

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Απομόνωση και πρωτεομική ανάλυση
χλωροσωμάτων του *Chlorobaculum tepidum***

Σπάχο Ντανιέλα

Υπεύθυνος καθηγητής: Τσιώτης Γεώργιος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2021

Περίληψη

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται την ανάπτυξη του πράσινου θειούχου βακτηρίου *Chlorobaculum tepidum*. Το *Chlorobaculum tepidum* αποτελεί ένα υποχρεωτικά αναερόβιο, θερμόφιλο βακτήριο που χρησιμοποιεί ανηγμένες ενώσεις θείου, όπως τα σουλφίδια και τα θειοθειικά ως ηλεκτρονιοδότες κατά την φωτοσύνθεση. Οι ενώσεις αυτές οξειδώνονται σε θειικά με ενδιάμεσο στάδιο την παραγωγή σφαιριδίων στοιχειακού θείου που αποθηκεύονται εξωκυττάρια. Τα σφαιρίδια αυτά παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. Για την μελέτη της ανάπτυξης του βακτηρίου ποσοτικοποιήθηκε η βακτηριοχλωροφύλλη *c* και το στοιχειακό θείο με φασματοφωτομετρία ορατού – υπεριώδους. Στη συνέχεια, απομονώθηκαν τα χλωροσώματα που αποτελούν την φωτοσυνθετική κεραία του βακτηρίου με διαβάθμιση ζάχαρης για τον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού τους περιεχομένου με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου και φασματομετρία μάζας. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η πρωτεομική ανάλυση.

Λέξεις κλειδιά: *Chlorobaculum tepidum*, πράσινα θειούχα βακτήρια, χλωροσώματα, αναερόβια φωτοσύνθεση, πρωτεομική ανάλυση

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	5
1.1 Η φωτοσύνθεση	5
1.2 Η οικογένεια <i>Chlorobiaceae</i>	6
1.3 Το <i>Chlorobaculum tepidum</i>	7
1.4 Τα χλωροσώματα	7
1.5 Η φωτοσύνθεση στο <i>C.tepidum</i>	9
1.6 Ο μεταβολισμός του θείου	10
1.7 Στόχος της εργασίας	11
2. Υλικά και Μέθοδοι	11
2.1 Ανάπτυξη και συλλογή κυττάρων <i>C. tepidum</i>	11
2.2 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους – ορατού (UV-Vis)	13
2.3 Μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου <i>C. Tepidum</i>	13
2.4 Απομόνωση στοιχειακού θείου	13
2.5 Απομόνωση χλωροσωμάτων	14
2.6 Μέθοδος Bradford.....	14
2.7 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	15
2.8 Χρώση αργύρου (Silver staining)	17
2.9 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών	17
2.10 Φασματομετρία μάζας	18
2.11 Πρωτεομική ανάλυση.....	19
2.12 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)	19
2.13 Φασματοσκοπία διασποράς ενέργειας ακτίνων X (Energy Dispersive Spectroscopy, EDS)	20
2.14 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM).....	20
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	21
3.1 Μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου <i>C. tepidum</i>	21
3.2 Απομόνωση στοιχειακού θείου	22
3.3 Απομόνωση χλωροσωμάτων.....	24
3.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM).....	28
3.5 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	29
3.6 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών και MALDI – TOF.....	29
3.7 Πρωτεομική ανάλυση.....	30
4. Συμπεράσματα	33
5. Μελλοντικοί στόχοι	33
6. Βιβλιογραφία	34

Συντομογραφίες

LH Light – harvesting

RC Reaction Center

CS Charge Separation

PS Photosystem

GSB Green Sulfur Bacteria

FMO Fenna-Matthews-Olson

BChl Bacteriochlorophyll

Fd Ferredoxin

NAD(P)⁺ Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

ATP Adenosine Triphosphate

FAD Flavin Adenine Dinucleotide

SQR Sulfide: Quinone Oxidoreductase

Dsr Dissimilatory Sulfite Reductase

AMP Adenosine Monophosphate

SEM Scanning Electron Microscopy

EDS Energy Dispersive Spectroscopy

BSA Bovine Serum Albumin

APS Ammonium Persulfate

TEMED Tetramethylethylenediamine

SDS – PAGE Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis

LC Liquid Chromatography

ESI Electrospray Ionization

MS Mass Spectrometry

MALDI Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization

PMF Peptide Mass Fingerprinting

PI Post – incubation

PSM Peptide Spectrum Match

MW Molecular Weight

TOF Time of Flight

TEM Transmission Electron Microscopy

1.2 Η οικογένεια *Chlorobiaceae*

Η οικογένεια *Chlorobiaceae* χρησιμοποιεί ανηγμένες ενώσεις θείου ή μοριακό υδρογόνο ως ηλεκτρονιοδότες. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό είναι η παρουσία σφαιριδίων στοιχειακού θείου που αποθηκεύονται εξωκυττάρια. Τα βακτήρια της οικογένειας αυτής είναι ακίνητα, αρνητικά κατά Gram με σχήμα σφαιρικό, ωοειδές ή ραβδοειδές. Όλα τα είδη περιέχουν κάποια ειδικά συμπλέγματα LH στο εσωτερικό του κυττάρου επί της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που ονομάζονται χλωροσώματα. Τα συμπλέγματα αυτά περιέχουν συγκεκριμένες βακτηριοχλωροφύλλες για την οικογένεια και ειδικότερα βακτηριοχλωροφύλλη c ή d στα πράσινα είδη και e στα καφέ είδη. Το μέγεθος των συμπλεγμάτων αυτών είναι πολύ μεγαλύτερο από της οικογένειας *Chromatiaceae*, γεγονός που επιτρέπει την ανάπτυξη των μελών της οικογένειας *Chlorobiaceae* σε ένταση φωτός 25-80 lux [4].

Όλα τα είδη της οικογένειας *Chlorobiaceae* που έχουν ανακαλυφθεί ζουν σε υδατικά περιβάλλοντα και η πλειοψηφία τους είναι μεσόφιλα. Τα πιο συνηθισμένα περιβάλλοντα περιλαμβάνουν λίμνες γλυκού νερού, λιμνοθάλασσες, φιόρδ, ιζήματα θαλασσών και λιμανιών. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί το *Chlorobaculum (C.) tepidum*, ένα θερμοφίλο είδος που απομονώθηκε από θειούχες πηγές και είναι ικανό να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 45-55°C [4].

Τα χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση των βακτηρίων περιλαμβάνουν την μορφολογία του κυττάρου, την σύσταση των χρωστικών, το φάσμα απορρόφησης και ορισμένες μεταβολικές ιδιότητες. Αυτές οι ιδιότητες κυρίως ήταν:

- η σύσταση σε καροτενοειδή και βακτηριοχλωροφύλλες για την διαίρεση σε πράσινα και καφέ
- η ικανότητα σχηματισμού κυστιδίων για τη διάκριση μεταξύ γενών
- η ικανότητα χρήσης θειοθειικών ως ηλεκτρονιοδότες στη φωτοσύνθεση για τη διάκριση υποειδών

Μία μελέτη διαίρεσε την οικογένεια *Chlorobiaceae* φυλογενετικά σε πέντε ομάδες με βάση την αλληλουχία του 16S rDNA, ενώ η συστηματική ταξινόμηση βασίζεται κυρίως σε αναγνωρίσιμα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με την οικογένεια *Chlorobiaceae* να κατατάσσεται όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [4]:

Τομέας: Βακτήρια
Φύλο: *Chlorobi*
Κλάση: *Chlorobia*
Τάξη: *Chlorobiales*
Οικογένεια: *Chlorobiaceae*

Εικόνα 1.2.1: Η συστηματική κατάταξη

1.3 Το *Chlorobaculum tepidum*

Το *C. tepidum* είναι ένα υποχρεωτικά αναερόβιο θερμοφίλο πράσινο θειούχο βακτήριο του γένους *Chlorobaculum* που απομονώθηκε από ορισμένες θερμές πηγές της Νέας Ζηλανδίας. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 47-48°C, ενώ το ανώτατο όριο ανάπτυξης 52 °C [5].

Ως αρνητικό κατά Gram βακτήριο, διαθέτει μία εξωτερική μεμβράνη και μία εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη [6]. Το γονιδίωμα του αποτελείται από μόνο ένα κυκλικό χρωμόσωμα με μέγεθος 2.154.946bp που κωδικοποιεί περίπου 2288 πρωτεΐνες [15].

Complete genome size, bp	2,154,946
Total no. of sequences	36,670
G + C percent	56.5
Total no. of CDS	2,288
Average CDS size, bp	837
Percent coding	88.9
No. of rRNA operons (16S-23S-5S)	2
No. of tRNA genes	50
No. of sRNA genes	2
Proteins similar to proteins of known function and role category	1,217
Proteins similar to proteins of known function but unknown role category	98
Conserved hypothetical proteins	293
Hypothetical proteins	680

Εικόνα 1.3.1: Γενικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος [15]

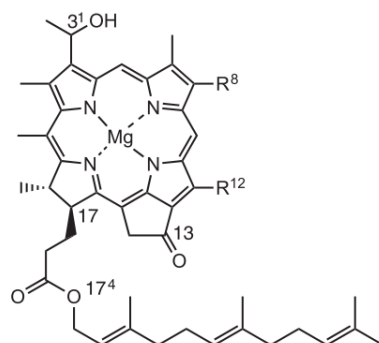
Για την καθήλωση του CO₂ το βακτήριο χρησιμοποιεί έναν αντίστροφο (αναγωγικό) κύκλο κιτρικού οξέος. Στη διαδικασία αυτή, όλα εκτός από τρία βήματα καταλύονται αντίστροφα από τα ίδια ένζυμα του ευθύ (οξειδωτικού) κύκλου κιτρικού οξέος. Τα δύο βήματα καταλύονται από την συνθάση του πυροσταφυλικού και την συνθάση του 2 – οξογλουταρικού που αποτελούν ένζυμα εξαρτώμενα από τη φερρεδοξίνη. Το τρίτο βήμα καταλύεται από την κιτρική λυάση, ένα εξαρτώμενο από ATP ένζυμο που συνίσταται από δύο πολυπεπίδια και καταλύει την μετατροπή του κιτρικού σε ακετυλο-CoA και οξαλοξικό. Η απορρόφηση του CO₂ στα ανώτερα φυτά, τα φύκη και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια βασίζεται στην RubisCO (ribulose-1,5-bis-phosphate carboxylase). Το *C.tepidum* κωδικοποιεί ένα ορθόλογο γονίδιο της μεγάλης υπομονάδας της RubisCO (RbcL), ενώ δεν έχει ανιχνευθεί η μικρή υπομονάδα [15].

