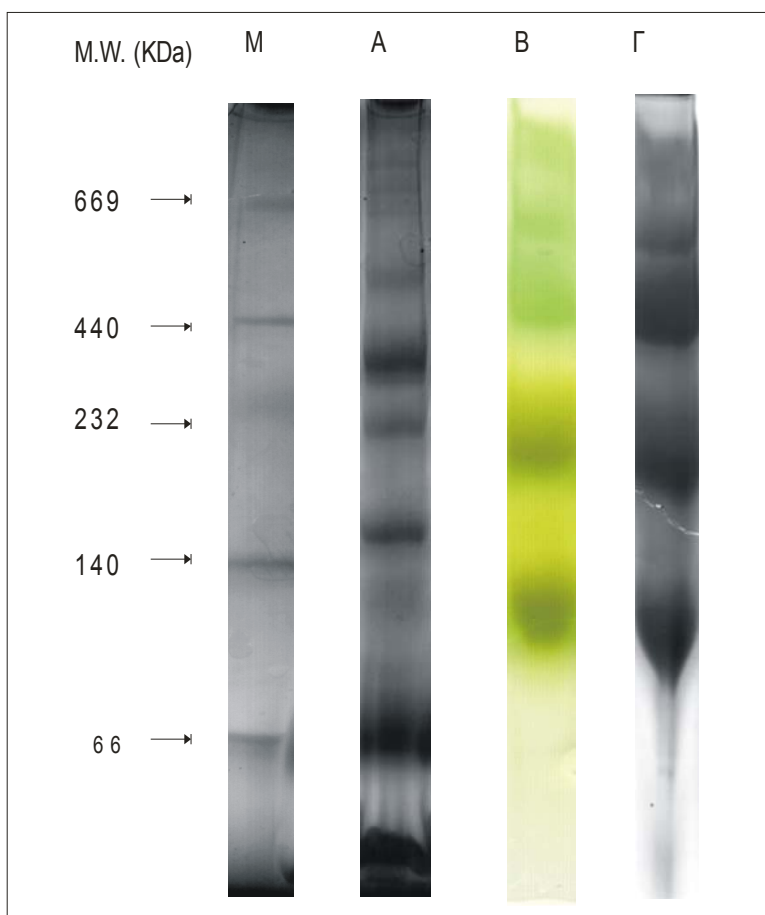
Όσο για την ένταση των κορυφών μεταξύ των φασμάτων των υπερκειμένων, δικαιολογείται από τον παρακάτω πίνακα 6, όπου φαίνονται τα διαφορετικά ποσοστά χλωροφύλλης που υπάρχουν μέσα στο κάθε δείγμα μας για κάθε μεταχείριση ξεχωριστά. Έτσι λοιπόν, από τον πίνακα φαίνεται ότι σε όλες τις μεταχειρίσεις η χλωροφύλλη α υπερισχύει της χλωροφύλλης b και μάλιστα αυτή η διαφορά γίνεται εντονότερη στο HL και μετά στο HLsper. Σε αυτά τα δύο παρουσιάζεται και το μεγαλύτερο ποσοστό σε ολικές χλωροφύλλες, πράγμα που είδαμε και στα φάσματα παραπάνω.

Χλωροφύλλη	HL	LL	HLsper	LLputr
Chla (μg chl /μl θυλακ)	2.63	1.38	1.85	0.78
Chlb(μg chl /μl θυλακ)	1.89	1.29	1.40	0.83
Chl(a+b)(μg chl /μl θυλακ)	4.53	2.66	3.25	1.61
Chla/Chlb	1.39	1.13	1.34	1.04

Πίνακας 6: Αποτελέσματα αναλογίας χλωροφύλλης a και b ,καθώς και ολικών χλωροφυλλών σε συνθήκες διαφορετικής έντασης φωτός, HL,LL,HLsper,LLputr. Chla/chlb είναι ο λόγος της χλωροφύλλης a προς τη χλωροφύλλη b.

3.3. Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση CN/PAGE

Από τις λωρίδες παρατηρούμε ότι στη μη αποδιατακτική ηλεκτροφορητική ανάλυση διακρίνονται περισσότερες ζώνες σε αντίθεση με το Green-native PAGE (σχεδόν διπλάσιες στον αριθμό), όπου ο αριθμός τους δεν άλλαξε μετά από χρώση του Green-native με Coomassie. Επίσης, παρατηρούμε ότι στο Green-native PAGE, τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα είναι πιο συμπυκνωμένα μεταξύ τους και μετατοπισμένα προς τα πάνω, και να χάνονται κάποιες ζώνες στα μεγάλα μοριακά βάρη. Η διαφοροποίηση, μπορεί να οφείλεται αποκλειστικά και μόνο, στην μπλε χρωστική Coomassie, όπου με το θετικό φορτίο της που κουβαλάει, να καταφέρνει να διαχωρίζει καλύτερα τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα ,με αποτέλεσμα να φαίνονται περισσότερες ζώνες στο A απ'ότι στο B, [40].



Εικόνα 7: Η διαβάθμιση των συγκεκριμένων πηκτών πολυακρυλαμιδίου είναι 4%-13%. **A:** Μη αποδιατακτική ηλεκτροφορητική ανάλυση (Blue- native PAGE) διαλυτοποιημένων θυλακοειδών μετά από χρώση με τη μπλε χρωστική Coomassie. **B:** Μη αποδιατακτική ηλεκτροφορητική ανάλυση (Green-native PAGE/πρώτη διάσταση) διαλυτοποιημένων θυλακοειδών. **Γ:** Μη αποδιατακτική ηλεκτροφορητική ανάλυση (Green-native PAGE/πρώτη διάσταση) διαλυτοποιημένων θυλακοειδών, μετά από χρώση με τη μπλε χρωστική Coomassie. **M:** είναι ο μάρτυρας.

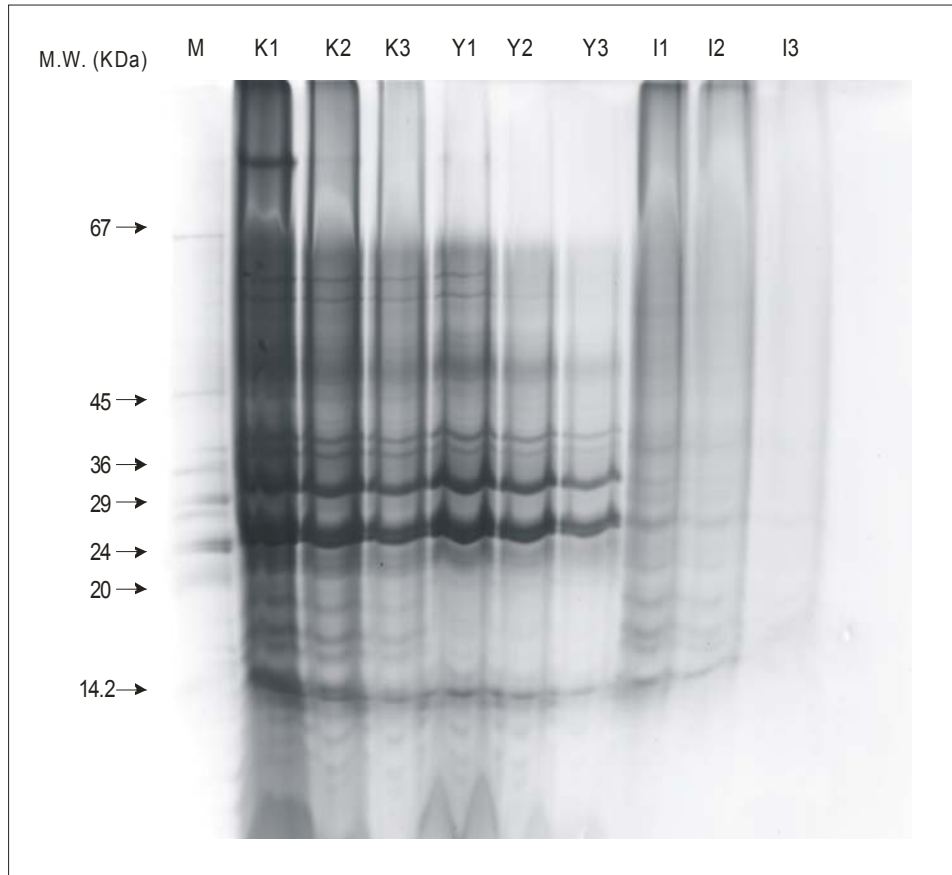
3.4. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (1D-SDS-Tricine /PAGE)

Η διαδικασία της αποδιατακτικής ηλεκτροφορητικής ανάλυσης ,χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των μεμβρανών καθώς και των υπερκειμένων και του ιζήματος από διαλυτοποιημένες μεμβράνες, σε διάφορες αραιώσεις.

Σε κάθε πηγάδι φορτώνονται 75μg χλωροφύλλης. Αντιθέτως, μετά τις αραιώσεις ,αυτή η συγκέντρωση της χλωροφύλλης θα πέσει στο 50% και στο 25% μετά την δεύτερη αραιώση.

Μετά ακολούθησαν άλλες δύο αραιώσεις και για τα τρία (μεμβράνες,

υπερκειμένα και ιζήματα) με διάλυμα ομογενοποίησης (βλ. §2.1.III) σε αναλογία 1:1 με τα δείγματα. Το αποτέλεσμα που προέκυψε φαίνεται παρακάτω στην εικόνα 8.



Εικόνα 8: Η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου στις πηκτές στοίβαξης και διαχωρισμού είναι 4% και 10% αντίστοιχα. Με M είναι ο μάρτυρας ,με K συμβολίζονται οι μεμβράνες , ενώ για τις διαλυτοποιημένες μεμβράνες ,με Y το υπερκειμένο και I το ίζημα. Αντίστοιχα τα νούμερα 1, 2, 3 είναι το αρχικό , μετά από 1^η αραίωση και μετά από 2^η αραίωση.

Από την εικόνα διαπιστώνουμε ότι η ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών γίνεται ολοένα και πιο ασθενέστερη, μετά από κάθε αραίωση. Επίσης, η έντονη ζώνη πάνω από τα 67 kDa (K1) για τις αδιάλυτες μεμβράνες, εξαφανίζεται στα υπόλοιπα, είτε λόγω απορρυπαντικού, είτε λόγω αραίωσης. Επίσης, είναι εμφανής η ομοιότητα που υπάρχει μεταξύ αδιάλυτων μεμβρανών και υπερκειμένου. Σε αντίθεση με το ίζημα όπου δεν υπάρχουν ζώνες, εκτός από κάποιες στα χαμηλά μοριακά βάρη, πράγμα που είναι επιθυμητό να μην υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες στο ίζημα μας, αφού επιδιώκουμε την ύπαρξη τους στο υπερκειμένο. Αυτό βέβαια εξαρτάται από το πόσο καλή είναι η

διαλυτοποίηση των θυλακοειδών μεμβρανών. Επίσης, αυτές οι ζώνες χαμηλού μοριακού βάρους που εμφανίζονται στο ίζημα (I_1), υπάρχουν και στις μεμβράνες αλλά όχι και στο υπερκείμενο. Συνεπώς, τόσο μικρές πρωτεΐνες είναι δύσκολο να απομονωθούν μετά από διαλυτοποίηση.

