



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Βιολογική και Οργανική Χημεία»

«Αξιολόγηση αντιγονικών πρωτεϊνών και μεταβολομική
μελέτη του παθογόνου *Legionella pneumophila*»

Πυλούδη Αναστασία-Μαρίνα

Υπεύθυνος Καθηγητής: Γεώργιος Τσιώτης

Ηράκλειο, 2022



UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF
CHEMISTRY

Postgraduate program in «Biological and
Organic Chemistry»

"Evaluation of antigenic proteins and metabolomic
analysis of the pathogen *Legionella pneumophila*"

Pyloudi Anastasia-Marina

Master Thesis Supervisor: Tsiotis Georgios

Heraklion, 2022

Στην οικογένειά μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και συγκεκριμένα σε εργαστήριο του τομέα Βιοχημείας, κατά τα έτη 2021 και 2022.

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της. Ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή, καθηγητή Γεώργιο Τσιώτη, υπεύθυνο του εργαστηρίου Βιοχημείας στο οποίο πραγματοποιήθηκε η μεταπτυχιακή εργασία και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης Ψαρουλάκη Άννα και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Απόστολο Σπύρο, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου, για τη βοήθεια τους που ήταν συνεχώς διαθέσιμη, για το ευχάριστο κλίμα και την υποστήριξή τους. Την Δρ. Μαθιουδάκη Ειρήνη, για την συνεχή καθοδήγηση, τις υποδείξεις και το ανιδιοτελές ενδιαφέρον της. Τον Δρ. Δημοσθένη Χοχλάκη από τη Μονάδα Ζωονόσων, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης, για την άψογη συνεργασία και το φιλικό κλίμα. Επιπλέον, αυτή η μελέτη δεν θα ολοκληρωνόταν χωρίς την κρίσιμη βοήθεια του εργαστηρίου του καθηγητή Σπυρούλια Γεώργιου, του τμήματος Φαρμακευτικής, στον τομέα Φαρμακευτικής Χημείας-Φαρμακογνωσίας, του Πανεπιστημίου Πατρών και φυσικά της πολύτιμη βοήθεια και προσφορά της υποψήφιας Δρ. Χασάπη Στυλιανής, για την επιστημονική καθοδήγησή της στο κομμάτι της μεταβολομικής μελέτης, την επιμονή, το χρόνο που διέθεσε και την υποστήριξή της, που έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη των εργαστηρίων του τομέα Βιοχημείας, των Καθ. Γανωτάκη και Επίκ. Καθ. Ιωάννη Παυλίδη αντίστοιχα, για την πολύ ευχάριστη συνεργασία αυτά τα χρόνια, αλλά και τα μέλη του εργαστηρίου του Αναπλ. καθ. Απόστολου Σπύρου από τον τομέα Αναλυτικής και Περιβαλλοντικής Χημείας.

Τελευταίο και πιο σημαντικό, είναι το ευχαριστώ που θέλω να πω σε όλη την οικογένειά μου που ήταν δίπλα μου και με στήριξε όλα τα χρόνια των σπουδών μου και συνεχίζει να με στηρίζει στα επόμενά μου βήματα.

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σπύρος Απόστολος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τσιώτης Γεώργιος (Επιβλέπων)

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ψαρουλάκη Άννα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Legionella* είναι ένα γένος παθογόνων Gram-αρνητικών, υποχρεωτικά αερόβιων βακτηρίων. Το είδος *L. pneumophila*, προκαλεί τη νόσο των Λεγεωνάριων ή λεγιονέλλωση, η οποία παρουσιάζεται κλινικά με τη μορφή δύο συνδρόμων: μίας οξείας βακτηριακής λοίμωξης του αναπνευστικού, που εκδηλώνεται κυρίως με πνευμονία και του πυρετού Pontiac, μια ίωση του αναπνευστικού που μοιάζει με γρίπη. Στην εργασία, πρωτεΐνες του βακτηρίου *L.pneumophila*, απομονωθήκαν μετά από ετερόλογη έκφραση σε *E. Coli*. Οι πρωτεΐνες αξιολογήθηκαν ως προς την αντιγονικότητά τους με ορούς ασθενών αλλά και υγιών ατόμων. Με γνώμονα την αντιγονικότητα επιλέχθηκε η dihydrolipoamide succinyltransferase (lpg_0533) για την δημιουργία ενός διαγνωστικού τεστ, που λειτουργεί βάσει της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης. Επιπλέον, έγινε μεταβολομική ανάλυση με φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού σε εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων από καλλιέργειες του βακτηρίου, για να μελετηθούν οι μεταβολίτες στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης του παθογόνου.

ABSTRACT

Legionella is a genus of pathogenic Gram-negative, obligate aerobic bacteria. The species *L. pneumophila* causes Legionnaires' disease or legionellosis, which presents clinically in the form of two syndromes: an acute bacterial respiratory infection, manifested mainly by pneumonia, and Pontiac fever, a respiratory virus similar to influenza. In the work, proteins of the bacterium *L.pneumophila* were isolated after heterologous expression in *E. Coli*. The proteins were evaluated for their antigenicity with sera from patients and healthy individuals. Based on antigenicity, dihydrolipoamide succinyltransferase (lpg_0533) was chosen for the creation of a diagnostic test, which works on the basis of electrochemical impedance spectroscopy. In addition, metabolomic analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy was performed on bacterial cell extract from cultures of the bacterium, to study the metabolites in the different stages of the pathogen's development.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πίνακας περιεχομένων

1.	Εισαγωγή	12
1.1	Ιστορία	12
1.2	Μορφολογία και οικολογία	12
1.3	Βιοχημικές Ιδιότητες	13
1.4	Επιδημιολογία	14
1.5	Κύκλος ζωής του βακτηρίου	15
1.6	Νόσος των λεγεωναρίων-Πυρετός Pontiac	17
1.7	Διάγνωση-Θεραπεία	18
1.8	Σκοπός	19
2.	Υλικά και Μέθοδοι	20
2.1	Επιλογή Γονιδίων	20
2.2	Μετασχηματισμός (Transformation)	21
2.3	Απομόνωση Πλασμιδίου	22
2.4	Στερεή καλλιέργεια <i>E.coli</i>	23
2.5	Υγρή καλλιέργεια <i>E. Coli</i>	23
2.6	Καλλιέργεια <i>Legionella pneumophila</i>	24
2.7	Λύση κυττάρων	26
2.8	Διαχωρισμός μεμβρανικών και υδατοδιαλυτών κλασμάτων	27
2.9	Μέθοδος Bradford-Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	28
2.10	Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης (BCA)	29
2.11	Χρωματογραφία συγγένειας	29
2.12	Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	31
2.13	Ανοσοαποτύπωμα (Western Blot)	35
2.14	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	37
2.15	Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών	38
2.16	Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF	39
2.17	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	39
2.18	Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης (EIS - Electrochemical Impedance Spectroscopy)	45
3.	Αποτελέσματα και συζήτηση	48

3.1	<i>Αντιγονικές πρωτεΐνες-Έκφραση και Απομόνωση</i>	48
3.2	<i>Απομόνωση Αντιγονικών πρωτεϊνών</i>	49
	<i>Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με MALDI-TOF</i>	52
3.3	<i>Μελέτη της αντιγονικότητας των πρωτεϊνών με ELISA</i>	57
3.4	<i>Στατιστική Ανάλυση</i>	59
3.5	<i>Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης (EIS - Electrochemical Impedance Spectroscopy)</i>	61
3.6	<i>Φασματοσκοπία Μαγνητικού Πυρηνικού Σύντονισμού (NMR-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)</i>	69
4.	Συμπεράσματα	76
5.	Μελλοντικοί Στόχοι	78
6.	Βιβλιογραφία	79
7.	Παράρτημα	86

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΙ ΟΡΟΙ

LCV	<i>Legionella</i> containing vacuole
CCV	<i>Coxiela</i> containing vacuole
ER	endoplasmic reticulum
PE phase	Post exponential phase
Icm	intracellular multiplication
Dot	defect in organelle trafficking
T4SS	Type 4 Secretion System
LB	Luria Broth
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
BCYE- α	Buffered Charcoal Yeast Extract Agar
BHI	Brain Heart Infusion
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
E.Coli	<i>Escherichia coli</i>
BCA	bicinchoninic acid
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
His	Histidine
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltoside
SDS	Sodium dodecyl-sulfate
PAGE	polyacrylamide g electrophoresis
APS	Ammonium Persulfate
TEMED	Tetramethylethylenediamine
BSA	Bovine serum albumin
PVDF	Poly(vinylidene fluoride
TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20
IgG	Immunoglobulin G
AP	Alkaline Phosphatase
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

NBT	nitro blue tetrazolium
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
HRP	horseradish peroxidase
ABS	Acrylonitrile Butadiene Styrene
CAN	Acetonitrile
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
TOF	time-of-flight
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	Optical Density
TSP	Trimethylsilylpropanoic acid
PCA	Principal component analysis
PLS-DA	Partial least-squares discriminant analysis
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy
LSV	Linear Sweep Voltametry
MVA	mercaptoundecanoic acid
EDC	ethyl(dimethylaminopropyl)carbodiimide
NHS	N-hydroxysuccinimide
AUC	Area Under Curve
HMDB	Human Metabolome Database
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

1. Εισαγωγή

1.1 Ιστορία

Η *Legionella* είναι gram-αρνητικά βακτήρια που ανακαλύφθηκαν το 1976, στη Φιλαδέλφεια της Πενσυλβάνια από το κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) των ΗΠΑ. Οι συμμετέχοντες στο 58ο ετήσιο συνέδριο της Αμερικανικής Λεγεώνας νόσησαν από μία αναπνευστική ασθένεια και αναφέρθηκαν 34 θανατηφόρα περιστατικά. Το 1976, οι J. McDade και C. Shepard αναγνώρισαν ένα βακτήριο ως αιτία της νόσου των Λεγεωνάριων¹. Έτσι, ανακαλύφθηκε ένα νέο gram-αρνητικό βακτήριο σε σχήμα ράβδου, που ονομάστηκε *Legionella pneumophila* από την Αμερικανική Λεγεώνα. Μόλις ταυτοποιήθηκε ο οργανισμός, περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν ότι η *Legionella* είχε ήδη απομονωθεί το 1947. Αποδείχθηκε επίσης ότι η *Legionella* ήταν η αιτία για ανεξήγητες επιδημίες γρίπης, όπως αυτή που εμφανίστηκε το 1968 στο Pontiac του Μίσιγκαν, μια κλινική κατάσταση που ονομάστηκε στη συνέχεια πυρετός Pontiac. Σήμερα, το γένος *Legionella* περιλαμβάνει περισσότερα από 65 διαφορετικά είδη και περισσότερες από 70 διακριτές οροομάδες. Αν και όλα τα είδη είναι δυνητικά παθογόνα, η λεγιονέλλωση προκαλείται συχνότερα από *Legionella pneumophila* οροομάδα 1 (Lp1). Άλλα είδη *Legionella* που συνήθως αναγνωρίζονται ως παράγοντες ασθένειας στον άνθρωπο είναι η *Legionella micdadei*, η *Legionella bozemanii*, η *Legionella dumoffii* και η *Legionella longbeachae*. Η κατανόησή μας για τη βιολογία και την παθογένεια των διαφορετικών μελών αυτού του γένους συνεχίζει να αυξάνεται.²

1.2 Μορφολογία και οικολογία

Τα βακτήρια *Legionella* είναι gram-αρνητικά, γ-πρωτεοβακτήρια σε σχήμα ράβδου που βρίσκονται σε περιβάλλοντα γλυκού νερού, καθώς και σε υγρό έδαφος. Ήταν το πρώτο βακτήριο που περιεγράφηκε και πολλαπλασιάστηκε σε ξενιστές πρωτόζωων, κυρίως υδρόβιες αμοιβάδες, γεγονός που οδήγησε στην ιδέα

ότι η ικανότητα των βακτηρίων να μολύνουν τα πρωτόζωα μπορεί επίσης να τους επιτρέψει να αναπαραχθούν στα μακροφάγα του ανθρώπινου πνεύμονα.¹

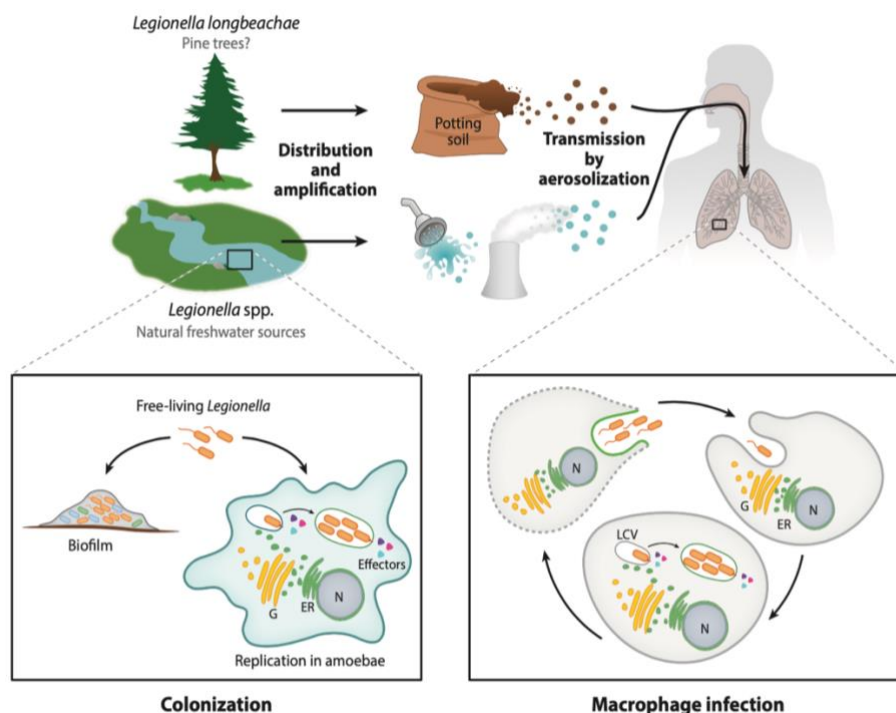
Το *L. pneumophila* έχει ανακτηθεί από ένα ευρύ φάσμα ανθρωπογενών και φυσικών υδρότοπων, όπως λίμνες, ρυάκια, κλιματιστικά, σιντριβάνια και υδρομασάζ. Εξαίρεση αποτελεί το *L. longbeachae*, το οποίο κατοικεί κυρίως στο έδαφος και η μόλυνση συνδέεται συχνά με την έκθεση σε χώμα γλάστρας. Τα βακτήρια αυτά δεν είναι υδρόβια βακτήρια που ζουν ελεύθερα, αλλά παρασιτούν σε αμοιβάδες γλυκού νερού και εδάφους.³ Τα είδη *Legionella* πολλαπλασιάζονται ενδοκυτταρικά σε πολλούς τύπους πρωτοζώων τόσο σε υδάτινο, όσο και σε εδαφικό περιβάλλον. Ενώ παρέχουν μια θέση για την αναπαραγωγή της *Legionella*, οι αμοιβάδες την προστατεύουν επίσης από σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες, αυξάνοντας την αντίσταση του *L. pneumophila* στα βιοκτόνα, τα αντιβιοτικά, το οξύ, το ωσμωτικό και θερμικό στρες.⁴

1.3 Βιοχημικές Ιδιότητες

Τα βακτήρια που ανήκουν στο είδος της *Legionella* διακρίνονται για τις ακόλουθες βιοχημικές ιδιότητες. Αρχικά δεν διασπούν τα σάκχαρα, ούτε προφανώς τη γλυκόζη. Υδρολύουν τη ζελατίνη και το άμυλο και συνεπώς πηγή άνθρακα αποτελούν τα αμινοξέα. Είναι θετικά σε αντιδράσεις όπως οξειδάσης και καταλάσης. Ενώ, είναι αρνητικά σε αντιδράσεις ουρεάσης και των νιτρικών αλάτων. Όταν βρίσκονται σε περιβάλλοντα που υπάρχει διαθέσιμη τυροσίνη, παράγεται μία χρωστική καφέ χρώματος και αν εκτεθούν οι αποικίες τους σε υπεριώδη ακτινοβολία υψηλών μηκών κύματος παράγουν μία φθορίζουσα χρωστική.^{49,50,51,52} Σε αντίθεση με άλλα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, οι *Legionellae* διαφέρουν στη σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος, αφού εντοπίζονται σε αυτό, εκτός των άλλων και διακλαδισμένοι λιποπολυσακχαρίτες.⁵³

1.4 Επιδημιολογία

Η νόσος των Λεγεωνάριων, συνδέεται περισσότερο με τα ανθρωπογενή υδάτινα περιβάλλοντα που περιέχουν νερό σε υψηλές θερμοκρασίες και βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά σε μορφή βιοφίλμ. Η ανθρώπινη μόλυνση εμφανίζεται συνήθως ως συνέπεια εισπνοής αερολυμάτων που περιέχουν *Legionella* που παράγονται από μολυσμένες πηγές νερού, όπως ντους, τζακούζι, υδραυλικά δίκτυα και συστήματα κλιματισμού. Η αυξημένη παρουσία αυτών, πιθανότατα οδήγησαν στην έκθεση του ανθρώπου στη *Legionella* και σε αυξημένη συχνότητα μόλυνσης στο δεύτερο μισό του 20ού αιώνα.⁶⁴ Ωστόσο, εδώ πρέπει να τονιστεί, ότι αν και δεν θεωρήθηκε ότι συνέβη μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο, έχει αναφερθεί μία περίπτωση, υποδηλώνοντας ότι αυτή η μορφή μετάδοσης μπορεί να υπάρχει, αλλά είναι σπάνια.⁵



Εικ.1.1

Οδοί μετάδοσης και κύκλος ζωής των *Legionella pneumophila* και *L. longbeachae*. Η *Legionella* μπορεί να φτάσει στους ανθρώπινους πνεύμονες, όπου μολύνει μακροφάγα χρησιμοποιώντας τους ίδιους μηχανισμούς που χρησιμοποιεί για να επιβιώσει στους ξενιστές της. Μέσα στο κύτταρο ξενιστή, η *Legionella* βρίσκεται σε ένα χωριστό διαμέρισμα, από όπου διαμορφώνει διάφορες οδούς σηματοδότησης ξενιστή μέσω της έκκρισης πρωτεϊνών τελεστών από ένα αποκλειστικό σύστημα έκκρισης Dot/Icm τύπου 4B. Το *L. longbeachae* βρίσκεται σε μείγματα εδάφους και γλάστρες και σχετίζεται με

κοινότητες αμοιβάδων και βιοφίλμ. Συντομογραφίες: ER, ενδοπλασματικό δίκτυο; G, συσκευή Golgi; LCV, κενοτόπιο που περιέχει *Legionella*. N, πυρήνας.¹

Τα άτομα με υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν τη νόσο των Λεγεωνάριων είναι άνδρες άνω των 50 ετών, καπνιστές και άτομα με υποκείμενη ιατρική πάθηση όπως διαβήτης, καρκίνο ή ανοσοκαταστολή. Ωστόσο, οποιοσδήποτε μπορεί να αναπτύξει τη νόσο των Λεγεωνάριων.

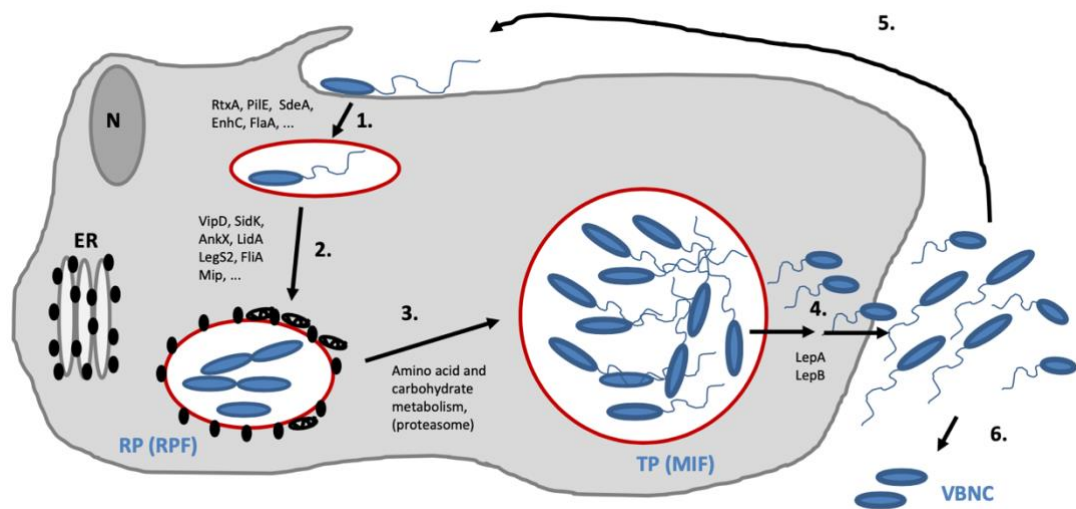
Η επιβάρυνση της νόσου των Λεγεωνάριων στην Ευρώπη και στις Ηνωμένες Πολιτείες αυξάνεται κάθε χρόνο. Η αύξηση των αναφερόμενων κρουσμάτων θα μπορούσε να οφείλεται σε περιβαλλοντικές συνθήκες. Μέχρι σήμερα, το γένος *Legionella* περιλαμβάνει 65 είδη, αλλά δεν είναι όλα εξίσου υπεύθυνα για τα εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα της νόσου παγκοσμίως, καθώς η *L. Pneumophila* οροτύπου (Serogroup 1- sg1) αντιπροσωπεύει το 80-90% των περιπτώσεων σε Ευρώπη και Αμερική. Το *L. longbeachae* αντιπροσωπεύει περίπου το 1% των περιπτώσεων παγκοσμίως, αλλά το 50–60% των περιπτώσεων στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία.^{6,7}

1.5 Κύκλος ζωής του βακτηρίου

Οι κύκλοι ζωής είναι μια σύνθεση εξέλιξης, προσαρμογής, εξειδίκευσης και επιβίωσης στη φύση. Όσον αφορά τις μολυσματικές ασθένειες, οι κύκλοι ζωής παρέχουν ενδείξεις για την κατανόηση των μηχανισμών παθογένεσης.

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, τα βακτήρια μεταδίδονται κυρίως με εισπνοή μολυσματικών αερολυμάτων και μετά την εισπνοή και την είσοδο στον ανθρώπινο πνεύμονα, προσλαμβάνονται από κυψελιδικά μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα. Η *L. pneumophila* έχει έναν διφασικό κύκλο ζωής, κατά τον οποίο αλλάζει μεταξύ μιας αναπτυξιακής (μη λοιμογόνου) και μιας μεταδοτικής (μολυσματικής) μορφής.⁸ Σε αυτή τη διαφοροποίηση, γίνονται μεταβολικές και μορφογενετικές αλλαγές και συμβαίνει κατά τη μετάβαση από ενδοκυττάριο σε εξωκυττάριο περιβάλλον.⁹ Όταν υπάρχουν ευνοϊκές συνθήκες για αντιγραφή,

δηλαδή ένα περιβάλλον πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, το βακτήριο καταστέλλει την έκφραση των χαρακτηριστικών μετάδοσης, όπως για παράδειγμα την κινητικότητα, την αντίσταση στα ωσμωτικά και στα οξέα ή την κυτταροτοξικότητα. Εκεί εκφράζονται γονίδια που χρησιμεύουν στην αναπαραγωγή και στον ενδοκυτταρικό πολλαπλασιασμό, χρησιμοποιώντας τους πόρους που χρειάζεται από τον ξενιστή. Στην άλλη περίπτωση, όταν το πλήθος των βακτηρίων αυξάνεται και τα θρεπτικά έχουν μειωθεί αρκετά, η *L.pneumophila* σταματά να αναπαράγεται και εκφράζει χαρακτηριστικά μετάδοσης. Έτσι, ο κύκλος ζωής ολοκληρώνεται, όταν τα βακτήρια απελευθερώνονται από το κύτταρο και εξαπλώνονται προς αναζήτηση νέων ξενιστών, με σκοπό την επανάληψη του.¹⁰ Τώρα, όσον αφορά την ανάπτυξη του βακτηρίου σε μέσο καλλιέργειας, η αναπτυξιακή και η μεταδοτική φάση αναφέρονται ως εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης. Έτσι, είναι προφανές πως η μεταβολική κατάσταση του βακτηρίου μέσα στο κύτταρο, είναι ο κύριος παράγοντας της επιβίωσής του μέσα στο κύτταρο ξενιστή.



Εικ.1.2

Σχηματική απεικόνιση των φάσεων του κύκλου ζωής του παθογόνου *Legionella pneumophila*⁵⁷

Αναλυτικότερα, όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 1.2, ο κύκλος ζωής του βακτηρίου μπορεί να χωριστεί σε έξι φάσεις. Αρχικά, το πρώτο βήμα είναι η πρόσβαση στον ξενιστή και στη συνέχεια η πρόσληψη του παθογόνου από το κύτταρο ξενιστή. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται μέσω περιελιγμένης φαγοκυττάρωσης, που απαιτεί τον κυτταροσκελετό της ακτίνης του ξενιστή. Στο δεύτερο βήμα, η *L. pneumophila* χρειάζεται το εκκριτικό της σύστημα T4BSS, για

να δημιουργήσει το LCV στο οποίο το βακτήριο διαφοροποιείται στην αναπαραγόμενη μορφή για αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό.¹⁴ Η διαφοροποίηση στην αναπτυξιακή μορφή του βακτηρίου επάγεται από την παρουσία θρεπτικών ουσιών, όπως τα αμινοξέα. Τα μιτοχόνδρια και τα κυστίδια από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) αρχίζουν και περιβάλλουν το LCV.²⁴ Το T4BSS εκκρίνει διάφορες πρωτεΐνες τελεστές, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη συνέχεια του κύκλου ανάπτυξης του βακτηρίου. Σε επόμενη φάση, στην αλληλεπίδραση *Legionella*-κυττάρου ξενιστή, η *L. pneumophila* αντιγράφεται εντός του LCV. Στη μεταεκθετική φάση, (PE), όταν περιορίζονται τα θρεπτικά συστατικά, η *L. Pneumophila*, αποκτά μαστίγιο, διαφοροποιείται στη μεταδοτική μορφή και τελικά σε μια ώριμη μολυσματική μορφή που μοιάζει με σπόρο, ανθεκτική στο στρες (MIF).^{25,26,8,27}

Στο τέταρτο βήμα, τα μολυσματικά MIF απελευθερώνονται από τον ξενιστή στο κυτταρόπλασμα και τελικά εξέρχονται από αυτό, με κυτταρική νέκρωση.²⁸ Η απελευθερωμένη μεταβολικά αδρανής μορφή είναι καλά προετοιμασμένη να μολύνει εκ νέου έναν ξενιστή ή να επιβιώσει στο περιβάλλον²⁶ στη μορφή VBNC για μεγάλο χρονικό διάστημα.

1.6 Νόσος των λεγεωναρίων-Πυρετός Pontiac

Η νόσος των λεγεωνάριων, ονομάζεται επίσης λεγεωνέλλωση. Είναι μια λοίμωξη του πνεύμονα (άτυπη πνευμονία) που μπορεί να οδηγήσει σε δυσκολία στην αναπνοή, αναπνευστική ανεπάρκεια ή ακόμα και θάνατο. Οι λοιμώδεις εστίες συνδέονται συνήθως με την έκθεση σε σταγονίδια νερού μολυσμένα με *Legionella*.

Οι λοιμώξεις εκδηλώνονται κυρίως με 2 μορφές. Τη Νόσο των Λεγεωνάριων, η οποία είναι μια σοβαρή μορφή πνευμονίας που οφείλεται σε μόλυνση με *Legionella* και τον πυρετό Pontiac, ο οποίος είναι μια ήπια ασθένεια που μοιάζει με γρίπη και θεραπεύεται μόνος του. Η νόσος των Λεγεωνάριων αφορά συχνότερα τους πνεύμονες και το γαστρεντερικό σωλήνα και σχετίζεται με σημαντική θνησιμότητα. Τα συμπτώματα είναι παρόμοια με εκείνα που

απαντώνται σε άλλες μορφές βακτηριακής πνευμονίας. Η έναρξη των συμπτωμάτων είναι ξαφνική. Τα μη πνευμονικά συμπτώματα όπως, αδυναμία, πυρετός, κακουχία, ρίγη, μυαλγίες, αρθραλγίες, πονοκέφαλος, ναυτία, έμετος και διάρροια, κυριαρχούν τις πρώτες δύο με τρεις ημέρες της ασθένειας. Αυτό το πρότυπο εξέλιξης και η παρουσία διάρροιας, που εμφανίζεται στο ένα τρίτο των περιπτώσεων, συχνά προσφέρουν τις μόνες ενδείξεις για τη διάγνωση. Ακόμη, εμφανίζεται δύσπνοια με την έναρξη άλλων πνευμονικών συμπτωμάτων και τείνει να επιδεινώνεται προοδευτικά σε ασθενείς που δεν λαμβάνουν θεραπεία.^{16,17} Τα χαρακτηριστικά του πυρετού Pontiac είναι ήπιος πυρετός, ρίγη, μυαλγία και πονοκέφαλος που διαρκεί 2 έως 5 ημέρες και συχνά υποχωρεί μόνος του χωρίς σημαντική θνησιμότητα.