1.4 Τα χλωροσώματα

Τα χλωροσώματα, οι μεγαλύτερες φωτοσυνθετικές κεραίες, είναι επιμήκεις δομές προσκολλημένες στο κυτταροπλασματικό μέρος της εσωτερικής κυτταρικής μεμβράνης [7]. Εμφανίζονται σε μέλη τριών βακτηριακών φύλων: *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria* και το μέγεθος των χλωροσωμάτων ποικίλλει ανάλογα με το είδος. Ακόμη, το μέγεθος αυξάνεται κατά την ανάπτυξη των χλωροσωμάτων και μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης, όπως η ένταση του φωτός [7,8].

Ένα χλωρόσωμα του *C. tepidum* εκτιμάται ότι περιέχει 200000-250000 BChl c, 2500 BChl a, 20000 καρροτενοειδή, 18000 κινόνες και 5000 πρωτεΐνες, δεσμευμένα από μία μονοστοιβάδα 20000 λιπιδίων [7]. Έχει μήκος 100-180nm, πλάτος 40-60nm και ύψος 10-20nm [9]. Το μέγεθος του χλωροσώματος σε συνδυασμό με την πολύ υψηλή συγκέντρωση χρωστικής είναι προφανώς απαραίτητα για την αποδοτική συγκέντρωση φωτονίων σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτός [2]. Τα 250000 μόρια BChl c συλλέγουν φωτεινή ενέργεια για περίπου 25 RC [10].

Οι χρωστικές δημιουργούν αυτοσυναρμολογούμενα συσσωματώματα χωρίς την βοήθεια πρωτεϊνών με δομές ραβδοειδείς, φυλλοειδείς ή ελικοειδείς. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του 3¹-hydroxy, της 13-καρβοξυλομάδας και του κεντρικού μαγνησίου είναι απαραίτητες για την αυτοσυναρμολόγηση των BChl c στα χλωροσώματα. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals ανάμεσα στις εστεροποιημένες αλυσίδες των BChl c θα μπορούσαν να είναι σημαντικές [13].



Εικόνα 1.4.1.: Η μοριακή δομή της BChl c [13]

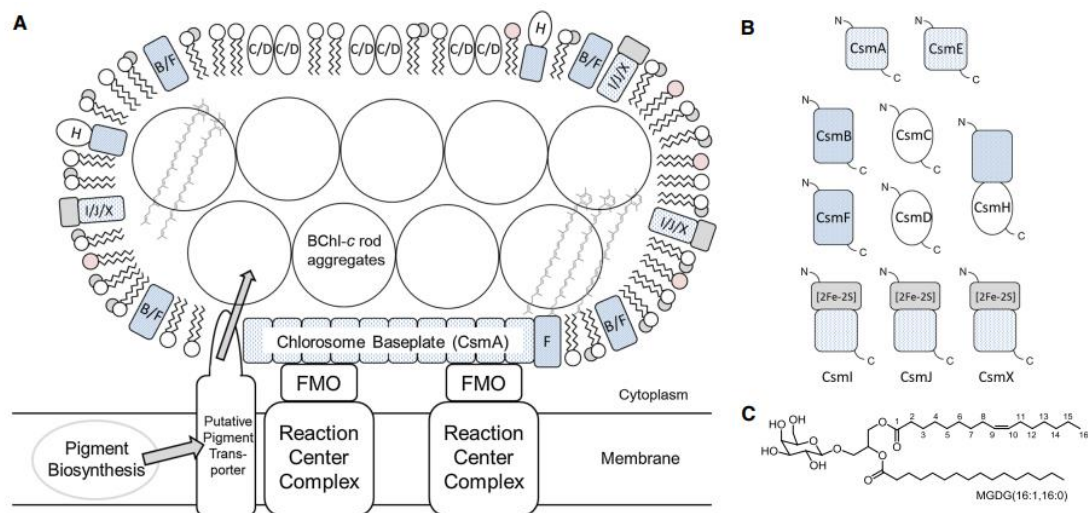
Το χλωροσωμικό περίβλημα του *C. tepidum* είναι μία ασύμμετρη μονοστοιβάδα γλυκολιπιδίων που περιέχει δέκα πρωτεΐνες: CsmA, CsmB, CsmC, CsmD, CsmE, CsmF, CsmH, CsmI, CsmJ, και CsmX [10]. Οι πρωτεΐνες αυτές κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις ομάδες: CsmA/E, CsmB/F/H, CsmC/D/H και CsmI/J/X [11].

protein	mass (kDa)
CsmA	6.2
pre-CsmA	8.3
CsmB	7.5
CsmC	14.3
CsmD	11.1
CsmE	7.5
CsmF	7.7
CsmH	21.8
CsmI	25.9
CsmJ	23.9
CsmX	24.0

Εικόνα 1.4.2: Μοριακά βάρη χλωροσωμικών πρωτεϊνών [14]

Η CsmA είναι η μοναδική πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για την δομή και ακεραιότητα του χλωροσώματος, καθώς και την βιωσιμότητα του κυττάρου [8]. Οι CsmI, CsmJ και CsmX είναι πρωτεΐνες σιδήρου – θείου και μεταφέρουν ηλεκτρόνια προς και από τις κινόνες στα χλωροσώματα [11]. Οι ομάδες CsmC/D και CsmB/F καθορίζουν το μέγεθος και σχήμα των χλωροσωμάτων, καθώς και ενδεχομένως την οργάνωση των μορίων BChl c στο εσωτερικό. Η CsmH δημιουργείται από τον συνδυασμό της N-τερματικής περιοχής των CsmB/F και της C-τερματικής περιοχής των CsmC/D και απαντάται ως διμερές στα χλωροσώματα [8]. Οι CsmI, CsmJ, και CsmX φέρουν μία περιοχή στο N-τερματικό άκρο που μοιάζει με την αδρενοδοξίνη και συναρμολογείται με μία συστάδα [2Fe-2S] και ενδεχομένως να ελέγχουν την μεταφορά της ενέργειας διέγερσης από τα χλωροσώματα στο RC [10].

Η εξωτερική μεμβράνη του χλωροσώματος συνίσταται από γλυκολιπίδια. Η μονογαλακτοσυλοδιακυλογλυκερόλη αποτελεί το κύριο συστατικό όλων των χλωροσωμάτων και δημιουργεί μία μονοστιβάδα με πάχος περίπου 10Å [9].



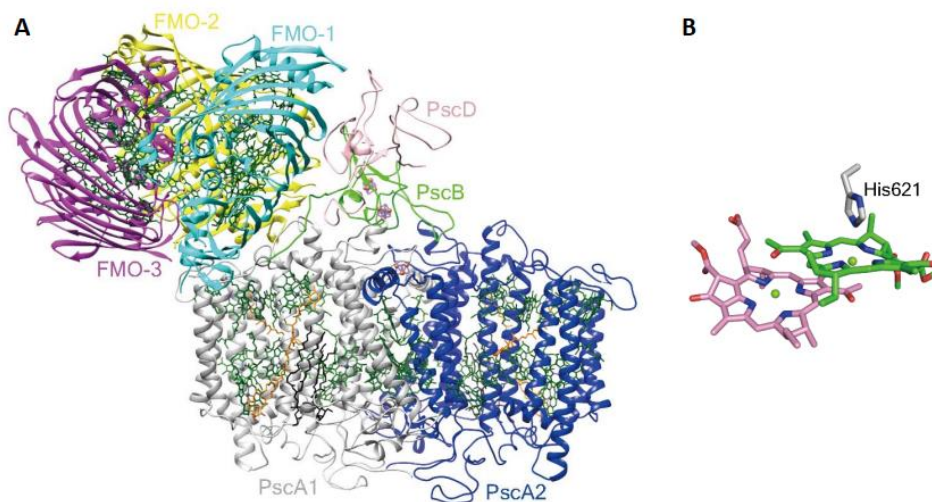
Εικόνα 1.4.3: Η δομή του χλωροσώματος (A), οι ομάδες των χλωροσωμικών πρωτεϊνών (B) και η δομή της μονογαλακτοσυλοδιακυλογλυκερόλης (C) [11]

1.5 Η φωτοσύνθεση στο *C. tepidum*

Το φωτοσυνθετικό σύστημα των πράσινων θειούχων βακτηρίων αποτελείται από τρία μέρη: ένα χλωρόσωμα που συλλέγει φως, έναν διαλυτό ενεργειακό πομπό FMO (Fenna-Matthews-Olson protein) και ένα RCI ενσωματωμένο στη μεμβράνη [11].

Η βάση του χλωροσώματος (baseplate) συνίσταται από την CsmA που προσδένει την BChl a και μεταφέρει την ενέργεια διέγερσης από τα αυτοσυναρμολογούμενα συσσωματώματα χρωστικών BChl c, d ή e στο εσωτερικό των χλωροσωμάτων προς τις πρωτεΐνες FMO στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης [11]. Οι πρωτεΐνες FMO έχουν μοριακό βάρος περίπου 40kDa και απαντώνται ως ομοτριμερή που προσδένουν οκτώ μόρια BChl a [6,12].

Το RC του *C. tepidum* (*GsbRC*) περιλαμβάνει έξι υπομονάδες: ένα ομοδιμερές δύο κεντρικών υπομονάδων των 82kDa (PscA), μία Fe-S πρωτεΐνη των 24kDa (PscB), δύο κυτοχρωμικές πρωτεΐνες των 20kDa (PscC) και μία πρωτεΐνη των 17kDa (PscD). Κάθε *GsbRC* προσδένει 16 BChl a, συμπεριλαμβανομένου ενός ζεύγους BChl a' (το στερεοϊσομερές στη θέση 13² του δακτυλίου E της BChl a), τέσσερις Chls a και τέσσερα παράγωγα χλωροβακτανίου ή γ-καροτενίου. Το ζεύγος των BChl a' απορροφά ενέργεια στα 840nm και ορίζεται ως P₈₄₀. Συναρμόζεται από την His⁶²¹ από δύο PscAs. Δέχεται ενέργεια από το FMO και αποτελεί τον πρωταρχικό ηλεκτρονιοδότη στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων [12].