Τέλος, θα μπορούσε να πει κανείς, ότι οι δύο ζώνες κοντά στα 60 kDa χάνονται στο υπερκείμενο μετά από αραιώση, πιθανότατα λόγω μικρότερης χλωροφύλλης στο δείγμα και συνεπώς και πρωτεΐνης, με συνέπεια να χάνεται το σήμα. Παρόμοιο φαινόμενο παρουσιάζεται και στις πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (κάτω από 20 kDa), όπου και αυτές μετά από αραιώση γίνονται ασθενέστερες. Οι συγκεκριμένες όμως, εμφανίζονται μόνο στο ίζημα, ενώ δεν υπάρχουν στο υπερκείμενο, πράγμα που οφείλεται στο ότι δεν κατάφεραν να απομονωθούν μετά την διαλυτοποίηση και παρέμειναν στο ίζημα.

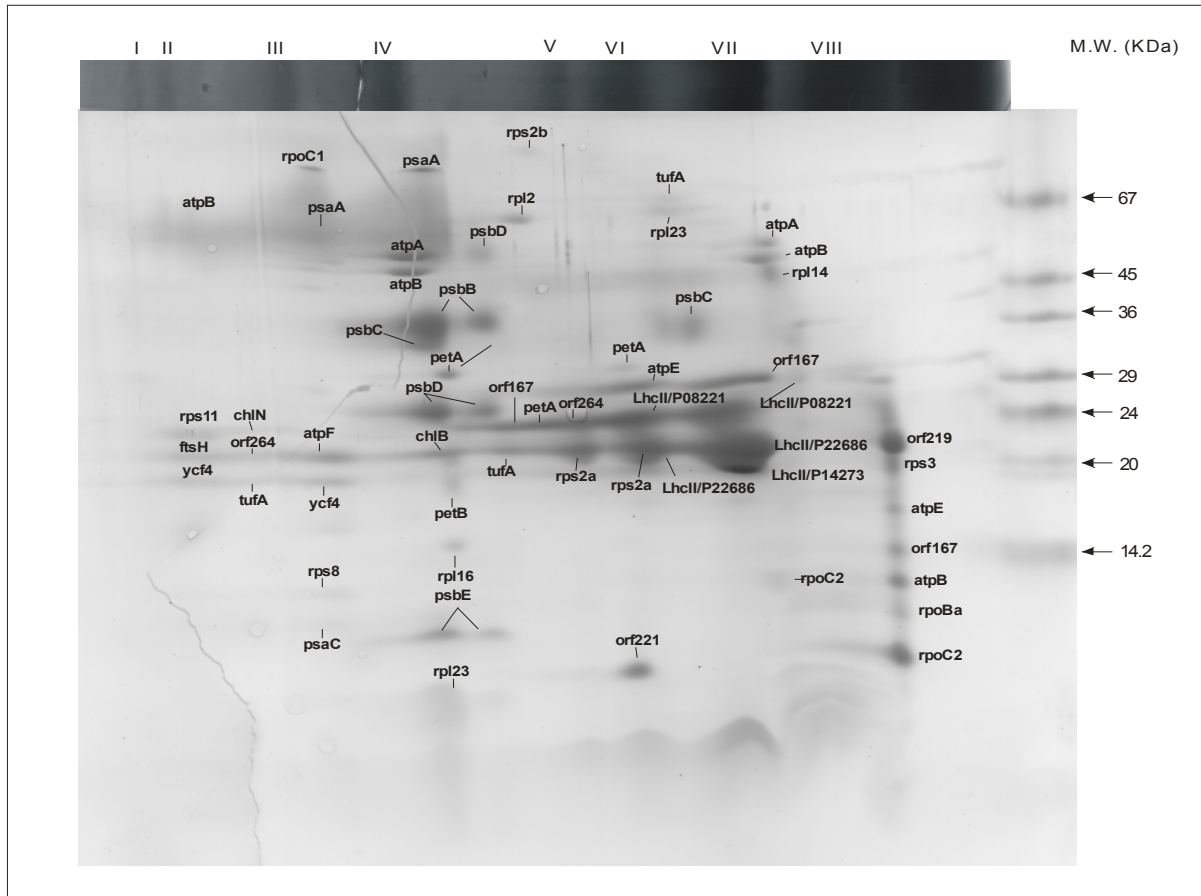
3.5. Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση

Όλα τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία διαχωρίστηκαν στη πρώτη διάσταση (BN/ PAGE) μεταφέρθηκαν και αναλύθηκαν στη δεύτερη διάσταση (αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, SDS-Tricine /PAGE) [32]. Έτσι λοιπόν, μετά από κολλοειδή χρώση coomassie και αποχρωματισμό της πηκτής, παρατηρήθηκαν 59 στίγματα (spots).

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 9), της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης SDS-Tricine /PAGE, η οποία προκύπτει από λωρίδα BN/PAGE, παρουσιάζονται οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες, που με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας μάζας (MALDI και ESI), καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε 33 διαφορετικά είδη μεμβρανικών πρωτεϊνών. Τα στίγματα αυτά κόπηκαν και αναμίχθηκαν με τρυψίνη και στη συνέχεια αναλύθηκαν με τη φασματοσκοπία μάζας. Πρόβλημα για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, υπήρξε στις περιπτώσεις που ο αριθμός των πεπτιδίων ήταν πολύ μικρός και λόγω του μεγάλου ποσού χρώσης coomassie που ανιχνευόταν στο στίγμα, πράγμα που αποφεύχθηκε μέσω του ESI.

Από την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών διαπιστώσαμε ότι στον οργανισμό υπάρχουν πολλές ριβοσωμικές πρωτεΐνες, ενώ εντοπίστηκαν και πρωτεΐνες που ανήκουν στο φωτοσύστημα I, φωτοσύστημα II και LCH II. Πολλές βέβαια, από τις πρωτεΐνες

αυτές, ανήκουν σε διαφορετική κατηγορία λόγω της λειτουργίας που προσφέρουν. Για παράδειγμα, κάποιες σχετίζονται με τον μεταβολισμό της ενέργειας, άλλες πάλι με τον μεταβολισμό του DNA και άλλες με την πρωτεϊνική σύνθεση.



Εικόνα 9: Η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου στις πηκτές στοίβαξης και διαχωρισμού είναι 4% και 10% αντίστοιχα. Με τους λατινικούς αριθμούς I,II,III,IV...είναι τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που παρουσιάζονται μέσα στη πηκτή Blue-Native/PAGE. Επίσης, φαίνονται τα ονόματα των πρωτεϊνών πάνω στη πηκτή SDS-Tricine/PAGE, που προέρχονται από κάθε σύμπλοκο.

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα I,II και III (εικόνα 9), περιέχουν πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στην πρωτεϊνική σύνθεση. Η ζώνη I περιλαμβάνει μία υπομονάδα της ATPase (*atpB*) και την πρωτεΐνη *ycf4*, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι οι μάντες μεγάλου μοριακού βάρους που παρατηρούνται στην πρώτη διάσταση, είναι υπερσύμπλοκα. Η ζώνη II περιλαμβάνει πρωτεΐνες που είναι σχετικές με την μετατροπή ενέργειας μέσα στον χλωροπλάστη. Οι πρωτεΐνες *atpA* και *atpB*, υπομονάδες της ATPase

προσδιορίζονται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με μοριακό βάρος κοντά στα 321 kDa. Επίσης, κοντά σε αυτές αναγνωρίστηκε και η *psaA*, η οποία είναι πρωτεΐνη του φωτοσυστήματος I

Στη συνέχεια, πρωτεΐνες που ανήκουν στο φωτοσύστημα II, όπως *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbE*, προέρχονται από την πρώτη διάσταση σε μοριακά βάρη ~280kDa για τον διμερή πυρήνα και ~220 kDa για τον μονομερή. Ενδιάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες του PSII εμφανίζεται το κυτόχρωμα *b₆/f* *petA* και *petB*, οριζόμενο ~250 kDa στην πρώτη διάσταση. Τέλος, οι πρωτεΐνες του LhcII προσδιορίζονται στις ζώνες VI και VII της πρώτης διάστασης με μοριακά βάρη ~120 kDa για τη πρώτη, όπου παριστάνει την τριμερή μορφή και ~68 kDa για τη δεύτερη που χαρακτηρίζεται από τη μονομερή μορφή του LhcII.

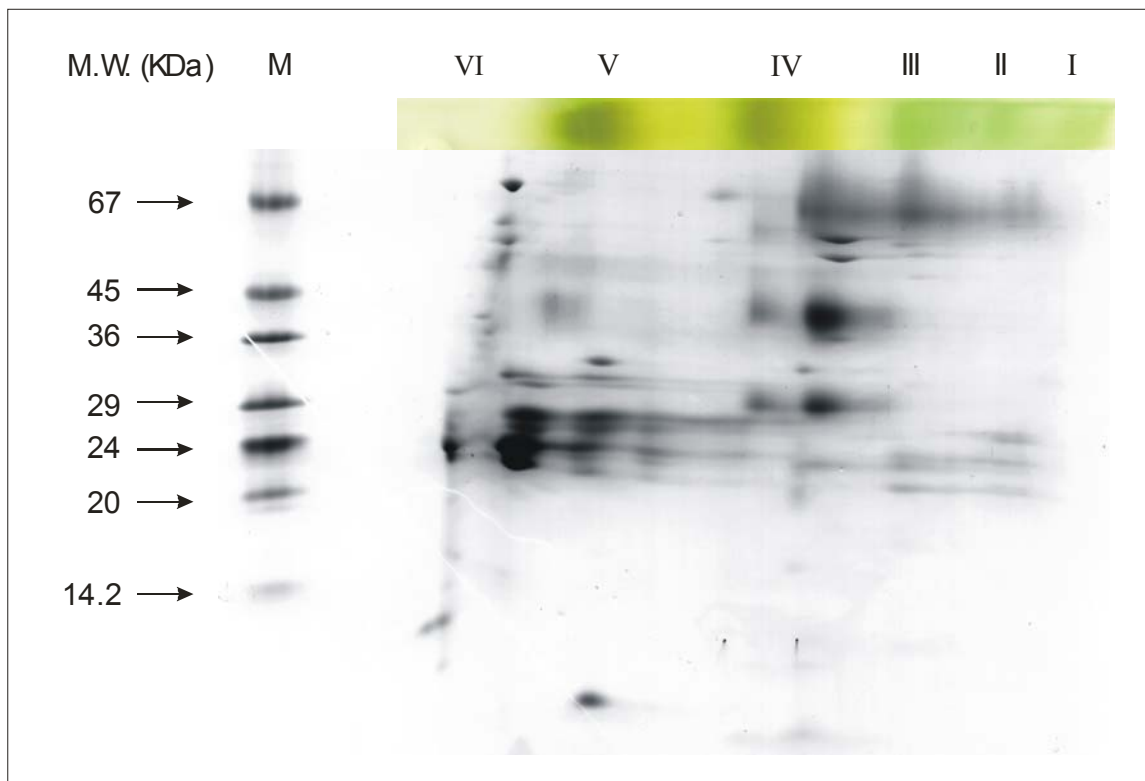
Τα περισσότερα από τα στίγματα της πηκτής αναγνωρίστηκαν και οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν ήταν οι αναμενόμενες και παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα που βρίσκεται στο παράρτημα. Έτσι λοιπόν, από τον πίνακα και την πηκτή (δεύτερη διάσταση) βλέπουμε ότι η *psaA* (P700 apoprotein A1) βρέθηκε κοντά στα 84 kDa, η οποία είναι ένα διμερές των μορίων χλωροφύλλης, [41,42], ενώ A1 (phylloquinone) είναι ένας ηλεκτρονιακός υποδοχέας, [43] που χρησιμοποιείται για την μεταφορά τους μέσα στο φωτοσύστημα I. Ενώ, άλλη μία πρωτεΐνη που εμφανίζεται στο φωτοσύστημα αυτό είναι η *psaC* (subunit VII) με μοριακό βάρος γύρω στα 104 kDa, δηλαδή ανήκει στο μονομερές του PSI.