Η *Legionella* προσβάλλει κυρίως άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών, αλλά έχουν αναφερθεί περιπτώσεις σε βρέφη και νεογνά. Η νόσος είναι δύσκολο να διακριθεί από την πνευμονία που προκαλείται από άλλα παθογόνα, επειδή παρουσιάζει παρόμοια κλινικά συμπτώματα. Ωστόσο, η παρουσία διάρροιας και αυξημένων επιπέδων κινάσης κρεατινίνης μπορεί να είναι δείκτες μόλυνσης από *Legionella*.^{18,19}

1.7 Διάγνωση-Θεραπεία

Συνήθως, στην νόσο των Λεγεωναρίων τα συμπτώματα είναι παρόμοια με άλλες πνευμονίες και αυτό δυσκολεύει τη διάγνωσή της, μιας και οι κλινικές ή ακτινολογικές ενδείξεις δεν έχουν ιδιαίτερη βαρύτητα.

Έτσι, πραγματοποιούνται επιπλέον εξετάσεις για να φανεί αν η *Legionella* είναι η αιτία της πνευμονίας σας. Αυτές οι εργαστηριακές εξετάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν: εξέταση ούρων, καλλιέργεια βιολογικών δειγμάτων ή και εξέταση αίματος.

Μια εξέταση ούρων μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία της πιο κοινής αιτίας της νόσου των Λεγεωνάριων, που είναι ο ορότυπος 1, αλλά όχι όλοι οι ορότυποι του

βακτηρίου. Στη συλλογή δείγματος καλλιεργούνται τα δείγματα, συνήθως από πτύελα, για να αναπτυχθούν τα βακτήρια.

Στην εξέταση αίματος ελέγχεται το επίπεδο των αντισωμάτων, τη στιγμή των συμπτωμάτων και τις εβδομάδες μετά την ανάρρωσή σας για να προσδιορίσετε εάν το ανοσοποιητικό σας σύστημα παρήγαγε αντισώματα κατά της *Legionella*.¹⁶

Η νόσος των Λεγεωνάριων έχει σημαντικά ποσοστά θνησιμότητας εάν δεν αντιμετωπιστεί ή εάν υπάρχει καθυστέρηση στη χορήγηση της κατάλληλης αντιβιοτικής θεραπείας.²⁰ Οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τη θνησιμότητα είναι η απόκτηση της λοίμωξης σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα, ο διαβήτης, η ανοσοκαταστολή και οι κακοήθειες.

Όσον αφορά τη θεραπεία της νόσου των Λεγεωναίων, τα αντιβιοτικά είναι η θεραπεία πρώτης γραμμής. Ενώ αν δεν υπάρξει χορήγηση κατάλληλης θεραπείας στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, έχει αποδειχτεί ότι αυξάνονται οι πιθανότητες θνησιμότητας.²⁰ Συχνότερα χρησιμοποιούμενα και ομολογουμένως αποτελεσματικά αντιβιοτικά είναι οι φθοριοκινολόνες και οι μακρολίδες. Ακόμη, αποτελεσματική κατά της νόσου έχει αποδειχθεί και η αζιθρομυκίνη με λιγότερες παρενέργειες, σε αντίθεση με την ερυθρομυκίνη που έχει συσχετιστεί με σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες παρά την στοχευμένη της δράση.^{21,22}

1.8 Σκοπός

Η συγκεκριμένη εργασία έχει στόχο την μελέτη αντιγονικών πρωτεϊνών της *Legionella pneumophila*, αλλά και την μεταβολομική ανάλυση βακτηριακών εκχυλισμάτων από καλλιέργειες του βακτηρίου. Συγκεκριμένα, αποσκοπεί στην εύρεση κατάλληλων αντιγονικών πρωτεϊνών που θα χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη ενός γρήγορου και αξιόπιστου διαγνωστικού τεστ, όπως και στη δημιουργία ενός ερευνητικού πρωτοκόλλου εκχύλισης βακτηριακών κυττάρων για απομόνωση των μεταβολιτών και περαιτέρω μελέτη τους με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, γνωστή και ως NMR. Απώτερος σκοπός της

έρευνας, είναι να βρεθεί η διαφοροποίηση των μεταβολιτών του παθογόνου οργανισμού, συγκρίνοντας διάφορα time points και συνεπώς διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Με αυτό τον τρόπο, η μελέτη στοχεύει στην ανεύρεση ιδιαίτερης σημασίας μεταβολιτών, που πιθανόν να αποτελούν στόχο για τη θεραπεία της νόσου των Λεγεωναρίων, που προκαλείται από προσβολή βακτηριακού στελέχους *Lp1*.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Επιλογή Γονιδίων

Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι για αρχή να μελετηθούν πρωτεΐνες του βακτηρίου *Legionella pneumophila*, οι οποίες παρουσιάζουν στοιχεία πιθανών βιοδεικτών τόσο για τη διάγνωση αλλά και πιθανών για την αντιμετώπιση της νόσου των Λεγεωναρίων. Από βιβλιογραφική έρευνα ⁴², επιλέχθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες, που πληρούν τα κριτήρια και κατατάσσονται στους πιθανούς βιοδείκτες της ασθένειας. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, τα αντίστοιχα γονίδια και περεταιίρω χαρακτηριστικά αυτών.

#Sample Number	Protein Name	Gene Name	Molecular Weight (kDa)	Location
1	Elongation Factor G	lpg0326_fusA	77	Cytoplasm
3	Elongation Factor T	lpg0314_tuf2	43	Cytoplasm
8	Elongation Factor T ₂	lpg0327_tufb	43	Cytoplasm
9	Dihydrolipoamide succinyltransferase	lpg0533_sucB	45	Cytoplasm

Πίνακας 2.1

Πρωτεΐνες που εξετάστηκαν στην εργασία.⁴²

2.2 Μετασηματισμός (Transformation)

Ο βακτηριακός μετασηματισμός είναι μια διαδικασία μεταφοράς γονιδίων με την οποία ορισμένα βακτήρια προσλαμβάνουν ξένο γενετικό υλικό από το περιβάλλον, προκειμένου να εκφραστούν οι γενετικές πληροφορίες που υπάρχουν σε αυτό. Στην παρούσα εργασία, η διαδικασία του μετασηματισμού έγινε με τη

μέθοδο του θερμικού σοκ. Σε αυτή τη μέθοδο, με την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας μεταβάλλεται η διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος και της μεμβράνης, επιτρέποντας στα μόρια του DNA να εισέλθουν στο κύτταρο. Στη συνέχεια, με μείωση της θερμοκρασίας, οι πόροι του κυτταρικού τοιχώματος κλείνουν και επανέρχεται στη φυσιολογική κατάσταση.

Συγκεκριμένα, σε αποστειρωμένες συνθήκες 50μL χημειοδεκτικών κυττάρων – competent cells BL21, αναμιγνύονται με 0,5μL πλασμιδίου σε ένα Eppendorf tube. Επωάζεται σε πάγο για 20 λεπτά και ακολουθεί θερμικό σοκ για 30 δευτερόλεπτα στους 42 °C. Στη συνέχεια επανατοποθετούνται σε πάγο για 5'. Αφού προστεθεί 1mL υγρού θρεπτικού LB (Luria Broth), τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για 60 λεπτά υπό ανάδευση, σε 225rpm. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντριση για 3 λεπτά σε 500 rpm. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε πολύ μικρή ποσότητα υπερκείμενου. Σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό LB και αντιβιοτικό carbenicillin 50μg/mL, απλώνονται τα κύτταρα με γυάλινη ράβδο και αφήνεται για ολονύχτια επώαση στους 37 °C . Τα ανασυνδιαμένα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν, είναι αποτέλεσμα της μεταπτυχιακής εργασίας της φοιτήτριας Κουτάντου Μυρτούς.

2.3 Απομόνωση Πλασμιδίου

Αφού ολοκληρωθεί ο μετασχηματισμός, επιλέγονται αποικίες για την απομόνωση του πλασμιδίου που καλλιεργούνται σε 5mL LB, θερμοκρασία 37 °C και υπό ανάδευση σε 180rpm, με 50μg/mL carbenicillin. Για την απομόνωση των πλασμιδίων χρησιμοποιείται το QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η έκλυση του pDNA πραγματοποιείται με 10mM TrisCl, pH 8,5. Μετά την απομόνωση, προσδιορίζεται στο MicroDrop η συγκέντρωση και η καθαρότητα του.

2.4 Στερεή καλλιέργεια E.coli

Για την στερεή καλλιέργεια του βακτηρίου *E.Coli* σε τρυβλίο, ζυγίζεται 1,5gr άγαρ και διαλύεται σε 100mL θρεπτικό LB, το οποίο θα αποστειρωθεί στον κλίβανο. Μετά το τέλος της αποστείρωσης και αφού η θερμοκρασία του διαλύματος έχει πέσει στους 50 °C, γίνεται προσθήκη αντιβιοτικού carbenicillin 50μg/mL, σε αναλογία 1:1000. Το τελικό διάλυμα με το θρεπτικό μοιράζεται ισόποσα σε τρυβλία Petri και αφού πήξουν σε θερμοκρασία δωματίου τοποθετούνται στους 4 °C.

2.5 Υγρή καλλιέργεια E. Coli

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων *E.Coli* με σκοπό την παραγωγή πρωτεϊνών, θα χρησιμοποιηθεί θρεπτικό υλικό Luria Broth (LB). Για την προετοιμασία LB όγκου 1L , ζυγίζονται 10gr Tryprone, 5gr Yeast Extract και 10gr NaCl. Διαλύονται και 900mL απιονισμένου νερού υπό ανάδευση. Με προσθήκη διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 1N, ρυθμίζεται το pH στο εύρος 7-7,2. Στη συνέχεια το διάλυμα ογκομετρείται στο 1L και τέλος ακολουθεί αποστείρωση στον κλίβανο, σε συνθήκες 120 °C, 15psi για 20 λεπτά. Για την ανάπτυξη των κυττάρων *E.Coli*, μια αποικία από το τρυβλίο μεταφέρεται σε κωνική φιάλη με 25mL LB με carbenicillin 50μg/mL. Η κωνική αυτή περιέχει την προκαλλιέργεια και θα αφεθεί για ολονύχτια επώαση στους 37 °C, υπό ανάδευση 180rpm. Την επόμενη μέρα, η προκαλλιέργεια μεταφέρεται σε 1Lt LB με αντιβιοτικό carbenicillin (1:1000) και αφήνεται για επώαση στον incubator, υπό ανάδευση 180rpm, στους 37 °C. Με το πέρας της 1,5 ώρας, σε δείγμα 1mL από την καλλιέργεια, μετράται η οπτική πυκνότητά της στα 600nm (OD₆₀₀). Η επιθυμητή τιμή της οπτικής πυκνότητας είναι μέσα στο εύρος 0,450-0,650. Αν αυτή έχει επιτευχθεί στην πρώτη δειγματοληψία, ακολουθεί η επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης με την προσθήκη IPTG. Το IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) είναι αντιδραστήριο που μιμείται την αλλολακτόζη. Η ποσότητα IPTG που θα προστεθεί και ο χρόνος επώασης της καλλιέργειας στον incubator μετά την επαγωγή, είναι διαφορετικές για την κάθε πρωτεΐνη και

καθορίζονται από δοκιμές. Στο τέλος, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 600rpm και φυλάσσονται στους -20 °C.

2.6 Καλλιέργεια *Legionella pneumophila*

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων και την απομόνωσή τους για περαιτέρω επεξεργασία και μελέτη, αρχικά γίνεται στερεή καλλιέργεια και έπειτα υγρή. Στους παρακάτω Πίνακες αναγράφονται τα υλικά των θρεπτικών που απαιτούνται για την καλλιέργεια του βακτηρίου *Legionella pneumophila*.

<i>BCYE-α</i>	
ACES buffer/Potassium hydroxide	5gr
Ferric pyrophosphate, soluble	0,125gr
L-cysteine hydrochloride	0,2gr
alpha-Ketoglutarate	0,5gr
Distilled water	60mL
molten, cooled (45-50oC) <i>Legionella</i> Agar Base, sterile	440mL

Πίνακας 2.2

BCYE-α growth supplement (Buffered Charcoal Yeast Extract)-1 vial per 500mL medium

BHI (Brain Heart Infusion) Broth	
Brain infusion solids	12.5gr
Beef heart infusion broth	5gr
Proteose peptone	10gr
Glucose	2gr
Disodium phosphate	2,5gr

Πίνακας 2.3

BHI (Brain Heart Infusion Broth) (1L) Oxoid CM1135

AYE	
ACES (N-2-acetamido-2-aminoethane sulfonic acid)	10gr
yeast extrac	10gr
l-Cys	0,4gr
ferric pyrophosphate	0,25gr

Πίνακας 2.4

AYE (1000 mL), pH=6,8

Για την παρασκευή των θρεπτικών και της καλλιέργειας απαιτούνται αποστειρωμένες συνθήκες. Αρχικά, σε 1ml αποστειρωμένου διαλύματος 20% BHI, διαλύεται μία μοναδιάα αποικία σε φιαλίδιο φύλαξης και έπειτα φυλάσσεται στους -20 °C. Πριν την καλλιέργεια αυτού, ξεπαγώνεται, αναδεύεται και ανοίγεται κοντά σε φλόγα. Με τη loop, η οποία έχει αποστειρωθεί, καίγοντας τη για μερικά δευτερόλεπτα στην φλόγα με την οποία εξασφαλίζονται αποστειρωμένες συνθήκες εργασίας, μεταφέρεται μικρή ποσότητα δείγματος και απλώνεται στο τρυβλίο που περιέχει BCYE-α θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια το τρυβλίο θα επωαστεί στους 36 °C.

Για την υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου *Legionella pneumophila*, επιλέγεται μια καθαρή αποικία από το τρυβλίο της στερεής καλλιέργειας και διαλύεται σε 22,5 mL yeast extract σε falcon 50mL και τέλος προστίθενται τα 2,5mL θρεπτικού BCYE-α. Τα συνολικά 25mL υγρής καλλιέργειας αφήνονται για επώαση στον incubator, στους 36 °C, υπό ανάδευση 180rpm για 24, 48 και για 72 ώρες αντίστοιχα. Καθ' όλη τη διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων καλλιέργειας, η διαδικασία γίνεται δίπλα στη φλόγα σε αποστειρωμένες συνθήκες. Ακόμη, κάθε φορά που ανοίγει ή κλείνει το καπάκι κάποιου σκεύους, καίγεται στη φλόγα για περαιτέρω προστασία και αποστείρωση.

2.7 Λύση κυττάρων

Τα κύτταρα τα οποία συλλέγονται από τις καλλιέργειες, μετά το τελικό στάδιο με τη φυγοκέντριση, φυλάσσονται στους -20 °C. Για τη διαδικασία της λύσης που ακολουθεί, χρειάζεται να ξεπαγώσουν και όταν φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται σε αυτά lysis buffer, όγκου (mL) , που ισούται με το εξαπλάσιο του βάρους τους σε γραμμάρια. Σε πρώτο στάδιο προστίθεται η μισή ποσότητα του lysis buffer και αφήνεται σε ηρεμία για 10' στον πάγο. Στη συνέχεια, προστίθεται η υπόλοιπη ποσότητα του lysis buffer και αναδεύεται έως ότου γίνει ομοιογενές. Στο τέλος της διαδικασίας προστίθενται ελάχιστα mg DNAase και 1mM PMSF. Ακολουθεί η λύση των κυττάρων, η οποία στην εργασία αυτή έγινε

με δύο διαφορετικούς τρόπους. Η πρώτη μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι η μηχανική λύση κυττάρων σε French Press (SLM Aminco, Model: FA-078) στα 40,000PSI, και η δεύτερη είναι η λύση κυττάρων με υπερήχους.

Lysis Buffer	
HEPES	20mM
NaCl	300mM
EDTA	1mM

Πίνακας 2.5

Υλικά για την Παρασκευή Lysis Buffer

Στην μέθοδο με την French Press, τα κύτταρα λύνονται μηχανικά μέσω της υψηλής πίεσης που τους ασκείται με το εξαναγκασμένο πέρασμα του αιωρήματος από τη μικρού διαμέτρου οπή, όπου και η αναπτυσσόμενη διάτμηση "σπάει" τα τοιχώματα των κυττάρων. Το δείγμα στη συνέχεια πιέζεται μέσα από μία βαλβίδα και υφίσταται τάση και αποσυμπίεση, προκαλώντας κυτταρική διαταραχή.²⁹

Η μέθοδος της λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων, χρησιμοποιείται τόσο για λύση κυττάρων *E.Coli*, όσο και για λύση κυττάρων *Legionella pneumophila*. Όσον αφορά τα κύτταρα *E.Coli*, οι συνθήκες λύσης είναι 15s on, 45 off, με amplitude 40%, cycle 100% για 15 λεπτά σε κάθε δείγμα. Όσον αφορά τα δείγματα κυττάρων *Legionella pneumophila*, οι συνθήκες που ακολουθούνται είναι 10s on, 50 off, με amplitude 70%, cycle 100% για 20 λεπτά σε κάθε δείγμα.

2.8 Διαχωρισμός μεμβρανικών και υδατοδιαλυτών κλασμάτων

Μετά την λύση των κυττάρων, τα κύτταρα φυγοκεντρώνται για 20', στις 12,000rpm σε θερμοκρασία 4 °C, ώστε να γίνει διαχωρισμός σπασμένων και

άσπαστων κυττάρων. Το ίζημα είναι τα κύτταρα που δεν υπέστησαν λύση, ενώ το υπερκείμενο είναι το ζητούμενο και συλλέγεται. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υπερφυγοκεντρείται για 60', στις 35,000rpm σε θερμοκρασία 4 °C, με σκοπό να διαχωριστούν το μεμβρανικό από το υδατοδιαλυτό κλάσμα, ίζημα και υπερκείμενο αντίστοιχα. Το μεμβρανικό κλάσμα στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιείται με 1mL Lysis Buffer και όλα τα δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C.

2.9 Μέθοδος Bradford-Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Πρώτο βήμα για την απομόνωση και ανάλυση των πρωτεϊνών στα δείγματα είναι η μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσής τους, που γίνεται με την μέθοδο Bradford. Βάση της μεθόδου αποτελεί η χρωστική που χρησιμοποιείται, η Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία έχει αρνητικό φορτίο. Στην ελεύθερη μορφή της έχει κόκκινο χρώμα και μέγιστο απορρόφησης στα 465nm, ενώ όταν αλληλεπιδρά σε όξινο περιβάλλον με την θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη, το σύμπλοκο που δίνει έχει μπλε χρώμα και μέγιστο απορρόφησης στα 595nm. Για την χρήση αυτής της μεθόδου απαιτείται ο σχεδιασμός καμπύλης αναφοράς. Για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάζεται μια σειρά διαλυμάτων με διαφορετικές αλλά γνωστές ποσότητες μιας πρότυπης πρωτεΐνης, στην προκειμένη περίπτωση Bovine Serum Albumin. Έπειτα μετράται η απορρόφηση καθενός από τα δείγματα και κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της απορρόφησης A ως προς την ποσότητα πρωτεΐνης.

Συγκεκριμένα, στην εφαρμογή της μεθόδου Bradford, στα άγνωστα δείγματα θα γίνουν αραιώσεις με αναλογίες 1:20 και 1:40 στα μεμβρανικά και 1:10 και 1:20 στα υδατοδιαλυτά κλάσματα. Έπειτα, επιλέγεται ένα 96-well plate και στο πηγαδάκι του κάθε δείγματος προστίθενται 10μL δείγματος και 200μL αντιδραστήριου Bradford. Τέλος, μετράται στο φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση στα 595nm. Η απορρόφηση πλέον, είναι ανάλογη της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, επομένως για τον προσδιορισμό της άγνωστης συγκέντρωσης του δείγματος, χρησιμοποιείται η καμπύλη αναφοράς.

2.10 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης (BCA)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης σε ένα δείγμα υπάρχει και άλλη μία μέθοδος, η Bicinchoninic Acid Assay- BCA. Αυτή βασίζεται στο ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να ανάγουν το Cu^{+2} σε Cu^{+1} σε ένα αλκαλικό διάλυμα (αντίδραση διουρίας), με την αναγωγή του χαλκού να προκαλείται κυρίως από υπολείμματα αμινοξέων όπως η κυστεΐνη, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνης που υπάρχουν στην πρωτεΐνη. Στη συνέχεια, δύο μόρια BCA σχηματίζουν χηλικό σύμπλοκο με κάθε ιόν Cu^{+} προκαλώντας αλλαγή χρώματος από πράσινο σε μωβ με ισχυρή απορρόφηση στα 562 nm.^{30,31,32}

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε BCA assay kit, Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific. Το διάλυμα BCA φτιάχνεται αναμειγνύοντας τα αντιδραστήρια A (Bicinchoninic Acid, Sodium Carbonate, Sodium Tartrate, and Sodium Bicarbonate, pH=11.25) και B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) σε αναλογία 50:1. Για τα άγνωστα δείγματα γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις και τοποθετούνται 10μl σε κάθε πηγαδάκι ενός 96-well plate και 200μl διαλύματος BCA. Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C στο σκοτάδι, για 30 λεπτά. Τέλος, η απορρόφηση μετράται στα 562nm με Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer.

2.11 Χρωματογραφία συγγένειας

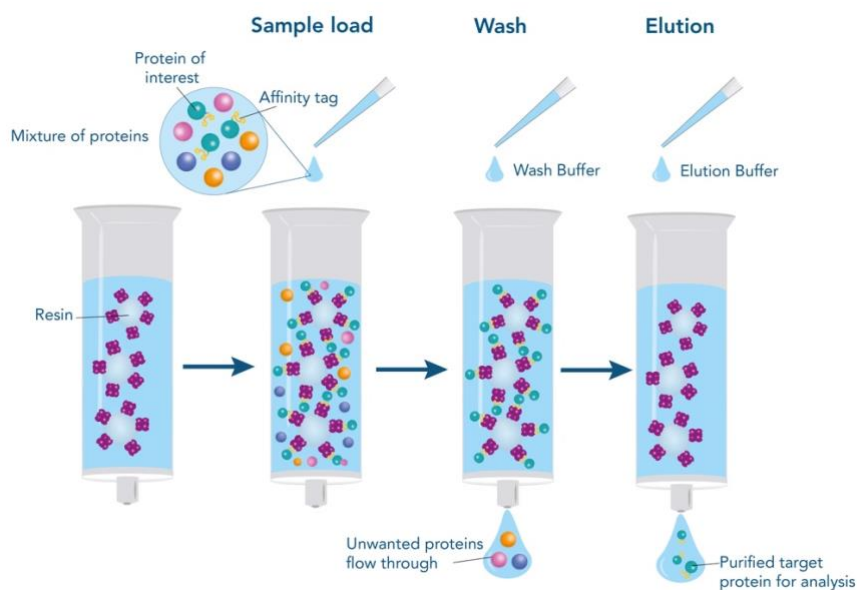
Η Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) αгарόζη είναι μια μήτρα χρωματογραφίας συγγένειας για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που περιέχουν μια ετικέτα έξι ή περισσότερων υπολειμμάτων ιστιδίνης, στο άμινο- είτε στο καρβόξυ-τελικό άκρο τους, την λεγόμενη His-Tag. Τα υπολείμματα ιστιδίνης στην His-Tag συνδέονται με τις κενές θέσεις στη σφαίρα συντονισμού των ακινητοποιημένων ιόντων νικελίου με υψηλή ειδικότητα και συγγένεια και διαχωρίζονται από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες στο δείγμα.

Τα δείγματα φορτώνονται στο υλικό πλήρωσης. Οι πρωτεΐνες με επισήμανση His-Tag δεσμεύονται και άλλες πρωτεΐνες περνούν μέσα από αυτό. Μετά το πλύσιμο,

οι επισημασμένες με His πρωτεΐνες εκλούνται με την βαθμιδωτή αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου στην κινητή φάση.

Για την διαδικασία της χρωματογραφίας συγγένειας με στήλη νικελίου, τα δείγματα, τόσο τα μεμβρανικά, όσο και τα υδατοδιαλυτά, χρειάζεται να υποστούν μία συγκεκριμένη επεξεργασία. Για τα μεμβρανικά υπάρχει ένα επιπλέον βήμα, αυτό της διαλυτοποίησης των μεμβρανών. Αυτή επιτυγχάνεται με προσθήκη απορρυπαντικού DDM 1% w/v σε Lysis Buffer με 1mM PMSF και η ζητούμενη τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα είναι 5mg/mL. Το δείγμα τοποθετείται υπό ανάδευση για 60 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 35,000rpm, σε θερμοκρασία 4 °C, για 60 λεπτά. Στο τέλος, συλλέγεται το υπερκείμενο που περιέχει τις διαλυτοποιημένες μεμβράνες και φιλτράρεται με σύριγγα πόρων διαμέτρου 0,2μm. Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία της χρωματογραφίας. Στα υδατοδιαλυτά, ακολουθείται η ίδια διαδικασία παραλείποντας το στάδιο της διαλυτοποίησης για 60 λεπτά στο πρώτο βήμα.

Όσον αφορά τη χρωματογραφία συγγένειας με στήλη νικελίου, το πρώτο βήμα είναι η προσθήκη 1mM ιμιδαζολίου, pH=7,4, για να αυξηθεί η προσδετική ικανότητα της πρωτεΐνης που πρόκειται να απομονωθεί. Το δείγμα θα τοποθετηθεί σε στήλη όγκου 4mL. Η στήλη έχει εξ' αρχής εξισορροπηθεί με 10 όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης, Buffer A και Buffer B, με τελική συγκέντρωση 10mM ιμιδαζολίου. Το έκλουσμα συλλέγεται. Ακολουθούν πλύσεις με 10 όγκους στήλης διαλύματος 10mM και 30mM ιμιδαζολίου αντίστοιχα και η έκλυση στο τέλος γίνεται με μία πλύση 5 όγκων στήλης διαλύματος έκλυσης 300mM ιμιδαζολίου. Στα διαδοχικά βήματα συλλέγονται όλα τα κλάσματα από τις πλύσεις. Στα μεμβρανικά δείγματα γίνεται επιπλέον προσθήκη 0,2% DDM σε όλα τα διαλύματα έκλυσης που περνάν από τη στήλη. Στο τέλος, το κλάσμα της πρωτεΐνης συμπυκνώνεται σε φίλτρο Amicon Ultra Centrifugal Filters (Invitrogen) σε τελικό όγκο έως 500μL.



Εικ.2.1

Τρόπος λειτουργίας της χρωματογραφίας συγγένειας (<https://www.iba-lifesciences.com/applications/protein-affinity-chromatography/>)

2.12 Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης που βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο, με σκοπό να διαχωρίσει πρωτεΐνες βάση του μοριακού τους βάρους. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ηλεκτροφόρησης, στη συγκεκριμένη εργασία εφαρμόστηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE), όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τη μάζα τους. Έτσι, τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη, που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με τη βοήθεια της θερμότητας. Με αυτόν τον τρόπο, εξασφαλίζεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών αποκλειστικά βάσει μεγέθους και όχι άλλων χαρακτηριστικών τους. Ακολουθούν συγκεντρωτικοί πίνακες με τα υλικά που χρειάζονται για την διαδικασία της μονοδιάστατης ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).

Glycerol
Ammonium Persulfate (APS) 10%
TEMED
AB-mix buffer
Gel Buffer

Πίνακας 2.6

Υλικά παρασκευής πηκτής πολυακρυλαμιδίου

AB-mix buffer	
Acrylamide	48gr/100mL
Bis-Acrylamide	1,5gr/100mL

Πίνακας 2.7

Υλικά παρασκευής AB-mix buffer (49,5% T, 3% C)

Gel Buffer	
Tris/HCl	3M, pH=8,5
SDS	0,3% w/v

Πίνακας 2.8

Υλικά για την παρασκευή Gel Buffer

Η πηκτική πολυακρυλαμιδίου χωρίζεται σε δύο διαφορετικές καταστάσεις, με διαφορετική σύσταση. Την πηκτική επιστοίβασης και την πηκτική διαχωρισμού. Στο πλαίσιο που διαμορφώνεται, μεταξύ των δύο ειδικών γυάλινων τζαμιών, τοποθετείται το διάλυμα της πηκτικής διαχωρισμού και μένει έως ότου πολυμεριστεί. Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα της πηκτικής επιστοίβασης και πριν προλάβει να πήξει προστίθενται ειδικά κτενάκια που θα δημιουργήσουν τις θέσεις εισαγωγής του δείγματος στην πηκτική. Όταν και αυτή πήξει, τότε το gel αφαιρείται από το πλαίσιο και φυλάσσεται σε υγρή πετσέτα στους 4 °C. Το gel τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, και σε αυτή συμπληρώνεται το

anode και cathode buffer (1x). Στη συνέχεια, τοποθετούνται τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση, έχοντας επεξεργαστεί κατάλληλα. Πριν την τοποθέτησή τους στη συσκευή, στα δείγματα προστίθεται sample buffer (4x) και αφήνονται στους 40 °C για 30 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί η αποδιάταξή τους, φορτώνονται 20μL δείγματος σε κάθε πηγαδάκι του gel και ξεκινάει η ηλεκτροφόρηση στα 200mA. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το gel τοποθετείται σε διάλυμα χρώσης Blue Silver G-250 και αφήνεται μέχρι να γίνουν ορατές οι μπάντες των δειγμάτων. Μετά από αυτό, τοποθετείται και σε διάλυμα αποχρωματισμού, ώστε να φύγουν τυχόν εντάσεις χρώσης στο φόντο.