Εικόνα 1.5.1: Δομή του συμπλέγματος FMO-GsbRC (A) και του P₈₄₀ (B) [12]

Έτσι, η ενέργεια διέγερσης που απορροφούν οι BChl c και τα καροτενοειδή μεταφέρεται σε χρωστικές με σταδιακά μικρότερα ενεργειακά επίπεδα: στη BChl a που σχετίζεται με την CsmA στη βάση (795nm), στη BChl a που σχετίζεται με το FMO (810nm) και στις βακτηριοχλωροφύλλες που σχετίζονται με το RCI (820-840nm) [10].

1.6 Ο μεταβολισμός του θείου

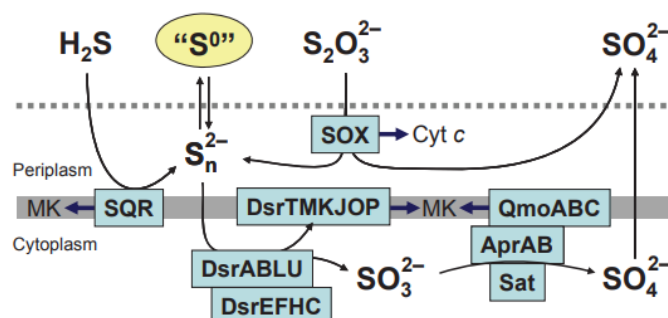
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το *C. tepidum* χρησιμοποιεί ανηγμένες ενώσεις θείου, όπως σουλφίδια και θειοθειικά ως ηλεκτρονιοδότες. Από την οξείδωση των ενώσεων αυτών σε θειικά υπό αναερόβιες συνθήκες, σχηματίζονται εξωκυττάρια σφαιρίδια στοιχειακού θείου, τα οποία καταναλώνονται από το βακτήριο μόνο όταν εξαντληθούν οι πρώτες. Τα ηλεκτρόνια από την οξείδωση του θείου περνάνε στην φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που τελικά ανάγει την φερρεδοξίνη (Fd). Η ανηγμένη Fd χρησιμοποιείται για την καθήλωση του CO₂ ή την αναγωγή του NAD(P)⁺ μέσω μίας οξειδοαναγωγής. Η βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων που παράγεται κατά την μεταφορά των ηλεκτρονίων της οξείδωσης του θείου χρησιμοποιείται στην σύνθεση ATP και την μεταφορά άλλων θρεπτικών συστατικών μέσα στο κύτταρο [17].

Υπάρχουν δύο γνωστά μεταβολικά μονοπάτια για την οξείδωση των θειοθειικών (S₂O₃²⁻). Το πρώτο είναι η οξείδωση σε τετραθειονικό μέσω της θειοθειικής αφυδρογονάσης σε μερικά μωβ θειούχα βακτήρια με τη παραγωγή του τετραθειονικού να είναι μεγαλύτερη σε ήπια όξινο περιβάλλον αφού το βέλτιστο pH για το ένζυμο ισούται με 4,25. Το δεύτερο είναι η οξείδωση σε θειικά με το πολυενζυμικό σύστημα Sox, του οποίου η ομάδα γονιδίων είναι η soxJXYZAKBW με τα γονίδια soxBXA και soxYZ να είναι απαραίτητα [18].

Η οξείδωση των σουλφιδίων σε στοιχειακό θείο πραγματοποιείται μέσω δύο κύριων μεταβολικών μονοπατιών. Το πρώτο είναι μέσω του φλαβοκυτοχρώματος c, μία περιπλασματική πρωτεΐνη που συνίσταται από δύο μονομερή: ένα μεγαλύτερο που προσδένει το FAD (υπομονάδα FccB) και ένα μικρότερο που προσδένει μία αίμη (υπομονάδα FccA). Το δεύτερο είναι μέσω του ενζύμου SQR (sulfide: quinone oxidoreductase) που χρησιμοποιεί την ισοπρενοειδής κινόνη ως ηλεκτρονιοδέκτη [4].

Το κύριο προϊόν της οξείδωσης των σουλφιδίων είναι τα πολυσουλφίδια. Όμως, η διαδικασία μετατροπής τους σε σφαιρίδια παραμένει άγνωστη. Το στοιχειακό θείο κυρίως αποτελείται από δακτύλιους S_8 και αλυσίδες πολυμερικού θείου, ενώ υπάρχουν και ίχνη δακτυλίων S_7 . Η οξείδωση των σφαιριδίων σε θειώδη πραγματοποιείται μέσω του συστήματος Dsr (dissimilatory sulfite reductase), του οποίου η ομάδα γονιδίων είναι η *sdrABEFHCKMLOPNRS* και τα δύο πρώτα γονίδια *dsrAB* κωδικοποιούν το ένζυμο αναγωγάση θειώδους με μία βιολογικά αντίστροφη λειτουργία [4,18].

Το τελευταίο στάδιο είναι η οξείδωση των θειωδών σε θειικά με δύο γνωστές διαδικασίες. Η πρώτη αποτελεί άμεση οξείδωση μέσω της αφυδρογονάσης θειώδους, ενώ η δεύτερη μέθοδος είναι η έμμεση οξείδωση εξαρτώμενη από το AMP μέσω του APS (adenosine-5'-phosphosulfate) [4].



Εικόνα 1.6.1: Τα μεταβολικά μονοπάτια και ένζυμα στην οξείδωση του θείου [27]

1.7 Στόχος της εργασίας

Στόχος της εργασίας αυτής αποτελεί η απομόνωση των χλωροσωμάτων και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που περιέχονται σε αυτά του βακτηρίου *C. tepidum*. Αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης των χλωροσωμάτων και επιδιώχθηκε ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με διάφορες αναλυτικές μεθόδους. Επίσης, μέσω της πρωτεομικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των χλωροσωμικών πρωτεϊνών.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Ανάπτυξη και συλλογή κυττάρων *C. tepidum*

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υλικό το PF₇ [5]. Για την παρασκευή 1L χρησιμοποιούνται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Πίνακας 2.1.1: Αντιδραστήρια και οι αντίστοιχες ποσότητες τους για το θρεπτικό υλικό PF₇

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
KH ₂ PO ₄	0,5gr
CH ₃ COONH ₄	0,5gr
NH ₄ Cl	0,4gr
NaCl	0,4gr
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2gr
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05gr
EDTA	0,0125gr
NaHCO ₃	2,0gr
Μείγμα ιχνοστοιχείων	1ml
Βιταμίνη B ₁₂ (20mg/L)	2ml
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	2gr

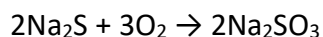
Για την παρασκευή 1L μείγματος ιχνοστοιχείων χρησιμοποιούνται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Πίνακας 2.1.2: Αντιδραστήρια και οι αντίστοιχες ποσότητες τους για το μείγμα ιχνοστοιχείων

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
EDTA	0,67gr
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,2gr
CoCl ₂ ·6H ₂ O	19mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	19mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	15mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10mg
VSO ₄ ·2H ₂ O	3mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	2,5mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1,7mg
H ₃ BO ₃	0,6mg
NaWO ₄ ·2H ₂ O	0,2mg
Na ₂ HSeO ₃	0,2mg
NaOH	pH=8

Αρχικά, τα αντιδραστήρια του πίνακα 2.1.1 διαλύονται πλήρως σε 800ml απιονισμένου νερού με συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα χωρίζεται σε δύο φιάλες των 500ml, οι οποίες τοποθετούνται για αποστείρωση στον κλίβανο στους 120°C για 20min. Μετά την επαναφορά των διαλυμάτων σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί η απαέρωση τους με τη διαβίβαση αερίου CO₂ μέσω ενός σιφωνίου και την κάλυψη του στόμιου της φιάλης με parafilm μέχρι να γίνουν διαυγή. Το parafilm χρησιμοποιείται για την αποφυγή εισχώρησης ατμοσφαιρικού οξυγόνου και κάθε φιάλη σφραγίζεται με ειδικό καπάκι με μονωτικό υλικό. Στη συνέχεια, προστίθεται και η δεύτερη πηγή θείου Na₂S με συγκέντρωση 7,7mM (διάλυση 0,6gr σε 5ml απιονισμένου νερού και προσθήκη 2ml διαλύματος σε 400ml καλλιέργειας) μέσω της προσαρμογή πορώδους φίλτρου 0,2μm (GE HealthCare, Life Sciences, Whatman™, Disposable Filter Device, 0,2μm polyethersulfone membrane) στη σύριγγα.

Ακολουθεί η ρύθμιση του pH σε 6,9 που αποτελεί τη βέλτιστη τιμή ανάπτυξης του βακτηρίου με τη χρήση αποστειρωμένων διαλυμάτων 10% w/v H₂SO₄ και 4M KOH. Τέλος, προστίθονται 20ml προκαλλιέργειας και οι φιάλες τοποθετούνται στο σκοτάδι overnight, ώστε το περισσευούμενο οξυγόνο να καταναλωθεί από το Na₂S σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Όλες οι σύριγγες που χρησιμοποιούνται μετά το σφράγισμα των φιαλών είναι αποστειρωμένες. Την επόμενη μέρα η καλλιέργεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 47-49°C υπό πλήρη φωτισμό κατά την διάρκεια της νύχτας. Η ανάπτυξη των βακτηρίων διαπιστώνεται με την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από ανοιχτό σε σκούρο πράσινο. Η φιάλη απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και φυλάσσεται στους 4°C. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 6000g για 20min και φυλάσσονται στους -20°C για περαιτέρω επεξεργασία [5].

2.2 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους – ορατού (UV-Vis)

Η μέθοδος βασίζεται στον νόμο Beer – Lambert, σύμφωνα με τον οποίο, η ένταση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από ένα δείγμα σχετίζεται με την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας εκθετικά. Η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από την οπτική διαδρομή d , την συγκέντρωση της ουσίας C και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που αποδίδεται με τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης ε :

$$I = I_0 \cdot 10^{-dC\varepsilon} \Rightarrow \frac{I}{I_0} = 10^{-dC\varepsilon}$$

Το πηλίκο I/I_0 ονομάζεται διαπερατότητα T και λαμβάνει τιμές από 1 έως 0. Με λογαρίθμηση της παραπάνω σχέσης προκύπτει:

$$-\log T = dC\varepsilon$$

Η παράσταση $-\log T$ αποτελεί την απορρόφηση A και προκύπτει η μαθηματική διατύπωση του νόμου [19]:

$$A = dC\varepsilon$$

Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις της απορρόφησης των δειγμάτων είναι ένα Multiskan Sky Microplate και οι κυψελίδες που χρησιμοποιούνται για την περιοχή του υπεριώδους είναι από χαλαζία.