Όσο για το φωτοσύστημα II παρατηρούνται, η *psbC* (CP43 chlorophyll apoprotein) στα 53 kDa, η *psbD* (D2 reaction center protein) στα 42 kDa, και η *psbB* (CP47 chlorophyll apoprotein) γύρω στο 58 kDa σύμφωνα και με τον πίνακα, [44]. Στη συνέχεια, για το LCH II βρέθηκαν η πρωτεΐνη *LhcII/P08221*, η *LhcII/P22686* και η *LhcII/P14273* (Chlorophyll a-b binding protein) οι οποίες παρατηρούνται σε μοριακό βάρος γύρω στο 27 kDa, με μικρή απόκλιση μεταξύ τους. Τέλος, εμφανίζονται τα κυτοχρώματα *b₆/f* (*petA* και *petB*) και *b559* (*psbE*) στα μοριακά βάρη 37,6 και 26,7 kDa για το πρώτο και στο 11,7 kDa για το δεύτερο.

Εξαίρεση βέβαια, αποτέλεσαν πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους (κάτω των 8-10 kDa), εκ των οποίων μόνο η *psbE* (4.4 kDa) κατάφερε να ταυτοποιηθεί, γνωρίζοντας το γεγονός ότι μικρές πρωτεΐνες είναι δύσκολο να ανιχνευθούν μέσω τρυψίνης.

Επιπρόσθετα, αναγνωρίστηκαν δύο πρωτεΐνες , η *ChlN* και η *ChlB* του γονιδιώματος, οι οποίες εμπλέκονται με την σύνθεση της χλωροφύλλης.

Στην αντίστοιχη πηκτή πολυακρυλαμιδίου (2D SDS-Tricine /PAGE), από λωρίδα Green-native PAGE, (δεν ταυτοποιήθηκε) παρατηρήθηκε ότι παρόλο που η λωρίδα περιλάμβανε λιγότερο αριθμό ζωνών, οπότε και πρωτεϊνικά σύμπλοκα, σημειώθηκε σχεδόν ο ίδιος αριθμός στιγμάτων (57 spots), δηλαδή πρωτεΐνες. Κατά συνέπεια λοιπόν ερχόμαστε παραδόξως στο παραπάνω συμπέρασμα ότι δεν χάνονται πρωτεϊνικά σύμπλοκα, αλλά ίσως είναι πιο συμπυκνωμένα και μετατοπισμένα προς τα πάνω. Η ανάλυση των φωτοσυνθετικών πρωτεϊνικών συμπλόκων της πρώτης διάστασης Green-Native /PAGE φαίνεται στην εικόνα 10, όπου και παρουσιάζεται το ίδιο μοτίβο πρωτεϊνών με αυτό της εικόνας 9. Βέβαια, υπάρχουν κάποιες διαφορές στα στίγματα, είτε είναι μετατοπισμένα, είτε δεν υπάρχουν. Για παράδειγμα στις πρωτεΐνες που προκύπτουν από το μέτωπο της λωρίδας ή το έντονο στίγμα στα 67 kDa κοντά στο VI, όπου δεν υπάρχει στη πηκτή από τη λωρίδα BN/PAGE, καθώς και το στίγμα που βρίσκεται στο κάτω μέρος της πηκτής , που προκύπτει από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο V είναι μετατοπισμένο σε σύγκριση με την εικόνα 9.



Εικόνα 10: Η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου στις πηκτές στοίβαξης και διαχωρισμού είναι 4% και 10% αντίστοιχα. Η υπομοναδική σύσταση των φωτοσυνθετικών πρωτεϊνικών συμπλόκων

της πρώτης διάστασης ,παρουσιάζεται με τους λατινικούς αριθμούς I, II, III, IV και V ,ενώ με VI είναι το μέτωπο του Green-Native πηκτώματος. M: είναι ο μάρτυρας.

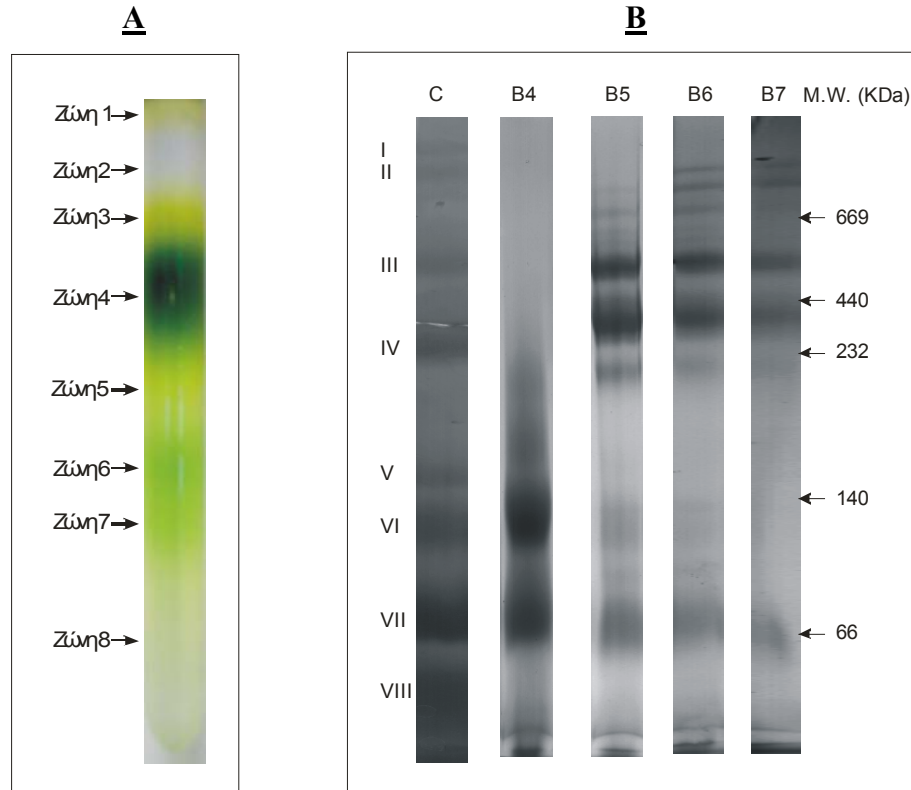
3.6. Διαβάθμιση ζάχαρης

3.6.1. Ανάλυση των συμπλόκων με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση

Στην εικόνα 11A, απεικονίζεται η διαβάθμιση ζάχαρης από τον οργανισμό *Scenedesmus Obliquus*, απ'όπου παρατηρούμε όσο πιο έντονο είναι το πράσινο χρώμα της ζώνης τόσο μεγαλύτερη η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη, συνεπώς οι λευκές ζώνες δεν περιέχουν καθόλου χλωροφύλλη. Στην ζώνη 1, εμπεριέχονται οι ξανθοφύλλες και τα καροτενοειδή.

Στην εικόνα 11B, φαίνεται η πηκτή της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφορητικής ανάλυσης (Blue- native PAGE), από τα κυριότερα κλάσματα της διαβάθμισης ζάχαρης (ζώνες 4,5,6,7) και έχοντας ως συγκριτικό μέσο, δείγμα control από τις διαλυτοποιημένες μεμβράνες.

Διακρίνονται ζώνες πρωτεϊνικών συμπλόκων, [29] μεγάλου μοριακού βάρους (πάνω από 669 kDa) χαρακτηρίζοντας το φωτοσύστημα I / φωτοσύστημα II, δηλαδή τα πολυ – υπομοναδικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα (supercomplexes), τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών και ανήκουν κυρίως στις ζώνες 5,6,7 από τη διαβάθμιση ζάχαρης. Επίσης, βλέπουμε πρωτεϊνικά σύμπλοκα μεταξύ του 200 και 550 kDa, που επίσης ανήκουν στις ζώνες 5,6,7 της διαβάθμισης ζάχαρης και αποτελούν μέρος του φωτοσυστήματος I και τον διμερή πυρήνα του φωτοσυστήματος II (550-600 kDa) ενώ συμμετέχουν πρωτεΐνες ATP-συνθέτασης (300 kDa), ο μονομερής πυρήνας του φωτοσυστήματος II (280 kDa) και πρωτεΐνες του κυτοχρώματος b6/f (250 kDa). Επιπροσθέτως, πρωτεϊνικά σύμπλοκα χαμηλότερου μοριακού βάρους που απαρτίζουν το LHCI (τριμερές LhcII γύρω στα 120 kDa και το μονομερές LhcII γύρω στα 70 kDa), ανήκουν αποκλειστικά στη ζώνη 4. Τέλος, συμπεραίνεται ότι, αν προστεθούν μεταξύ τους οι ζώνες που προκύπτουν από τα B₄,B₅,B₆,B₇ , παίρνουμε το ίδιο μοτίβο με τη λωρίδα του control.



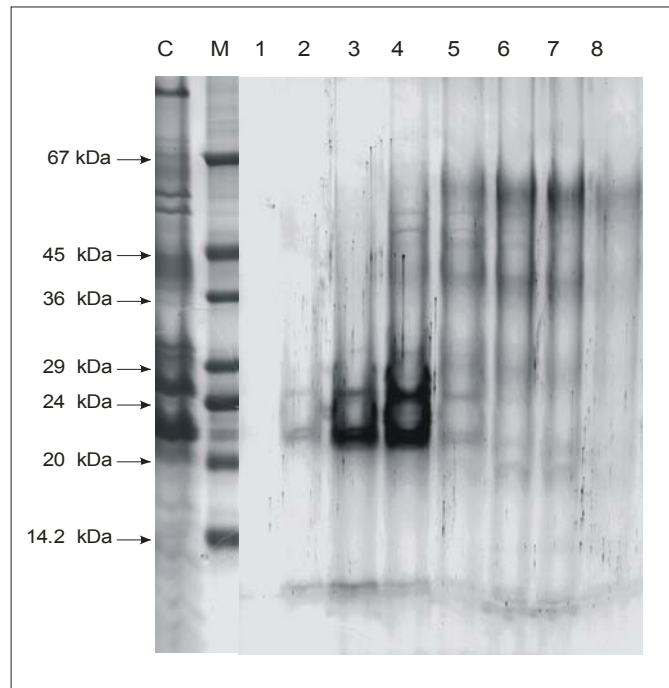
Εικόνα 11: **A:** σχηματική απεικόνιση διαβάθμισης ζάχαρης, **B:** Μη αποδιατακτική ηλεκτροφορητική ανάλυση (Blue- native PAGE), από τις ζώνες 4,5,6,7 της διαβάθμισης ζάχαρης. Με c συμβολίζεται το control (δείγμα υπερκειμένου διαλυτοποιημένων μεμβρανών) και με τους λατινικούς αριθμούς I,II,III,IV...είναι τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που παρουσιάζονται μέσα στη πηκτή.