Πηκτή Επιστοιβασής 4%	
AB-mix	1mL
Gel buffer	4mL
H2O	Συμπλήρωμα μέχρι τελικό όγκο
APS	90μL
TEMED	9μL

Πίνακας 2.9

Υλικά παρασκευής πηκτής επιστοιβασής 4% (Τελικός όγκος 12mL)

Πηκτή Διαχωρισμού 10%	
AB-mix	6mL
Gel buffer	10mL
Glycerol	3gr
H2O	Συμπλήρωμα μέχρι τελικό όγκο
APS	150μL
TEMED	15μL

Πίνακας 2.10

Υλικά παρασκευής πηκτής διαχωρισμού 10% (Τελικός όγκος 30mL)

Anode buffer (10x)	
Tris/HCl	1M, pH=8,9

Πίνακας 2.11

Υλικά παρασκευής Anode Buffer (10x)

Cathode buffer (10x)	
Tris	1M
Tricine	1M
SDS	1% w/v

Πίνακας 2.12

Υλικά παρασκευής Anode Buffer (10x)

Sample Buffer (4x)	
SDS	8% w/v
Glycerol	40% w/v
Beta-mercaptoethanol	5%
Bromophenol blue	0,04%
Tris/HCl	240mM

Πίνακας 2.13

Υλικά παρασκευής Sample Buffer

Blue Silver (200mL)	
Phosphoric Acid 10% v/v	20mL
Ammonium Sulfate 10% w/v	20gr
Dd H2O	40mL
Coomassie Blue G-250	0.24gr
Methanol 20% v/v	40mL

Πίνακας 2.14

Υλικά παρασκευής διαλύματος χρώσης του gel

Διάλυμα Αποχρωματισμού
Acetic Acid 7% v/v
Methanol 5%
Nanopure H2O

Πίνακας 2.15

Υλικά παρασκευής διαλύματος αποχρωματισμού του gel

2.13 Ανοσοαποτύπωμα (Western Blot)

Μετά την ηλεκτροφόρηση, η μεταφορά των πρωτεϊνών (blotting) γίνεται σε μια συνθετική μεμβράνη PVDF υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος. Η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος κατά την διάρκεια της μεταφοράς είναι $[1,2 * \text{ύψος μεμβράνης} * \text{πλάτος μεμβράνης}] \text{ mA/cm}^2$ και η μεταφορά διαρκεί μιάμιση ώρα. Στη συσκευή του blotting τοποθετούνται με σειρά, 5 διηθητικά χαρτιά στο μέγεθος της πηκτής που έχουν βραχεί με TBST, η πηκτή, η μεμβράνη που έχει κοπεί στο μέγεθος της πηκτής και έχει ενεργοποιηθεί σε MeOH και τέλος 5 διηθητικά χαρτιά ξανά. Η τοποθέτηση της πηκτής γίνεται προς την άνοδο, ενώ της

μεμβράνης προς την κάθοδο, αφού οι πρωτεΐνες μας έχουν αρνητικό φορτίο και πρέπει να μεταφερθούν από την πηκτή προς την μεμβράνη.

Μετα το πέρας της μεταφοράς ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης σε 2% BSA σε TBST buffer για 60 λεπτά, προκειμένου να καλυφθούν οι μη-ειδικές θέσεις. Μετά την επώαση γίνονται τρεις πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών με TBST buffer. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης για 60 λεπτά με το πρωτοταγές αντίσωμα σε TBST [ορός ασθενούς (1:500) ή anti-His Alkaline phosphatase antibody (1:2000) (Sigma-Aldrich)]. Μετά την επώαση επαναλαμβάνονται τρεις πλύσεις με TBST. Η μεμβράνη επωάζεται, εάν χρειάζεται, για 60 λεπτά με δευτεροταγές αντίσωμα σε TBST [anti-human IgG, Alkaline phosphatase antibody (1:1000) (Sigma-Aldrich)]. Γίνονται ξανά τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με TBST όπως πριν και άλλες τρεις των 5 λεπτών με Alkaline Phosphatase buffer (AP buffer). Η εμφάνιση των πρωτεϊνών γίνεται με επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα με 250μg/ml BCIP και 500μg/ml NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium), έως ότου εμφανιστεί ιώδες χρώμα στις μπάντες της πρωτεΐνης. Το μόριο BCIP υδρολύεται με το ρυθμιστικό AP και το παραγόμενο μόριο διμερίζεται για να δώσει ένα προϊόν χρώματος ιώδους.

TBST Buffer	
Tris/HCl	10mM, pH=8,5
NaCl	150mM
Tween20	0,05%

Πίνακας 2.16

Υλικά παρασκευής διαλύματος TBST Buffer

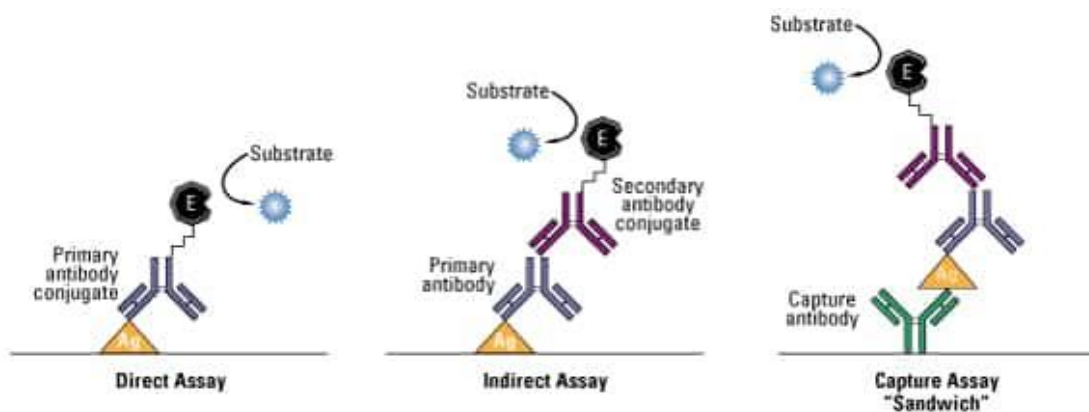
AP Buffer (Alkaline phosphatase)	
Tris/HCl	100mM, pH=9,5
NaCl	100mM
MgCl ₂	5mM

Πίνακας 2.17

Υλικά παρασκευής διαλύματος AP Buffer

2.14 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Η ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αντιγονικότητας των πρωτεϊνών της *Legionella pneumophila*. Σε μια ELISA, το αντιγόνο ακινητοποιείται σε μια στερεή επιφάνεια και στη συνέχεια δημιουργεί σύμπλοκο με το αντίσωμα, που είναι ειδικό για αυτό. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα που είναι σημασμένο με ένα ένζυμο, και συνδέεται στο πρώτο αντίσωμα. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου αναφοράς, μέσω επώασης με το κατάλληλο υπόστρωμα για την παραγωγή ενός μετρήσιμου προϊόντος, όπως στην συγκεκριμένη περίπτωση ένα έγχρωμο προϊόν. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του βιομορίου που μελετάται.



Εικ.2.2

Απεικόνιση τρόπου λειτουργίας της ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Microtiter flat bottom 96-wells plates καλύπτονται με διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης - αντιγόνου, 5, 10, 15 και 20μg/mL σε coating buffer. Το plate φυλάσσεται στους 4°C ολονύκτια, καλυμμένο με διάφανη μεμβράνη. Την επομένη, αφού έχει αφαιρεθεί το υγρό από τα πηγαδάκια του plate, προστίθενται 200μL blocking buffer σε κάθε θέση και αφήνεται για επώαση για 60 λεπτά στους 37 °C. Στη συνέχεια, ακολουθούν 3 πλύσεις με 200μL washing Buffer η καθεμία και προστίθενται 100μL αντισώματος σε κάθε θέση. Το αντίσωμα έχει αραιωθεί σε blocking buffer με αναλογία 1:1000. Αφήνεται για επώαση στους 37 °C για 60 λεπτά. Ακολουθούν ξανά 3 πλύσεις με washing Buffer και έπειτα προστίθεται 100μL rabbit anti-human IgG HRP, που έχει αραιωθεί σε

blocking buffer με αναλογία 1:3000. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 30' και 3 πλύσεις με washing buffer. Μετά από προσθήκη 100μL υποστρώματος TMB (Core Biorad) και επώαση για 10 λεπτά στο σκοτάδι, η αντίδραση σταματάει με προσθήκη 100μL H₂SO₄ 0,5M. Τέλος, σε microplate reader (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific), μετράται η απορρόφηση στα 450nm.

2.15 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών

Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης εκμεταλλευόμαστε την ικανότητα της θρυψίνης, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου, να διασπά τις πεπτιδικές αλυσίδες κυρίως στο καρβοξυλικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη ή αργινίνη των πρωτεϊνών. Η χρήση της είναι ευρέως διαδεδομένη στην πρωτεομική ανάλυση. Οι λωρίδες που έχουν εμφανιστεί στην πηκτή σε μπάντες, κόβονται σε πολύ μικρά κομμάτια και τοποθετούνται σε eppendorfs. Εκεί ακολουθούν 3 πλύσεις των 15 λεπτών με 50% v/v ACN και 50mM ABS, ώστε να απομακρυνθεί η χρώση που τα έκανε ορατά στην πηκτή. Στη συνέχεια προστίθεται 10mM DDT σε 50mM ABS και επωάζονται για 45 λεπτά σε θερμοκρασία 56°C. Έπειτα, για την αλκυλίωση τους, επωάζονται για 45 λεπτά υπό ανάδευση στο σκοτάδι, με ιωδοακεταμίδιο 55mM σε 50mM ABS. Γίνονται, 3 πλύσεις των 15 λεπτών με 50mM ABS και 50% ACN και μετά προστίθεται 100% ACN και επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να αφυδατωθούν. Μετά το πέρας των 15 λεπτών, προστίθενται 25-30μL θρυψίνης (20μg σε 160μL HCl 1mM). Η θρυψίνη έχει αραιωθεί σε 10mM ABS και 10% ACN. Αφήνεται για επώαση 14-16 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C. Ακολουθεί επώαση σε 50% ACN - 0,1% TFA για 30 λεπτά και μετά σε 100% ACN. Τέλος, συλλέγεται το υπερκείμενο από τις πλύσεις που περιέχει τα ζητούμενα πεπτίδια και ξηραίνεται στο speed-vac. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C.

2.16 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική στην οποία τα δείγματα ιονίζονται σε φορτισμένα μόρια και μετράται η αναλογία μάζας προς φορτίο. Στη φασματομετρία μάζας MALDI-TOF, η πηγή ιόντων είναι ο ιονισμός από λέιζερ υποβοηθούμενος από μήτρα (MALDI- matrix-assisted laser desorption/ionization) και ο αναλυτής μάζας είναι ο αναλυτής χρόνου πτήσης (TOF- time of flight). Το MALDI είναι κατάλληλο για την ανάλυση βιομορίων όπως πεπτίδια, λιπίδια, σακχαρίτες και άλλα οργανικά μακρομόρια. Η βασική αρχή του TOF, είναι ότι ιόντα διαφορετικών m/z διασκορπίζονται χρονικά κατά τη διάρκεια της πτήσης τους. Με την προϋπόθεση ότι όλα τα ιόντα ξεκινούν το ταξίδι τους την ίδια στιγμή ή σε ένα αρκετά σύντομο χρονικό διάστημα, τα ελαφρύτερα θα φτάσουν νωρίτερα στον ανιχνευτή από τα βαρύτερα.

Στην πρωτεομική, το MALDI χρησιμοποιείται για την ταχεία ταυτοποίηση πρωτεϊνών. Η λήψη αποτυπωμάτων μάζας των πεπτιδίων είναι η πιο δημοφιλής αναλυτική εφαρμογή MALDI-TOF. Σε αυτή την προσέγγιση, τα πεπτίδια παράγονται με πέψη πρωτεϊνών από ένα ειδικό για την αλληλουχία ένζυμο όπως η θρυψίνη. Και στη συνέχεια τα πεπτίδια αναλύονται με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF για να ληφθούν οι πεπτιδικές μάζες. Οι πειραματικές μάζες συγκρίνονται με μια βάση δεδομένων που περιέχει θεωρητικές πεπτιδικές μάζες από έναν δεδομένο οργανισμό.

2.17 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, είναι μία τεχνική που βασίζεται στη διέγερση των πυρήνων των μορίων, όταν αυτοί βρίσκονται υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μαγνητικό πεδίο. Όταν ένα δείγμα εκτίθεται σε μαγνητικό πεδίο και παλμό ραδιοσυχνότητας (rf), οι πυρήνες απορροφούν και εκπέμπουν εκ νέου αυτήν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η ενέργεια που εκπέμπεται έχει μια συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού, η οποία

εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των μαγνητικών ιδιοτήτων των ισοτόπων των ατόμων και της ισχύος του μαγνητικού πεδίου. Είναι μία από τις κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την λήψη διάφορων ειδών πληροφοριών για τα μόρια και μπορεί να δώσει ακριβείς και λεπτομερείς πληροφορίες για τη δομή την τοπολογία και άλλα χαρακτηριστικά των μορίων, όταν αυτά βρίσκονται τόσο σε υγρή όσο και σε στερεή κατάσταση. Ένα από τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής έναντι άλλων ειδών φασματοσκοπίας, είναι πως η μέθοδος είναι μη-καταστρεπτική και για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται σε πληθώρα δοκιμών, όπως αυτή της μελέτης διάφορων βιολογικών δειγμάτων.⁴³

Αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο εκχύλισης των βακτηριακών κυττάρων⁶⁵, μετά τη λύση τους, ώστε να απομονωθούν οι μεταβολίτες του βακτηρίου σε βέλτιστες συνθήκες και να είναι σε θέση να μελετηθούν στη συνέχεια με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, με τις μικρότερες απώλειες.

Αρχικά, από στερεή καλλιέργεια του βακτηρίου γίνεται υγρή καλλιέργεια σε falcon των 50mL με συνολικό όγκο καλλιέργειας 30mL και με αρχική οπτική πυκνότητα κάθε δείγματος $OD_{600}=0,2$. Τα δείγματα συλλέγονται ανά ισόποσες ομάδες στις 24, στις 48 και στις 72 ώρες, ώστε να υπάρχει ίσος αριθμός δειγμάτων από κάθε χρονική στιγμή. Ακολουθεί φυγοκέντριση των falcon με στα 4.355g, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 5 °C. Το υπερκείμενο όπου βρίσκονται τα θρεπτικά υλικά απορρίπτεται και το ίζημα στο οποίο είναι τα ζητούμενα κύτταρα συλλέγεται. Στη συνέχεια γίνονται 3 πλύσεις με 1mL παγωμένο PBS στα κύτταρα. Αυτό γίνεται με προσθήκη του PBS στο falcon, διαλυτοποίηση των κυττάρων, μεταφορά τους σε Eppendorf των 2mL και στη συνέχεια ανάδευση στο vortex και φυγοκέντριση ώστε να απορριφθεί το υπερκείμενο. Στην φυγοκέντριση η θερμοκρασία είναι 5 °C. Επόμενο βήμα είναι η ομογενοποίηση του δείγματος με 600μL ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου (50% acetonitrile (v/v), 50mM NaH_2PO_4/K_2HPO_4 buffer pH=7,4) και έπειτα 3 κύκλοι κατάψυξης – απόψυξης του δείγματος σε υγρό άζωτο. Ακολουθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων με τη μέθοδο των υπερήχων. Οι συνθήκες λύσης είναι 20 κύκλοι του 1 λεπτό στους υπερήχους, με 10 δευτερόλεπτα σε υπέρηχους και 50 δευτερόλεπτα σε υσυχία, και σε όλη τη διαδικασία το δείγμα να βρίσκεται στον πάγο ώστε να παραμένει η θερμοκρασία χαμηλή. Με το πέρας της λύσης, το δείγμα φυγοκεντρείται στα 17.418g, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C και το υπερκείμενο συλλέγεται. Το

ίζημα επαναϊωρείται σε 500μL ρυθμιστικού διαλύματος ακετονιτριλίου, ακολουθεί ανάδευση με vortex για περαιτέρω εκχύλιση και ξανά φυγοκέντριση όπου το υπερκείμενο συλλέγεται και ενώνεται με το προηγούμενο. Το δείγμα ξηραίνεται υπό κενό σε speed-vac και φυλάσσεται στους -80 °C.

Συνέχεια έχει η προετοιμασία του δείγματος για ανάλυση στο NMR όργανο με την προσθήκη ποσότητας ρυθμιστικού και δευτεριομένου νερού D₂O, ώστε να επιτευχθεί διατήρηση της ομοιογένειας του δείγματος. Στην προκειμένη περίπτωση, το δείγμα διαλύθηκε σε 550μL ρυθμιστικού 0,2M K₂HPO₄, 4% NaN₃ σε 100% D₂O με 0,1 mM TSP. Το TSP (Trimethylsilylpropanoic acid) χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο και για ποσοτικοποίηση. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε σωληνίσκο κατάλληλης διαμέτρου, 5mm ή 10mm, και τελικά στον αισθητήρα. Στα δείγματα πάρθηκαν φάσματα τόσο σε φασματόμετρο Bruker DPX-300MHz όσο και σε φασματόμετρο Bruker 700MHz High-Definition NMR AVANCE III με ψυχόμενη τρι-πυρηνική cryo probe.

Τα δείγματα αναλυθηκαν με NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), κατά την οποία καταστέλλεται ο συντονισμός των πρωτονίων του διαλύτη, με την χρήση ακτινοβολίας συγκεκριμένης συχνότητας. Αυτό συμβαίνει κατά τους χρόνους καθυστέρησης μεταξύ των πειραμάτων και τον χρόνο μίξης της ακολουθίας. Ως αποτέλεσμα, έχει την μείωση της διαφοράς των spin που συντονίζονται με τη συχνότητα του νερού και βρίσκονται σε ισορροπία.^{44,45} Η ακολουθία αυτή είναι πολύ χρήσιμη, διότι στις περισσότερες περιπτώσεις δειγμάτων υπάρχει δυσαναλογία στον πληθυσμό των πρωτονίων της ουσίας του δείγματος και αυτών που προέρχονται από τον διαλύτη. Έτσι προκύπτουν φάσματα με κορυφή σήματος του διαλύτη τόσο μεγαλύτερη των υπολοίπων, που υπερκαλύπτει κάθε ζητούμενο σήμα που αντιστοιχεί σε μεταβολίτη, με αποτέλεσμα να χάνετε.

Μία ακόμη παλμική ακολουθία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι η ακολουθία CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill). Η λειτουργία της βασίζεται στους διαφορετικούς χρόνους αποδιέγερσης T₂ των βιομορίων, ώστε να μειώσει τη μοριακή διάχυση. Χρησιμοποιείται κυρίως για την απαλοιφή φασματικών σημάτων μεγάλου εύρους, που προκύπτουν συνήθως από ογκώδη

μόρια, όπως για παράδειγμα οι πρωτεΐνες, τα οποία δίνουν σήμα σε ppm που δίνουν και μικρότερα μόρια, επικαλύπτοντάς τα.^{46,47,48}

Μέσα από τα εργαλεία που υπάρχουν διαθέσιμα, συλλέγεται ένας μεγάλος όγκος πληροφοριών για τα προς ανάλυση δείγματα, ο οποίος χρειάζεται ειδικό χειρισμό ώστε να μπορέσουν να εξαχθούν οι μέγιστες δυνατές πληροφορίες, χρήσιμες για την ανάλυση των φασμάτων. Μπορεί να ακούγεται ως μία απλή και καθορισμένη σειρά από βήματα και τεχνικές, ωστόσο είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που τις περισσότερες φορές γίνεται χειροκίνητα από τον ερευνητή και αποτελεί το πιο απαιτητικό κομμάτι της δουλειάς. Υπάρχουν λογισμικά αυτόματης ποσοτικοποίησης που στηρίζονται σε βάσεις δεδομένων και λογισμικά που επιτρέπουν την επεξεργασία αυτών των δεδομένων και είναι τα εργαλεία που βοηθούν στην αποσαφήνιση των φασμάτων.

Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με το λογισμικό Bruker Topspin Software και ChenomxNMRSuite Profiler. Τα φάσματα, εισήχθησαν στο πρόγραμμα Topspin 4.1.3, όπου και έγινε χειροκίνητη διόρθωση στρέβλωσης της φάσεως των φασμάτων αλλά και της βασικής φασματικής γραμμής. Η διόρθωση φάσης και βασικής γραμμής επηρεάζουν την ποσοτικοποίηση και την στατιστική ανάλυση των μεταβολιτών και στο συγκεκριμένη εργασία έγινε ως προς την απλή κορυφή του TSP, στα 0,0ppm, που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Επίσης σημαντική είναι και η ευθυγράμμιση των φασμάτων, καθώς οι μετατοπίσεις των κορυφών μεταξύ των διαφορετικών φασμάτων που μπορεί να οφείλονται σε εξωγενείς παράγοντες όπως μεταξύ άλλων το όργανο ή η θερμοκρασία, επηρεάζουν την στατιστική ανάλυση. Στη συνέχεια εισάγεται το φάσμα στο λογισμικό ChenomxNMRSuite, με σκοπό την ταυτοποίηση πιθανών μεταβολιτών από τις φασματικές κορυφές. Η διαδικασία ξεκινάει με την επιλογή της υπό διερεύνηση περιοχής. Εμφανίζονται οι πιθανοί μεταβολίτες με αχνή και διακεκομμένη τη γραμμή των κορυφών τους. Με χειροκίνητη σύγκριση 1:1 τόσο της κάθε κορυφής για το αν υπάρχει και στο πειραματικό φάσμα, αλλά και της έντασης της καθεμίας η οποία αυξομειώνεται επίσης χειροκίνητα, ώστε να ταιριάζει με τον βέλτιστο τρόπο στο φάσμα, η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλες τις υπάρχουσες κορυφές του φάσματος και για όλα τα φάσματα. Πολλές φορές υπάρχει η περίπτωση να ταυτοποιηθούν μερικώς και όχι πλήρως, κάποιοι μεταβολίτες, αν όλες οι θεωρητικά αναμενόμενες κορυφές δεν ταιριάζουν

απόλυτα στις πειραματικές, ή συμπέφτουν με κορυφές άλλου μεταβολίτη και αλληλεπικαλύπτονται.

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του bucketing του φάσματος, ή αλλιώς κατακερματισμός ή τμηματοποίηση. Με αυτό τον τρόπο, χωρίζεται το φάσμα σε ίσα τμήματα με πολύ μικρό εύρος και έτσι τα δεδομένα γίνονται αξιοποιήσιμα και πιο εύκολα διαχειρίσιμα. Υπάρχουν επίσης λογισμικά, που δέχονται τα δεδομένα σε αυτή τη μορφή (buckets) που βοηθούν στην στατιστική ανάλυση (PCA, PLS-DA). Η μέθοδος PCA - Principal Component Analysis, ή αλλιώς μέθοδος ανάλυσης κύριων συνιστωσών, είναι μία μη-επιβλεπόμενη τεχνική γραμμικής παλινδρόμησης για πολυμεταβλητά δεδομένα. Προβάλλει πολύπλοκα σετ δεδομένων σε ένα νέο σύστημα συντεταγμένων με λιγότερες διαστάσεις. Η PCA είναι πολύ καλή μέθοδος στο να απεικονίζει τη δομή του συνόλου σε σχέση με τη διακύμανση. Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, γιατί παρέχει μία πρώτη εικόνα για την ύπαρξη ομοιοτήτων ή διαφορών του συνόλου των δεδομένων που μελετώνται. Η μέθοδος PLS - Partial Least Squared, ή αλλιώς ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολυπαραμετρικών δεδομένων. Οι δύο αυτές τεχνικές ανάλυσης δεδομένων διαφέρουν στο ότι η PLS είναι επιβλεπόμενη, ενώ η PCA είναι μη επιβλεπόμενη μέθοδος ταξινόμησης. Η PLS-DA προβάλλει τα δεδομένα σε ένα χώρο λίγων διαστάσεων, μεγιστοποιώντας το διαχωρισμό μεταξύ διαφορετικών ομάδων στις λίγες πρώτες διαστάσεις, που ονομάζονται και λανθάνουσες μεταβλητές. Το PLS-DA παράγει επίσης μέτρα μεταβλητής σημασίας. Επίσης, στο MetaboAnalyst είναι διαθέσιμα μέτρα σημαντικότητας μεταβλητών. Το πρώτο μέτρο σημαντικότητας μεταβλητών στην προβολή Variable Importance in Projection (VIP), είναι ένα σταθμισμένο άθροισμα τετραγώνων των φορτίσεων PLS που λαμβάνει υπόψη το ποσό της επεξηγημένης διακύμανσης Y κάθε συνιστώσας.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός των δύο μεθόδων, με κατηγοριοποίηση δεδομένων βάσει της ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων και στην συνέχεια ανάλυση κυρίων συνιστωσών, είναι ο βέλτιστος και προτεινόμενος τρόπος ανάλυσης.^{59,60,61,62,63}

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το MetaboAnalyst 5.0. Τα φάσματα κατακερματίστηκαν σε τμήματα εύρους 0,2ppm, έχοντας αφαιρέσει την περιοχή που βρίσκεται η κορυφή του νερού στα 4,41-5,39ppm. Η διαδικασία του φασματικού κατακερματισμού έγινε με χρήση του λογισμικού AMIX Bruker Biospin. Η μέθοδος ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA), χρησιμοποιήθηκε ως πρώτο βήμα για την παροχή μιας αρχικής κατανόησης των δεδομένων. Χρησιμοποιώντας αυτή τη στατιστική τεχνική, τα δεδομένα προβλήθηκαν στον διανυσματικό χώρο των μειωμένων μεταβλητών. Αυτό διευκόλυνε την οπτικοποίηση των ομάδων καθώς και των πιθανών ακραίων στοιχείων. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν προσεγγίσεις στατιστικής ανάλυσης που περιλαμβάνουν παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS).

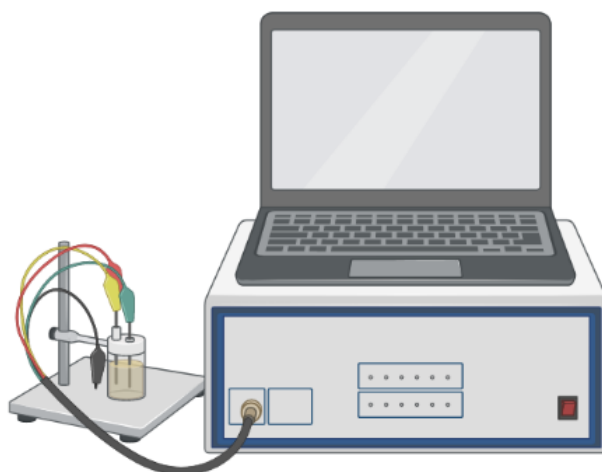
Στην παρούσα μελέτη, αρχικά τα δείγματα αναλύθηκαν σε φασματόμετρο Bruker DPX-300MHz στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, τόσο στο ίδιο δείγμα με διαφορετικές παραμέτρους και παλμικές ακολουθίες, όσο και σε διαφορετικά δείγματα, ώστε να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας των πρωταρχικών δειγμάτων, για να υπάρχει η επιθυμητή ένταση μεταβολιτών στα φάσματα. Αφού καθορίστηκε τόσο η παλμική ακολουθία, zgpg και cpmg, όσο και η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας σε $t=0$ από την οποία θα προκύπτει το δείγμα προς ανάλυση, $OD_{620} \approx 0,2$, πάρθηκαν φάσματα από 2 κύκλους καλλιιεργειών στα οποία έγιναν όλα τα βήματα της ανάλυσης με Topspin Software και ChenomxNMRSuite Profiler, εκτός της στατιστικής με Metaboanalyst. Στη συνέχεια, τα δείγματα από τον δεύτερο κύκλο καλλιιεργειών που είχαν ήδη μετρηθεί σε Bruker DPX-300MHz, μαζί με καινούρια δείγματα από νέο κύκλο καλλιιεργειών, ξηράνθηκαν και στάλθηκαν στο τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών, για να μετρηθούν σε φασματόμετρο Bruker 700MHz High-Definition NMR AVANCE III με ψυχόμενη τρι-πυρηνική cryo probe. Τα αποτελέσματα που αναλύονται και παρουσιάζονται αφορούν αποκλειστικά φάσματα από Bruker 700MHz, από 5 δείγματα καλλιιεργειας 24 ωρών, 4 δείγματα καλλιιεργειας 48 ωρών και 4 δείγματα καλλιιεργειας 72 ωρών.