2.3 Μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου *C. Tepidum*

Για την μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου, πραγματοποιείται μία φυγοκέντρηση 1ml καλλιέργειας που λαμβάνεται κάθε δύο ώρες σε 13000g για 10min. Το ίζημα που προκύπτει περιέχει τα κύτταρα και το στοιχειακό θείο και εκχυλίζεται με 1ml μεθανόλης 99,9%. Ακολουθεί μία φυγοκέντρηση σε 13000g για 10min και η μέτρηση της απορρόφησης του υπερκειμένου με φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) στα 669nm και στα 265nm για την ποσοτικοποίηση της BChl c ($\varepsilon_{669} = 86 \frac{L}{cm \cdot mol}$) και του στοιχειακού θείου ($\varepsilon_{265} = 24 \frac{L}{cm \cdot mol}$) αντίστοιχα [20].

2.4 Απομόνωση στοιχειακού θείου

Για την απομόνωση του στοιχειακού θείου πραγματοποιείται μία φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε 6000g για 20min και το ίζημα που προκύπτει ομοιογενοποιείται σε 1ml υπερκειμένου. Το δείγμα επιστοιβάζεται σε περίπου 10-15ml διαλύματος ζάχαρης 2M και φυγοκεντρείται σε 4000g για 10min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο με τρεις φορές μέχρι την εξαφάνιση του πράσινου χρώματος. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα Tris-H₂SO₄ και φυγοκεντρείται σε 13000g για 5min. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, προστίθεται 1ml διαλύματος Tris-H₂SO₄ και το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C [17]. Τέλος, για την παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης με το μοντέλο JEOL-JSM-6390 LV στα 20kV και 1000-5000x μεγέθυνση, τα δείγματα τοποθετούνται πάνω σε γυάλινο πλακίδιο και χρησιμοποιείται ταινία άνθρακα για την συγκόλλησή τους.

2.5 Απομόνωση χλωροσωμάτων

Για την απομόνωση των χλωροσωμάτων, προστίθονται 15ml isolation buffer του οποίου η σύσταση αναγράφεται παρακάτω και 0,01gr λυσοζύμης σε 2gr κυττάρων.

Isolation buffer:

- 10mM Tris-HCl (pH=7,5)
- 2M NaSCN
- 5mM EDTA
- 1mM PMSF
- 2mM DDT

Συμπληρώνουμε μέχρι τα 20ml και ακολουθεί το σπάσιμο των κυττάρων με French Press (124MPa, 4°C) τέσσερις φορές, αλλά και μέσω υπερήχων με τη βοήθεια της βελόνας για 10min (15sec λειτουργία βελόνας, 45sec αδράνεια). Το ομοιογενοποιημένο διάλυμα φυγοκεντρείται σε 12000rpm για 20min με τον ρότορα SS34. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται ξανά σε 35000rpm για 1h με τον ρότορα TFT5038 για την συλλογή των μεμβρανών. Το ίζημα που προκύπτει επαναιωρείται σε 6ml 20mM HEPES / 150mM NaCl (pH=8). Στη συνέχεια, παρασκευάζονται διαλύματα ζάχαρης διαφορετικών συγκεντρώσεων σε HEPES 20mM για τη διαβάθμιση ζάχαρης με τη σύσταση κάθε φιαλιδίου να είναι η εξής:

Πίνακας 2.5.1: Σύσταση φιαλιδίων για τη διαβάθμιση ζάχαρης

% w/v	70	60	50	40	20
ml	1	1	2	2,5	2,5

Η προσθήκη των διαλυμάτων ζάχαρης είναι μη συνεχής (step gradient) με πρώτο το πιο πυκνό και τελευταίο το πιο αραιό. Σε κάθε σωλήνα προστίθεται 1,5ml δείγματος πάνω από τη διαβάθμιση ζάχαρης. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 35000rpm για 18h στους 4°C με τον ρότορα TH641 - Swing Out. Συλλέγεται η πράσινη λωρίδα από κάθε σωλήνα και αραιώνεται (4X) με HEPES 20mM/ NaCl 150mM (pH=8). Τα δείγματα φυγοκεντρούνται ξανά σε 35000rpm για 1h με τον ρότορα TFT5038. Το ίζημα επαναιωρείται σε 1ml HEPES 20mM/ NaCl 150mM (pH=8) και αποθηκεύεται στους -20°C [14].

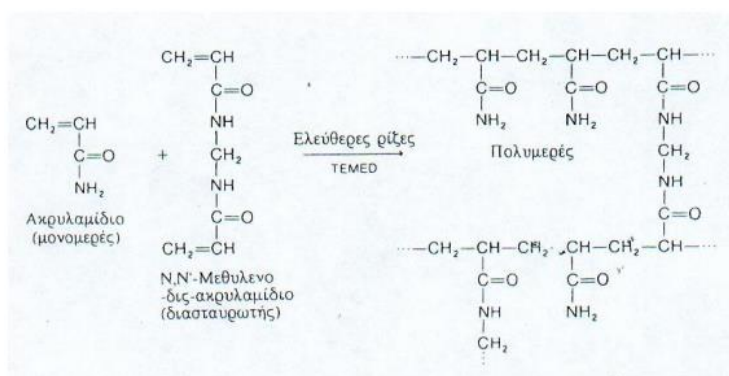
2.6 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα με τη βοήθεια της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Η χρωστική αυτή φέρει αρνητικό φορτίο και αλληλεπιδρά με τα θετικά φορτία των πρωτεϊνών σε όξινες συνθήκες. Στην ελεύθερη μορφή της εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 465nm, ενώ το σύμπλοκο της με τις πρωτεΐνες εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 595nm και μπλε χρώμα. Για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής, απαιτείται η κατασκευή μίας πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του άγνωστου δείγματος. Παρασκευάζονται διαλύματα της πρότυπης πρωτεΐνης BSA με διαφορετικές αλλά γνωστές συγκεντρώσεις και μετρείται η απορρόφηση του καθενός στα 595nm [22].

2.7 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία αναλυτική μέθοδο για την εξέταση της κίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε ρυθμιστικά διαλύματα μέσα σε μία μήτρη πηκτής. Η κίνηση των μορίων εξαρτάται από το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται, το μέγεθος των πόρων της πηκτής, το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο και τη χημική σύσταση των μορίων που διαχωρίζονται [23].

Οι πηκτές που δημιουργούνται με τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου έχουν αρκετά πλεονεκτήματα που περιλαμβάνουν την υψηλή διακριτική ικανότητα, την ικανότητα διαχωρισμού μεγάλης ποσότητας δειγμάτων, την αμελητέα αλληλεπίδραση των μορίων με τη πηκτή και την φυσική τους σταθερότητα. Κατά την παρασκευή τους πολυμερίζεται το ακρυλαμίδιο μέσω παραγωγής ελεύθερων ριζών με τον παράγοντα δημιουργίας διασταυρώσεων N,N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο στον κενό χώρο μεταξύ δύο ορθογώνιων τζαμιών. Προστίθεται μία ουσία που προκαλεί την δημιουργία ελεύθερων ριζών, όπως το υπερθειικό αμμώνιο (APS) μαζί με τον καταλύτη της διάδοσης των ελεύθερων ριζών στο σύστημα N,N-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED). Το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από την αναλογία ακρυλαμιδίου/ δισ-ακρυλαμιδίου, αλλά και την ποσότητα του μείγματος αυτού [23].



Εικόνα 2.7.1: Σχηματισμός πηκτών πολυακρυλαμιδίου [23]

Παρουσία ενός ανιονικού απορρυπαντικού, όπως το δωδεκυλοθειικό νάτριο SDS και ενός παράγοντα αναγωγής δισουλφιδικών δεσμών, όπως η μερκαπτοαιθανόλη είναι δυνατός ο διαχωρισμός και ο χαρακτηρισμός του αριθμού και του μεγέθους των πρωτεϊνών ή των υπομονάδων τους. Η περίσσεια της μερκαπτοαιθανόλης ανάγει όλους τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και SDS προσδένεται σε αυτές τις περιοχές, αποκαλύπτοντας τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις [23]. Για την εμφάνιση της πηκτής, χρησιμοποιείται μία χρωστική, όπως η Coomassie Brilliant Blue R-250 που σχηματίζει ένα σύμπλοκο μπλε χρώματος με τις πρωτεΐνες σε όζινες συνθήκες.

Η σύσταση όλων των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου είναι:

Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών (low range biorad):

- Phosphorylase b (97400Da)
- Serum albumin (66200Da)
- Ovalbumin (45000Da)
- Carbonic anhydrase (31000Da)
- Trypsin inhibitor (21500Da)
- Lysozyme (14400Da)

Sample buffer:

- 12% w/v SDS
- 10% w/v Glycerol
- 6% w/v Mercaptoethanol
- 0,05% w/v Serva Blue G
- 150mM Tris-HCl, pH=7

ABmix

- 48% w/v Acrylamide
- 1,5% w/v Bis-acrylamide

Anode buffer pH=8,9 (10x):

- 1M Tris

Cathode buffer pH= 8,25 (10x):

- 1M Tris
- 1M Tricine
- 1% w/v SDS

Gel buffer pH=8,45 (3x):

- 3M Tris
- 0,3% w/v SDS

Stacking gel 4%:

- 1ml ABmixS
- 4ml gel buffer (3x)
- νερό σε τελικό όγκο 12ml
- 90μl APS
- 9μl TEMED

Separating gel 16,5%:

- 3gr glycerol
- 10ml ABmixS
- 10ml gel buffer (3x)
- νερό σε τελικό όγκο 30ml
- 100μl APS
- 10μl TEMED

Διάλυμα χρώσης:

- 0,12% w/v Coomassie Brilliant Blue G-250
- 10% w/v Ammonium Sulphate
- 10% w/v Phosphoric Acid
- 20% v/v Methanol

Διάλυμα αποχρωματισμού:

- 5% v/v Methanol
- 7% v/v Acetic Acid

Σε 15μl δείγματος προστίθονται 5μl sample buffer και τα δείγματα τοποθετούνται για 5min στους 90°C. Στη συνέχεια, φορτώνονται στα πηγαδάκια της πηκτής, εφαρμόζεται τάση 200V και όταν η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος σβήνουμε το τροφοδοτικό.