3.6.2. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (1D)

Η ανάλυση των πρωτεϊνών των διαχωρισμένων ζωνών από τη διαβάθμιση ζάχαρης έγινε με αποδιατακτική ηλεκτροφορητική ανάλυση (SDS-Tricine/ PAGE). Σε όλες τις ζώνες της διαβάθμισης ζάχαρης, παρατηρήθηκε ότι οι χλωροφυλλικές πρωτεΐνες περιορίζονται στις ζώνες 3 έως 7 κυρίως λόγω πράσινου χρώματος. Επίσης, βλέπουμε ότι οι πρωτεΐνες που ανήκουν στο LHC II (~ 22 kDa), εντοπίζονται στην ζώνη 3 και 4. Σύμφωνα με το control παρουσιάζονται δύο πρωτεΐνες ~55-60 kDa ,οι οποίες χαρακτηρίζουν τα CP43 και CP47 του φωτοσυστήματος II, [44]. και αυτά παρουσιάζονται στις ζώνες 4,5. Ακόμα, παρατηρούμε αχνά κάποιες πρωτεΐνες ~40 kDa και στα ~60kDa , όπου αυτές επισημαίνονται κυρίως στις ζώνες 5,6,7. Αντιθέτως, χάνεται η μπάντα περίπου στα 85 kDa , που εμφανίζεται στο control, καθώς και στα 32

kDa η διπλή ζώνη στο control δεν φαίνεται ξεκάθαρα σε κάποιο από τα δείγματα της διαβάθμισης ζάχαρης.

Η καταβύθιση πρωτεϊνών με ακετόνη (100 μl δείγματος από κάθε ζώνη μέσα σε 300 μl ακετόνης) και στη συνέχεια φυγοκέντρωση για απομάκρυνση της ακετόνης και φόρτωση του πηγαδιού της πηκτής με 100μl sample buffer, δεν βελτίωσε τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, αφού χάνονταν πρωτεΐνες.

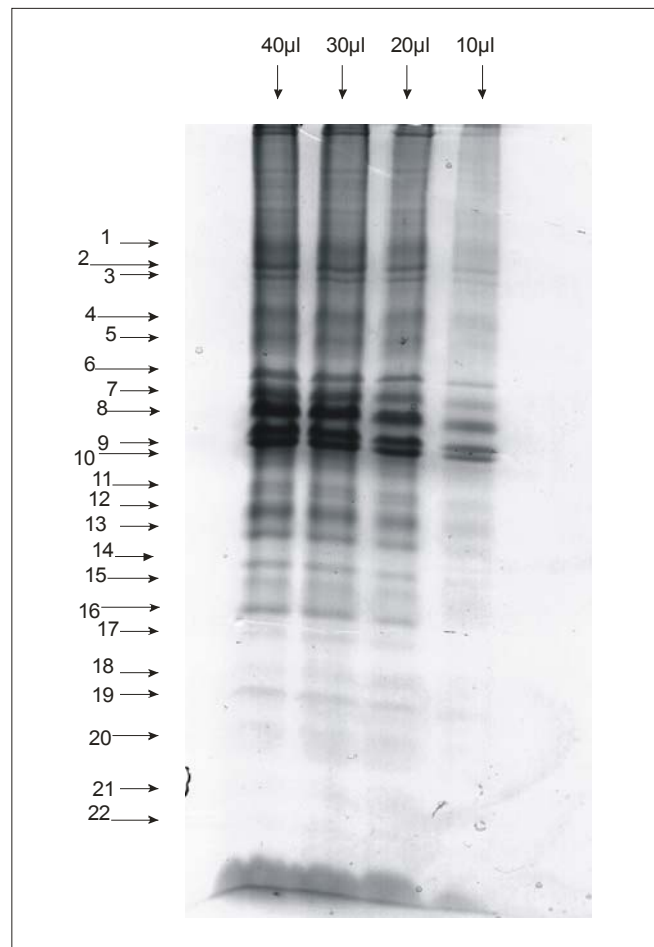


Εικόνα 12: Η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου στις πηκτές στοίβαξης και διαχωρισμού είναι 4% και 10% αντίστοιχα. Σχηματική απεικόνιση αποδιατακτικής ηλεκτροφορητικής ανάλυσης (SDS-Tricine/ PAGE), από όλες τις ζώνες της διαβάθμισης ζάχαρης . Με c συμβολίζεται το control (δείγμα υπερκειμένου διαλυτοποιημένων μεμβρανών) και M είναι ο μάρτυρας.

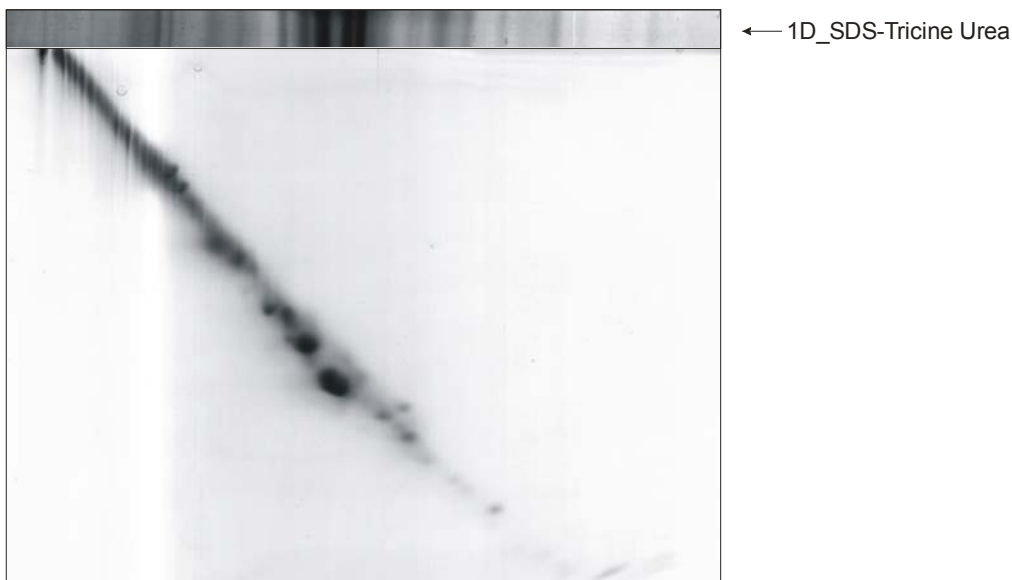
3.7. Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση

Το σύνολο των πρωτεϊνών σημειώθηκε και με την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση 2D_SDS-Tricine/PAGE, δια μέσου της πρώτης διάστασης με ουρία. Το αποτέλεσμα σε αυτή τη μέθοδο ήταν η αποτύπωση των πρωτεϊνών πάνω σε μία διαγώνιο. Στην εικόνα 14 παρατηρήθηκαν κάποιες ουρές που άφηναν τα στίγματα στην αρχή της διαγωνίου και το οποίο ενδεχομένως να οφειλόταν σε κακή προσκόλληση μεταξύ της λωρίδας και της πηκτής, με αποτέλεσμα τα σημεία να μην είναι τόσο

διακριτά. Σαφώς, διαπιστώνεται ότι η ποσότητα των 30μl, έχει καλά αποτελέσματα, σε ένταση στιγμάτων και ευκρίνεια, όπως και στο σύνολο των πρωτεϊνών (εικόνα 13). Η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου στις πηκτές στοίβαξης και διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3% και 10% αντίστοιχα και 6M ουρίας για τη πρώτη διάσταση της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης SDS-Tricine /PAGE. Ενώ, για τη δεύτερη διάσταση SDS-Tricine /PAGE χρησιμοποιήθηκαν, 3% πολυακρυλαμίδης για τη πηκτική στοίβαξης και 16.5% πολυακρυλαμίδης για τη πηκτική διαχωρισμού .



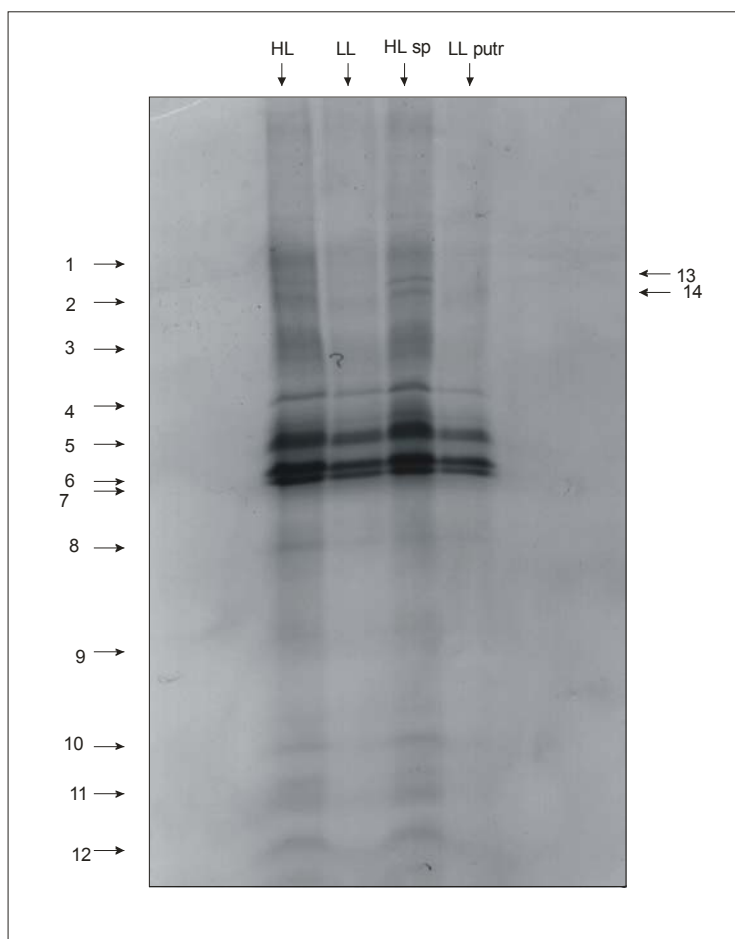
Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση αποδιατακτικής ηλεκτροφορητικής ανάλυσης 1D_SDS-Urea-Tricine/ PAGE, από δείγματα μεμβρανών LL σε διάφορες συγκεντρώσεις (10μl,20μl,30μl και 40μl). Οι αριθμοί 1 έως 22 συμβολίζουν τον αριθμό των πρωτεϊνών που έχουν το ίδιο μοριακό βάρος.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση 2D_SDS-UREA/SDS-Tricine PAGE, από λωρίδα 30μl .

Σαν δεδομένο από σχετικές έρευνες που έχουν γίνει, σε υψηλή ένταση φωτισμού έχουμε σχετικά μικρή κεραία και αφθονία ενεργών κέντρων αντίδρασης, όπως συμβαίνει και με μεγάλη σχετική συγκέντρωση πουτρεσίνης, ενώ σε χαμηλή ένταση φωτισμού παρατηρείται η αντίθετη απόκριση, ακριβώς όπως συμβαίνει και με μεγάλη σχετική συγκέντρωση σπερμίνης, [45,46,47,48]. Έτσι λοιπόν, πάλι από πρώτα πειράματα είδαμε ότι στη πηκτή θα έπρεπε να υπάρχει μία ομοιότητα μεταξύ HL και LLputr και μεταξύ LL με το HLsper, αφού θα έπρεπε να συμπεριφέρονται το ίδιο. Πράγμα που θα πρέπει να μελετηθεί με επανάληψη του πειράματος.