2.18 Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης (EIS - Electrochemical Impedance Spectroscopy)

Η φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης (EIS - Electrochemical Impedance Spectroscopy) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των διεπιφανειακών ιδιοτήτων που σχετίζονται με συμβάντα βιο-αναγνώρισης που συμβαίνουν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, όπως για παράδειγμα, η αναγνώριση αντισώματος-αντιγόνου. Η ηλεκτροχημική ανίχνευση καθίσταται δυνατή χάρη σε ένα στοιχείο τριών ηλεκτροδίων που αποτελείται από ένα ηλεκτρόδιο εργασίας Au, έναν ηλεκτρόδιο μετρητή Pt και ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl. Το ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμεύει ως επιφάνεια στην οποία λαμβάνει χώρα η αντίδραση οξειδοαναγωγής. Η εμπέδηση είναι το μέτρο της συνολικής ικανότητας ενός κυκλώματος να αντιστέκεται στο ρεύμα και λαμβάνει υπόψιν όλες τις παραμέτρους που εμποδίζουν τη ροή μέσα σε μια αντίσταση, όπως η επαγωγή, η αντίσταση και η χωρητικότητα. Κατά τις μετρήσεις με EIS, το ηλεκτρικό ρεύμα μετράται καθώς εφαρμόζεται τάση σε ένα δείγμα σε διαφορετικές συχνότητες. Στους βιοαισθητήρες EIS, δημιουργείται μια διαφορά στο ηλεκτρικό σήμα λόγω της κινητικής δέσμευσης των αντισωμάτων και των αντιγόνων τους στην επιφάνεια των αισθητήρων. Ως αποτέλεσμα, παράγεται αντίσταση μεταφοράς ηλεκτρονίων, που αντιπροσωπεύει την ποσότητα των δεσμευμένων μορίων.^{34,35,36,37,38}

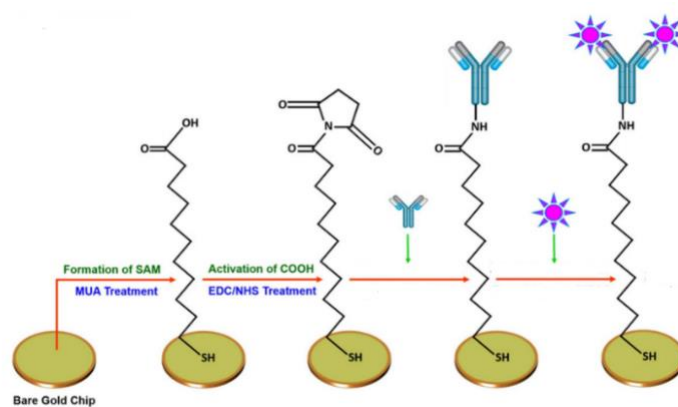
Στην παρούσα εργασία έγιναν δοκιμές ανάπτυξης ενός βιοαισθητήρα, βασισμένο στην μονιμοποίηση της πρωτεΐνης SucB-Dihydrolipoamide Succinyltransferase (Ipg0533) του παθογόνου βακτηρίου *Legionella pneumophila* σε ηλεκτρόδια χρυσού, με σκοπό την γρήγορη διάγνωση της νόσου των Λεγεωναρίων. Το σύστημα, όπως προαναφέρθηκε αποτελείται από 3 ηλεκτρόδια, ένα ηλεκτρόδιο χρυσού εργασίας, έναν ηλεκτρόδιο Pt μετρητής και ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl. Τα ηλεκτρόδια χρυσού που χρησιμοποιήθηκαν (Methrom, disposable SPEs DRP-250AT), καθαρίστηκαν με Linear Sweep Voltametry (LSV) σε ρυθμιστικό PBS (2,7mM KCl, 137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,7mM KH₂PO₄). Στη συνέχεια, έγινε πρόσδεση μερκαπτενδεκανοϊκού οξέος (MVA), του πρώτου βιομορίου πάνω στον χρυσό. Μετά από επώαση μίας μέρας, έγιναν πλύσεις των ηλεκτροδίων με αιθανόλη για απομάκρυνση περίσσειας MVA. Έπειτα, για την

πρόσδεση των υπόλοιπων βιομορίων, τα ηλεκτρόδια επώαστηκαν σε διάλυμα EDC 0,1M / NHS 0,1M για 2,5 ώρες. Αφού προσδέθηκαν, έγινε πλύση ηλεκτροδίων με PBS και τοποθετήθηκαν για ξήρανση στον απαγωγό. Όταν πλέον είχαν στεγνώσει, ακολούθησε η μονιμοποίηση της πρωτεΐνης, με προσθήκη στάγδην 4μL διαλύματος πρωτεΐνης στην επιφάνεια του χρυσού, και ολονύκτια επώαση των ηλεκτροδίων στους 4 °C και έπειτα ξήρανση στον απαγωγό. Η πρωτεΐνη έχει προηγουμένως διαλυθεί σε ρυθμιστικό φωσφορικών, το οποίο ρυθμίστηκε σε pH 0,5 μονάδες κάτω από το pI της πρωτεΐνης (θεωρητικό pI:6.00). Σκοπός αυτής της διαφοράς στο pH είναι να αποκτήσει η πρωτεΐνη θετικό φορτίο και έτσι να μπορέσει να προσδεθεί πιο αποτελεσματικά στην αρνητικά φορτισμένη καρβοξυλική ομάδα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό φωσφορικών-κιτρικού οξέως 500mM, pH 5.5 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$ / Citric acid, NaOH). Σε κάθε ένα από τα παραπάνω βήματα, γινόταν μέτρηση με φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης, για να διασφαλιστεί η επιτυχής κατεργασία των ηλεκτροδίων χρυσού και να εξασφαλιστεί η πρόσδεση της πρωτεΐνης στο τέλος. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης για την εξέταση απόκρισης σήματος του βιοαισθητήρα στα αντισώματα από ορούς ασθενών της Νόσου των Λεγεωναρίων, ορούς ασθενών πυρετού Q οξείας μορφής, πυρετού Q χρόνιας μορφής και ορούς αιμοδοτών υγιών ατόμων. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 3 ηλεκτρόδια σε ορούς ασθενών της Νόσου των Λεγεωναρίων, 1 ηλεκτρόδιο σε ορούς ασθενών πυρετού Q οξείας μορφής, 1 ηλεκτρόδιο σε ορούς ασθενών πυρετού Q χρόνιας μορφής και 2 ηλεκτρόδια αναφοράς (blank). Στο ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς (blank) έγινε μόνο το πρώτο βήμα καθαρισμού με LSV και απευθείας η δοκιμή απόκρισης σε ορούς πρώτα υγιών και έπειτα ασθενών. Και στο δεύτερο ηλεκτρόδιο αναφοράς (blank), ακολουθήθηκε όλη η διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω, χωρίς όμως να γίνει μονιμοποίηση της πρωτεΐνης στο τελευταίο στάδιο, με σκοπό να ελεγχθούν τυχόν αλληλεπιδράσεις υποβάθρου μεταξύ βιομορίων και αντισωμάτων από τους ορούς. Όλες οι παραπάνω μετρήσεις EIS πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ποτενσιοστάτη PalmSens4 εξοπλισμένο αναλυτή απόκρισης συχνότητας, στο εύρος συχνοτήτων μεταξύ 0,2Hz και 100kHz. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό PBS σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φάσματα λήφθηκαν και επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό PSTrace 5.8.



Εικ.2.3

Σχηματική απεικόνιση της διάταξης των 3 ηλεκτροδίων με την γείωση. ⁴⁰



Εικ.2.4

Τα στάδια καταργασίας του χρυσού μέχρι την πρόσδεση του αντισώματος. ⁴¹

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Αντιγονικές πρωτεΐνες-Έκφραση και Απομόνωση

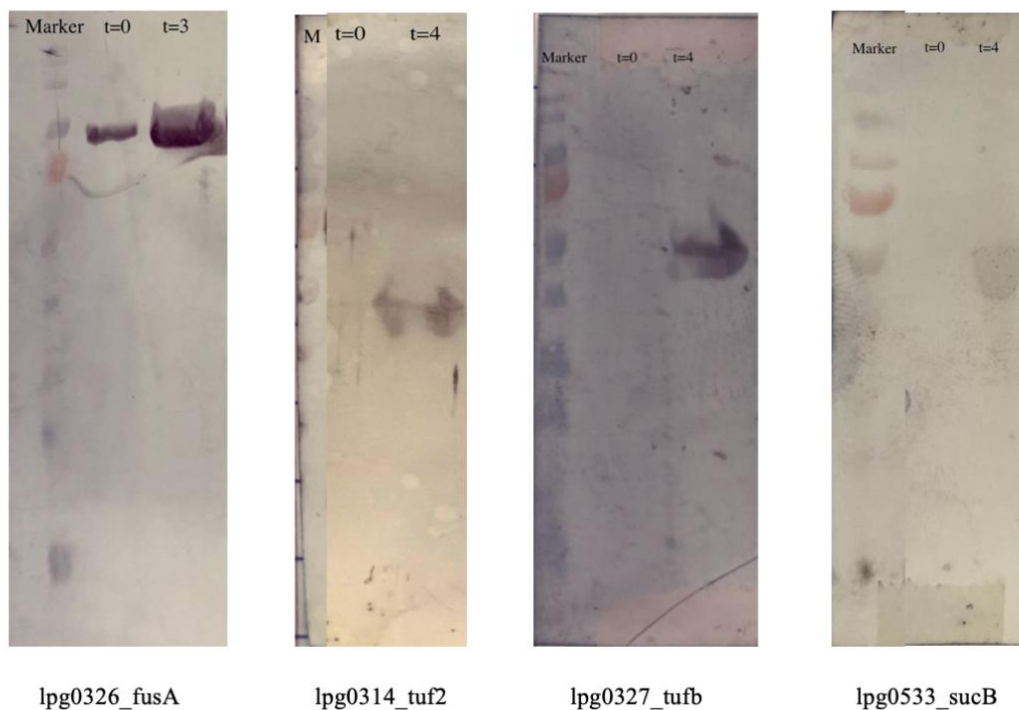
Σε αυτή την εργασία μελετήθηκαν συνολικά 4 διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες εκφράστηκαν από ανασυνδιασμένα πλασμίδια που περιείχαν το γονίδιο που κωδικοποιεί την καθεμία πρωτεΐνη. Για την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών, χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pET22b(+) με επισήμανση His-tag στο C-τερματικό άκρο. Οι φορείς αυτοί φέρουν την ένθεση του κάθε γονιδίου ξεχωριστά. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της In-Fusion κλωνοποίησης, ώστε να γίνει η μεταφορά του επιθυμητού γονιδίου από το κωδικόνιο έναρξης μέχρι το κωδικόνιο λήξης στο τελικό πλασμίδιο (pET22b(+)). Η έκφραση πραγματοποιήθηκε σε βακτηριακά κύτταρα *E. Coli*. Για τη διαδικασία του μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν χημειοδεκτικά κύτταρα *E. Coli BL21*. Έτσι, μετασχηματισμένα κύτταρα *E. Coli* αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες όγκων 1L, σε incubator. Ως επαγωγέας της έκφρασης χρησιμοποιείται το Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG), αφού το πλασμίδιο pET22b(+) περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης. Οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης για την κάθε πρωτεΐνη συγκεντρώθηκαν βιβλιογραφικά⁴² και συνοψίζονται στον παρακάτω Πίνακα 18.

<u>Sample Number</u>	<u>Protein Name</u>	<u>Gene Name</u>	<u>Molecular Weight (kDa)</u>	<u>Temperature (°C)</u>	<u>Shaking (rpm)</u>	<u>IPTG concentration (mM)</u>	<u>Time after induction (h)</u>
1	Elongation Factor G	lpg0326_fusA	77	37	180	1	3
3	Elongation Factor T	lpg0314_tuf2	43	25	180	0,5	4
8	Elongation Factor T ₂	lpg0327_tufb	43	25	180	0,5	4
9	Dihydrolipoamide succinyltransferase	lpg0533_sucB	45	37	180	1	4

Πίνακας 3.1

Βέλτιστες συνθήκες έκφρασης για κάθε υπό-μελέτη πρωτεΐνη.⁴²

Σύμφωνα με τις παραπάνω βέλτιστες συνθήκες έκφρασης για κάθε πρωτεΐνη στόχο, έγιναν καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας, όγκου 1L όπως και προαναφέρεται. Μετά την επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης και το πέρας του κατάλληλου χρόνου, έγινε συλλογή των κυττάρων. Για τον έλεγχο της έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφορησης SDS-PAGE και του Western blotting.



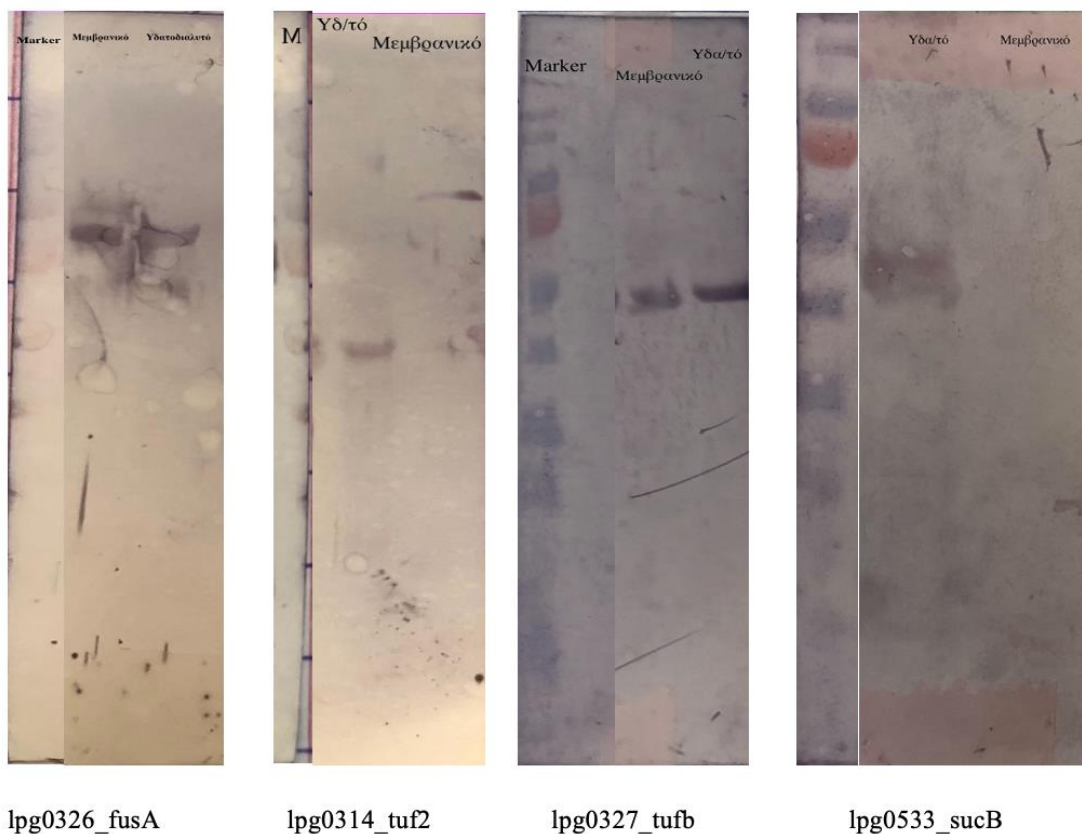
Εικ.3.1

Έκφραση πρωτεΐνης 1 (lpg0326_fusA), πρωτεΐνης 3 (lpg0314_tuf2), πρωτεΐνης 8 (lpg0327_tufb), πρωτεΐνης 9 (lpg0533_sucb) από 1L καλλιέργειας

3.2 Απομόνωση Αντιγονικών πρωτεϊνών

Μετά τον έλεγχο της έκφρασης και τη λύση των κυττάρων, ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών στόχων. Μετά την υπερφυγοκέντρωση, γίνεται διαχωρισμός υδατοδιαλυτού και μεμβρανικού κλάσματος και ακολουθούν SDS-PAGE και Western Blotting για να ταυτοποιηθεί η τοποθεσία στο κύτταρο

της πρωτεΐνης, αν βρίσκεται δηλαδή στο μεμβρανικό ή υδατοδιαλυτό μέρος και αν συμφωνεί με τη αυτή που προέβλεψε η βιβλιογραφία.



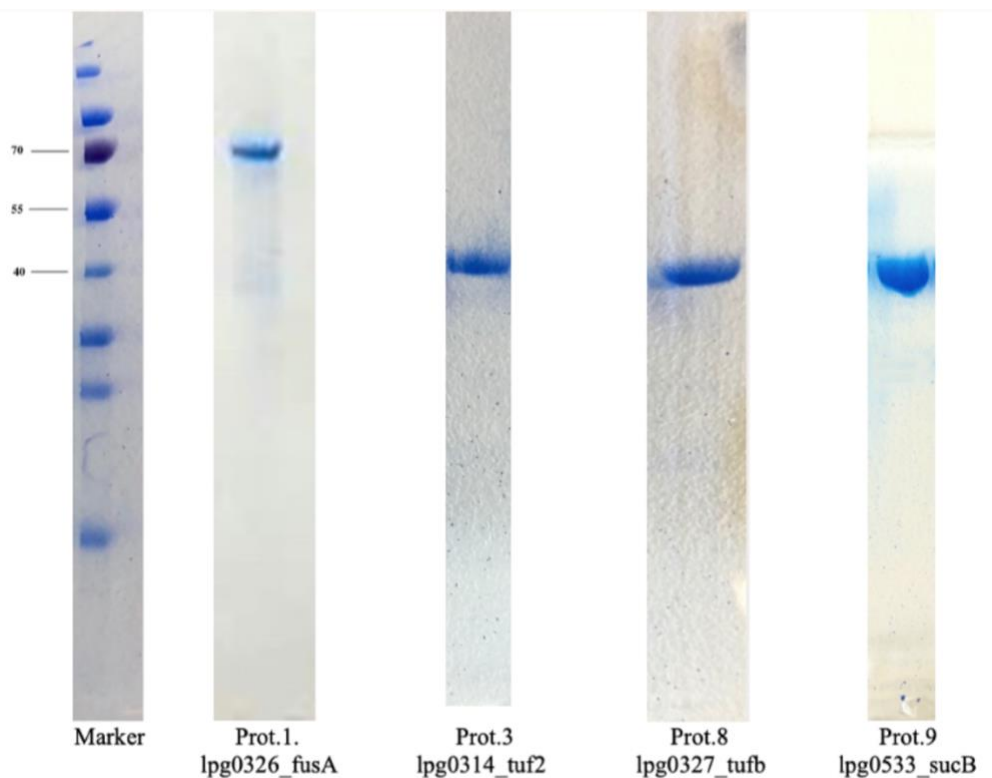
Εικ.3.2

Μεμβράνη από Western Blot με το μεμβρανικό και υδατοδιαλυτό κλάσμα των: πρωτεΐνης 1 (Ipg0326_fusA), πρωτεΐνης 3 (Ipg0314_tuf2), πρωτεΐνης 8 (Ipg0327_tufb) και πρωτεΐνης 9 (Ipg0533_sucB)

Λαμβάνοντας υπόψιν την Εικόνα 3.2, φαίνεται πως η πρωτεΐνη 1 (Ipg0326_fusA), εντοπίζεται τόσο στο υδατοδιαλυτό όσο και στο μεμβρανικό κλάσμα στο επιθυμητό ύψος που αντιστοιχεί στο μοριακό της βάρος και για αυτό τον λόγο θα διερευνηθεί περαιτέρω με χρωματογραφία συγγένειας και στα δύο της κλάσματα. Η πρωτεΐνη 3 (Ipg0314_tuf2) εντοπίζεται στο υδατοδιαλυτό κλάσμα, ωστόσο υπάρχει και ένα μικρό σήμα σε μεγαλύτερο μοριακό βάρος στο μεμβρανικό κλάσμα. Η πρωτεΐνη 9 (Ipg0533_sucB) δίνει σήμα στο υδατοδιαλυτό κλάσμα. Ενώ, η πρωτεΐνη 8 (Ipg0327_tufb) δίνει σήμα τόσο στο μεμβρανικό όσο και στο υδατοδιαλυτό κλάσμα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όλες οι πρωτεΐνες

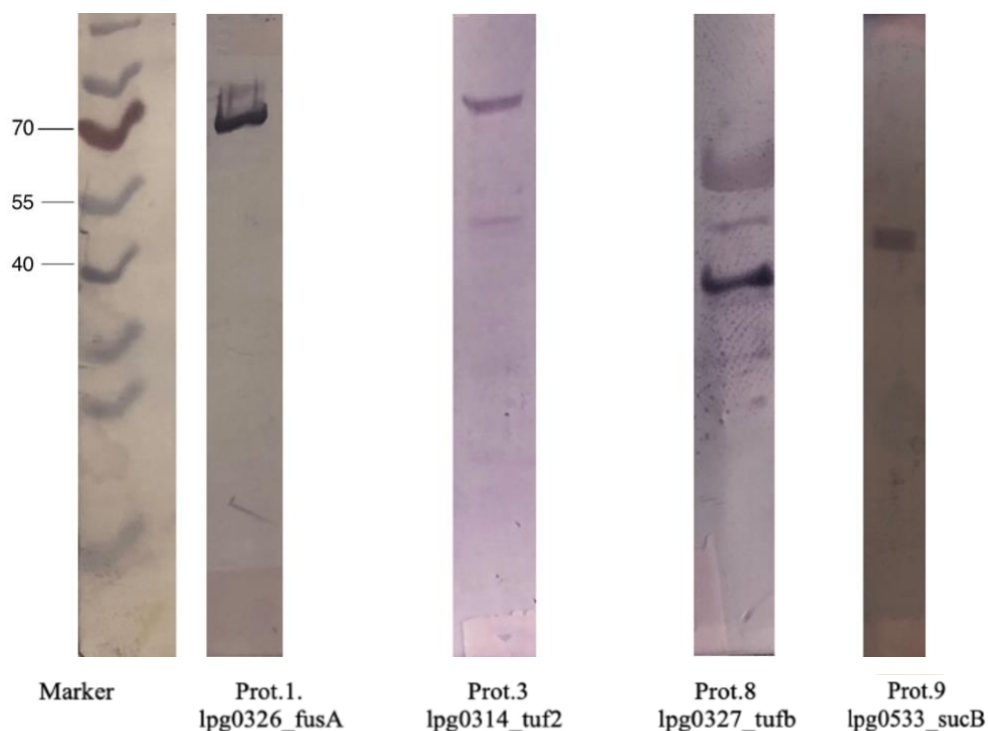
αναμένεται να βρίσκονται στο υδατοδιαλυτό κλάσμα, όπως και επιβεβαιώθηκε με τις 3 και 9. Οι πρωτεΐνες 1 και 8, θα διερευνηθούν περαιτέρω με καθαρισμό από στήλη Ni και των δύο κλασμάτων, μεμβρανικού και υδατοδιαλυτού.

Έτσι, αφού καθοριστεί η τοποθεσία της πρωτεΐνης στόχου, επιλέγεται το κάθε κλάσμα για περαιτέρω μελέτη. Ακολουθεί καθαρισμός του κάθε δείγματος που περιέχει την πρωτεΐνη στόχο, χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας. Στην περίπτωση που το κλάσμα που θα διερευνηθεί είναι αυτό των μεμβρανικών πρωτεϊνών, κρίνεται πρώτα απαραίτητη η διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών με χρήση 1% w/v DDM. Τα κλάσματα που επιλέχθηκαν καθαρίστηκαν όλα με τη μέθοδο χρωματογραφίας συγγένειας με στήλη Νικελίου και στη συνέχεια έγινε έλεγχος της καθαρότητας της πρωτεΐνης με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.



Εικ.3.3

Πηκτές στις οποίες απεικονίζονται τα συμπυκνωμένα δείγματα από τις καθαρισμένες πρωτεΐνες των υδατοδιαλυτών κλασμάτων.



Εικ.3.4

Μεμβράνες στις οποίες απεικονίζονται τα συμπυκνωμένα δείγματα από τις καθαρισμένες πρωτεΐνες των υδατοδιαλυτών κλάσμάτων, μετά από επώαση σε αντίσωμα Anti-His.

Στην Εικόνα 3.3 φαίνονται οι λωρίδες που έδωσαν στις πηκτές τα υδατοδιαλυτά κλάσματα των πρωτεϊνών, μετά από τον καθαρισμό με στήλη συγγένειας και συμπύκνωση αυτών. Όπως υποδεικνύουν τα SDS-PAGE, το έκλουσμα από τη χρωματογραφία αποτελείται από μία πολύ καθαρή πρωτεΐνη χωρίς προσμίξεις στο επιθυμητό μοριακό βάρος, αντίστοιχο για την κάθε μία. Οι απομονωμένες πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν, με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF, με χρήση λογισμικού BIONTOOLS, χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων της MASCOT με δεδομένα από την Uniprot.org.

Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με MALDI-TOF

Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με φασματομετρία MALDI-TOF. Αρχικά, κόπηκαν οι επιθυμητές μπάντες που έδιναν το σήμα στις πηκτές και ακολούθησε θρυψινοποίηση, ή αλλιώς πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών με θρυψίνη. Τα δείγματα που εξετάστηκαν με αυτή τη μέθοδο για ταυτοποίηση πρωτεϊνών ήταν

σήματα σε πηκτές που αφορούσαν τις πρωτεΐνες 1 (lpg0326_fusA), 3 (lpg0314_tuf2), 8 (lpg0327_tufb) και 9 (lpg0533_sucb). Και οι τέσσερις, ταυτοποιήθηκαν με ιδιαίτερα υψηλό αριθμό πεπτιδίων αντίστοιχα.

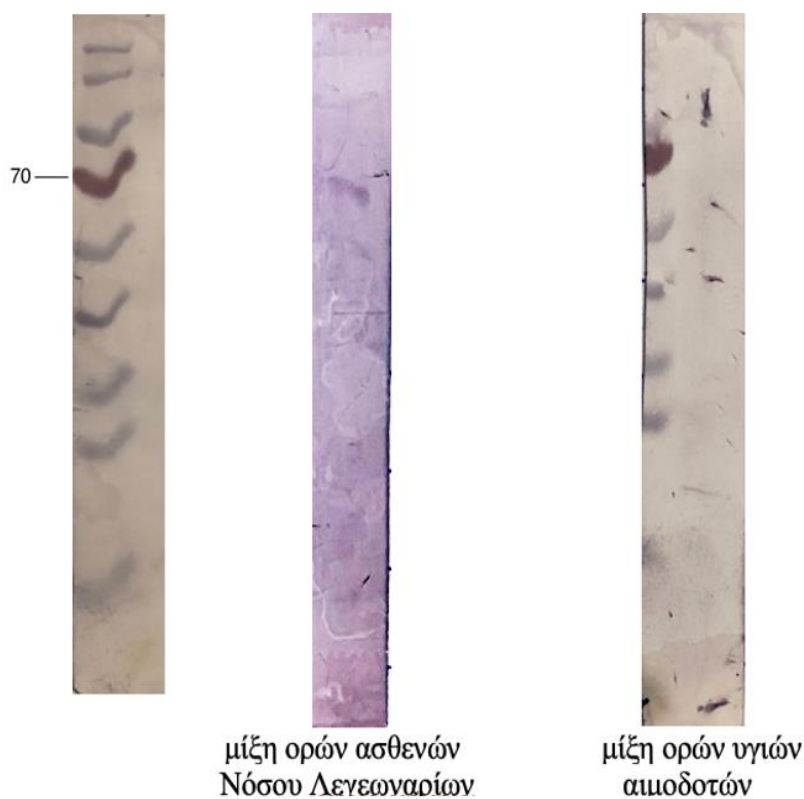
Protein Name	Theoretical MW (Da)	Mascot Score	Peptides
Elongation factor G	77,319	618	17
Elongation factor T	43,179	-	11
Elongation factor T2	43,179	-	9
Dihydrolipoamide Succinyl transferase	45,048	-	16

Πίνακας 3.2

Αποτελέσματα από χρήση φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF, για ταυτοποίηση των πρωτεϊνών lpg0326_fusA, lpg0314_tuf2, lpg0327_tufb και lpg0533_sucb.