2.8 Χρώση αργύρου (Silver staining)

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε και η χρώση αργύρου, για την οποία παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα Α (pH=6):

- 0,4M $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$
- 30% v/v EtOH
- 0,5% w/v Γλουταραλδεΐδη
- 0,1% w/v Sodium thiosulfate

Διάλυμα Β:

- 0,1% w/v $AgNO_3$
- 0,025% v/v Φορμαλδεΐδη

Διάλυμα Γ:

- 2,5% w/v Na_2CO_3
- 0,04% v/v Φορμαλδεΐδη

Για την χρώση αργύρου, η πηκτή επωάζεται σε 100ml διαλύματος Α για 30min. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με υπερκάθαρο νερό (nanopure) για 10min η κάθε μία. Στη συνέχεια, η πηκτή επωάζεται σε 100ml διαλύματος Β για 40min και αφήνεται στο σκοτάδι. Η πηκτή εμφανίζεται με 100ml διαλύματος Γ και η αντίδραση τερματίζεται με διάλυμα CH_3COOH 5% v/v για 5min. Η πηκτή φυλάσσεται σε διάφανη μεμβράνη με CH_3COOH 1% v/v στους 4°C.

2.9 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών

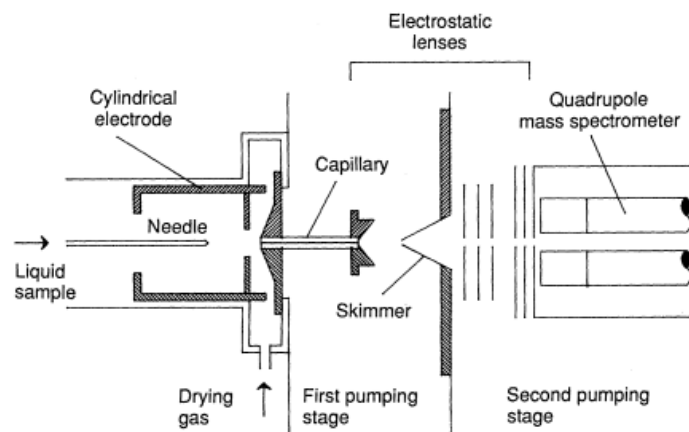
Το πρώτο βήμα για την θρυψινοποίηση είναι η συλλογή του δείγματος με την αποκοπή των πρωτεϊνικών λωρίδων της πηκτής και τον τεμαχισμό τους σε μικρά κομμάτια. Για τον αποχρωματισμό τους χρησιμοποιούνται 100μl ACN 50% v/v (Acetonitrile) και ανάδευση για 30min. Μετά την αφαίρεση του ACN προστίθονται 100μl ABS (Ammonium Bisulfate) και τα δείγματα αναδεύονται για 30min. Μετά την αφαίρεση του ABS προστίθονται 100μl ACN 100% v/v και τα δείγματα αναδεύονται για άλλα 30min. Μετά την αφαίρεση του ACN ακολουθεί η αναγωγή των δειγμάτων με την προσθήκη 100μl DDT (1,4-dithiothreitol) 10mM (παρασκευή με διάλυση 15,4mg σε 10ml ABS 50mM) και η ανάδευση τους για 45min σε 56°C. Μετά την αφαίρεση του DTT προστίθονται 100μl ACN 100% v/v. Η αλκυλίωση πραγματοποιείται μετά την αφαίρεση του ACN με την προσθήκη 100μl IAA (iodoacetamide) 55mM (παρασκευή με διάλυση 101,7mg σε 10ml ABS 50mM) και την ανάδευση για 45min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, ακολουθεί η ίδια διαδικασία με τον αποχρωματισμό των λωρίδων για την πλύση των δειγμάτων με ACN 50%, ABS και ACN 100%. Μετά την αφαίρεση του ACN πραγματοποιείται η πέψη με την προσθήκη 40μl θρυψίνης και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C ολονύχτια. Για την έκλυση των πρωτεϊνών ενώνονται τα δύο υπερκείμενα που προκύπτουν από διαδοχικές πλύσεις των δειγμάτων με 50μl TFA (trifluoroacetic acid) σε ACN 50% v/v και μετά με ACN 100% v/v. Τέλος, το συνολικό διάλυμα τοποθετείται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα και τα πεπτίδια που προκύπτουν φυλάσσονται στους -20°C [16].

2.10 Φασματομετρία μάζας

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί μία αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό της μάζας μορίων μέσω του ιοντισμού τους στην αέρια φάση, την επιτάχυνση τους από ένα ηλεκτρικό πεδίο και τον διαχωρισμό τους με βάση τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Η διάταξη περιλαμβάνει ένα σύστημα εισαγωγής του δείγματος, μία πηγή ιοντισμού, τον αναλυτή μάζας και τον ανιχνευτή. Δύο συνηθισμένες ήπιες πηγές ιοντισμού είναι ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκάσμο (ESI) και ο ιοντισμός εκκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από μήτρα (MALDI). Οι αναλυτές μάζας διαχωρίζουν τα παραγόμενα ιόντα με βάση τον λόγο μάζας προς φορτίου και διακρίνονται σε μαγνητικού πεδίου και χρόνου πτήσεως. Τέλος, τα ιόντα συλλέγονται από τον ανιχνευτή που τα μετατρέπει σε ανάλογο ηλεκτρικό ρεύμα [31].

Ο ιοντισμός με MALDI χρησιμοποιείται για την μελέτη πολικών βιοπολυμερών, των οποίων το μοριακό βάρος κυμαίνεται από μερικές χιλιάδες έως εκατοντάδες χιλιάδες Dalton (Da). Μία μικρή ποσότητα αναλύτη διασπείρεται ομοιόμορφα σε μία στερεή ή υγρή μήτρα που απορροφά έντονα την ακτινοβολία λέιζερ και τοποθετείται πάνω σε μεταλλική πλάκα. Η πλάκα αυτή εισέρχεται σε έναν θάλαμο κενού και η δέσμη ενός παλμικού λέιζερ εστιάζεται πάνω στο δείγμα, προκαλώντας την εκκρόφηση των ιόντων [31]. Ο πιο συνηθισμένος αναλυτής μάζας που χρησιμοποιείται με MALDI είναι ο αναλυτής χρόνου πτήσεως (time of flight, TOF), στον οποίο τα ιόντα επιταχύνονται από την περιοχή ιοντισμού προς έναν ελεύθερο από πεδία σωλήνα. Τα ιόντα που εισέρχονται έχουν την ίδια κινητική ενέργεια και διαχωρίζονται με βάση τον χρόνο πτήσης τους προς τον ανιχνευτή που διαφέρει λόγω των διαφορετικών μαζών τους [31].

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκάσμο χρησιμοποιείται για την μελέτη βιομορίων με μοριακό βάρος πάνω από 100000Da και πραγματοποιείται υπό ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία. Με την βοήθεια μίας ανοιξειδωτής τριχοειδούς βελόνας, η οποία βρίσκεται σε δυναμικό αρκετών kV ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο που τη περιβάλλει, αντλείται το διάλυμα του δείγματος. Κατά την διέλευση των δημιουργούμενων φορτισμένων σταγόνων μέσω ενός τριχοειδούς, ο διαλύτης εξατμίζεται και τα μόρια του αναλύτη φορτίζονται. Η πυκνότητα φορτίου αυξάνεται μέχρι η επιφανειακή τάση να μην μπορεί να υποστηρίξει το φορτίο (όριο Rayleigh) και η σταγόνα διασπάται σε μικρότερες. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη. Η εισαγωγή του δείγματος μπορεί εύκολα να γίνει απευθείας από την έξοδο μίας στήλης υγρής χρωματογραφίας [31].



Εικόνα 2.10.1: Συσκευή για ιοντισμό με ηλεκτροψεκάσμο [31]

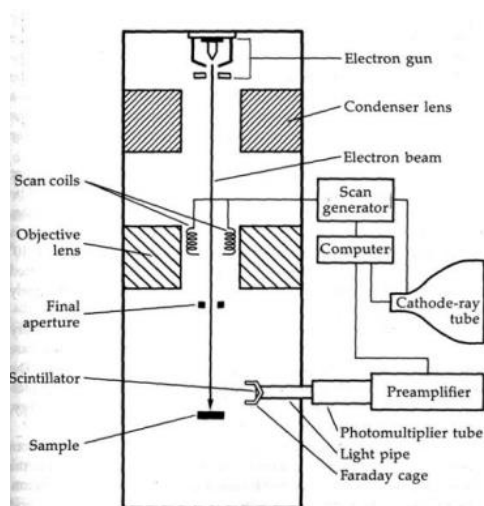
2.11 Πρωτεομική ανάλυση

Το πρωτέομα περιλαμβάνει τα είδη, τις λειτουργίες και τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από ένα συγκεκριμένο γονιδίωμα. Έτσι, η πρωτεομική μελετάει τις πρωτεΐνες, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους και τις αλληλεπιδράσεις τους με στόχο την κατανόηση πολύπλοκων βιολογικών διεργασιών. Τα βασικά στάδια των μεθόδων που χρησιμοποιούνται είναι η συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, η ανάλυση με φασματομετρία μάζας και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με ανάλυση δεδομένων. Οι πιο συνηθισμένες τεχνικές για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών είναι η διαδοχική φασματομετρία μάζας και η αποτύπωση μάζας πεπτιδίου (PMF). Οι πρωτεΐνες πρωτεολύονται ενζυματικά σε πεπτίδια και συγκρίνεται η μετρούμενη μάζα κάθε πεπτιδίου με τη μάζα πεπτιδίων από πρωτεΐνες που υπάρχουν σε βάσεις δεδομένων. Έτσι, ταυτοποιείται η πρωτεΐνη από την οποία προήλθε το πεπτίδιο [24]. Στη παρούσα εργασία, τα δεδομένα για την πρωτεομική ανάλυση προέκυψαν από υγρή χρωματογραφία και συζευγμένη φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκασμό (LC-ESI-MS/MS), ενώ η βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση ήταν η NCBI για τον οργανισμό *Chlorobaculum tepidum* TLS στις 02/02/2021.

2.12 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης χρησιμοποιεί μία δέσμη ηλεκτρονίων για την μεγέθυνση ενός στερεού άνω των 30000x, που δεν μπορεί να επιτευχθεί με την οπτική μικροσκοπία. Η αρχή λειτουργίας βασίζεται στην παραγωγή των ηλεκτρονίων από ένα θερμαινόμενο μεταλλικό νήμα που επιταχύνονται υπό την επίδραση μίας διαφοράς δυναμικού και την διέλευση της δέσμης των ηλεκτρονίων από διάφορα διαφράγματα για την ομοιομορφία της και από διάφορους φακούς για την εστίαση της πάνω στο δείγμα σε έναν θάλαμο υπερυψηλού κενού [21].