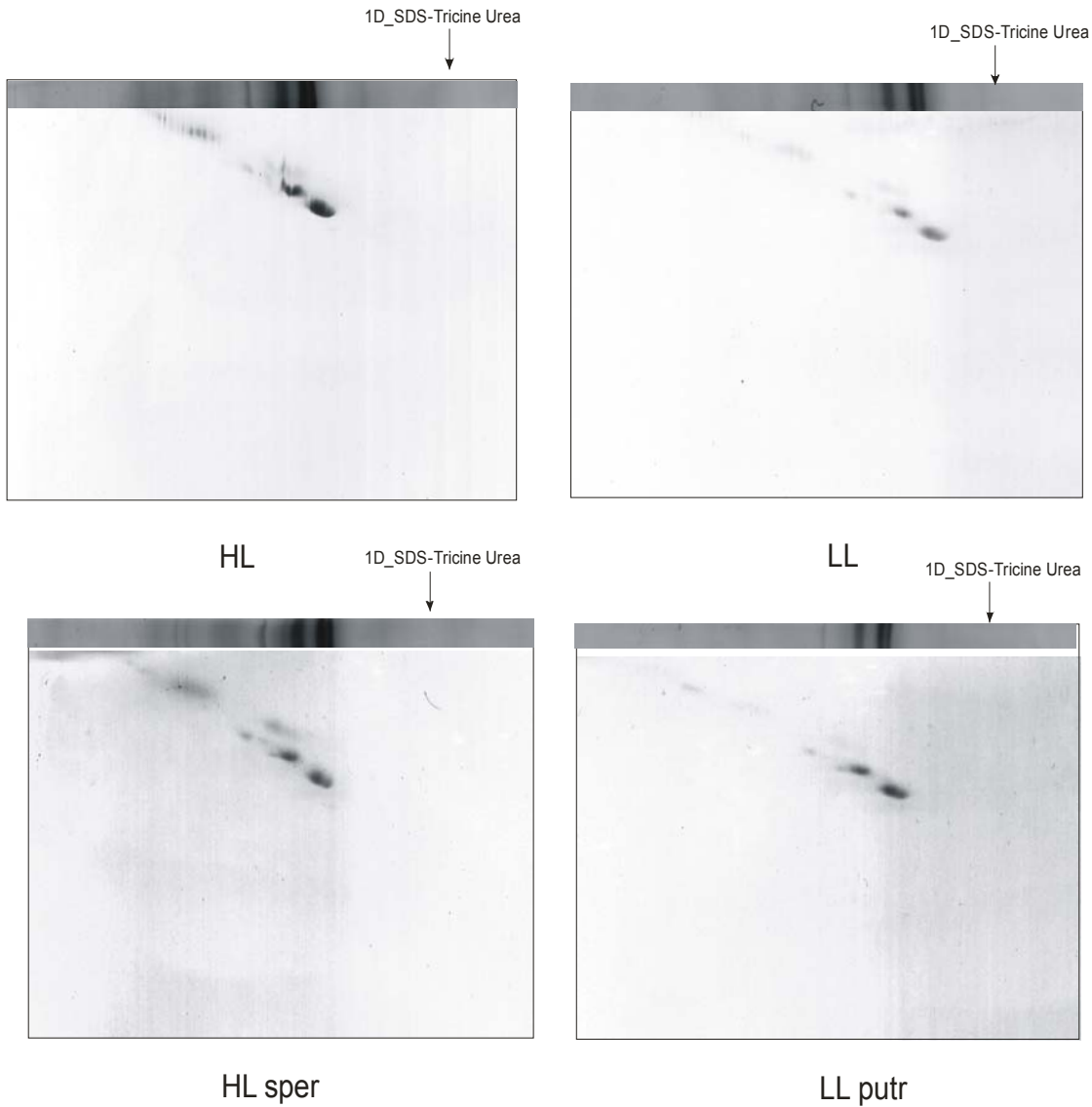
Η ανάλυση των πρωτεϊνών με την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση 1D_SDS-Tricine_UREA/PAGE έδειξαν πώς τα HL είναι όμοια μεταξύ τους, με ελαφριές διαφορές κυρίως σε μετατόπιση των ζωνών είτε προς τα πάνω, είτε προς τα κάτω και τα LL μεταξύ τους, με λιγότερες διακριτές ζώνες, αφού κάποιες από αυτές χάνονταν σε σύγκριση με τα HL.



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση αποδιατακτικής ηλεκτροφορητικής ανάλυσης 1D_SDS-Urea-Tricine/ PAGE, από μεμβράνες διαφορετικής έντασης φωτός (HL, LL, HLsper, LLputr). Οι αριθμοί 1 έως 14 συμβολίζουν τον αριθμό των πρωτεϊνών που έχουν το ίδιο μοριακό βάρος. Η συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου στις πηκτές στοίβαξης και διαχωρισμού παρέμειναν οι ίδιες, δηλαδή 3% και 10% για τη πρώτη διάσταση και 3% με 16.5% για τη δεύτερη διάσταση.

Ενώ, η ανάλυση με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση 2D_SDS-Tricine/PAGE έδειξε, ότι χάνονταν οι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (στο τελείωμα της διαγωνίου) σε όλες τις μεταχειρήσεις HL, LL, HLsper και LLputr, ενώ διαφορά υπήρχε στο HLsper, όπου φαίνονταν δύο στίγματα παραπάνω σε σύγκριση με τις άλλες τρεις μεταχειρίσεις και το οποίο φαίνεται χαρακτηριστικά και στην εικόνα 15 με τους αριθμούς 13,14. Οι ουρές έκαναν την εμφάνιση τους και εδώ σε ορισμένα στίγματα, κυρίως στην αρχή της διαγωνίου όπως χαρακτηριστικά διακρίνονται στην εικόνα 16 στη πηκτή του HL. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός της εντάσεως των στιγμάτων για κάθε μεταχείριση, πράγμα που δείχνει διαφορετική συγκέντρωση των πρωτεϊνών μέσα στο

δείγμα, παρότι η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν η ίδια για όλα τα δείγματα (30μg χλωροφύλλης).



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση αποδιατακτικής ηλεκτροφορητικής ανάλυσης 2D_SDS-UREA/SDS-Tricine PAGE από λωρίδα 1D_SDS-Tricine-UREA PAGE και για τις τέσσερις μεταχειρήσεις (HL, LL, HLsper, LLputr).

3.8. Σκέδαση Φωτός

Σκοπός της μεθόδου αυτής ήταν η μελέτη της δομής και των ταυτοποιημένων πρωτεϊνικών συμπλόκων, τα οποία προήλθαν από τις θυλακοειδείς μεμβράνες χλωροπλαστών του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*. Μέσω

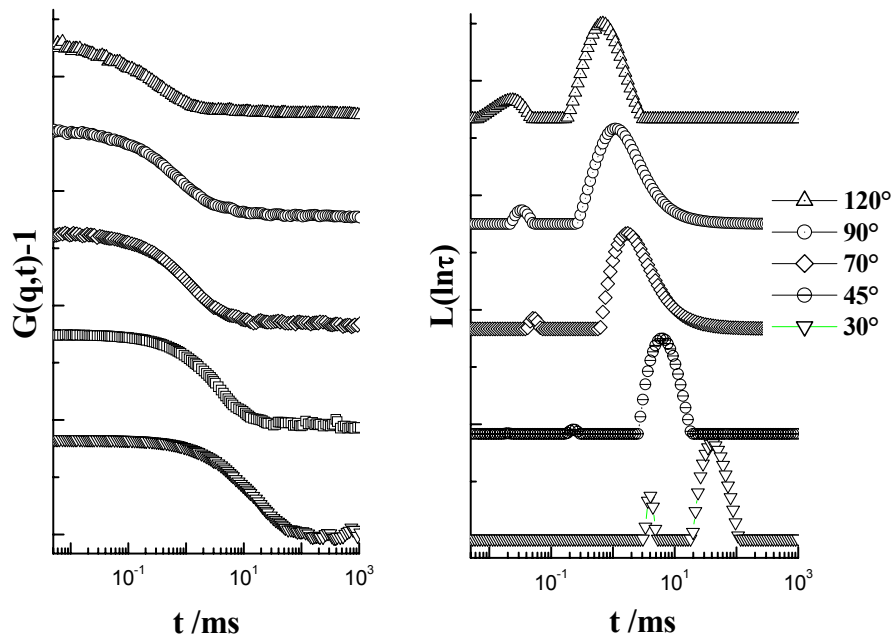
δυναμικών μετρήσεων βρέθηκαν οι συντελεστές διάχυσης και οι υδροδυναμικές ακτίνες των συμπλόκων, ενώ μέσω στατικών μετρήσεων βρέθηκαν οι γυροσκοπικές ακτίνες.

Αρχικά, αναλύθηκαν τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα θυλακοειδών μεμβρανών που έχουν διαχωριστεί με την μέθοδο της διαβάθμισης ζάχαρης.

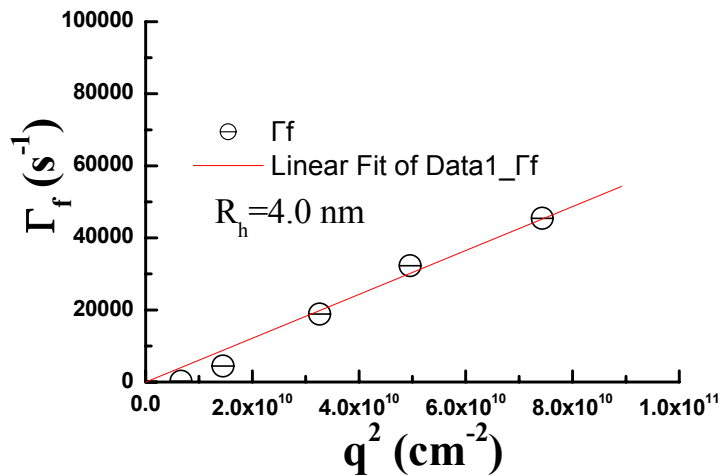
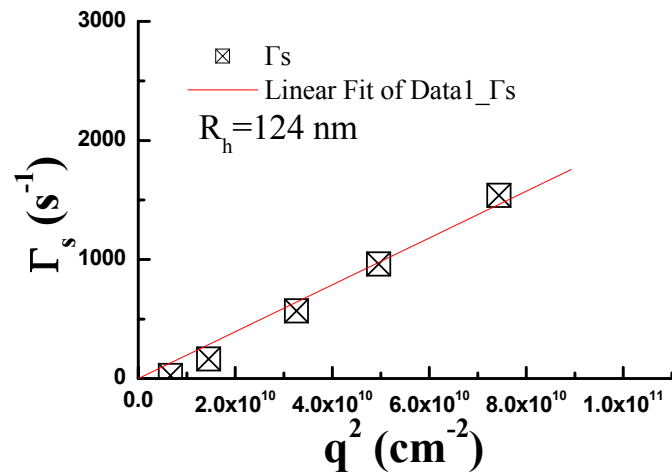
Από τις μετρήσεις αυτές, βρίσκοντας το Γ ($\Gamma=1/\tau$, τ :χρόνος χαλάρωσης) και στη συνέχεια από το διάγραμμα αυτού σε συνάρτηση με το q^2 (σχήμα 7) βρέθηκε ο συντελεστής διάχυσης D των δειγμάτων, ενώ με τη βοήθεια του δια μέσω της εξίσωσης

$$D=k_B T/6\pi\eta R_h, \quad (5)$$

βρέθηκε η υδροδυναμική ακτίνα R_h , όπου k_B είναι η σταθερά Boltzman, T είναι η θερμοκρασία και η το ιξώδες του διαλύματος. Παρακάτω στα σχήματα 6,7 φαίνονται ενδεικτικά για τη ζώνη 3 από τη διαβάθμιση ζάχαρης.



Σχήμα 6. Διαγραμματική απεικόνιση των συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης (με τα fit που χρησιμοποιήθηκαν) και των αντίστοιχων Inverse Laplace για το δείγμα της ζώνης 3 με γωνίες σκέδασης 120° , 90° , 70° , 45° και 30° .