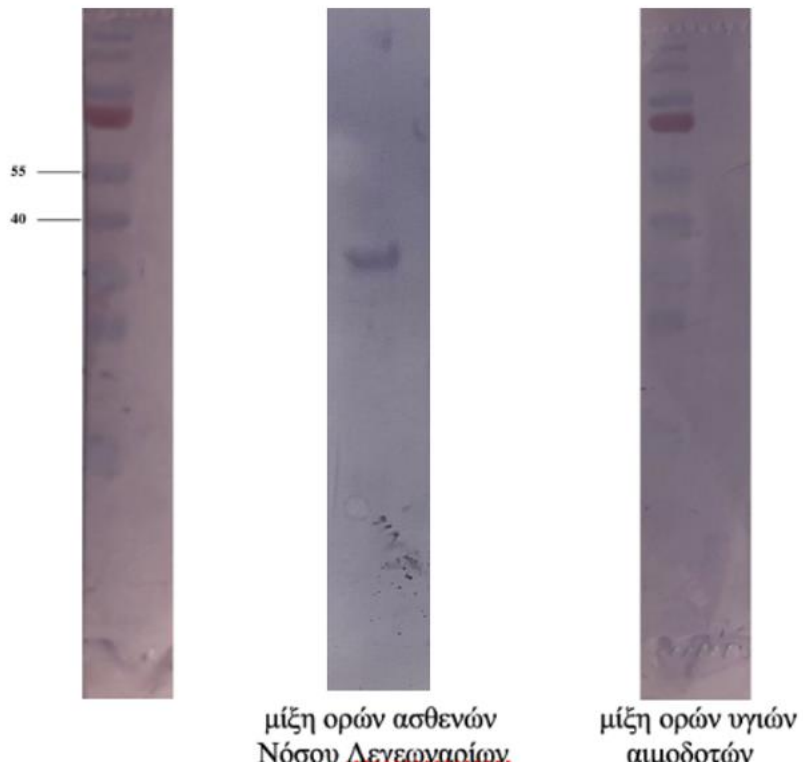
Στην Εικόνα 3.4, απεικονίζονται οι λωρίδες των μεμβρανών από Western blot με επώαση σε Anti-His. Στις πρωτεΐνες 1 και 9 παρατηρούνται μοναδικά σήματα στη μεμβράνη με επώαση σε Anti-His στο επιθυμητό ύψος. Στην πρωτεΐνη 3, εμφανίζονται δύο σήματα, με το χαμηλότερο να είναι πολύ κοντά στο επιθυμητό μοριακό βάρος, ενώ το ψηλότερο σήμα κοντά στα 80kDa. Αυτό ήταν ένα μοτίβο που εμφανιζόταν επανειλημμένα στην συγκεκριμένη πρωτεΐνη κατά τη διαδικασία του Western blot με επώαση σε Anti-His. Θα μπορούσε να δικαιολογηθεί, αν θεωρηθεί πως το υψηλότερο σήμα είναι πολύ κοντά στο διπλάσιο του επιθυμητού μοριακού βάρους και έτσι ίσως έχει πιάσει σε κάποιο συσσωμάτωμα που έχει δημιουργηθεί από διμερές αυτής. Επίσης, όσον αφορά την πρωτεΐνη 8, παρατηρούνται περισσότερες από μία μπάντες, σε διάφορα ύψη. Με μεγαλύτερη ένταση εμφανίζεται μία μπάντα στα 30kDa περίπου. Ενώ αυτή που εμφανίζεται ψηλότερα στις μεμβράνες, είναι θεωρητικά σήμα από την πρωτεΐνη στόχο που αναμένεται στα 43kDa. Όσες φορές και να επαναλήφθηκε η συγκεκριμένη διαδικασία, το μοτίβο πολλαπλών σημάτων εμφανιζόταν το ίδιο στην πρωτεΐνη 8. Δυστυχώς η λωρίδα με μοριακό βάρος 30kDa δεν μπόρεσε να ταυτοποιηθεί.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντιγονικότητα των πρωτεϊνών. Οι μεμβράνες που μεταφέρθηκαν οι πρωτεΐνες επώαστηκαν σε ορούς ασθενών της νόσου των Λεγεωνάριων. Προκειμένου να ελεγχθεί αν η αντιγονικότητα των πρωτεϊνών-στόχων με τους ορούς από τους ασθενείς της *Legionella* οφείλεται στην ειδικότητα των πρωτεϊνών ή αν είναι αποτέλεσμα κάποια άλλης αλληλεπίδρασης, έγινε έλεγχος των πρωτεϊνών αυτών με ορούς από αιμοδοτές, οι οποίοι δεν είχαν νοσήσει από *Legionella* και δεν είχαν αντισώματα έναντι του παθογόνου.



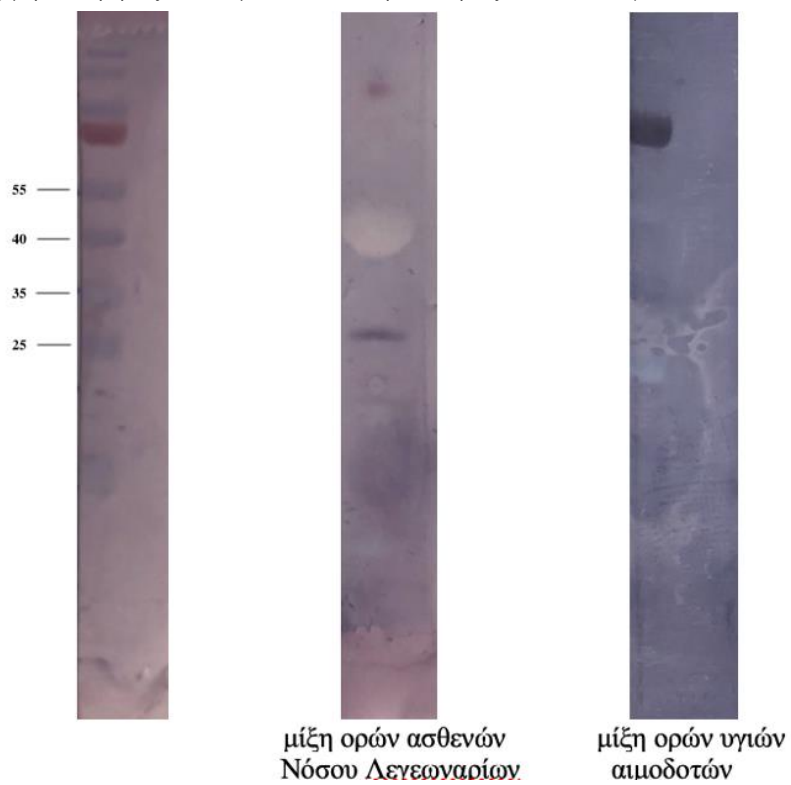
Εικ.3.5

Μεμβράνες στις οποίες απεικονίζονται τα συμπυκνωμένα δείγματα του υδατοδιαλυτού κλάσματος της πρωτεΐνης I (Irg0326_fusA) μοριακού βάρους 77kDa, μετά από επώαση σε ορούς ασθενών και υγιών.



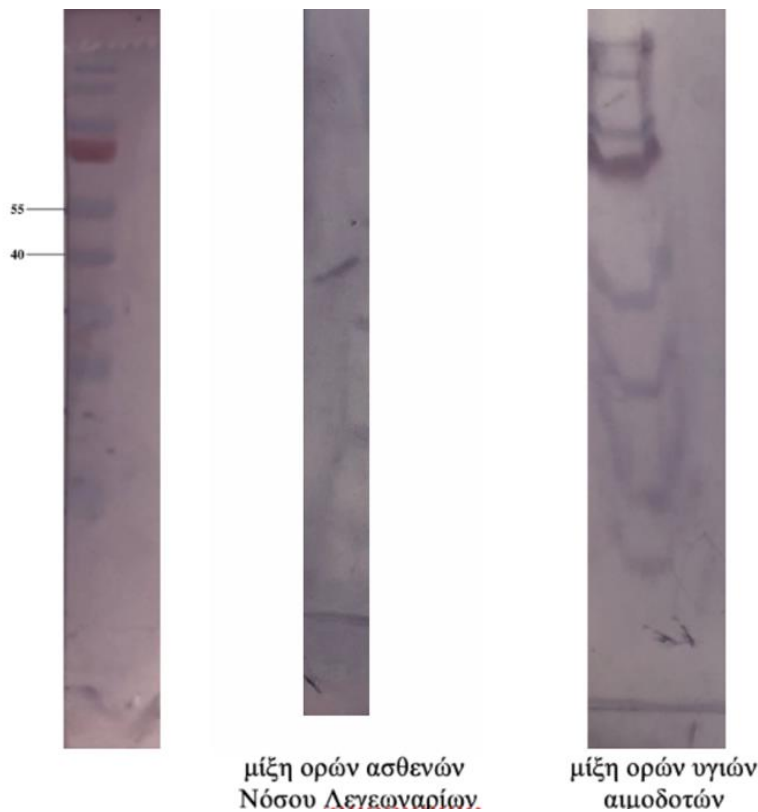
Εικ.3.6

Μεμβράνες στις οποίες απεικονίζονται τα συμπυκνωμένα δείγματα του υδατοδιαλυτού κλάσματος της πρωτεΐνης 3 (Irg0314_tuf2) μοριακού βάρους 43kDa, μετά από επώαση σε σε ορούς ασθενών και υγιών.



Εικ.3.7

Μεμβράνες στις οποίες απεικονίζονται τα συμπυκνωμένα δείγματα του υδατοδιαλυτού κλάσματος της πρωτεΐνης 8 (Irg0327_tufb) μοριακού βάρους 43kDa, μετά από επώαση σε σε ορούς ασθενών και υγιών.



Εικ.3.8

Μεμβράνες στις οποίες απεικονίζονται τα συμπυκνωμένα δείγματα του υδατοδιαλυτού κλάσματος της πρωτεΐνης 9 (Irg0533_sucb) μοριακού βάρους 45kDa, μετά από επώαση σε σε ορούς ασθενών και υγιών.

Στις παραπάνω εικόνες είναι εμφανή τα σήματα που δείχνουν την αντίδραση στα αντισώματα των ορών ασθενών με νόσο Λεγεωνάριων. Στις μεμβράνες με την πρωτεΐνη 1, παρατηρείται σήμα στο επιθυμητό μοριακό βάρος με επώαση σε ορούς ασθενών. Στην πρωτεΐνη 3, παρατηρούνται δύο σήματα στην μεμβράνη. Επίσης, όσον αφορά την πρωτεΐνη 8, στην επώαση με ορούς ασθενών, παρατηρούνται περισσότερες από μία μπάντες, σε διάφορα ύψη. Με μεγαλύτερη ένταση εμφανίζεται μία μπάντα στα 30kDa περίπου. Ενώ αυτή που εμφανίζεται ψηλότερα στις μεμβράνες, είναι θεωρητικά σήμα από την πρωτεΐνη στόχο που αναμένεται στα 43kDa και εμφανίζεται με μορφή ghost band. Αυτές οι ζώνες σήματος, λαμβάνονται κανονικά υπόψιν, αφού είναι απλά ένδειξη υπερβολικής δραστηριότητας στο δευτερεύον ένζυμο αντισώματος (AP ή HRP) που καταναλώνει το υπόστρωμα εξαιρετικά γρήγορα. Όσες φορές και να επαναλήφθηκε η συγκεκριμένη διαδικασία, το μοτίβο πολλαπλών σημάτων εμφανιζόταν το ίδιο στην πρωτεΐνη 8. Δυστυχώς η λωρίδα με μοριακό βάρος 30kDa δεν μπόρεσε να ταυτοποιηθεί. Τέλος, όσον αφορά την πρωτεΐνη 9,

παρατηρείται μοναδικό σήμα, στο επιθυμητό ύψος. Ακόμη, σε όλες τις πρωτεΐνες που δοκιμάστηκαν με Western blot και επλώστηκαν σε ορό υγιών αιμοδοτών, δεν παρατηρήθηκε σήμα και αυτό επιβεβαιώνει την αντιγονικότητά τους, μιας και στον ορό υγιών ανθρώπων, δεν υπάρχουν τα αντίστοιχα για αυτές τις πρωτεΐνες αντισώματα.

3.3 Μελέτη της αντιγονικότητας των πρωτεϊνών με ELISA

Για να ερευνηθεί περαιτέρω και με μεγαλύτερη ακρίβεια, αν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες είναι αντιγονικές ή όχι, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ELISA με ορούς ασθενών με *Legionella* και με αιμοδοτές. Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν 15 οροί ασθενών και 11 οροί αιμοδοτών συνολικά, με τις πρωτεΐνες - στόχους που απομονώθηκαν.

<u>Ασθενείς</u>	<u>pr.1</u> (lpg0326_fusA)	<u>pr.3</u> lpg0314_tuf2)	<u>pr.8</u> (lpg0327_tufb)	<u>pr.9</u> (lpg0533_sucB)
17	3,845	0,761	2,146	1,477
339	3,924	0,896	1,896	3,444
450	3,882	0,783	2,337	3,962
74	2,976	0,841	2,052	2,605
64	1,117	0,827	1,856	1,982
37	1,524	0,79	1,468	2,93
54	2,656	0,693	0,739	1,567
27	1,354	1,115	1,235	1,87
202	1,325	1,106	1,255	1,101
231	1,347	0,993	1,403	1,795
257	1,418	0,919	1,147	2,65
54980	1,824	0,709	1,066	2,638
55032	1,443	0,252	0,921	2,824
321	2,171	0,219	1,51	2,819
378	1,89	0,231	1,755	2,37

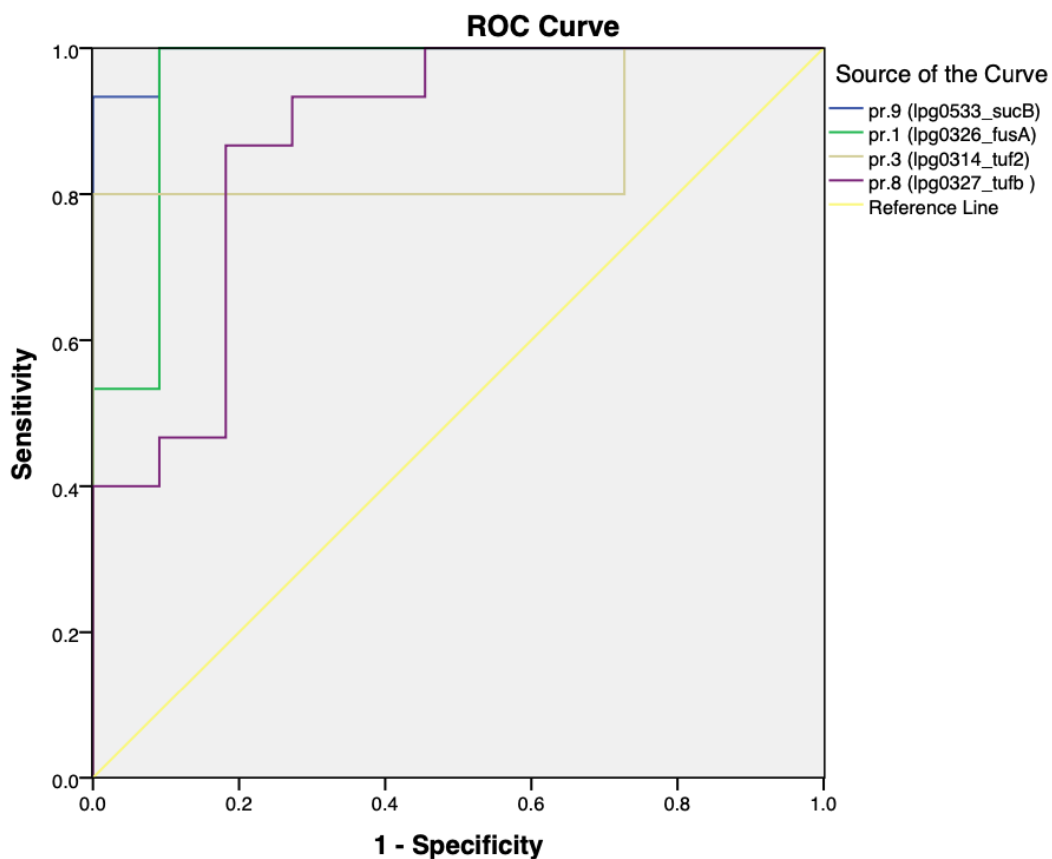
<u>Αιμοδοτές</u>	<u>pr.1</u>	<u>pr.3</u>	<u>pr.8</u>	<u>pr.9</u>
e	0,41	0,127	0,657	0,777
f	0,367	0,218	0,595	0,844
h	0,463	0,206	0,824	0,438
i	0,369	0,289	1,508	0,595
j	0,756	0,379	1,55	0,946
a	0,524	0,421	1,017	1,126
2764	0,513	0,305	0,26	0,198
53601	1,57	0,287	0,899	1,029
2800	0,819	0,268	0,651	0,672
54633	1,092	0,416	0,202	0,327
2768	0,826	0,501	0,562	0,481

Πίνακας 3.3

Αποτελέσματα από χρήση τεχνικής ELISA με ορούς ασθενών της νόσου των Λεγεωνάριων και ορούς υγιών αιμοδοτών, για τις lpg0326_fusA, lpg0314_tuf2, lpg0327_tufb και lpg0533_sucb.

3.4 Στατιστική Ανάλυση

Μετά την διαδικασία της ELISA, επόμενο βήμα είναι η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που πάρθηκαν, ώστε να είναι αξιοποιήσιμα και να βοηθήσουν στην κατάληξη ασφαλούς συμπεράσματος σχετικά με την αντιγονικότητα των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα εξήχθησαν με τη βοήθεια του λογισμικού IBM SPSS v.19. και απεικονίζονται σε διαγράμματα ROC Curve (Receiver Operator Characteristic Curve) και Box Plot. Η ROC Curve είναι μια γραφική παράσταση που χρησιμοποιείται για να δείξει τη διαγνωστική ικανότητα των δυαδικών ταξινομητών. Χρησιμοποιείται σε πολλούς τομείς όπως η ιατρική, η ακτινολογία και οι φυσικοί κίνδυνοι. Μια γραφική παράσταση πλαισίου Box Plot, είναι ένας τύπος γραφήματος που χρησιμοποιείται συχνά στην ανάλυση δεδομένων. Τα διαγράμματα πλαισίου δείχνουν οπτικά την κατανομή των αριθμητικών δεδομένων. Έξω από το box μπορεί να υπάρχουν γραμμές που εκτείνονται από αυτό και υποδεικνύουν την ελάχιστη (κάτω ράβδος) και τη μέγιστη (άνω ράβδος). Τα ακραία σημεία που διαφέρουν σημαντικά από το υπόλοιπο σύνολο δεδομένων απεικονίζονται ως μεμονωμένα σημεία.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
pr.9 (lpg0533_sucB)	.994	.010	.000	.974	1.000
pr.1 (lpg0326_fusA)	.958	.044	.000	.872	1.000
pr.3 (lpg0314_tuf2)	.855	.081	.002	.696	1.000
pr.8 (lpg0327_tufb)	.873	.074	.001	.728	1.000

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Εικ.3.9

Απεικόνιση στατικής ανάλυσης αποτελεσμάτων ELISA σε διάγραμμα ROC Curve, συνολικά και για τις τέσσερις πρωτεΐνες.

Στην Εικόνα 3.9, το διάγραμμα ROC Curve, αφορά όλες τις πρωτεΐνες. Για την πρωτεΐνη 1 (lpg0326_fusA), η τιμή που αντιστοιχεί στο cut-off αυτών των μετρήσεων είναι 1.1045 και η τιμή AUC (Area under the curve) είναι 0.958. Συμπεραίνεται πως κάθε τιμή μεγαλύτερη από 1.104 θεωρείται θετικό σήμα απόκρισης. Για την πρωτεΐνη 3 (lpg0314_tuf2), η τιμή που αντιστοιχεί στο cut-off αυτών των μετρήσεων είναι 0.461 και η τιμή AUC (Area under the curve) είναι

0.855. Συμπεραίνεται πως κάθε τιμή μεγαλύτερη από 0.461 θεωρείται θετικό σήμα απόκρισης. Όσον αφορά την πρωτεΐνη 8 (Ipg0327_tufb), η τιμή που αντιστοιχεί στο cut-off αυτών των μετρήσεων είναι 1.509 και η τιμή AUC (Area under the curve) είναι 0.873. Συμπεραίνεται πως κάθε τιμή μεγαλύτερη από 1.509 θεωρείται θετικό σήμα απόκρισης. Τέλος, για την πρωτεΐνη 9 (Ipg0533_sucB). Η τιμή που αντιστοιχεί στο cut-off αυτών των μετρήσεων είναι 1.065 και η τιμή AUC (Area under the curve) είναι 0.994. Η πρωτεΐνη αυτή, έχει μεταξύ των υπολοίπων, την τιμή AUC που πλησιάζει περισσότερο το 1, και άρα είναι η ζητούμενη, επιτυγχάνεται σε αυτή καλύτερος διαχωρισμός με μεγαλύτερη ευαισθησία. Συμπεραίνεται πως κάθε τιμή μεγαλύτερη από 1.065 θεωρείται θετικό σήμα απόκρισης.

3.5 Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης (EIS - Electrochemical Impedance Spectroscopy)

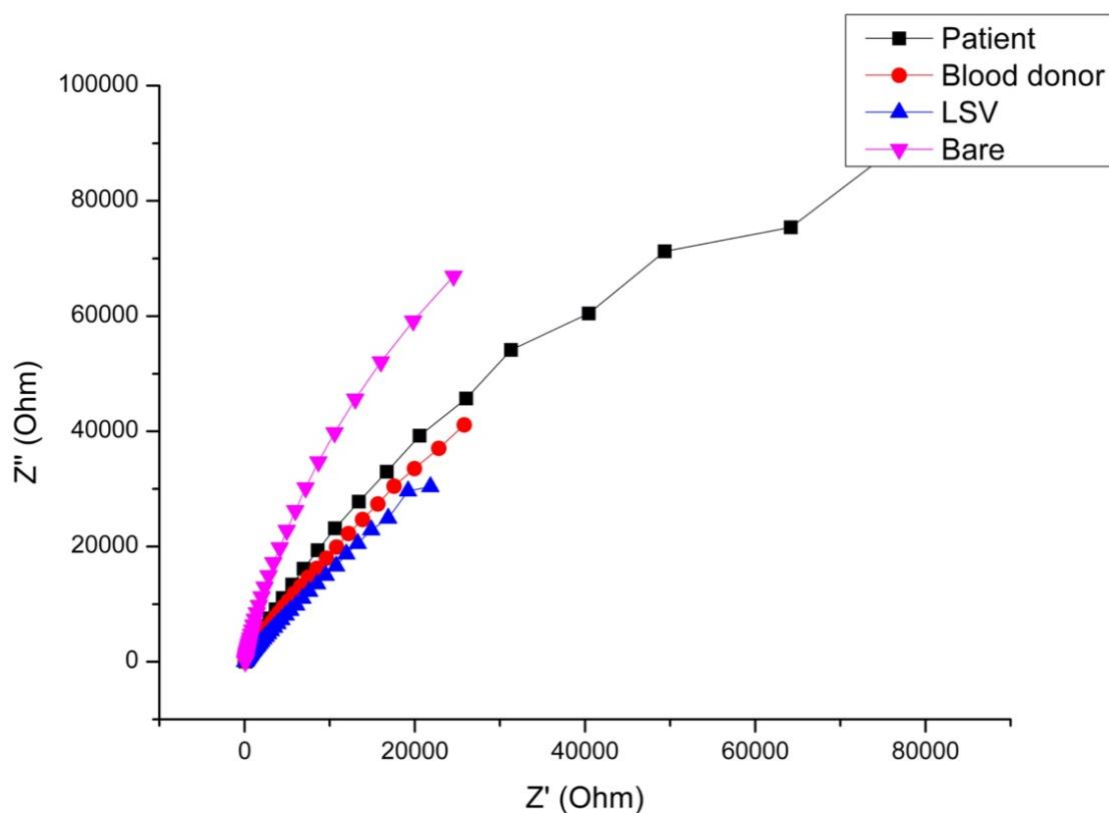
Με βάση τα αποτελέσματα της ELISA και δεδομένης της συμπεριφοράς των πρωτεϊνών σε όλες τις δοκιμές έκφρασης, απομόνωσης και καθαρισμού, επιλέχθηκε μία από τις παραπάνω πρωτεΐνες στόχους για να εξεταστεί στον βιοαισθητήρα, ως διαγνωστικός δείκτης της νόσου των Λεγεωνάριων. Όπως ειπώθηκε και στην παραπάνω ενότητα, έγινε προσπάθεια δημιουργίας ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα για την έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση της νόσου των Λεγεωνάριων, βασισμένη στην μονιμοποίηση της αντιγονικής πρωτεΐνης, που στην εν λόγω περίπτωση είναι η Ipg0533_sucb.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο Ipg0533_sucB, είναι μέρος ενός συμπλόκου πρωτεΐνης στην εσωτερική μεμβράνη αλλά το ίδιο εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα.⁵⁴ Γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα όλων των δοκιμών που έγιναν σε αυτή την εργασία και αναφέρονται παραπάνω, ότι εντοπίζεται δηλαδή στα υδατοδιαλυτά κλάσματα των δειγμάτων. Η αλληλουχία αυτή, περιγράφει το συστατικό E2, του συστήματος 2-οξογλουταρικού του κύκλου TCA, διυδρολιποαμιδική σουκινυλοτρανσφεράση. Ένα σύμπλεγμα πολλαπλών

αντιγράφων τριών ενζυματικών συστατικών. Η λειτουργία της είναι καταλύει τη συνολική μετατροπή του 2-οξογλουταρικού σε ηλεκτρυλο-CoA και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂).^{55,56}

Η πρωτεΐνη αυτή, έδωσε ικανοποιητικά και επαναλήψιμα αποτελέσματα στην έκφραση, στην απομόνωση και στον καθαρισμό της. Έτσι, δημιουργήθηκαν 7 διαφορετικά ηλεκτρόδια χρυσού, από τα οποία 3 δοκιμάστηκαν σε ορούς ασθενών της νόσου των Λεγεωναρίων, 2 σε ορούς ασθενών του πυρετού Q (1 για χρόνια μορφή και 1 για οξεία μορφή) και 2 που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα blank.

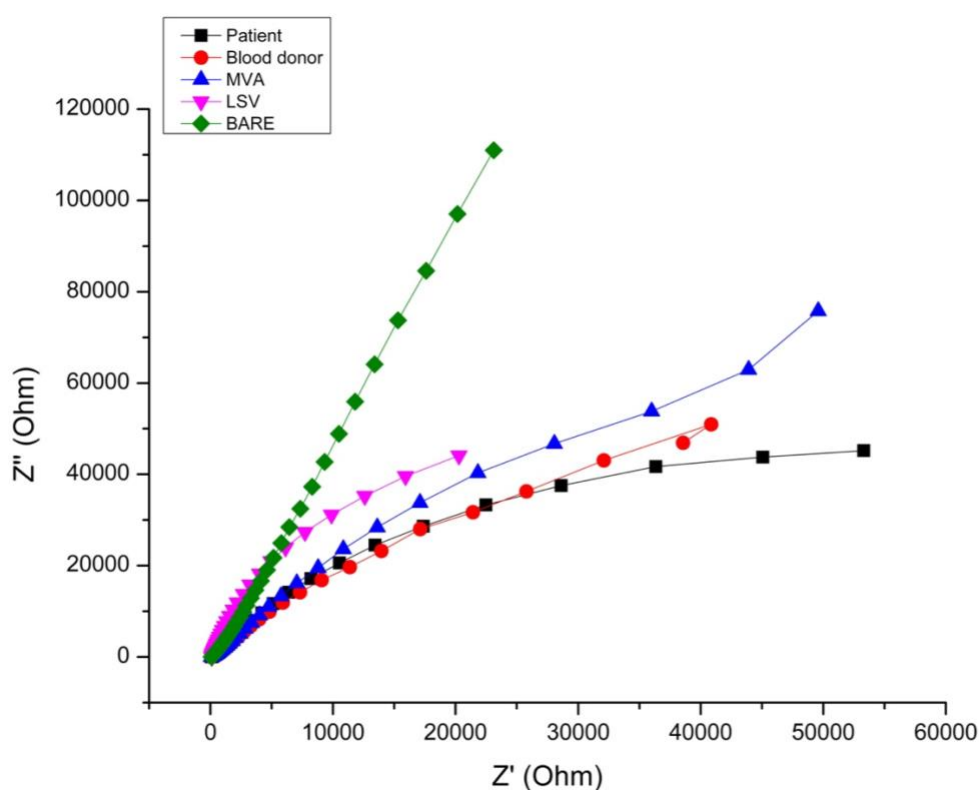
Ο τρόπος που παρουσιάζονται τα διαγράμματα ηλεκτροχημικής εμπέδησης του βιοαισθητήρα, είναι σε μορφή γραφικής παράστασης Nyquist plot. Σε αυτό το είδος διαγράμματος στον άξονα x βρίσκεται το Z' που είναι το πραγματικό μέρος, ενώ στον άξονα y, βρίσκεται το Z'' που είναι το φανταστικό μέρος.



Εικ.3.18

Διαγραμματική απεικόνιση απόκρισης του πρότυπου ηλεκτροδίου blank τροποποιημένο μόνο με LSV, με επώαση σε ορούς ασθενών νόσου των Λεγεωναρίων.

Αρχικά, στην Εικ.3.18 απεικονίζεται το διάγραμμα ηλεκτροχημικής εμπέδησης του πρώτου πρότυπου ηλεκτροδίου blank, το οποίο είχε μόνο τροποποιηθεί με LSV και ακολούθησε επώαση αυτού σε ορούς υγιών και ασθενών της νόσου των Λεγεωναρίων. Δεν έχει γίνει προσθήκη των υπόλοιπων μορίων MVA, NHS / EDC που προετοιμάζουν την επιφάνεια του χρυσού στο ηλεκτρόδιο για να δεχτεί και να προσδέσει την πρωτεΐνη στη συνέχεια. Είναι προφανές από τις καμπύλες του διαγράμματος, πως δεν υπάρχει κάποια απόκριση στο ηλεκτρόδιο από τα αντισώματα των ορών, μιας και δεν υπάρχουν τα αντίστοιχα αντιγόνα από την πρωτεΐνη.