Η δέσμη αυτή σαρώνει συνεχώς την επιφάνεια του δείγματος με κατάλληλα πηνία και οδηγεί στον σχηματισμό της εικόνας μέσω της παραγωγής των δευτερογενών ηλεκτρονίων από την αλληλεπίδραση της δέσμης με τα άτομα του δείγματος. Η εικόνα είναι αποτέλεσμα της αντίθεσης περιοχών με διαφορετικό αριθμό δευτερογενών ηλεκτρονίων, αφού όσο περισσότερα ηλεκτρόνια παράγονται, τόσο πιο φωτεινή εμφανίζεται. Ο αριθμός των δευτερογενών ηλεκτρονίων που παράγεται εξαρτάται από την μορφολογία και την χημική σύσταση του σημείου [21].



Εικόνα 2.12.1: Η διάταξη ενός τυπικού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης [21]

2.13 Φασματοσκοπία διασποράς ενέργειας ακτίνων X (Energy Dispersive Spectroscopy, EDS)

Εκτός από τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, μπορούν να παραχθούν και ακτίνες X από την αλληλεπίδραση της δέσμης ηλεκτρονίων με τα άτομα του δείγματος. Το φαινόμενο αυτό προκαλείται από τον εκτοπισμό ηλεκτρονίων της εσωτερικής στοιβάδας των ατόμων (οπή) που τα καθιστά ασταθή και οδηγεί στην μετάπτωση ηλεκτρονίων της εξωτερικής στοιβάδας στην εσωτερική με ταυτόχρονη εκπομπή ακτίνων X. Οι ακτίνες X είναι χαρακτηριστικές για κάθε άτομο, γεγονός που επιτρέπει έναν άμεσο και μη καταστροφικό ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των στοιχείων στο δείγμα [21].

2.14 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)

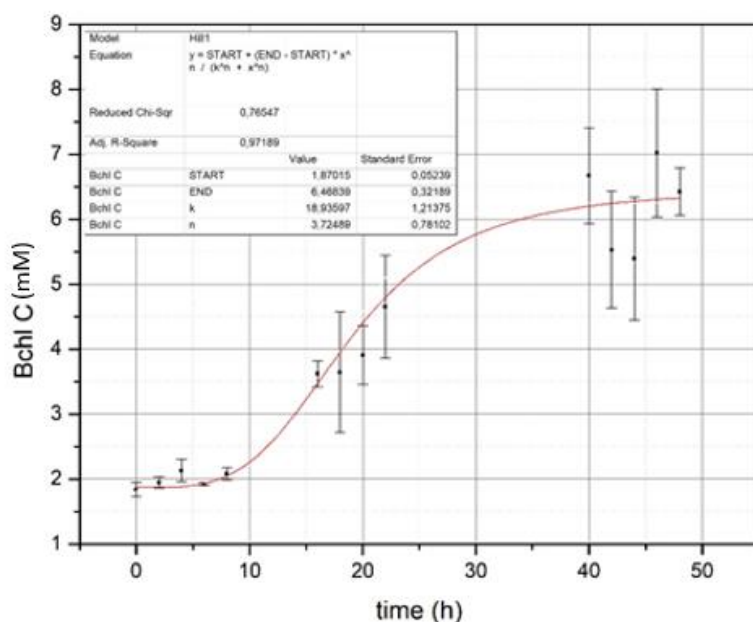
Τα κύρια μέρη της διάταξης που χρησιμοποιείται στην ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης είναι ίδια με εκείνα της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης που αναφέρθηκαν παραπάνω: μία πηγή ηλεκτρονίων και μία σειρά από διαφράγματα και φακούς σε έναν θάλαμο υπερυψηλού κενού. Όμως, επειδή τα ηλεκτρόνια πρέπει να διαπεράσουν το δείγμα, χρησιμοποιείται ένα πολύ μεγαλύτερο δυναμικό επιτάχυνσης. Το δυναμικό αυτό κυμαίνεται από 100kV έως και 400kV που επιτρέπει μεγεθύνσεις ανώ των 1000000x και ανάλυση των 0,2nm. Ακόμη, είναι απαραίτητο ένα σύστημα ψύξης για την αποτροπή της θερμικής διάσπασης λόγω του υπερβολικού ποσού θερμότητας που παράγεται. Έτσι, το TEM παρέχει πληροφορίες για την μορφολογία, τη σύσταση αλλά και την κρυσταλλική δομή [29,30].

Όσον αφορά την προετοιμασία του δείγματος, υπάρχουν αρκετές διαφορετικές τεχνικές, όπως η αρνητική χρώση (negative staining). Η αρνητική χρώση είναι μία εύκολη και γρήγορη διαδικασία που επιτρέπει την παρατήρηση των σωματιδιακών συστατικών ενός δείγματος πάνω σε ένα πλέγμα στήριξης (support grid) αφού έχουν βυθιστεί σε μία ηλεκτρονικά πυκνή βαφή. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην παραγωγή ενός περιγράμματος της δομής από την βαφή, παρέχοντας πληροφορίες για το μέγεθος και το σχήμα. Μία από τις πιο συνηθισμένες βαφές αποτελεί το φωσφοβολφραμικό οξύ (phosphotungstic acid, PTA) [30].

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

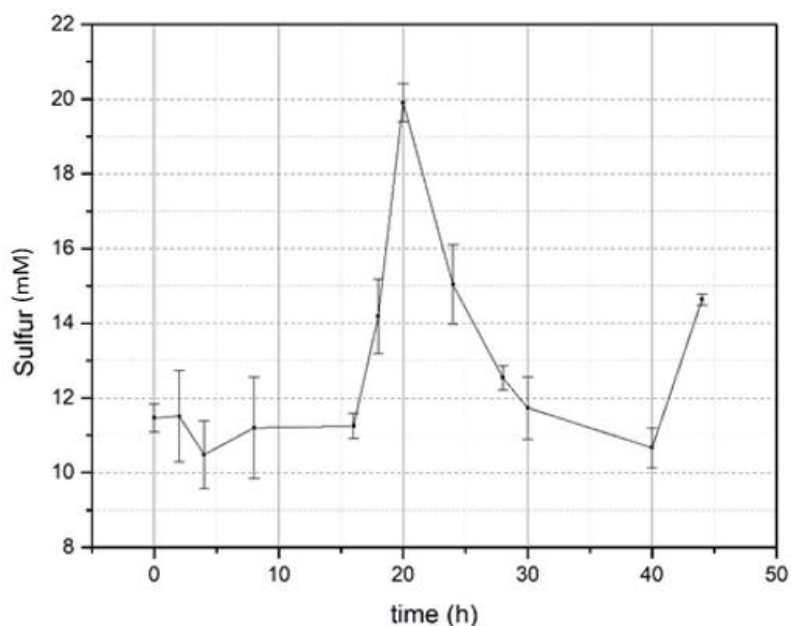
3.1 Μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου *C. tepidum*

Κατά την μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου με βάση το πρωτόκολλο της παραγράφου 2.3, ποσοτικοποιήθηκε η Bchl c με την μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 669nm και την μετατροπή της σε συγκέντρωση με βάση τον νόμο Beer – Lambert. Έτσι, κατασκευάστηκε το διάγραμμα της συγκέντρωσης Bchl c ως προς τον χρόνο με τη χρήση του προγράμματος OriginPro, λαμβάνοντας τρία δείγματα από δύο διαφορετικά βιολογικά κάθε δύο ώρες:



Εικόνα 3.1.1: Διάγραμμα συγκέντρωσης Bchl c ως προς τον χρόνο για τα δύο βιολογικά

Ομοίως με την Bchl c, ποσοτικοποιήθηκε και το στοιχειακό θείο με την μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 265nm και προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα:



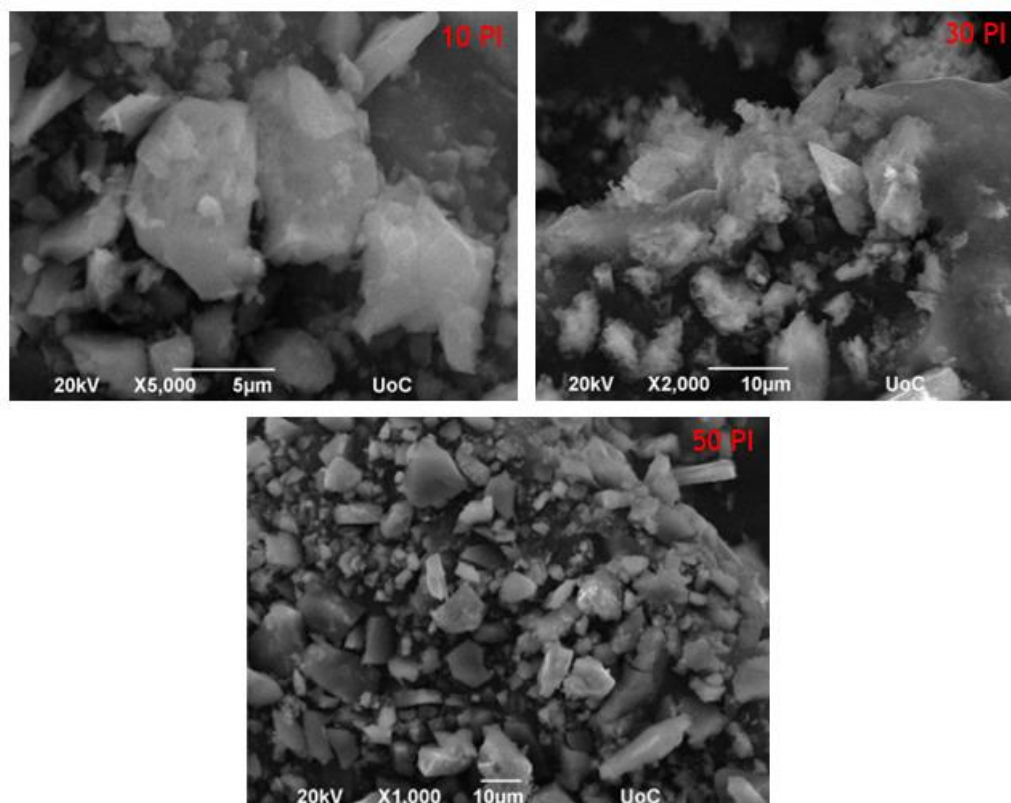
Εικόνα 3.1.2: Διάγραμμα συγκέντρωσης στοιχειακού θείου ως προς τον χρόνο για τα δύο βιολογικά

Η ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού χαρακτηρίζεται από τέσσερις φάσεις: την λανθάνουσα, την εκθετική, την στατική και την φάση θανάτου. Κατά την λανθάνουσα, δεν μεταβάλλεται ο πληθυσμός των βακτηρίων, καθώς προσαρμόζονται στις καινούργιες συνθήκες περιβάλλοντος. Κατά την εκθετική, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με εκθετικό ρυθμό, καθώς οι συνθήκες είναι ιδανικές. Κατά την στατική φάση, ο αριθμός των βακτηρίων παραμένει σταθερός λόγω της εξάντλησης κάποιου θρεπτικού συστατικού ή της συσσώρευσης κάποιου τοξικού μεταβολικού προϊόντος, ενώ στη φάση θανάτου παρατηρείται η μείωση του πληθυσμού. Από την εικόνα 3.1.1 παρατηρείται ότι η λανθάνουσα φάση διαρκεί περίπου μέχρι τις 10 ώρες, η εκθετική μέχρι τις 40 ώρες και η στατική μέχρι τις 50 ώρες.