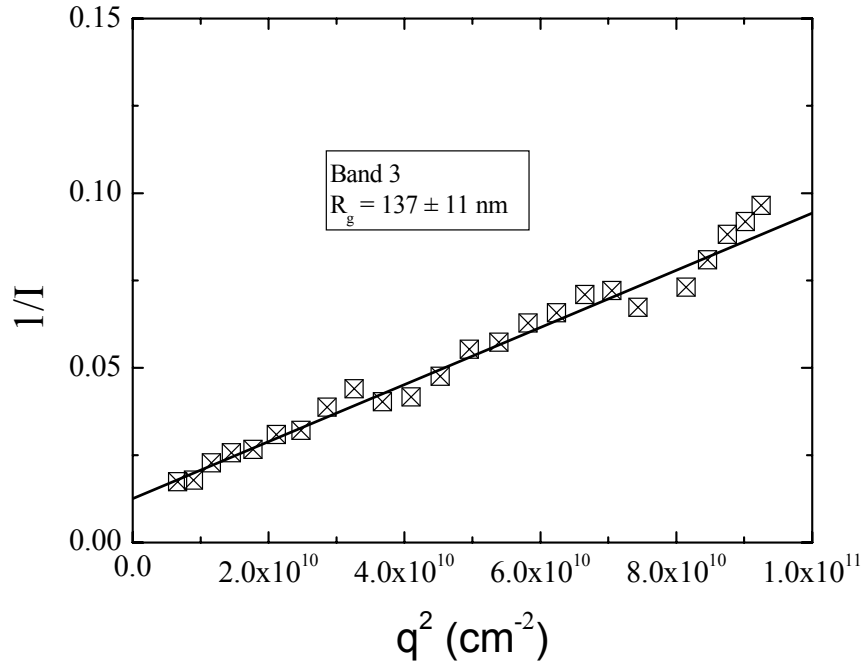


Σχήμα 7. Διαγραμματική απεικόνιση του Γ συναρτήσει του q^2 για την εύρεση του συντελεστή διάχυσης για το δείγμα της ζώνης 3.

Επίσης, από τα δείγματα μελετήθηκαν και με τη στατική σκέδαση φωτός προκειμένου να βρεθεί η γυροσκοπική ακτίνα R_g των συμπλόκων που περιέχουν.

Από το διάγραμμα της αντίστροφης έντασης με το q^2 και μέσω της εξίσωσης 2 (βλ. §2.2.12), μπορεί να βρεθεί η γυροσκοπική ακτίνα R_g , η οποία αναφέρεται στα σωματίδια που περιέχονται στο διάλυμα και τα οποία έχουν το μεγαλύτερο μέγεθος, δηλαδή στο μεγαλύτερο πρωτεϊνικό σύμπλοκο στην συγκεκριμένη περίπτωση καθώς αυτά είναι που σκεδιάζουν περισσότερο. Παρακάτω παρατίθεται ένα παράδειγμα από το διάγραμμα του $1/I$ με το q^2 για το δείγμα από τη ζώνη 3 της διαβάθμισης ζάχαρης. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η γυροσκοπική ακτίνας R_g δεν αυξάνεται καθώς πηγαίνουμε

σε δείγματα μεγαλύτερου βάρους, όπως συμβαίνει με την υδροδυναμική ακτίνα. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει διότι τα σωματίδια που περιέχουν τα δείγματα έχουν διαφορετικά σχήματα μεταξύ τους.



Σχήμα 8. Διαγραμματική απεικόνιση του $1/I$ με το q^2 για την εύρεση της γυροσκοπικής ακτίνας R_g του δείγματος από τη ζώνη 3 της διαβάθμισης ζάχαρης.

Διαιρώντας τις γυροσκοπικές ακτίνες με τις μεγαλύτερες υδροδυναμικές ακτίνες είναι δυνατό να μελετηθεί το σχήμα των συμπλόκων. Η μελέτη αυτή αφορά μόνο τα μεγαλύτερα σύμπλοκα που περιέχονται σε κάθε δείγμα. Γενικά ισχύει ότι ο λόγος R_g/R_h ξεκινά από 0.778 στην περίπτωση τέλει σφαίρας και φτάνει πάνω από 2 για ελλειψοειδή σωματίδια και εκτεταμένες αλυσίδες. Όσον αφορά τα ελλειψοειδή, όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος αυτός, τόσο περισσότερο μεγαλώνει ο μεγάλος άξονας του ελλειψοειδούς σε σχέση με τον μικρό άξονα.

Οι συντελεστές διάχυσης και οι αντίστοιχες υδροδυναμικές ακτίνες που προέκυψαν από τις δυναμικές μετρήσεις των δειγμάτων για τις αντίστοιχες ζώνες από την διαβάθμιση ζάχαρης συνοψίζονται στον πίνακα 8, ενώ παρατηρείται καθώς

πηγαίνουμε προς κλάσματα μεγαλύτερου μοριακού βάρους, η υδροδυναμική ακτίνα εμφανίζει μια τάση αύξησης.

Sample	D(s ⁻¹ *cm ²)	R _h (nm)
Ζώνη 3	6.30*10 ⁻⁷	3.4
Ζώνη 4	4.97*10 ⁻⁷	4.3
Ζώνη 5	3.11*10 ⁻⁷	6.8
Ζώνη 6	4.45*10 ⁻⁷	4.8
Ζώνη 7	2.93*10 ⁻⁷	7.3

Πίνακας 8: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός (Dynamic Light scattering), από δείγματα ζωνών διαβάθμισης ζάχαρης, όπου D: ο συντελεστής διάχυσης και R_h: η υδροδυναμική ακτίνα.

Τέλος, έγιναν προσπάθειες για τη δομή και το σχήμα των συμπλόκων από τις πληροφορίες που δίνονται από τον λόγο R_g/R_h.

Κεφάλαιο 4^ο

Συμπεράσματα

Επιτεύχθηκε διαλυτοποίηση μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων από θυλακοειδείς μεμβράνες του *Scenedesmus obliquus*, με τη χρήση του μη ιοντικού απορρυπαντικού dodecyl-β-D-maltoside και διαπιστώθηκε ότι η απόδοση διαλυτοποίησης βελτιστοποιείται με την αύξηση του λόγου απορρυπαντικού προς χλωροφύλλη. Συγκεκριμένα, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες χάνουν την σταθερότητα τους, όταν χρησιμοποιούνται απορρυπαντικά με αλυσίδα 7 και 8 ανθράκων,[49].

Επίσης, δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο άλλο ισχυρότερο απορρυπαντικό, για τον λόγο ότι θέλαμε να επιτύχουμε καθαρισμό της μεμβράνης από διάφορα οργανίδια (λιπίδια, φωσφολιπίδια κτλ.) και να απομονώσουμε τα φωτοσυνθετικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα χωρίς να προκαλέσουμε την διάσπαση τους, πράγμα που το συναντάμε στην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση λόγω του ισχυρού απορρυπαντικού SDS, που υπάρχει εκεί.

Συνεπώς, ο καταλληλότερος λόγος απορρυπαντικού/χλωροφύλλης αντιστοιχεί στην τιμή 15, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας ορατού και της Blue-Native PAGE ηλεκτροφορητικής ανάλυσης.

Επίσης, η επιλογή του κατάλληλου pH στα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, σε σύγκριση με τις πηκτές BN και SDS-Tricine PAGE, ώστε να ταιριάζουν οι συνθήκες με τα διαλύματα των πηκτών, καθώς και το γεγονός ότι οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, λόγω υδροφοβικότητας, σχηματίζουν συσσωματώματα (aggregates) είναι δύο στοιχεία που ο ερευνητής πρέπει να λάβει υπόψη του προκειμένου να επιλέξει τις κατάλληλες συνθήκες διαλυτοποίησης οι οποίες θα αποφέρουν το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Στα φάσματα (σχήμα 1,2) παρατηρείται στο υπερκείμενο η μεγάλη ποσότητα σε χλωροφύλλη με χαρακτηριστικές κορυφές κοντά στα 435nm και 680nm για τη χλωροφύλλη α και στα 480nm και 645nm για τη χλωροφύλλη β, σε σχέση με το ιζήμα, με λόγο απορρ./χλωρ. 15, όπου και αποδεικνύεται ότι είναι και ο καλύτερος για την διαλυτοποίηση των θυλακοειδών μεμβρανών, ώστε να λαμβάνουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Την απόδειξη αυτή, έρχεται να καλύψει το σχήμα 3, όπου φαίνεται η διαφορά των κορυφών μεταξύ υπερκειμένου και ιζήματος.

Το ίδιο παρατηρείται και στις μεταχειρίσεις HL, LL, HLsper και LLputr μεταξύ των κορυφών των υπερκειμένων και των ιζημάτων στα ίδια μήκη κύματος με παραπάνω. Επιπλέον, στα φάσματα των ιζημάτων διακρίνεται μια αλλαγή στη διπλή κορυφή μεταξύ των μεταχειρίσεων στα 435nm, όπου αυτή η διπλή κορυφή εμφανίζεται να είναι όμοια στις εντάσεις υψηλού και χαμηλού φωτισμού με τις πολυαμίνες σπερμίνη και πουτρεσίνη αντίστοιχα (HLsper,LLputr) και διαφέρει από την διπλή κορυφή των εντάσεων υψηλού και χαμηλού φωτισμού χωρίς πολυαμίνες (HL,LL) που και εδώ τυγχάνει να είναι όμοια. Βέβαια αυτή η διαφορά οφείλεται στις πολυαμίνες. Επίσης, η χλωροφύλλη α υπερσχύει της χλωροφύλλης b και μάλιστα αυτή η διαφορά γίνεται εντονότερη στο HL και μετά στο HLsper, καθώς σε αυτά τα δύο παρουσιάζεται και το μεγαλύτερο ποσοστό σε ολικές χλωροφύλλες.

Η συγκριτική μελέτη των Blue-Native και Green-Native πηκτωμάτων ανέδειξε ότι η πρώτη ηλεκτροφορητική ανάλυση είναι η καταλληλότερη μέθοδος για πρωτεϊνική ανάλυση διαλυτοποιημένων θυλακοειδών μεμβρανών, εφόσον σε αυτή λαμβάνονται

περισσότερες ζώνες, δηλαδή περισσότερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Στη δεύτερη διάσταση όμως, λαμβάνεται όμοιο μοτίβο στιγμάτων, αν και υπάρχουν κάποιες διαφορές στα στίγματα, είτε είναι μετατοπισμένα, είτε δεν υπάρχουν όπως αναφέρθηκαν στη παράγραφο 3.5.

Στη δεύτερη διάσταση εντοπίστηκαν 59 πρωτεϊνικές υπομονάδες από τα διαχωρισμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της BN/PAGE και 57 πρωτεϊνικές υπομονάδες από τα απομονωμένα φωτοσυνθετικά σύμπλοκα της Green-Native /PAGE, πράγμα που έρχεται σε αντιπαράθεση του πώς από λιγότερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του Green-native/PAGE, γίνεται να λαμβάνουμε περίπου τα ίδια σημεία (spots).