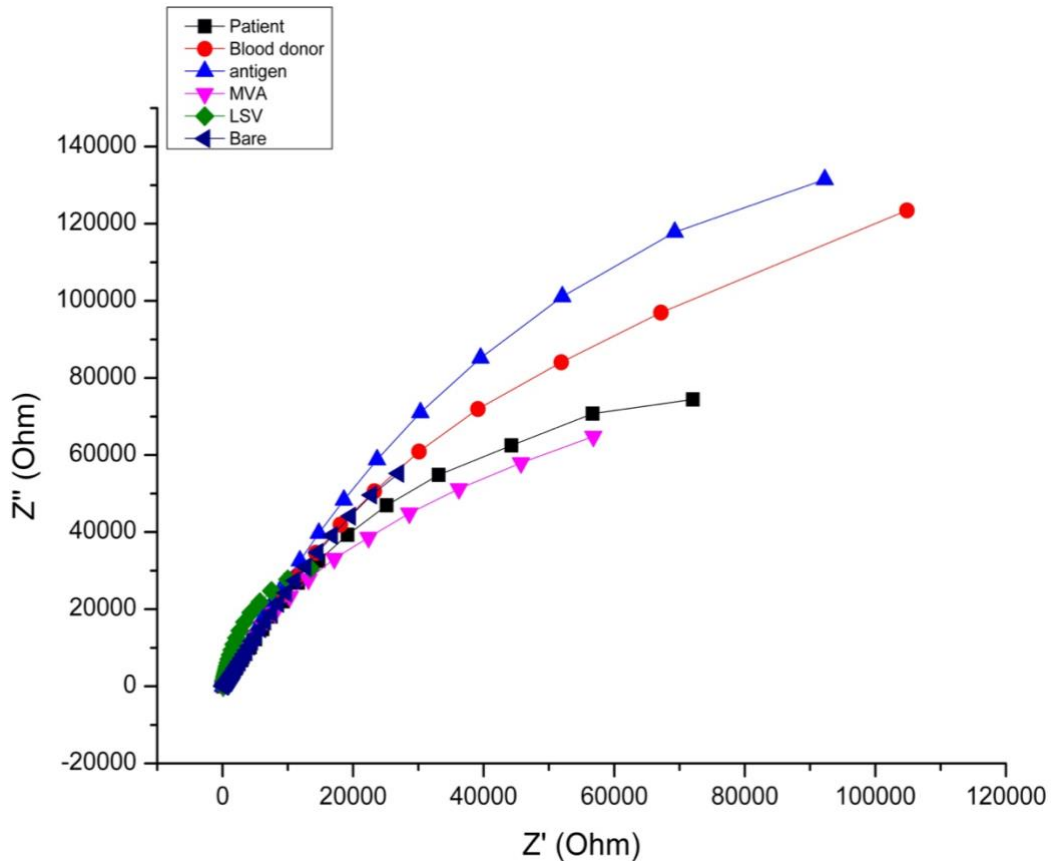


Εικ.3.19

Διαγραμματική απεικόνιση απόκρισης του πρότυπου ηλεκτροδίου blank με προσθήκη όλων των βιομορίων εκτός της πρωτεΐνης και με επώαση σε ορούς ασθενών νόσου των Λεγεωναρίων.

Στην Εικ.3.19 απεικονίζεται το το διάγραμμα ηλεκτροχημικής εμπέδησης του δεύτερου πρότυπου ηλεκτροδίου blank, στο οποίο εκτός από την τροποποίηση με LSV έχει γίνει μονιμοποίηση και των υπόλοιπων μορίων MVA, NHS / EDC. Παρατηρώντας τις καμπύλες των ορών για ασθενή και αιμοδότη, έχουν την ίδια κλίση και συμπίπτουν. Από αυτό συμπεραίνεται πως δεν υπάρχει επίσης

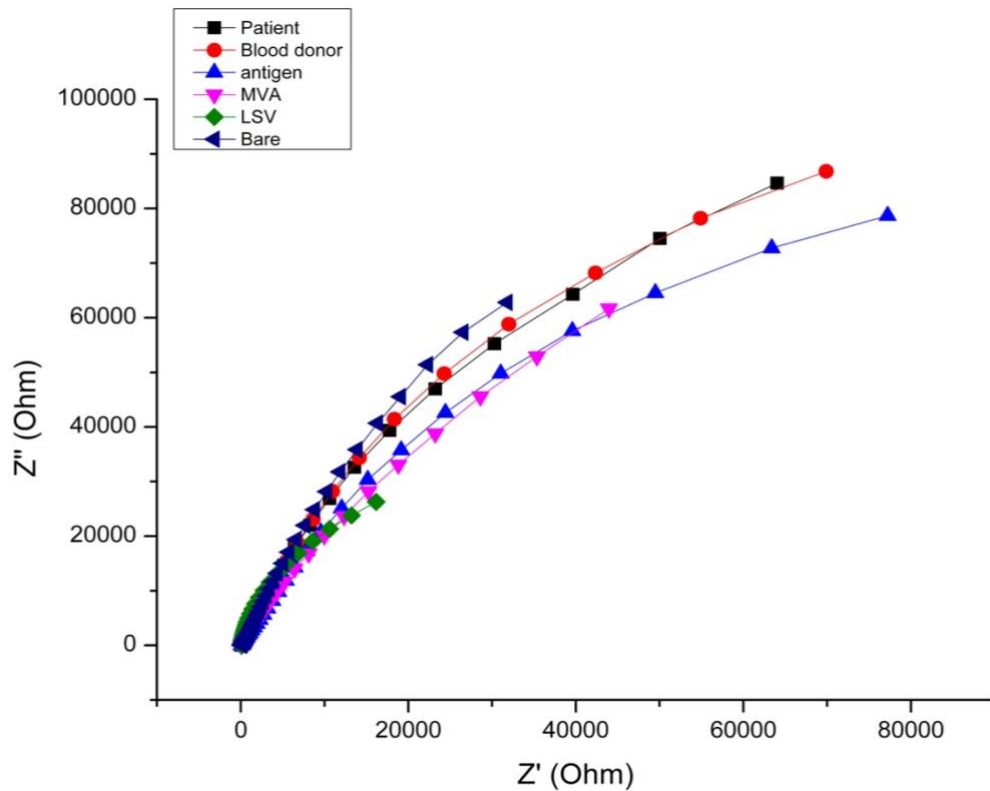
απόκριση στα αντισώματα του ορού ασθενών νόσου των Λεγεωνάριων, μιας και το ηλεκτρόδιο συμπεριφέρεται με τον ίδιο τρόπο και στον ορό υγιών αιμοδοτών, που δεν έχει αντισώματα.



Εικ.3.20

Διαγραμματική απεικόνιση απόκρισης του ηλεκτροδίου #1 με επώαση σε ορούς ασθενών νόσου των Λεγεωνάριων.

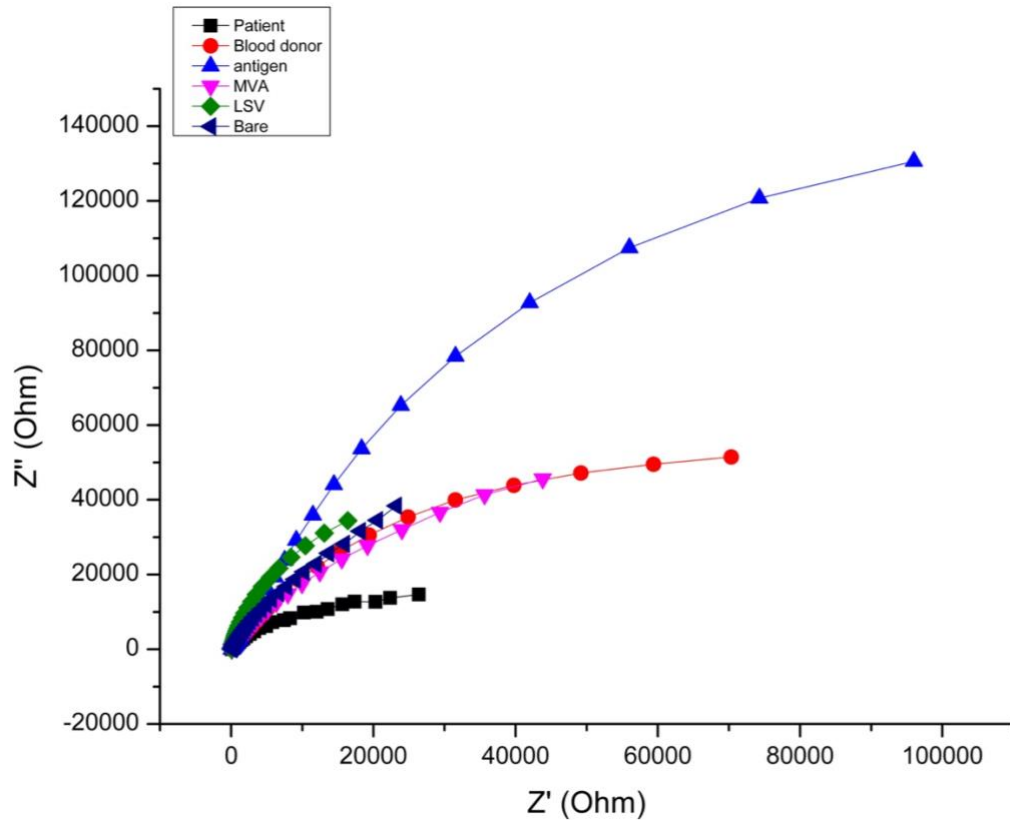
Στην Εικ.3.20 απεικονίζεται το #1 ηλεκτρόδιο χρυσού, το οποίο δοκιμάστηκε για απόκριση σε ορούς ασθενών νόσου των Λεγεωνάριων. Η διαφορά κλίσης των καμπυλών που αντιστοιχούν σε επώαση με ορούς υγιών αιμοδοτών και σε επώαση με ορούς ασθενών, δείχνει πως υπάρχει απόκριση, με την προσθήκη ορού ασθενή που περιέχει αντισώματα με την ακινητοποιημένη στον χρυσό, πρωτεΐνη.



Εικ.3.21

Διαγραμματική απεικόνιση απόκρισης του ηλεκτροδίου #2 με επώαση σε ορούς ασθενών νόσου των Λεγεωνάριων.

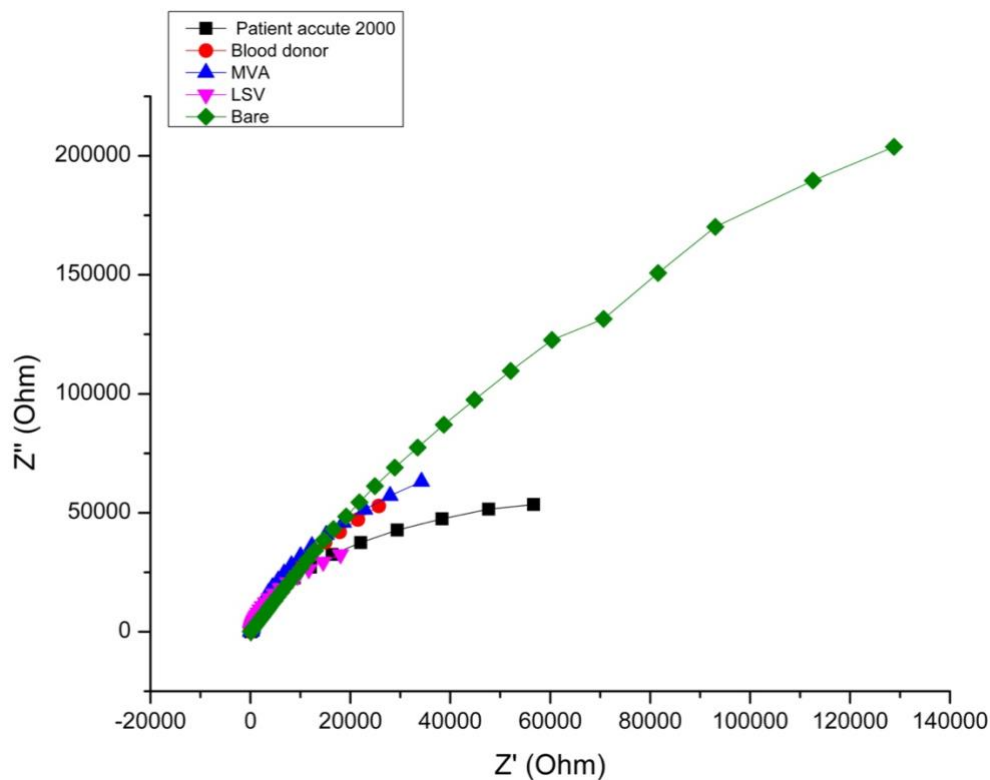
Στην Εικ.3.21 απεικονίζεται το #2 ηλεκτρόδιο χρυσού, το οποίο δοκιμάστηκε για απόκριση σε ορούς ασθενών νόσου των Λεγεωνάριων. Στο συγκεκριμένο ηλεκτρόδιο χρυσού δεν παρατηρείται διαφορά κλίσης στις καμπύλες που αντιστοιχούν στις αποκρίσεις για ορών ασθενών και υγιών. Για αυτό δεν υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ των σημείων των καμπυλών.



Εικ.3.22

Διαγραμματική απεικόνιση απόκρισης του ηλεκτροδίου #3 με επώαση σε ορούς ασθενών νόσου των Λεγεωνάριων.

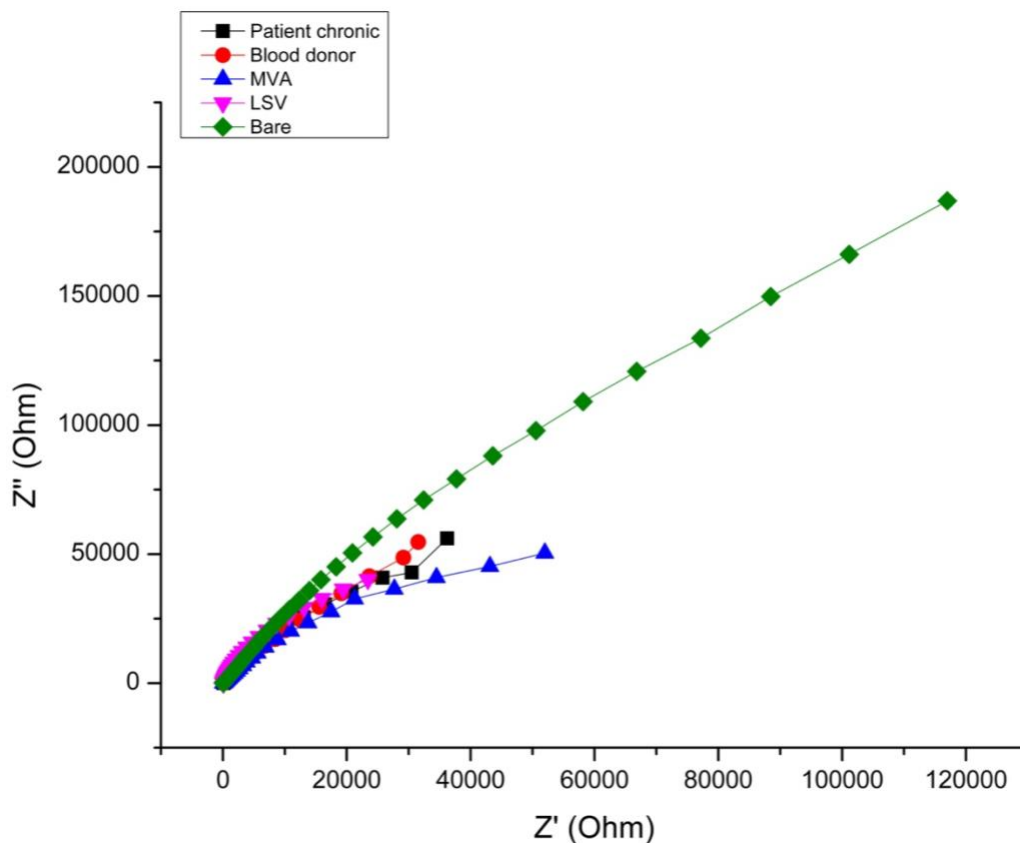
Στην Εικ.3.22 απεικονίζεται το #3 ηλεκτρόδιο χρυσού, το οποίο δοκιμάστηκε για απόκριση σε ορούς ασθενών νόσου των Λεγεωνάριων. Παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην κλίση των καμπυλών που αντιστοιχούν σε επώαση με ορούς υγιών αιμοδοτών και σε επώαση με ορούς ασθενών. Η διαφορά αυτή καταδεικνύει την απόκριση που έχει το ηλεκτρόδιο στα αντισώματα των ορών ασθενών με την μονιμοποιημένη πρωτεΐνη.



Εικ.3.23

Διαγραμματική απεικόνιση απόκρισης του ηλεκτροδίου #4 με επώαση σε ορούς ασθενών του πυρετού Q οξείας μορφής.

Στην Εικ.3.23 απεικονίζεται το #4 ηλεκτρόδιο χρυσού, το οποίο δοκιμάστηκε για απόκριση σε ορούς ασθενών νόσου του πυρετού Q, οξείας μορφής. Υπάρχει μια διαφορά στην κλίση των καμπυλών που αντιστοιχούν σε επώαση με ορό αιμοδοτή και ασθενή αντίστοιχα, αλλά είναι πολύ μικρή. Για αυτό τον λόγο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συγκριθεί με την απόκριση που υπάρχει σε επώαση με ορούς ασθενών νόσου Λεγεωναρίων και έτσι να γίνει διάκριση των ασθενών.



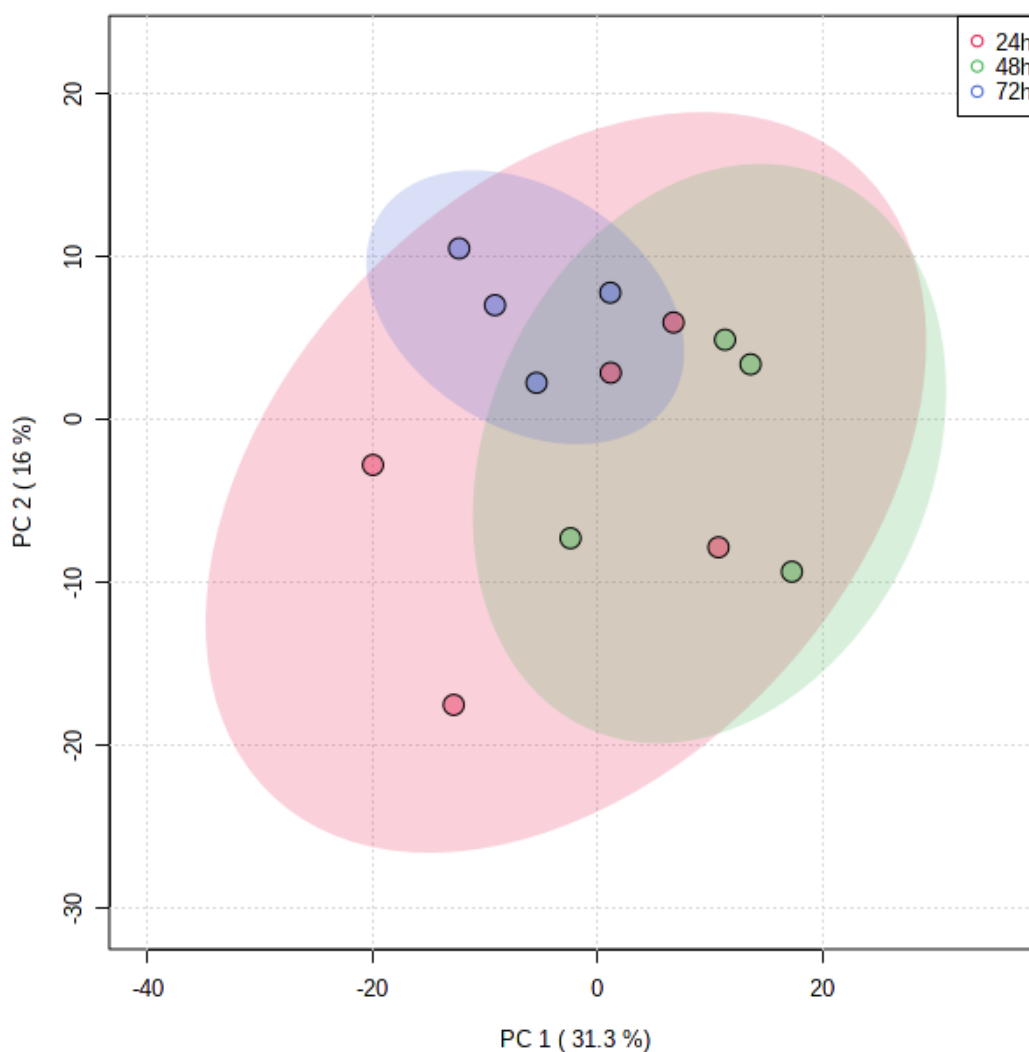
Εικ.3.24

Διαγραμματική απεικόνιση απόκρισης του ηλεκτροδίου #5 με επώαση σε ορούς ασθενών του πυρετού Q χρόνιας μορφής.

Στην Εικ.3.24 απεικονίζεται το #5 ηλεκτρόδιο χρυσού, το οποίο δοκιμάστηκε για απόκριση σε ορούς ασθενών νόσου του πυρετού Q, χρόνιας μορφής. Μεταξύ των δύο καμπυλών για υγιή αιμοδότη και ασθενή δεν υπάρχει διαφορά στην κλίση και η μία συμπίπτει με την άλλη. Συνεπώς, είναι προφανές πως δεν υπάρχει απόκριση της πρωτεΐνης, σε αντισώματα ορού ασθενών του πυρετού Q. Αυτό, σε συνδυασμό με το προηγούμενο διάγραμμα του ηλεκτροδίου #4, οδηγεί σε συμπέρασμα πως το ηλεκτρόδιο χρυσού με μονιμοποιημένη την πρωτεΐνη Irg0533_sucb μπορεί να διαχωρίσει με μεγάλη διακριτική ικανότητα ορούς με αντισώματα ασθενών νόσου των Λεγεωναρίων και ασθενών πυρετού Q.

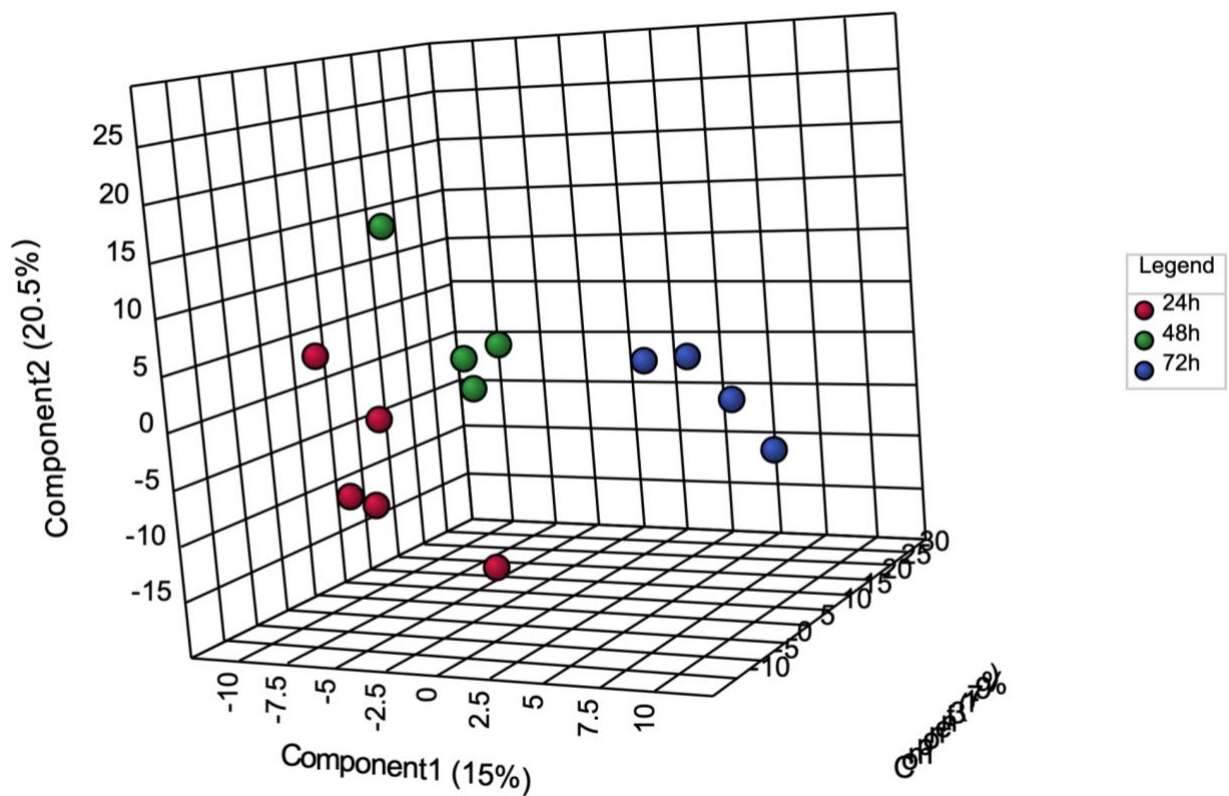
3.6 Φασματοσκοπία Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού (NMR- Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)

Στόχος με το πρώτο βήμα της ανάλυσης ήταν η κατάταξη των μεταβολιτών σε κατηγορίες, ανάλογα με το timepoint της καλλιέργειας. Υπήρχαν 3 ομάδες δεδομένων, 24 ωρών, 48 ωρών και 72 ωρών. Για την χρονική στιγμή 24 ωρών υπήρξαν 5 δείγματα, ενώ για την στιγμή των 48 και 72 ωρών υπήρξαν 4 δείγματα.



Εικ.3.25

Απεικόνιση των 2D PCA scores plot που προέρχονται από δεδομένα NMR για σύγκριση μεταβολιτών από εκχύλισμα καλλιέργειας *Legionella pneumophila* σε τρία διαφορετικά time points, 24h με κόκκινο, 48h με πράσινο και 72h με μπλε χρώμα.



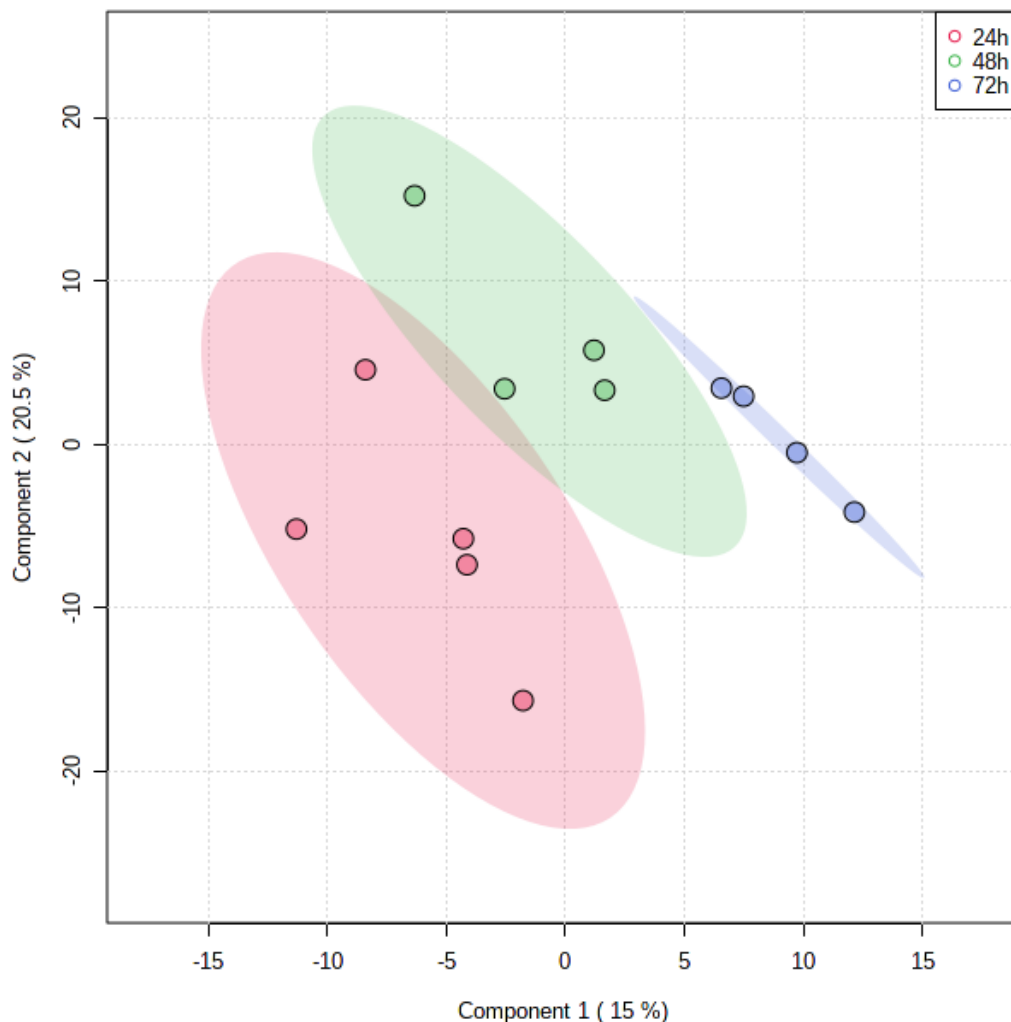
Εικ.3.26

Απεικόνιση των 3D PCA scores plot που προέρχονται από δεδομένα NMR για σύγκριση μεταβολιτών από εκχύλιμα καλλιέργειας *Legionella pneumophila* σε τρία διαφορετικά time points, 24h με κόκκινο, 48h με πράσινο και 72h με μπλε χρώμα.

Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Metaboanalyst 5.0 για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Τα δεδομένα εισήχθησαν σε δύο μορφές, αρχικά σε μορφή bucket και σε δεύτερη φάση ποσοτικά σε μορφή συγκεντρώσεων. Στη συνέχεια, έγινε κανονικοποίηση των δεδομένων. Δοκιμάστηκαν διάφοροι τύποι κανονικοποίησης, από τις τρεις κατηγορίες που παρέχονται από το λογισμικό, ακόμη και συνδυασμός μεθόδων, και βρέθηκε ο βέλτιστος τρόπος να είναι με auto-scaling. Με αυτό τον τρόπο η κλίμακα δεδομένων προσαρμόζει κάθε μεταβλητή/χαρακτηριστικό με έναν παράγοντα κλιμάκωσης που υπολογίζεται με βάση τη διασπορά της μεταβλητής, συγκεκριμένα στο auto-scaling, διαιρείται με την τυπική απόκλιση της κάθε μεταβλητής.

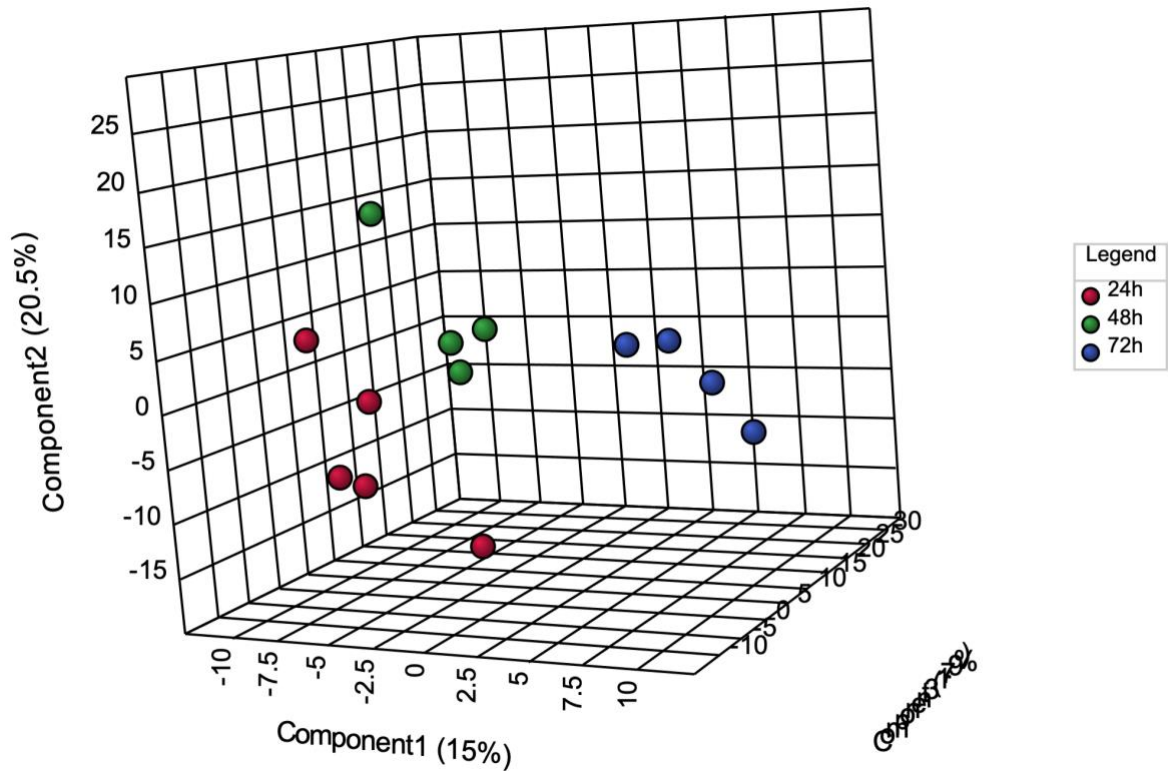
Η μέθοδος ανάλυσης κύριων συνιστωσών PCA, στα φάσματα CPMG των εκχυλισμάτων βακτηριακών κυττάρων *Legionella pneumophila*, εφαρμόστηκε για την παρατήρηση της ομαδοποίησης των δεδομένων με βάση τη χρονική στιγμή του κάθε δείγματος στην καλλιέργεια. Όπως παρατηρείται οπτικά, οι δύο ομάδες

που αντιστοιχούν στις 48 και 72 ώρες (με πράσινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα) είναι μεν αρκετά διαχωρισμένες η μία της άλλης με μικρή αλληλεπικάλυψη, και οι δύο όμως επικαλύπτονται από την ομάδα δειγμάτων που αντιστοιχεί στις 24 ώρες καλλιέργειας. Αυτό υποδηλώνει πως η μη-επιβλεπόμενη μέθοδος διαχωρισμού PCA δεν μπορεί να εξάγει χρήσιμες πληροφορίες από το συγκεκριμένο σετ δεδομένων που εξήχθη από NMR CPMG φάσματα. Στην Εικ.3.26 , απεικονίζεται το 3D PCA scores plot, για περαιτέρω διερεύνηση του PCA, βασισμένο στις πρώτες τρεις κύριες συνιστώσες, η καθεμία από τις οποίες αποτελεί και έναν άξονα (PC1, PC2, PC3). Ο διαχωρισμός των δεδομένων συνεχίζει να είναι προφανής για τις δύο ομάδες των 48 και 72 ωρών, ενώ η ομάδα των 24 ωρών φαίνεται να είναι πιο διαχυμένη στο χώρο.



Εικ.3.27

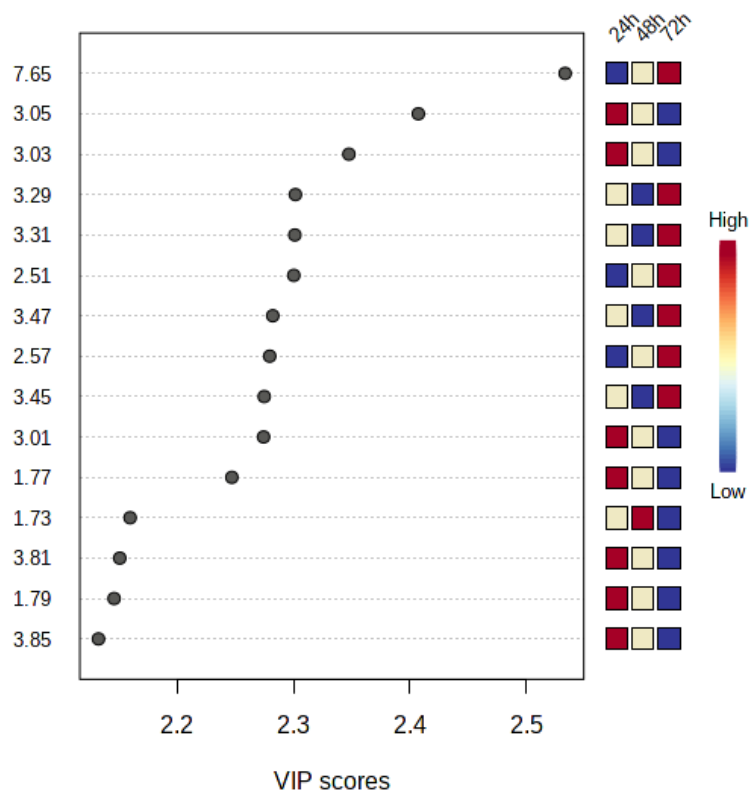
Απεικόνιση των 2D PLS-DA scores plot που προέρχονται από δεδομένα NMR για σύγκριση μεταβολιτών από εκχύλισμα καλλιέργειας *Legionella pneumophila* σε τρία διαφορετικά time points, 24h με κόκκινο, 48h με πράσινο και 72h με μπλε χρώμα.



Εικ.3.28

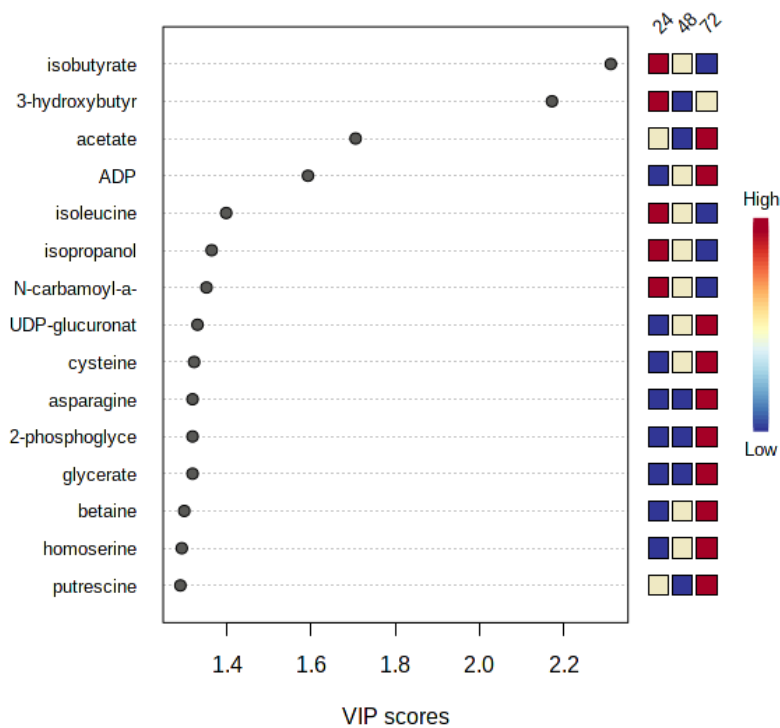
Απεικόνιση των 3D PLS-DA scores plot που προέρχονται από δεδομένα NMR για σύγκριση μεταβολιτών από εκχύλισμα καλλιέργειας *Legionella pneumophila* σε τρία διαφορετικά time points, 24h με κόκκινο, 48h με πράσινο και 72h με μπλε χρώμα.

Η μέθοδος ανάλυση μερικών ελάχιστων τετράγωνων PLS-DA, χρησιμοποιήθηκε για να δείξει την ταξινόμηση των τριών ομάδων, όπως φαίνεται και στην Εικ 3.27. Σε αντίθεση με το 2D PCA scores plot, οι διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων των δεδομένων είναι αρκετά εύκολο να διακριθούν. Υπάρχει μεγάλη τάση διαχωρισμού, χωρίς οι ομάδες των δειγμάτων να αλληλεπικαλύπτονται και αυτό φαίνεται καλύτερα και με αναπαράσταση στον τρισδιάστατο χώρο μέσω του 3D PLS-DA scores plot στην Εικ 3.28. Η ομαδοποίηση των δεδομένων ανά τους τρεις άξονες, που αντιστοιχούν στις τρεις λανθάνουσες συνιστώσες, στο 3D PLS-DA scores plot, είναι εμφανής και ισχύει για την τρίτη λανθάνουσα συνιστώσα $R^2 = 0,987$ και $Q^2 = 0,253$. Το R^2 , αντιστοιχεί σε R^2Y και δείχνει την ικανότητα του μοντέλου να προσαρμόζεται στα πραγματικά δεδομένα, κοινώς δείχνει την ακρίβεια. Όσο πιο κοντά είναι η τιμή του στο 1, τόσο καλύτερη ομαδοποίηση έχω. Ενώ το Q^2 που αντιστοιχεί και αυτό στο Q^2Y , αντικατοπτρίζει την ευαισθησία της μεθόδου.



Εικ.3.29

Απεικόνιση των ppm με τους πιο σημαντικούς μεταβολίτες που ταξινομούνται με βάση τη βαθμολογία VIP PLS-DA. Ο μικρός heatmap στα δεξιά δείχνει τις διακυμάνσεις της συγκέντρωσης τους στις ομάδες στα τρία διαφορετικά time points, 24h, 48h και 72h. Ανάλυση αρχείου με buckets pick list.



Εικ.3.30

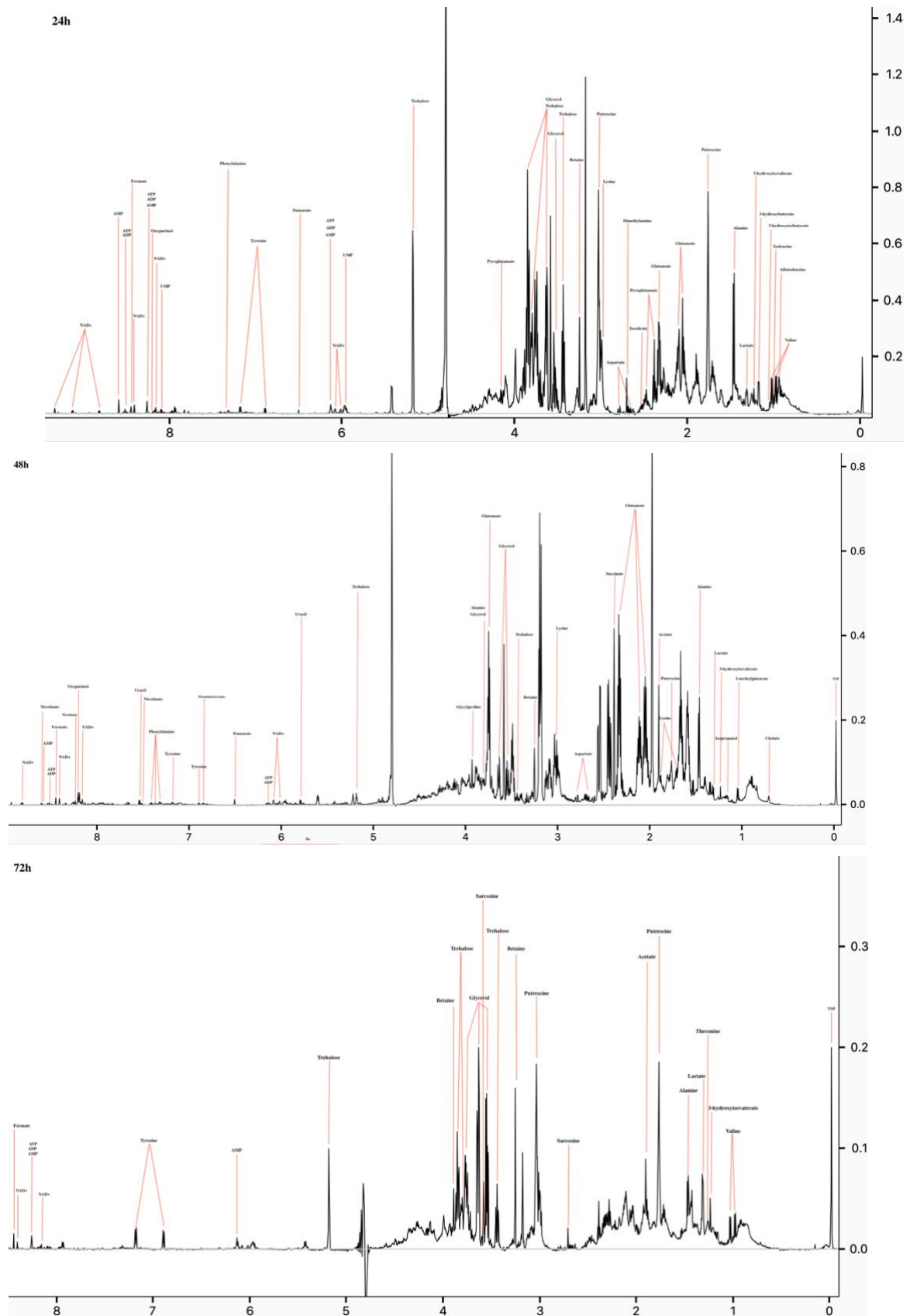
Απεικόνιση των πιο σημαντικών μεταβολιτών που ταξινομούνται με βάση τη βαθμολογία VIP PLS-DA. Ο μικρός heatmap στα δεξιά δείχνει τις διακυμάνσεις της συγκέντρωσης τους στις ομάδες στα τρία διαφορετικά time points, 24h, 48h και 72h. Ανάλυση αρχείου με συγκεντρώσεις μεταβολιτών που προέκυψαν από χειροκίνητη ανάλυση μέσω λογισμικού Chenomx NMR Suite.

Υπάρχουν δύο μέτρα σημαντικότητας στο PLS-DA: το ένα είναι η μεταβλητή σημαντικότητας στην προβολή (VIP) και το άλλο είναι το σταθμισμένο άθροισμα των απόλυτων συντελεστών παλινδρόμησης regression coefficients (coef.). Στις εικόνες 3.29 και 3.30, απεικονίζονται οι 15 πιο σημαντικές μετατοπίσεις σε ppm και ενώσεις, αντίστοιχα, που συνεισφέρουν περισσότερο στην ομαδοποίηση των δεδομένων, ταξινομημένες με βάση το VIP score. Τα χρωματιστά κουτιά στα δεξιά υποδεικνύουν τις σχετικές συγκεντρώσεις του αντίστοιχου μεταβολίτη σε κάθε ομάδα υπό μελέτη.

Αναλύοντας τα δεδομένα βάσει των buckets του φάσματος, οι μετατοπίσεις σε ppm που αντιστοιχούν σε ενώσεις που φαίνεται να συνεισφέρουν περισσότερο στον διαχωρισμό είναι στα 7.65, 3.05, 3.03, 3.29, 3.31, 2.51, 3.47, 2.57 και άλλες όπως υποδηλώνει ο άξονας Y στο διάγραμμα. Οι μετατοπίσεις αντιστοιχούν σε μεταβολίτες σύμφωνα με τις κορυφές που υπάρχουν στο φάσμα σε εκείνα τα ppm. Το 7,65 αντιστοιχεί σε 4-aminohippurate, τα 3,05 και 3,03 σε putrescine, το 3.29 και 3.31 σε N-carbamoyl-β-alanine, το 2.57 σε pyroglutamate, το 3.47 σε trehalose και το 2.57, το 3.45 σε trehalose, το 3.01 σε lysine και cysteine, τα 1.73 και 1.77 σε putrescine, το 3.81 σε trehalose, 2-phosphoglycerate και glycerate, το 1.79 σε putrescine και 3.85 σε trehalose.

Αντίστοιχα, αναλύοντας τα δεδομένα βάσει των συγκεντρώσεων του κάθε μεταβολίτη που προκύπτει αποκλειστικά από χειροκίνητη προσαρμογή και υπολογισμό μέσω λογισμικού Chenomx NMR Suite, οι 15 ενώσεις που φαίνεται να συνεισφέρουν περισσότερο στον διαχωρισμό είναι isobutyrate, 3-hydroxybutyrate, acetate, ADP, isoleucine, isopropanol, N-carbamoyl-alanine, UDP-glucuronate, cysteine, asparagine, 2-phosphoglycerate, glycerate, betaine, homoserine και putrescine.

Παρατηρείται μία μερική ταύτιση της ανάλυσης βάσει buckets, με την ανάλυση βάσει συγκεντρώσεων των μεταβολιτών. Μεταβολίτες όπως putrescine, N-carbamoyl-β-alanine, glycerate παρατηρούνται και στα δύο διαγράμματα των VIP Score των PLS-DA.



Εικ.3.31

Απεικόνιση φασμάτων ¹H NMR με αντιστοιχισμένους τους μεταβολίτες των κορυφών, ένα για κάθε χρονική στιγμή της καλλιέργειας των βακτηριακών κυττάρων *Legionella pneumophila*. Από πάνω προς τα κάτω, τα φάσματα ανήκουν σε 24, 48 και 72 ώρες καλλιέργειας αντίστοιχα.

Η εικόνα 3.31, ενδεικτικά ένα φάσμα *crmgpr1d* ^1H NMR από κάθε χρονική στιγμή, ένα που αντιστοιχεί σε ένα δείγμα 24 ωρών, ένα σε δείγμα 48 ωρών και ένα σε δείγμα 72 ωρών. Τα φάσματα αναλύθηκαν χειροκίνητα με λογισμικό Chemonx NMR Suite και κάθε μεταβολίτης συγκρίθηκε με τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές, για τις κορυφές του σε φάσματα από βάσεις δεδομένων όπως η HMDB (Human Metabolome Database). Ταυτοποιήθηκαν συνολικά 59 μεταβολίτες από όλα τα φάσματα και πληθώρα αυτών απεικονίζεται και στην εικόνα 3.32, όπου αναγράφονται οι μεταβολίτες στους οποίους αντιστοιχούν οι κορυφές των φασμάτων.

4. Συμπεράσματα

Οι πρωτεΐνες Elongation Factor G (*lpg0326_fusA*), Elongation Factor T (*lpg0314_tuf2*), Elongation Factor T₂ (*lpg0327_tufb*), Dihydrolipoamide Succinyltransferase (*lpg0533_sucB*) έχουν αναφερθεί ως αντιγονικές και έχουν κλωνοποιηθεί επιτυχώς.⁴² Μετά από τις διαδικασίες μετασχηματισμού, έκφρασης, απομόνωσης και καθαρισμού, έγιναν έλεγχοι αντιγονικότητας με μεθόδους όπως αυτές του Western blotting. Έχοντας αρκετά καθαρές πρωτεΐνες μετά από επεξεργασία με χρωματογραφία στήλης Ni-NTA και βασισμένοι στα ικανοποιητικά αποτελέσματα του Western blotting, διεξήχθησαν διαδικασίες ταυτοποίησης με φασματοσκοπία MALDI-TOF. Εκεί ταυτοποιήθηκαν με σημαντικό αριθμό πεπτιδίων, τόσο η Elongation Factor G (*lpg0326_fusA*), η Elongation Factor T (*lpg0314_tuf2*) αλλά και η Elongation Factor T₂ (*lpg0327_tufb*). Ακολούθησε περαιτέρω μελέτη της αντιγονικότητας όλων των πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ELISA. Τα αποτελέσματα όπως φαίνονται και στην παραπάνω ενότητα, εκτός από επαναλήψιμα υπήρξαν και πολύ ενθαρρυντικά όσον αφορά την διαγνωστική ικανότητα των πρωτεϊνών. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, υπήρξε απόκριση στους ασθενείς, τόσο μεγαλύτερη από αυτή στους ορούς υγιών αιμοδοτών, ώστε ο διαχωρισμός να είναι σημαντικά μεγάλος. Καλύτερα στατιστικά στοιχεία ήταν αυτά της πρωτεΐνης Dihydrolipoamide Succinyltransferase (*lpg0533_sucB*). Η πρωτεΐνη αυτή είχε τις μεγαλύτερες

αποκρίσεις σε ορούς ασθενών νόσου των Λεγεωναρίων , ενώ έδειξε και τις μικρότερες αποκρίσεις σε ορούς από υγιείς αιμοδότες. Όλα τα παραπάνω λειτουργούν ως ένδειξη πως και οι τέσσερις πρωτεΐνες μπορούν να φανούν χρήσιμοι ως διαγνωστικοί δείκτες της ασθένειας που προκαλείται από το παθογόνο *Legionella pneumophila*, με προτιμότερη επιλογή την Dihydroliipoamide Succinyltransferase (Ipg0533_sucB). Για αυτό και επιλέχθηκε για να εξεταστεί στον βιοαισθητήρα, ως διαγνωστικός δείκτης της νόσου των Λεγεωνάριων. Όπως έχει αναδιατυπωθεί, έγινε προσπάθεια δημιουργίας ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα για την έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση της νόσου των Λεγεωνάριων, βασισμένη στην μονιμοποίηση της πρωτεΐνης, που στην εν λόγω περίπτωση είναι η Ipg0533_sucb. Τα αποτελέσματα υπήρξαν ενθαρυντικά, αφού εκτός από απόκριση που είχε το ηλεκτρόδιο με την πρωτεΐνη στους ορούς ασθενών νόσου των Λεγεωνάριων, δεν παρατηρήθηκαν αποκρίσεις σε ορούς υγιών αλλά ούτε σε ορούς ασθενών πυρετού Q, χρόνιας ή οξείας μορφής. Θα μπορούσε να υποτεθεί δηλαδή πως δεν υπάρχουν cross reactions των αντιγόνων της *L.pneumophila* με αυτά της *C.burnetii* , γεγονός που το καθιστά επιλεκτικό ως διαγνωστικό εργαλείο. Όσον αφορά τη μεταβολομική ανάλυση της φασματοσκοπίας μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR), τα αποτελέσματα τόσο από την χειροκίνητη των φασμάτων, όσο και από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, φαίνονται να είναι ενθαρυντικά για να υπάρξει σε συνέχεια της εργασίας περαιτέρω ποσοτική και ποιοτική ανάλυση με πιο πολύπλοκα εργαλεία και σύνθετα λογισμικά. Συγκεκριμένα, η πουτρεσκίνη, η N-καβαμουλ-αλανίνη και το γλυκερικό οξύ, ως μεταβολίτες με μεγάλο αντίκτυπο στον διαχωρισμό των δεδομένων, αξίζει σε πρώτη φάση, να διερευνηθούν περαιτέρω ως προς τη θέση και τη λειτουργία τους, στα βιοχημικά μονοπάτια και τις μεταβολικές οδούς του βακτηρίου.

5. Μελλοντικοί Στόχοι

Σε επόμενο στάδιο, έρχεται σαν πρώτο βήμα η ερμηνεία της ποσοτικής και ποιοτικής διαφοροποίησης των μεταβολιτών των μέχρι τώρα ευρημάτων και η πιθανή συσχέτιση μεταβολιτών που συνεισφέρουν στη διαφοροποίηση αυτή μέσω των μεταβολικών τους μονοπατιών με τον κύκλο ζωής του βακτηρίου. Αποτελεί επίσης μελλοντικό στόχο της παρούσας μελέτης, η ανάπτυξη καρκινικών κυτταρικών σειρών (πιθανών HeLa cells). Αφενός μολυσμένων με το βακτήριο και αφετέρου υγιών, ώστε να γίνει η σύγκριση των μεταβολιτών που υπάρχουν στο κύτταρο ξενιστή, όταν αυτό μολύνεται με τον παθογόνο μικροοργανισμό και όταν είναι υγιές. Με τη σειρά της, θα ακολουθήσει ερμηνεία τόσο των ποιοτικών όσο και των ποσοτικών αποτελεσμάτων ώστε να επιτευχθεί η ανεύρεση μεταβολιτών, που να αποτελούν πιθανόν στόχο για τη θεραπεία της νόσου των Λεγεωναρίων, που προκαλείται από προσβολή του ανθρώπου από το παθογόνο βακτήριο *Legionella pneumophila* sg1.