Από την εικόνα 3.1.2 παρατηρείται ότι πριν τις 20 ώρες η παραγωγή των σφαιριδίων είναι μειωμένη με μικρές αυξομειώσεις. Μετά αυξάνεται εκθετικά με το μέγιστο στις 20 ώρες και μειώνεται με περίπου τον ίδιο ρυθμό μέχρι τις 40 ώρες. Στη στατική φάση (40-50h) παρατηρείται ξανά αύξηση της ποσότητας. Επομένως, η μέγιστη παραγωγή του θείου πραγματοποιείται στις 20 ώρες, ενώ η επακόλουθη μείωση υποδεικνύει την κατανάλωση των σφαιριδίων από το βακτήριο.

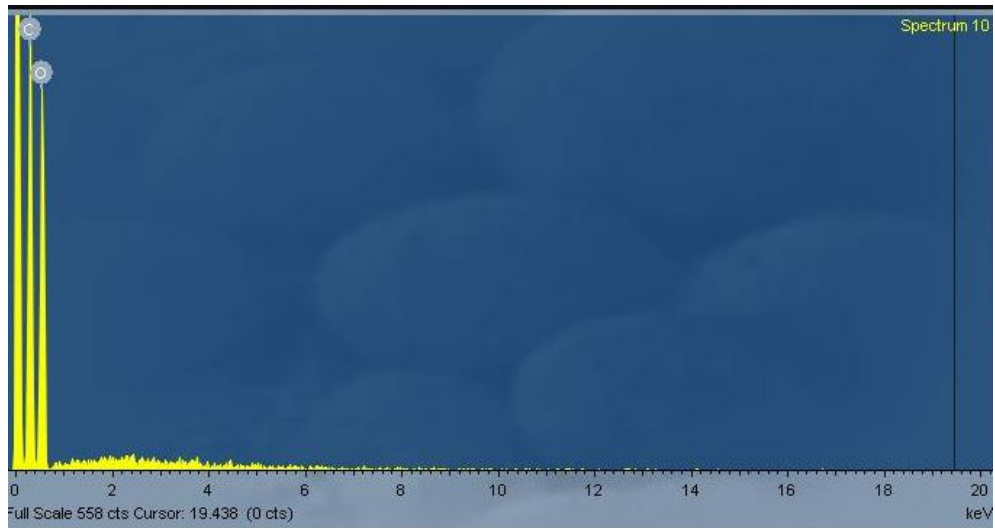
3.2 Απομόνωση στοιχειακού θείου

Τα δείγματα για την απομόνωση στοιχειακού θείου ελήφθησαν 10, 30 και 50 ώρες μετά την επώαση (post incubation – PI). Από την παρατήρηση των σφαιριδίων στοιχειακού θείου με SEM ελήφθησαν οι παρακάτω εικόνες:

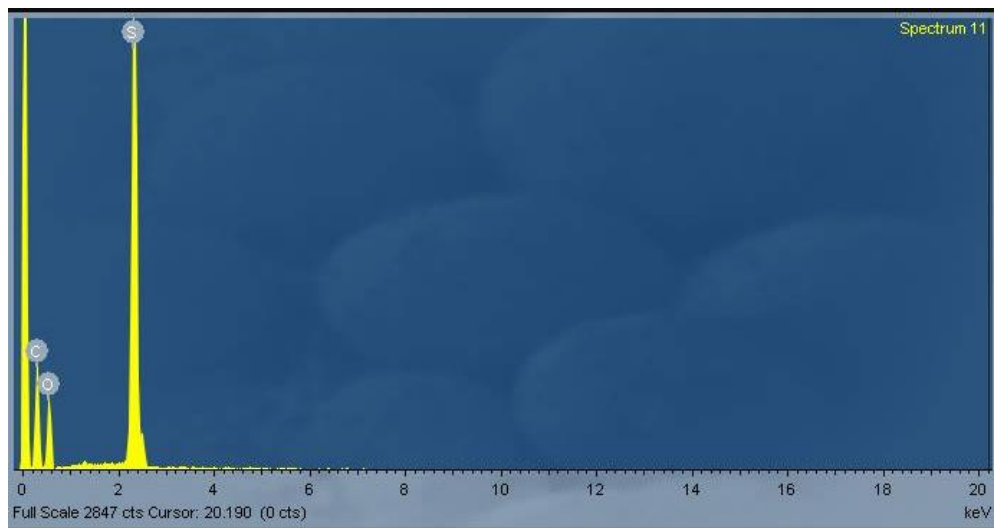


Εικόνα 3.2.1: Απεικόνιση σφαιριδίων στοιχειακού θείου με SEM για δείγματα 10PI, 30PI και 50PI

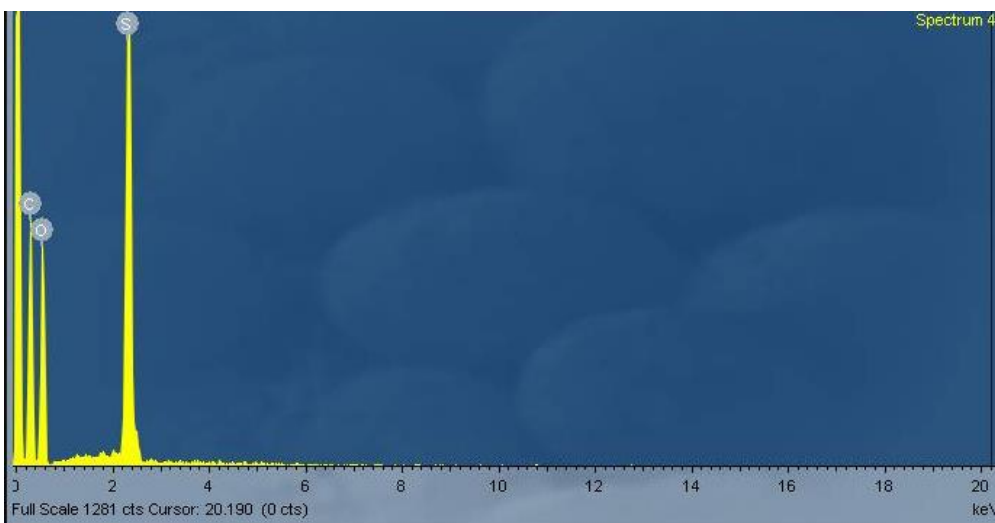
Ακόμη, ελήφθησαν τα φάσματα με φασματοσκοπία διασποράς ενέργειας ακτίνων Χ για κάθε ένα από τα τρία δείγματα (10PI, 30PI και 50PI):



Εικόνα 3.2.2: Φάσμα EDS δείγματος 10PI

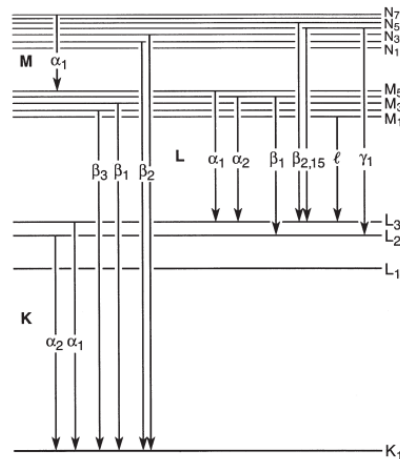


Εικόνα 3.2.3: Φάσμα EDS δείγματος 30PI



Εικόνα 3.2.4: Φάσμα EDS δείγματος 50PI

Η κορυφή του άνθρακα οφείλεται στην μετάπτωση K_{α_1} που ισούται με 0,277keV και η κορυφή του οξυγόνου οφείλεται στην ίδια μετάπτωση που ισούται με 0,525keV. Η κορυφή του θείου οφείλεται σε τρεις μεταπτώσεις που αλληλεπικαλύπτονται και αντιστοιχούν στην K_{α_1} που ισούται με 2,308keV, στην K_{α_2} που ισούται με 2,307keV και K_{β_1} που ισούται με 2,464keV [28].

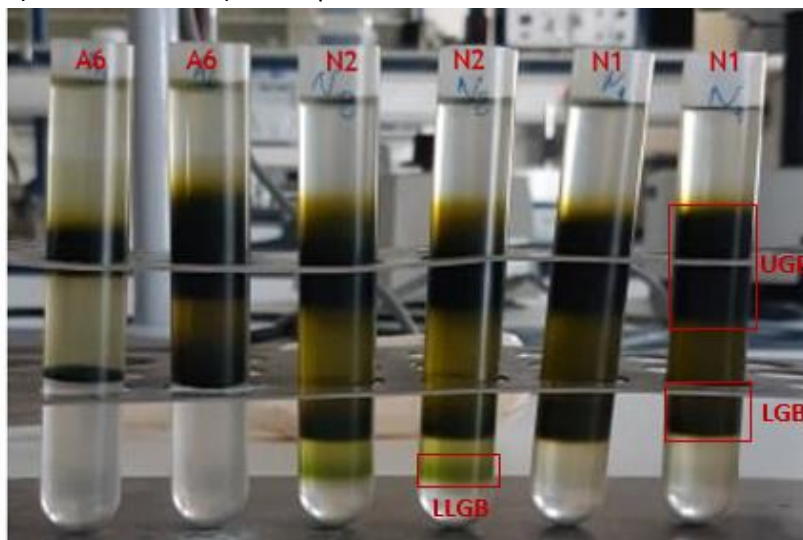


Εικόνα 3.2.5: Γραμμικό φάσμα μεταπτώσεων [28]

Κατά τις 10 ώρες μετά την επώαση δεν ανιχνεύεται η παρουσία του θείου από την στοιχειακή ανάλυση με EDS (εικόνα 3.2.2). Αυτό οφείλεται στην μειωμένη παραγωγή του θείου από το βακτήριο. Αντίθετα, 30 και 50 ώρες μετά την επώαση ανιχνεύεται η παρουσία του θείου με το μέγεθος των σφαιριδίων να είναι μικρότερο στις 50 ώρες που υποδεικνύει την κατανάλωση τους από το βακτήριο. Επίσης, ανιχνεύθηκε η παρουσία του άνθρακα και του οξυγόνου που μπορεί να οφείλεται στην χρήση της ταινίας άνθρακα, στην ύπαρξη πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του θείου, στον ατελή καθαρισμό ή στην επαφή των δειγμάτων με την ατμόσφαιρα.