Άλλο ένα συμπέρασμα που βγαίνει είναι ότι τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που δεν έχουν αποχρωματιστεί ή καταψυχθεί, μπορούν να εξαχθούν αποτελεσματικότερα από τις λωρίδες, ύστερα από αποτελέσματα δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν με τους τρόπους: α) λωρίδα που είχε προηγουμένως αποχρωματιστεί, β) είχε καταψυχθεί στους -40°C , γ) κατευθείαν από τη πηκτή BN/PAGE. Οπότε, λαμβάνονται περισσότερα στίγματα στη πηκτή όταν χρησιμοποιείται η λωρίδα αμέσως μετά το πέρας της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (BN/PAGE). Ενώ με τους άλλους δύο τρόπους χάνονταν πρωτεΐνες ή σημειώνονταν υπολείμματα με τη μορφή ακίδων πάνω στη λωρίδα.

Ο λόγος μπορεί να έγκειται στη σύσταση του διαλύματος αποχρωματισμού, γιατί το συγκεκριμένο διάλυμα δρα παράλληλα και σαν διάλυμα σταθεροποίησης των πρωτεϊνικών ζωνών πάνω στη μη αποδιατακτική πηκτή. Γι' αυτό ακριβώς το λόγο σε μία λωρίδα που προέρχεται από μία native πηκτή η οποία προηγουμένως δεν έχει αποχρωματιστεί, οι πρωτεϊνικές ζώνες είναι ευκολότερο να μετακινηθούν από τη λωρίδα στην αποδιατακτική πηκτή και ν' αναλυθούν στη δεύτερη διάσταση σε σύγκριση με μία λωρίδα η οποία έχει αποχρωματιστεί προηγουμένως.

Κάτι παρόμοιο μπορεί να συμβαίνει στις λωρίδες BN/PAGE, που έχουν αποθηκευτεί στην κατάψυξη, αφού στην δεύτερη διάσταση διακρίνονται τελικά λιγότερα στίγματα (spots), απ' ότι αν το πείραμα διεξαχθεί με λωρίδα προερχόμενη αμέσως μετά το πέρας της πρώτης διάστασης. Σε αυτό, δεν μπορεί να εξηγηθεί το που οφείλεται, αλλά ίσως η πολύ χαμηλή θερμοκρασία και ο χρόνος μεσολάβησης μέχρι την χρήση της, να καταστρέφουν ορισμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα.

Επιπρόσθετα, από την αποδιατακτική ηλεκτροφορητική ανάλυση 1D_SDS-Tricine/PAGE (παραγρ. 3.4), βγαίνει το συμπέρασμα ότι πρωτεΐνες σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους (ζώνη πάνω από τα 67 kDa στο K1), όπως και πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (κάτω των 20 kDa), χάνονται μετά την διαλυτοποίηση. Αυτό μπορεί να οφείλεται, είτε στο είδος του απορρυπαντικού, είτε λόγω αραίωσης. Ενώ, είναι γνωστό ότι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους είναι δύσκολο να απομονωθούν και παραμένουν στο ίζημα.

Ωστόσο, το σύνολο των πρωτεϊνών επιτεύχθηκε και με την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, δια μέσου της πρώτης διάστασης με ουρία, όπου οι πρωτεΐνες βρίσκονταν πάνω σε μία διαγώνιο. Πρόβλημα υπήρξε στις ουρές που άφηναν τα στίγματα στην αρχή της διαγωνίου και το οποίο ενδεχομένως να οφειλόταν σε κακή επαφή μεταξύ της λωρίδας και της πηκτής, με αποτέλεσμα τα σημεία να μην είναι τόσο διακριτά.). Επίσης, το γεγονός ότι στη πηκτή θα έπρεπε να υπάρχει μία ομοιότητα μεταξύ HL και LLputr και μεταξύ LL με το HLsper, τα αποτελέσματα έδειξαν μία ομοιότητα εντελώς αντίθετη, δηλαδή εμφανίζονταν ως ίδια τα HL μεταξύ τους, με ελαφριές διαφορές κυρίως σε μετατόπιση των ζώνων και παράλληλα τα LL μεταξύ τους, με λιγότερες διακριτές ζώνες, αφού κάποιες από αυτές χάνονταν σε σύγκριση με τα HL.

Άλλο ένα πρόβλημα ήταν και το γεγονός ότι χάνονταν οι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (στο τελείωμα της διαγωνίου) σε όλες τις μεταχειρίσεις HL, LL, HLsper και LLputr, ενώ διαφορά υπήρχε στο HLsper, όπου φαίνονταν δύο στίγματα παραπάνω σε σύγκριση με τις άλλες τρεις. Έτσι λοιπόν, τα γεγονότα αυτά μας αναγκάζουν να μην έχουμε οριστικά αποτελέσματα με αποτέλεσμα να πρέπει να γίνουν στο μέλλον μία σειρά επαναλήψεων, ώστε να καταφέρουμε να μελετήσουμε την ακριβή συμπεριφορά τους. Ενώ, μελλοντικά σχεδιάζεται να γίνει ταυτοποίηση των στιγμάτων, που προκύπτουν από την πηκτή της μεθόδου αυτής.

Όσο για τα αποτελέσματα που δόθηκαν από την διαβάθμιση ζάχαρης, είτε από τις πηκτές b-native/PAGE και 1D_SDS-Tricine/PAGE, είτε από τα φάσματα, ήρθαν να επιβεβαιώσουν για άλλη μία φορά τα συμπεράσματα που ήδη είχαν βγει από τις άλλες μεθόδους, ακόμα και ως μέσο σύγκρισης ή σαν συμπληρωματική μέθοδος. Ενώ, η απουσία της χλωροφύλλης στο πάνω μέρος της διαβάθμισης, υπογραμμίζει την ήπια μορφή των συνθηκών διαλυτοποίησης. Βέβαια στα φάσματα, παρατηρήθηκε ότι η

μεγαλύτερη ποσότητα βρέθηκε στην ζώνη 4, ενώ στις 5,6,7 δηλώνεται η ύπαρξη περισσότερης χλωροφύλλης α. Επίσης, από την πηκτή 1D_SDS-Tricine/PAGE, βλέπουμε ότι οι πρωτεΐνες που ανήκουν στο LHC II (~ 22 kDa), εντοπίζονται στην ζώνη 3 και 4, ενώ στο b-native/PAGE, παίρνουμε το ίδιο μοτίβο με την πηκτή από δείγμα διαλυτοποιημένων μεμβρανών, αν οι ζώνες που παρουσιάζονται σε κάθε λωρίδα προστεθούν μεταξύ τους.

Από την ταυτοποίηση των πεπτιδικών υπομονάδων των φωτοσυνθετικών πρωτεϊνικών συμπλόκων που έγινε με χρήση φασματοσκοπίας μάζας, παρατηρήθηκε ότι ένα μεγάλο μέρος των πρωτεϊνών ήταν ριβοσωμικές, ενώ εντοπίστηκαν πολλές πρωτεΐνες οι οποίες έχουν διαφορετικό ρόλο και λειτουργία μέσα στον χλωροπλάστη. Για παράδειγμα, κάποιες είναι απαραίτητες για τον μεταβολισμό της ενέργειας, άλλες πάλι για τον μεταβολισμό του DNA και άλλες για την πρωτεϊνική σύνθεση. Πολλές βέβαια, από τις πρωτεΐνες αυτές, ανήκουν στο φωτοσύστημα I, φωτοσύστημα II και LHC II. Παρόλα αυτά, τα περισσότερα στίγματα αναγνωρίστηκαν και καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε 33 διαφορετικά είδη μεμβρανικών πρωτεϊνών, από τις οποίες οι περισσότερες ήταν οι αναμενόμενες. Εξαίρεση βέβαια, αποτέλεσαν πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους (κάτω των 8-10 kDa), εκ των οποίων μόνο η *psbE* (4.4 kDa) κατάφερε να ταυτοποιηθεί, γνωρίζοντας το γεγονός ότι μικρές πρωτεΐνες είναι δύσκολο να ανιχνευθούν μέσω τρυψίνης και πολλές φορές λόγω χρώσης coomassie (δεν έχει ξεβάψει καλά), η οποία μπορεί να αποφευχθεί μέσω ηλεκτρονιακού ψεκασμού ESI.

Τέλος, σύμφωνα με τη σκέδαση φωτός αποκαλύπτεται η ταυτόχρονη παρουσία μορίων διαφορετικών μεγεθών στα 6-8 nm και στα 10-14 nm. Το μικρότερο μέγεθος συσχετίζεται με την ακτίνα τριμερών και μονομερών μορφών του φωτοσυστήματος Light Harvesting Complex II, ενώ το μεγαλύτερο μέγεθος συνδέεται με την παρουσία φωτοσυστήματος I (PS I) και φωτοσυστήματος II (PS II). Έτσι λοιπόν, εδώ θα μπορούσαμε να προσθέσουμε την μεγάλη χρησιμότητα που παρέχει η πηκτή b-native/PAGE, στην ανάλυση της τετραεδρικής κατασκευής των μεμβρανικών πρωτεϊνών, συγκρίνοντας την με την βοήθεια που προσφέρετε από την σκέδαση του φωτός.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας αποτελεσμάτων από την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών (2D BN/SDS-Tricine PAGE), με τη χρήση φασματοσκοπίας μάζας (MALDI και ESI).

Accession number/datab ase	Protein	Number of peptides identified by MALDI-TOF	Number of peptides identified by ESI-MS/MS	Mascot Score	Protein MW
orf219	putative site-specific DNA endonuclease	4	-	19	28565
rps3	ribosomal protein S3	3	-	15	81957
atpE	CF1 epsilon subunit of ATP synthase	5	-	27	15944
orf167	putative site-specific DNA endonuclease	2	-	12	22020
atpB	CF1 beta subunit of ATP synthase	4	-	15	52878
rpoBa	beta subunit of RNA polymerase fragment a	5	-	17	86734
rpoC2	beta" subunit of RNA polymerase	12	-	24	301558
atpA	CF1 alpha subunit of ATP synthase	19	-	129	55735
atpB	CF1 beta subunit of ATP synthase	11	-	111	52878
rpl14	ribosomal protein L14	5	-	23	13296
orf167	putative site-specific DNA endonuclease	3	-	13	22020
Lhcll/P08221	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I	-	35	474	27235
Lhcll/P22686	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I	-	27	205	27128
Lhcll/P14273	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I	-	19	136	26906
rpoC2	beta" subunit of RNA polymerase	16	-	19	301558
tufA	translational elongation factor Tu	2	-	15	46761
rpl23	ribosomal protein L23	5	-	34	13627
psbC	CP43 chlorophyll	14	-	65	53202

	apoprotein of photosystem II				
petA	apocytochrome f of cytochrome b6/f complex	5	-	34	37641
atpE	CF1 epsilon subunit of ATP synthase	2	-	18	15944
Lhcll/P08221	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I	-	19	209	27235
Lhcll/P22686	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I	-	14	170	27128
rps2a	ribosomal protein S2 fragment a	5	-	17	61331
orf221	putative site-specific DNA endonuclease	5	-	23	28600
orf264	putative site-specific DNA endonuclease	3	-	14	32586
petA	apocytochrome f of cytochrome b6/f complex	3	-	14	37641
orf167	putative site-specific DNA endonuclease	3	-	15	22020
rps2a	ribosomal protein S2 fragment a	9	-	30	61331
tufA	translational elongation factor Tu	5	-	21	46761
rps2b	ribosomal protein S2 fragment b	6	-	18	44867
rpl2	ribosomal protein L2	4	-	29	30759
psbD	D2 reaction center protein of photosystem II	11	-	62	42341
psbB	CP47 chlorophyll apoprotein of photosystem II	23	-	159	58664
petA	apocytochrome f of cytochrome b6/f complex	10	-	70	37641
psbD	D2 reaction center protein of photosystem II	11	-	62	42341
psbD	D2 reaction center protein of photosystem II	11	-	72	42341
chlB	ChlB subunit of protochlorophyllide reductase	5	-	17	63534
petB	apocytochrome b6 of cytochrome b6/f complex	5	-	32	26780
rpl16	ribosomal protein L16	2	-	23	15805
psbE	cytochrome b559 alpha subunit of photosystem II	5	-	48	11737
psbE	cytochrome b559 alpha subunit of photosystem II	5	-	48	11737
rpl23	ribosomal protein L23	4	-	31	13627