6. Βιβλιογραφία

1. Mondino, S., Schmidt, S., Rolando, M., Escoll, P., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C. (2019). Pathogenesis Mechanisms of *Legionella*. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2020, 15, 439–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis>
2. Burillo, A., Pedro-Botet, M. L., & Bouza, E. (2017). Microbiology and Epidemiology of Legionnaire’s Disease. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 31, Issue 1, pp. 7–27). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.10.002>
3. Newton, H. J., Ang, D. K. Y., van Driel, I. R., & Hartland, E. L. (2010). Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 23, Issue 2, pp. 274–298). <https://doi.org/10.1128/CMR.00052-09>
4. *anand1983*. (n.d.).
5. Correia, A. M., Ferreira, J. S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho, R., Gonçalves, J., Antunes, D. M., Almeida, S., Mendes, A., Guerreiro, M., Sampaio, D. A., Vieira, L., Machado, J., Simões, M. J., Gonçalves, P., & Gomes, J. P. (2016). Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires’ Disease. *New England Journal of Medicine*, 374(5), 497–498. <https://doi.org/10.1056/nejmc1505356>
6. Beauté, J. (2017). Legionnaires’ disease in Europe, 2011 to 2015. *Eurosurveillance*, 22(27). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.27.30566>
7. Currie, S. L., & Beattie, T. K. (n.d.). *Title: Compost and Legionella longbeachae- An emerging infection?*
8. Molofsky, A. B., & Swanson, M. S. (2004). Differentiate to thrive: Lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. In *Molecular Microbiology* (Vol. 53, Issue 1, pp. 29–40). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04129.x>
9. Oliva, G., Sahr, T., & Buchrieser, C. (2018). The life cycle of *L. pneumophila*: Cellular differentiation is linked to virulence and metabolism. In *Frontiers in*

- Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8, Issue JAN). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00003>
10. Garduño, R. A. (2007). Life Cycle, Growth Cycles and Developmental Cycle of *Legionella pneumophila*. In *Legionella pneumophila* (pp. 65–84). Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-70896-6_4
 11. Hubber, A., & Roy, C. R. (2010). Modulation of host cell function by *legionella pneumophila* type IV effectors. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 26, pp. 261–283). <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104034>
 12. Finsel, I., & Hilbi, H. (2015). Formation of a pathogen vacuole according to *Legionella pneumophila*: How to kill one bird with many stones. In *Cellular Microbiology* (Vol. 17, Issue 7, pp. 935–950). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/cmi.12450>
 13. Hilbi, H., & Haas, A. (2012). Secretive Bacterial Pathogens and the Secretory Pathway. *Traffic*, 13(9), 1187–1197. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01344.x>
 14. Qiu, J., & Luo, Z. Q. (2017). *Legionella* and *Coxiella* effectors: Strength in diversity and activity. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 10, pp. 591–605). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.67>
 15. Nagai, H., & Kubori, T. (2011). Type IVB secretion systems of *Legionella* and other gram-negative bacteria. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 2, Issue JUNE). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00136>
 16. *American Thoracic Society*. (2016). <http://www.cdc.gov/legionella>
 17. *Medical Rounds*. (n.d.).
 18. Sharma, L., Losier, A., Tolbert, T., dela Cruz, C. S., & Marion, C. R. (2017). Atypical Pneumonia: Updates on *Legionella*, *Chlamydia*, and *Mycoplasma Pneumonia*. In *Clinics in Chest Medicine* (Vol. 38, Issue 1, pp. 45–58). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.11.011>
 19. Cunha, C. B., & Cunha, B. A. (2017). Legionnaire’s Disease Since Philadelphia: Lessons Learned and Continued Progress. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 31, Issue 1, pp. 1–5). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.10.001>

20. Heath, C. H., Grove, D. I., & Looke, D. E. (1996). Delay in Appropriate Therapy of Legionella Pneumonia Associated with Increased Mortality. In *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* (Vol. 15, Issue 4).
21. Burdet, C., Lepeule, R., Duval, X., Caseris, M., Rioux, C., Lucet, J. C., & Yazdanpanah, Y. (2014). Quinolones versus macrolides in the treatment of legionellosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(9), 2354–2360. <https://doi.org/10.1093/jac/dku159>
22. Sabrià, M., Pedro-Botet, M. L., Gómez, J., Roig, J., Vilaseca, B., Sopena, N., & Baños, V. (2005). Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires disease. *Chest*, 128(3), 1401–1405. <https://doi.org/10.1378/chest.128.3.1401>
23. Grohmann, E., Christie, P. J., Waksman, G., & Backert, S. (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. In *Molecular Microbiology* (Vol. 107, Issue 4, pp. 455–471). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/mmi.13896>
24. Isberg, R. R., O’connor, T., & Heidtman, M. (n.d.). *The Legionella pneumophila replication vacuole: making a cozy niche inside host cells*.
25. Appelt, S., & Heuner, K. (2017). The flagellar regulon of Legionella-A review. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 7, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00454>
26. Garduño, R. A., Garduño, E., Hiltz, M., & Hoffman, P. S. (2002). Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infection and Immunity*, 70(11), 6273–6283. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6273-6283.2002>
27. Abdelhady, H., & Garduño, R. A. (2013). The progeny of *Legionella pneumophila* in human macrophages shows unique developmental traits. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 349, Issue 2, pp. 99–107). <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12300>
28. Xu, L., & Luo, Z. Q. (2013). Cell biology of infection by *Legionella pneumophila*. In *Microbes and Infection* (Vol. 15, Issue 2, pp. 157–167). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.11.001>
29. <https://www.glenmills.com/product/french-press-g-m-high-pressure-cell-disruption/>

30. He, F. (2011). Bradford Protein Assay. *BIO-PROTOCOL*, 1(6).
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.45>
31. Otieno, B. A., Krause, C. E., & Rusling, J. F. (2016). *Bioconjugation of Antibodies and Enzyme Labels onto Magnetic Beads* (pp. 135–150).
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.10.005>
32. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
33. Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., & Wolk, D. M. (2013). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 547–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>
34. Karunakaran, C., Bhargava, K., Benjamin, R., (2015). *Biosensors and bioelectronics*, Elsevier.
35. Slouka, C., Wurm, D., Brunauer, G., Welzl-Wachter, A., Spadiut, O., Fleig, J., & Herwig, C. (2016). A Novel Application for Low Frequency Electrochemical Impedance Spectroscopy as an Online Process Monitoring Tool for Viable Cell Concentrations. *Sensors*, 16(11), 1900. <https://doi.org/10.3390/s16111900>
36. Leva-Bueno, J., Peyman, S. A., & Millner, P. A. (2020). A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Medical Microbiology and Immunology*, 209(3), 343–362. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00668-0>
37. Manickam, A., Chevalier, A., McDermott, M., Ellington, A. D., & Hassibi, A. (2010). A CMOS Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) Biosensor Array. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, 4(6), 379–390.
<https://doi.org/10.1109/TBCAS.2010.2081669>
38. Kim, D., & Kang, D. (2008). Molecular Recognition and Specific Interactions for Biosensing Applications. *Sensors*, 8(10), 6605–6641.
<https://doi.org/10.3390/s8106605>
39. Mathioudaki E, Alifragis Y, Fouskaki M, Chochlakis D, Xie H, et al. (2021) Electrochemical antigenic sensor for the diagnosis of chronic Q fever. *Biomed Res Clin Prac* 6: DOI: 10.15761/BRCP.1000224

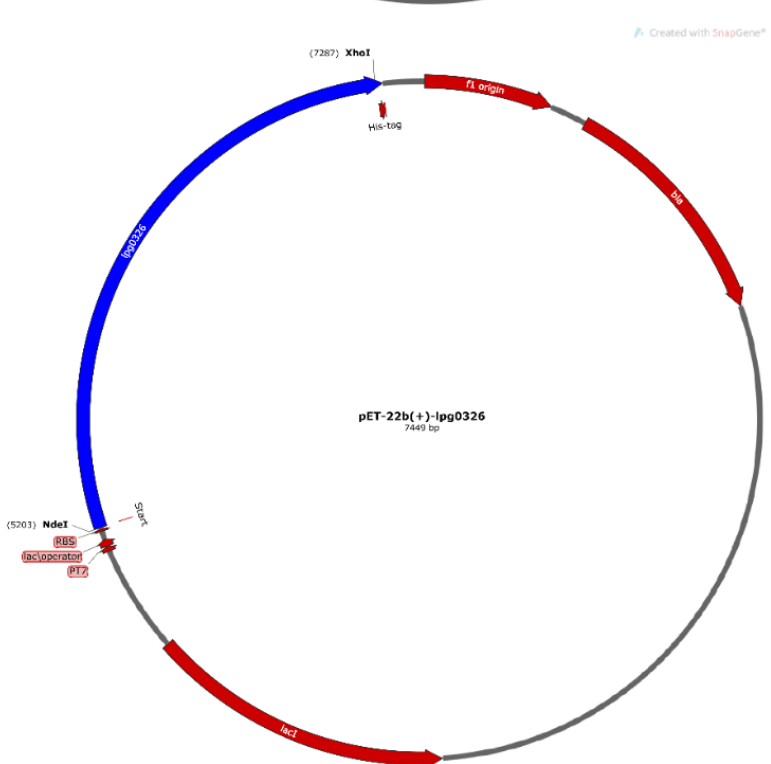
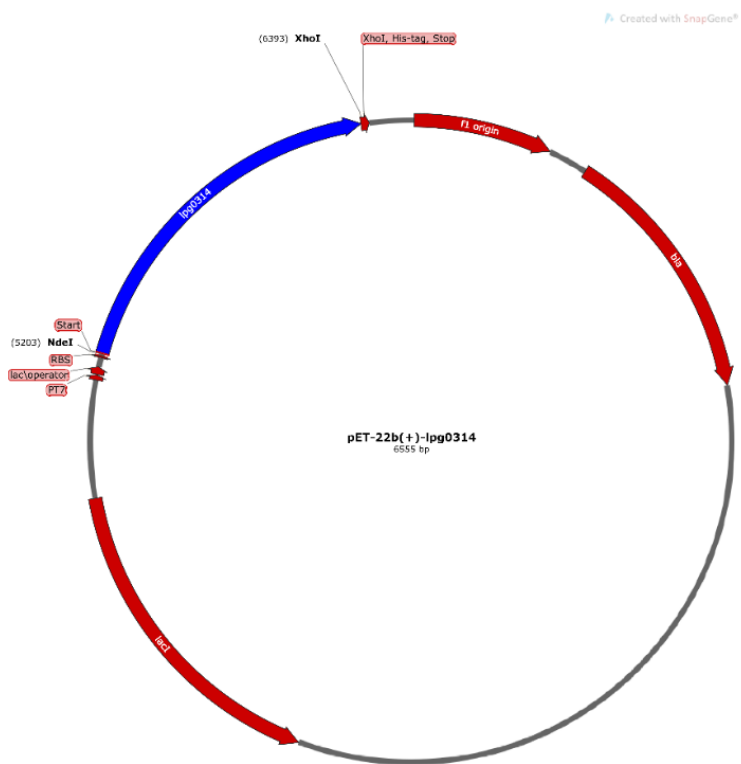
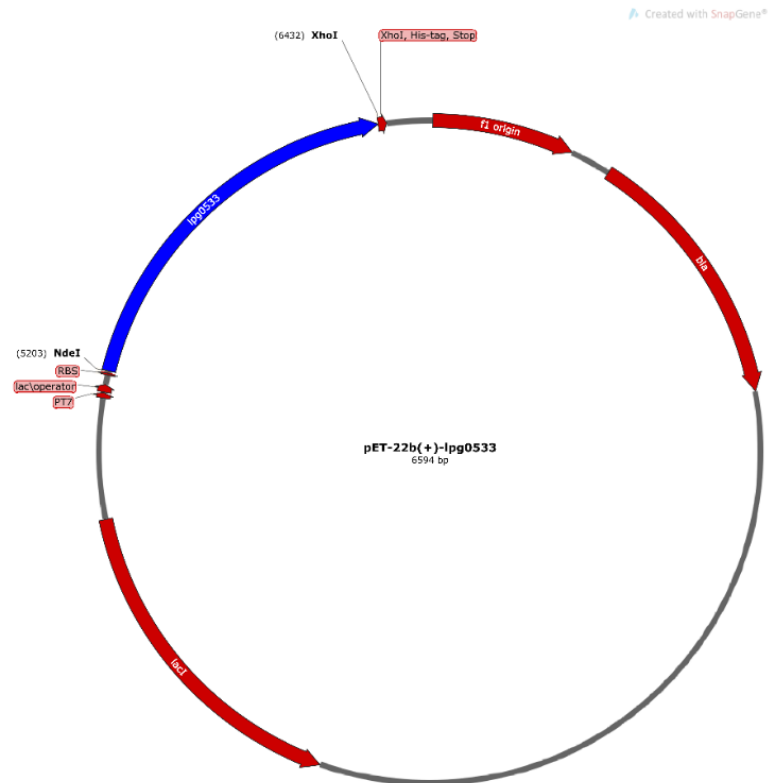
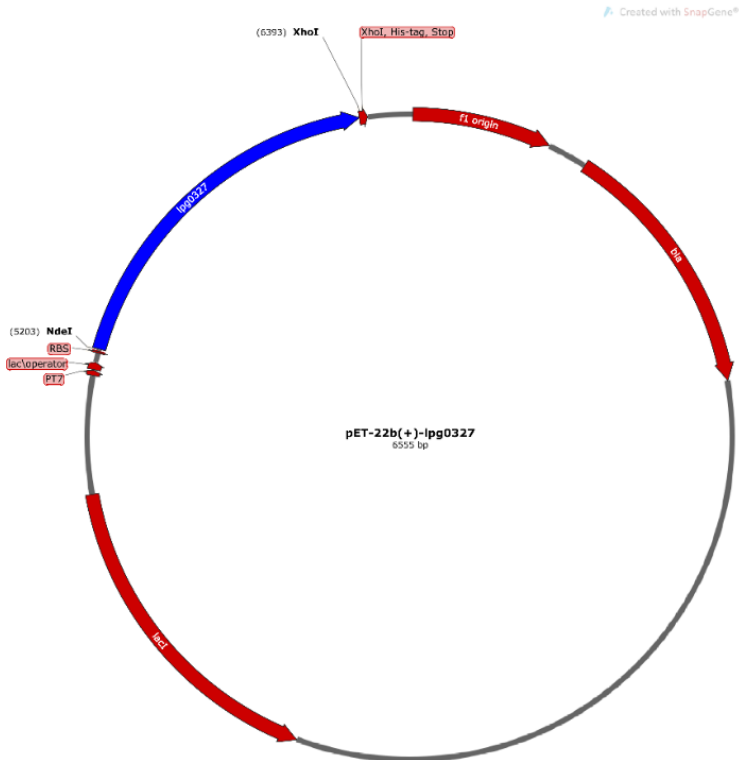
40. Giapintzaki, A. (2022), *Study of the antigenic proteins of Coxiella Burnetii, the etiological agent of Q fever*
41. Drozd, M., Karoń, S., & Malinowska, E. (2021). Recent Advancements in Receptor Layer Engineering for Applications in SPR-Based Immunodiagnostics. *Sensors*, 21(11), 3781. <https://doi.org/10.3390/s21113781>
42. Koutantou, M., (2020), *Study of Antigenic Proteins of Legionella pneumophila"*
43. Daviss, Bennett (April 2005). "Growing pains for metabolomics" (<http://www.the-scientist.com/article/display/15427/>). *The Scientist* 19 (8): 25–28.
44. Nicholson, J. K., Foxall, P. J. D., Spraul, Manfred., Farrant, R. Duncan., & Lindon, J. C. (1995). 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR Spectroscopy of Human Blood Plasma. *Analytical Chemistry*, 67(5), 793–811. <https://doi.org/10.1021/ac00101a004>
45. Mckay, R. T. (2011). How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 38A(5), 197–220. <https://doi.org/10.1002/cmr.a.20223>
46. Wang, Y., Bollard, M. E., Keun, H., Antti, H., Beckonert, O., Ebbels, T. M., Lindon, J. C., Holmes, E., Tang, H., & Nicholson, J. K. (2003). Spectral editing and pattern recognition methods applied to high-resolution magic-angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver tissues. *Analytical Biochemistry*, 323(1), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.07.026>
47. Aiello, F., Gerretzen, J., Simons, M. G., Davies, A. N., & Dani, P. (2021). A multivariate approach to investigate the NMR CPMG pulse sequence for analysing low MW species in polymers. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 59(2), 172–186. <https://doi.org/10.1002/mrc.5100>
48. Bliziotis, N. G., Engelke, U. F. H., Aspers, R. L. E. G., Engel, J., Deinum, J., Timmers, H. J. L. M., Wevers, R. A., & Kluijtmans, L. A. J. (2020). A comparison of high-throughput plasma NMR protocols for comparative untargeted metabolomics. *Metabolomics*, 16(5), 64. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01686-y>
49. Subbaram, K., Kannan, H., & Masadeh, M. M. A. (2017). Isolation, identification, characterization and antibiotic sensitivity profile of pathogenic *Legionella pneumophila* isolates from different water sources. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 411–415. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.023>

50. Fox, K. F., & Brown, A. (1993). Properties of the genus *Tatlockia* .
Differentiation of *Tatlockia* (*Legionella*) *maceachernii* and *micdadei* from each other and from other *legionellae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(5), 486–491. <https://doi.org/10.1139/m93-069>
51. Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. M., Boone, D. R., de Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F. A., & Schleifer, K.-H. (Eds.). (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7>
52. Fujii, T., Sato, K., Miyata, K., Inoue, M., & Mitsuhashi, S. (1986). Biochemical properties of beta-lactamase produced by *Legionella gormanii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29(5), 925–926. <https://doi.org/10.1128/AAC.29.5.925>
53. Moss, C. W., Weaver, R. E., Dees, S. B., & Cherry, W. B. (1977). Cellular fatty acid composition of isolates from Legionnaires disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 6(2), 140–143. <https://doi.org/10.1128/jcm.6.2.140-143.1977>
54. Weber, S. S., Joller, N., Küntzel, A. B., Spörri, R., Tchang, V. S., Scandella, E., Rösli, C., Ludewig, B., Hilbi, H., & Oxenius, A. (2012). Identification of Protective B Cell Antigens of *Legionella pneumophila*. *The Journal of Immunology*, 189(2), 841–849. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200794>
55. Derosier, D. J., Oliver, R. M., & Reed, L. J. (1971). Crystallization and Preliminary Structural Analysis of Dihydrolipoyl Transsuccinylase, the Core of the 2-oxoglutarate dehydrogenase Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(6), 1135–1137. <http://www.jstor.org/stable/60289>
56. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q5ZY40/entry>
57. Eisenreich, W., & Heuner, K. (2016). The life stage-specific pathometabolism of *Legionella pneumophila*. *FEBS Letters*, 590(21), 3868–3886. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12326>
58. Nagai, H., & Kubori, T. (2011). Type IVB Secretion Systems of *Legionella* and Other Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00136>
59. Xia, J., & Wishart, D. S. (2011). Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature Protocols*, 6(6), 743–760. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.319>

60. Raja, G., Jung, Y., Jung, S. H., & Kim, T.-J. (2020). ¹H-NMR-based metabolomics for cancer targeting and metabolic engineering –A review. *Process Biochemistry*, 99, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.023>
61. Zhao, L.-L., Qiu, X.-J., Wang, W.-B., Li, R.-M., & Wang, D.-S. (2019). NMR Metabolomics and Random Forests Models to Identify Potential Plasma Biomarkers of Blood Stasis Syndrome With Coronary Heart Disease Patients. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01109>
62. Xia, J., & Wishart, D. S. (2011). Metabolomic Data Processing, Analysis, and Interpretation Using MetaboAnalyst. *Current Protocols in Bioinformatics*, 34(1). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1410s34>
63. Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 68(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
64. Vance P., Schaafeffer F., Trevino E. et al., *Clinical Microbiology Newsletter*, (2015), 119-123, 37 (15) doi: 10.1016/j.clinmicnews.2015.07.003
65. Louise V. Holyoake, Stuart Hunt, Guido Sanguinetti, Gregory M. Cook, Mark Shepherd; CydDC-mediated reductant export in *Escherichia coli* controls the transcriptional wiring of energy metabolism and combats nitrosative stress. *Biochem J* 15 March 2016; 473 (6): 693-701. Doi: 10.1042/BJ20150536

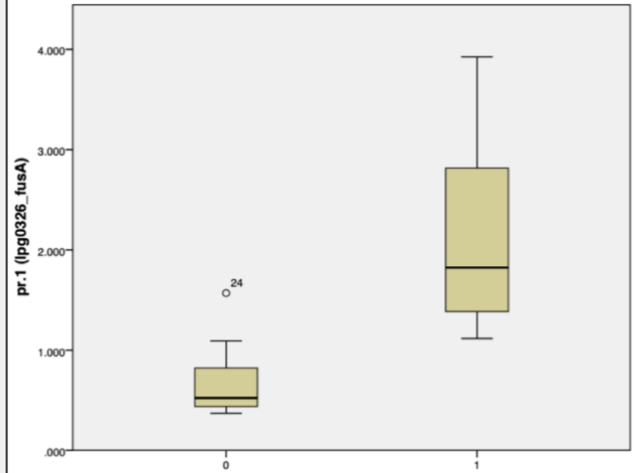
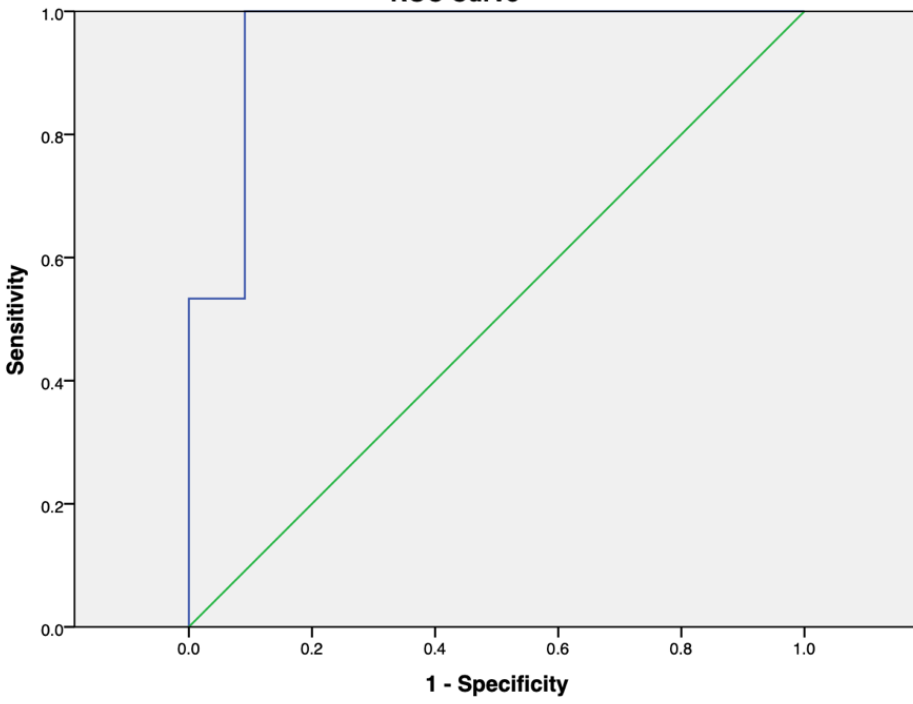
7. Παράρτημα

Α. Πλασμίδια⁴²

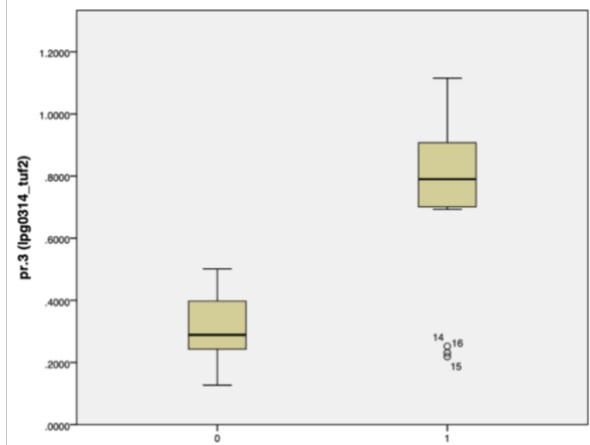
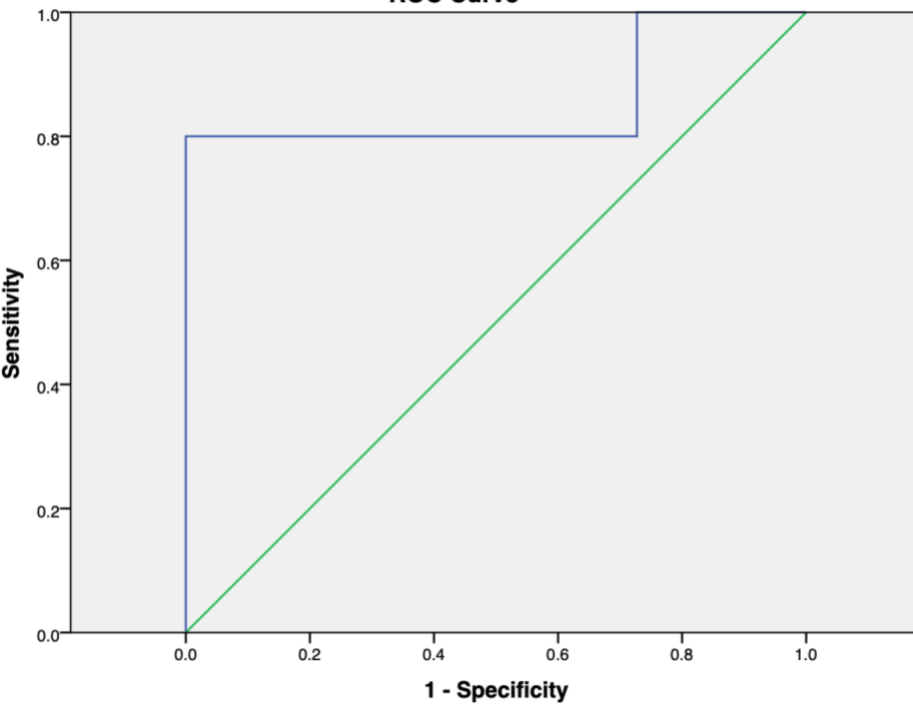


Β. Στατιστική Ανάλυση αποτελεσμάτων ELISA

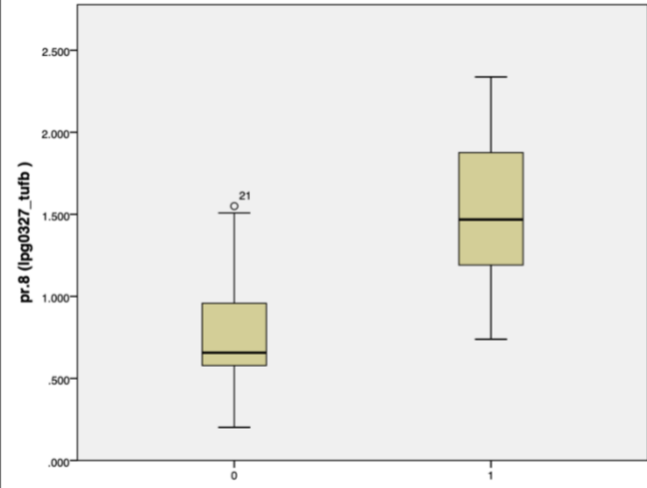
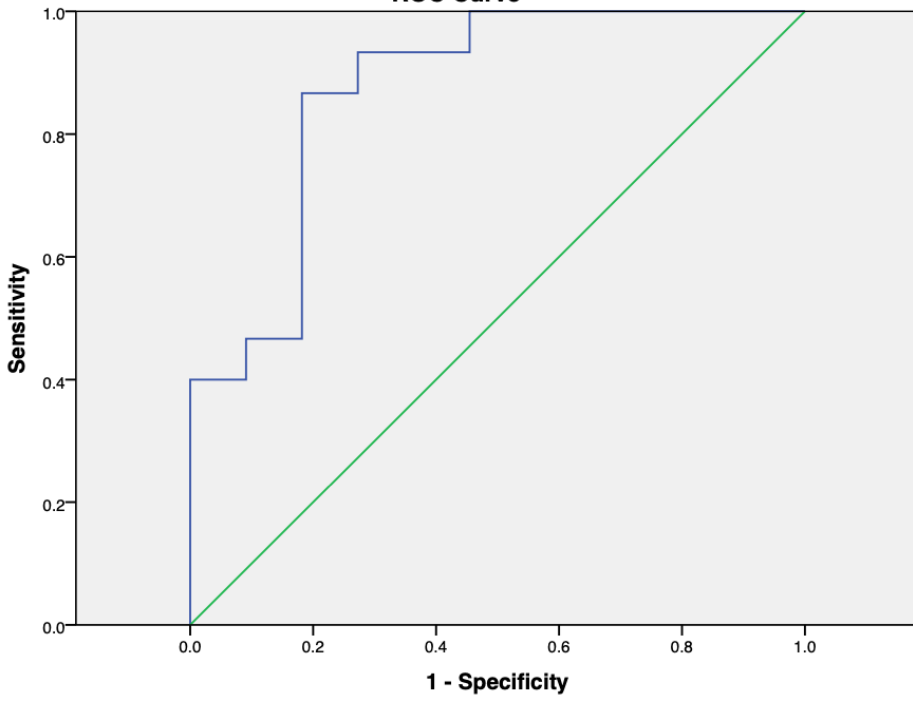
ROC Curve



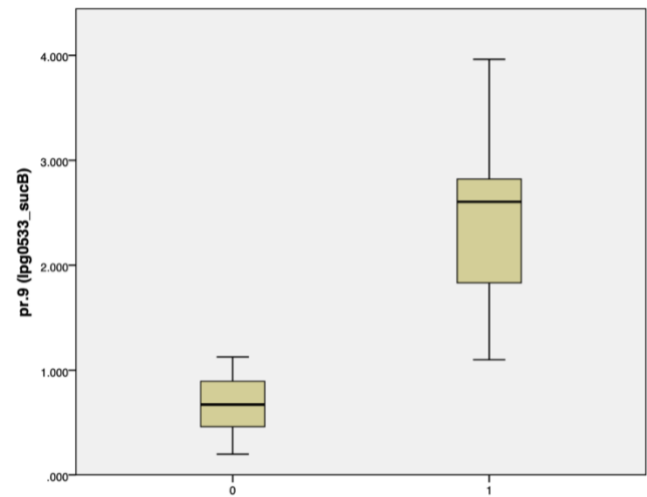
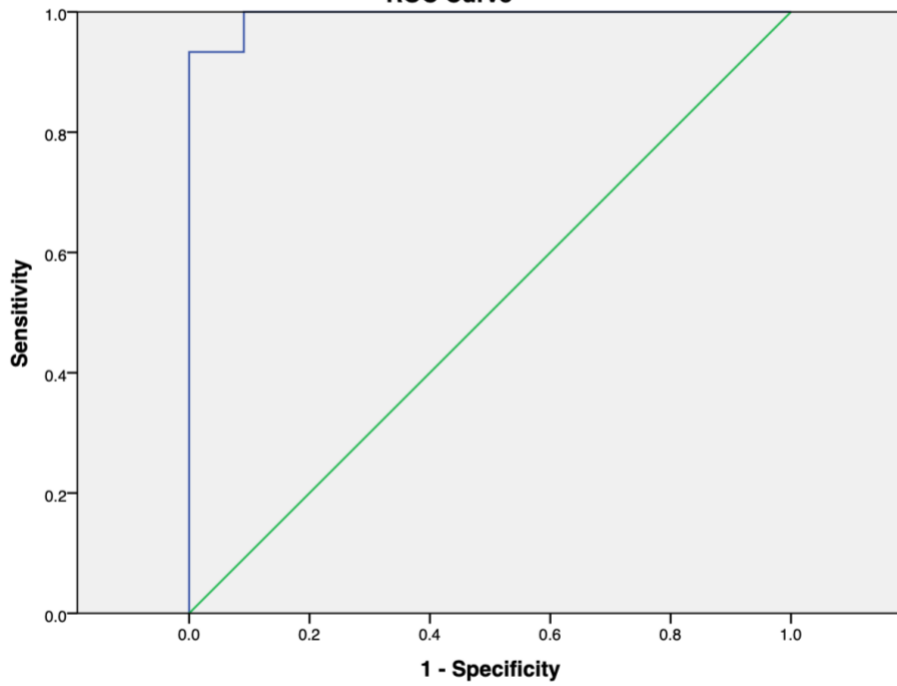
ROC Curve



ROC Curve



ROC Curve



Γ. Φάσματα NMR μετά από ανάλυση με ChenomX NMR Suite