psaA	P700 apoprotein A1 of photosystem I	8	-	31	84391
atpA	CF1 alpha subunit of ATP synthase	14	-	89	55735
atpB	CF1 beta subunit of ATP synthase	19	-	120	52878
psbB	CP47 chlorophyll apoprotein of photosystem II	17	-	73	58664
psbC	CP43 chlorophyll apoprotein of photosystem II	13	-	64	53202
rpoC1	beta' subunit of RNA polymerase	11	-	24	183759
psaA	P700 apoprotein A1 of photosystem I	8	-	27	84391
atpF	CF0 subunit I of ATP synthase	3	-	17	21454
ycf4	hypothetical chloroplast RF4	3	-	19	24772
rps8	ribosomal protein S8	2	-	14	15303
psaC	subunit VII of photosystem I	5	-	50	10436
chlN	ChlN subunit of protochlorophyllide reductase	4	-	10	67130
orf264	putative site-specific DNA endonuclease	5	-	20	32586
tufA	translational elongation factor Tu	5	-	19	46761
rps11	ribosomal protein S11	3	-	17	14528
ftsH	cell division protein	18	-	15	434846
ycf4	hypothetical chloroplast RF4	3	-	19	24772

Βιβλιογραφία

- [1]. Vladimir A. ,Shuvalov and Ulrich Heber. (2003) Photochemical reactions in dehydrated photosynthetic organisms, leaves, chloroplasts and photosystem II particles: reversible reduction of pheophytin and chlorophyll and oxidation of β -carotene. *Chemical Physics*,294(3), Pages 227-237.
- [2]. Alexander V. Vener, Itzhak Ohad and Bertil Andersson, (1998) Protein phosphorylation and redox sensing in chloroplast thylakoids. *Current Opinion in*

Plant Biology, 1(3), Pages 217-223.

- [3]. W.L. Butler and M. Kitajima, (1975) Energy transfer between Photosystem II and Photosystem I in chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 396(1), Pages 72-85.
- [4]. David M. Kramer, Thomas J. Avenson and Gerald E. Edwards, (2004) Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions *Trends in Plant Science*,9(7), Pages 349-357.
- [5]. Eugeniusz Parys and Hubert Jastrzębski Light-enhanced dark respiration in leaves, isolated cells and protoplasts of various types of C₄ plants *Journal of Plant Physiology*, Volume 163, Issue 6, 10 April 2006, Pages 638-647.
- [6]. Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A.J., Peltier, J.B., Rudella. A., Sun, Q., and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell*,16(2), 478-499.
- [7]. James Barber and Werner Kühlbrandt, (1999) Photosystem II . *Current Opinion in Structural Biology*, 9(4), Pages 469-475.
- [8]. James Barber, (2004) Photosystem II: Protein Components. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Pages 367-374.
- [9]. Fromme, P., Yu, H., Deruyter, Y.S., Jolley, C., Chauhan, D.K., Melkozernov, A., and Grotjohann, I. (2005). Structure of Photosystems I and II. *Chimie*, In Press.
- [10]. K. Saito, K. Mukai and H. Sumi, (2005) Excited states of pigments in photosystem II reaction centers of photosynthesis: Characterization into a central dimer and remaining monomers. *Chemical Physics Letters*, 401(1-3),Pages 122-129.

- [11]. So Iwata and James Barber,(2004) Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen-evolving center. *Current Opinion in Structural Biology*,14(4), Pages 447-453.
- [12]. Andreas Holzenburg, Fiona H. Shepherd and Robert C. Ford, (1994) Localization of the oxygen-evolving complex of photosystem II by fourier difference analysis. *Micron* 25(5), Pages 447-451.
- [13]. Jonathan H. A. Nugent, Alison Telfer, Christalla Demetriou and James Barber, (1989) Electron transfer in the isolated photosystem II reaction centre complex. *FEBS Letters*, 255 (1), Pages 53-58.
- [14]. Γανωτάκης, Δ., και Κοτζαμπάσης, Κ. (2003). Κεφάλαιο 5. Φωτοσύνθεση Ι: Μετατροπή της ηλιακής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια. In: *Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον*, pp. 155, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο,Ελλάδα, ISBN 960-524-168-4.
- [15]. M.Karas, H.F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 kDa ,*Anal Chem.*, 1988,60 ,(20), 2299-2301.
- [16]. Koichi Tanaka, H.W., Yutaka Ido, Satoshi Akita,Yoshikazu and Tamio Yoshida, Protein and Polymer Analyses up to m/z 100.000 by Laser Ionization Time of flight Mass Spectrometry. *Rcm*, 1988, 2(8), 151-153.
- [17]. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse, “Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules,” *Science* 246, 64 (1989).
- [18]. Gaffron, H. (1939) Der auffalende Unterschied in der Physiologie nahe verwandter Algenstaemme nebst Bemerkungen uber die Lichtatmung *Biol. Zentrbl.* 59, 302–312.

- [19]. Navakoudis E., Lütz C., Langebartels C., Lütz-Meindl U. and Kotzabasis K. (2003) Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines.
- [20]. Ormrod D.P. and Beckerson D.W., Polyamines as antiozonants for tomato. *Hortic. Sci.* 21 (1986), pp. 1070–1071.
- [21]. Sfakianaki M., Sfichi L., Kotzabasis K. (2006) The involvement of LHCII associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 84:181-188.
- [22]. Kotzabasis, K., Fotinou, C., Roubelakis-Angelakis, K.A., and Ghanotakis, D. (1993). Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine. *Photosynth. Res.* 38, 83-88.
- [23]. N.I. Bishop, H. Senger Preparations and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*, in: A. San Pietro, (Ed.), *Methods in enzymology*, vol 23, part A. Acad. Press, New York, 1971, pp 53-66.
- [24]. Stefano Caffarri‡, Roberta Croce‡, Jacques Breton§, and Roberto Bassi, (2001) The Major Antenna Complex of Photosystem II Has a Xanthophyll Binding Site Not Involved in Light Harvesting ,the journal of biological chemistry Vol. 276, No. 38, Issue of September 21, pp. 35924–35933.
- [25]. Schägger, H., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, 199(2), 223-231.
- [26]. Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166(2), 368-379.
- [27]. Celis, J.E., Rasmussen, H.H., Olsen, E., Madsen, P., Leffers, H., Honore, B.,

Dejgaard, K., Gromov, P., Hoffmann, H.J., Nielsen, M., Vassilev, A., Vintermyr, O., Hao, J., Celis, A., Basse, B., Lauridsen, J.B., Ratz, G.P., Andersen, A.H., Walbum, E., Kjaergaard, I., Puype, M., Van Damme, J., and Vandekerckhove, J. (1993) The human keratinocyte twodimensional gel protein database: update 1993. *Electrophoresis*, 14, 1091–1198.

[28]. L. Sfichi, N. Ioannidis, K. Kotzabasis, Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of Light-harvesting complex II changes, *Photochem Photobiol* 80 (2004) 499-506.

[29]. Rexroth, S., Meyer zu Tittingdorf, J.M.W., Krause, F., Dencher, N.A., and Seelert, H. (2003) Thylakoid membrane at altered metabolic state: Challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis*, 24, 2814-2823.

[30]. Kugler M., Jansch L., Kruff V., Schmitz, U.K., and Braun, H.P. (1997) Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BNPAGE). *Photosynthesis Research*, 53, 35–44.

[31]. Suorsa M., Regel, P.E., Paakkarinen, V., Battchikova, N., Herrmann, R.G., and Aro, E.M., (2004) Protein assembly of photosystem II and accumulation of subcomplexes in the absence of low molecular mass subunits PsbL and PsbJ. *Eur. J. Biochem.* 271, 96–107

[32]. M.Aivaliotis, M.Karas and G.Tsiotis, *Photosynthesis research* 88 (2006) 143-157.

[33]. Isam Rais, M.Karas and H. Schägger, *Proteomics* 2004, 4, 2567-2571.

[34]. M.M.Bradford, A rapid and sensitive method for the estimation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254.

- [35]. C. Jones, D. Hare, S. Compton, Measuring plant protein with Bradford assay. Evaluation and standard method, *J Chem Ecol* 15 (1989) 979-992.
- [36]. Porra RJ, Thompson WA and Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 975:384-394.
- [37]. Light Scattering A.K. Rizos , A.M. Tsatsakis, M.I. Shtilman and W. Brown, *Polymer* 39 (1998) 4729-4734.
- [38]. N.B.Cech, C.G Enke..*Mass Spectrometry Reviews*. 2001, 20 , 362–387.
- [39]. Anne Beigbeder, Maria Vavadakis, Eleni Navakoudis and Kiriakos Kotzabasis ,) 1995 Influence of polyamine inhibitors on light-independent and light-dependent chlorophyll biosynthesis and on the photosynthetic rate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 28(3), Pages 235-242.
- [40]. Veronika Reisinger and Lutz Andreas Eichacker, Analysis of Membrane Protein Complexes by Blue Native PAGE. *Practical Proteomics* 1-2/2006.
- [41]. G. Doring, J.L. Bailey, J. Weikara, H.T. Witt, *Naturwissenschaften* 5 (1968) 219-224.
- [42]. J.R. Norris, R.A. Uphaus, H.L. Crespi, J.J. Katz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 625-628.
- [43]. K. Brettel, *Biochim. Biophys. Acta* 1318 (1997) 322-373.
- [44]. K. Saito, T. Kikuchi, M. Nakayama, K. Mukai and H. Sumi, (2006) A single

chlorophyll in each of the core antennas CP43 and CP47 transferring excitation energies to the reaction center in Photosystem II of photosynthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 178(2-3), Pages 271-280.

[45]. Senger, H., and Bauer, B. (1987). Influence of high light quality on adaptation and function of the photosynthetic apparatus. *Photochem. Photobiol.* 45, 539-545.

[46]. Hoffmann, B., and Senger, H. (1988). Kinetics of photosynthetic apparatus adaptation in *Scenedesmus obliquus* to change in irradiance and light quality. *Photochem. Photobiol.* 47, 737-739.

[47]. Horton, P., Ruban, A.V., Walters, R.G. (1994). Regulation of light harvesting in green plants: indication by non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* 106, 415-420.

[48]. Kotzabasis, K., Strasser, B., Navakoudis, E., Senger, H., and Dörnemann, D. (1999). The regulatory role of polyamines in structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. *J. Photochem. Photobiol. B*: 50, 45-52.

[49]. H. Michel. in (Michel, H., ed.) *Crystallisation of Membrane Proteins*, CRC Press, Boston 1991, pp.73-88.

[50]. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680-685.

[51]. Heinemeyer, J., Eubel, H., Wehmheoner, D., Jeansch, L., and Braun, H.P. (2004) Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants. *Phytochemistry*, 65, 1683–1692.

[52]. Ciambella C., Roepstorff, P., Aro, E.M., and Zolla, L.(2005) A proteomic approach for investigation of photosynthetic apparatus in plants. *Proteomics*, 5, 746–757.