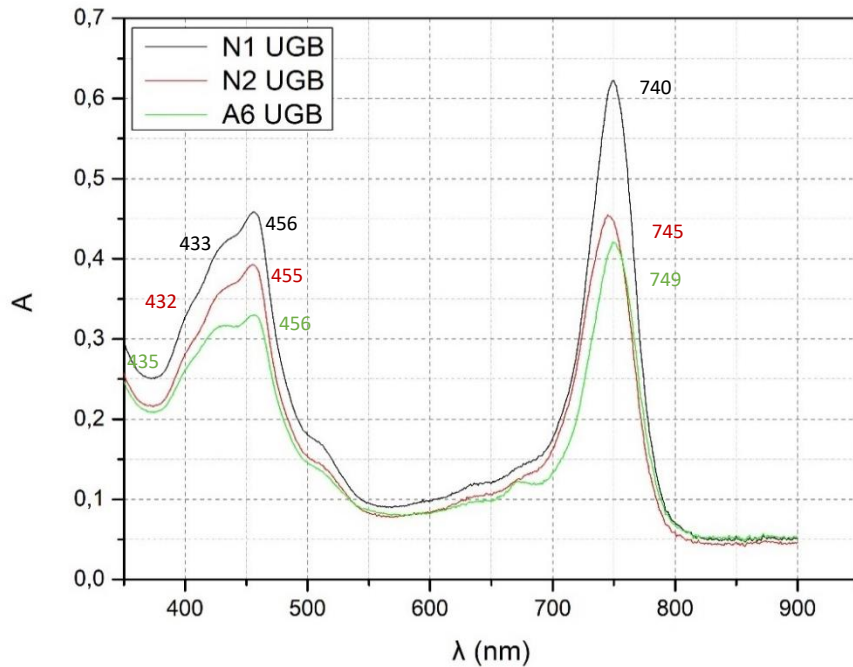
3.3 Απομόνωση χλωροσωμάτων

Για την απομόνωση των χλωροσωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά βιολογικά (A6, N1, N2) και δύο δείγματα από κάθε βιολογικό. Οι λωρίδες που προκύπτουν με τη διαβάθμιση ζάχαρης στους σωλήνες μετά την τελευταία φυγοκέντρηση του πρωτοκόλλου της παραγράφου 2.5 απεικονίζεται παρακάτω:

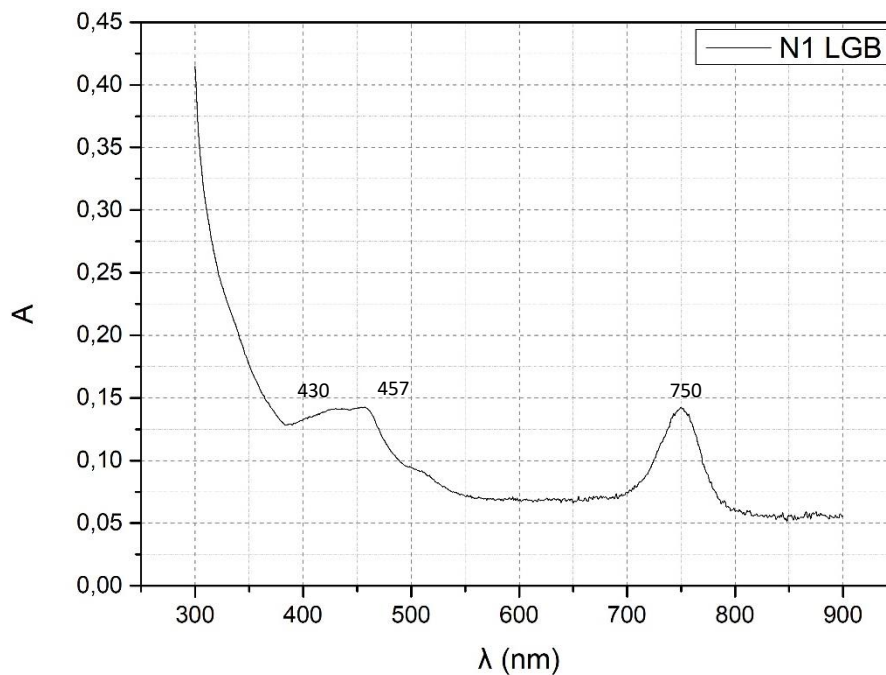


Εικόνα 3.3.1: Μπάντες φιαλιδίων μετά το πέρας της διαβάθμισης ζάχαρης

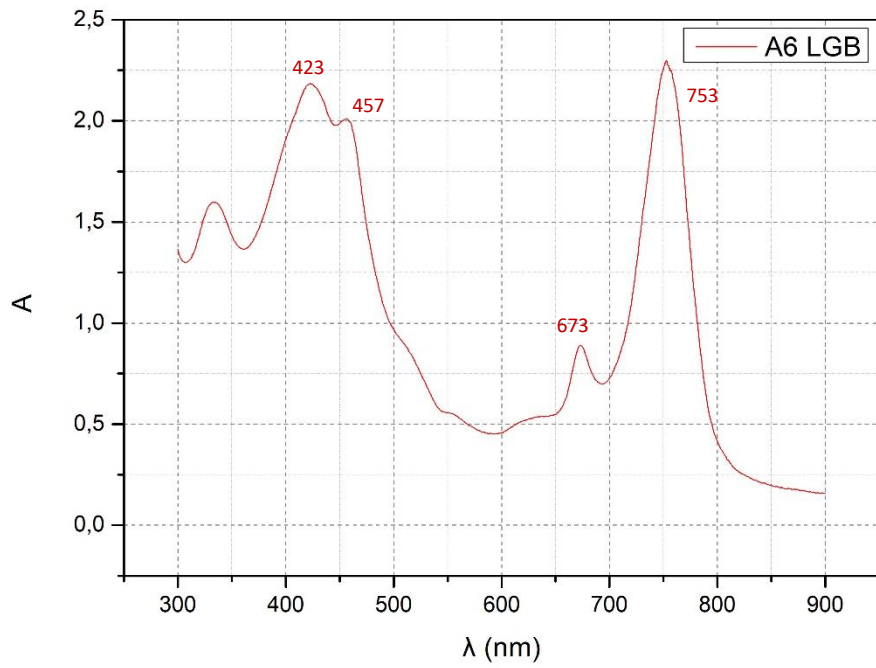
Σε κάθε σωλήνα παρατηρείται μία ανώτερη πράσινη μπάντα (upper green band, UGB) και μία κατώτερη πράσινη μπάντα (lower green band, LGB). Τα δείγματα A6 εμφανίζουν μία μετατόπιση των πράσινων λωρίδων που ενδεχομένως να οφείλεται στην καλύτερη διαβάθμιση ζάχαρης με τις λωρίδες να είναι πιο στενές. Στα δείγματα N2 παρατηρείται και μία κατώτερη ανοιχτή πράσινη μπάντα (lower light green band, LLGB) που μπορεί να οφείλεται σε κάποια μεταβολή των συνθηκών καλλιέργειας, όπως το pH ή η παρουσία οξυγόνου. Το πράσινο χρώμα είναι ενδεικτικό της παρουσίας βακτηριοχλωροφύλλων. Δεν ήταν δυνατή η συλλογή της LGB του βιολογικού N2. Κάθε μπάντα συλλέχθηκε και ελήφθησαν τα φάσματα με φασματομετρία UV-Vis για το εύρος 300-900nm:



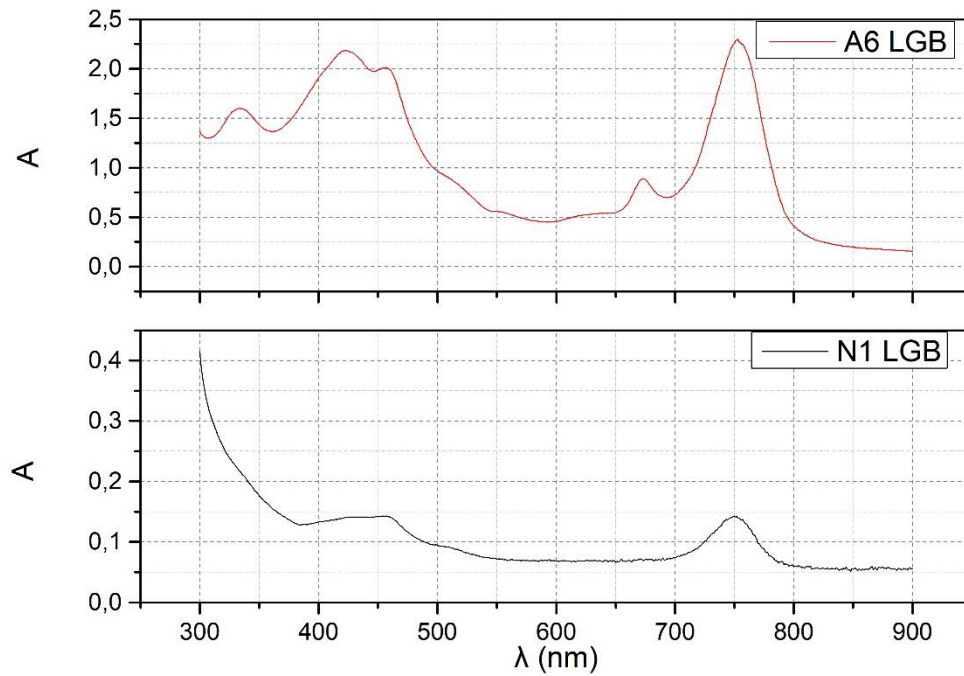
Εικόνα 3.3.2: Συγκριτικό διάγραμμα των απορροφήσεων ως προς το μήκος κύματος των UGBs για τα τρία βιολογικά



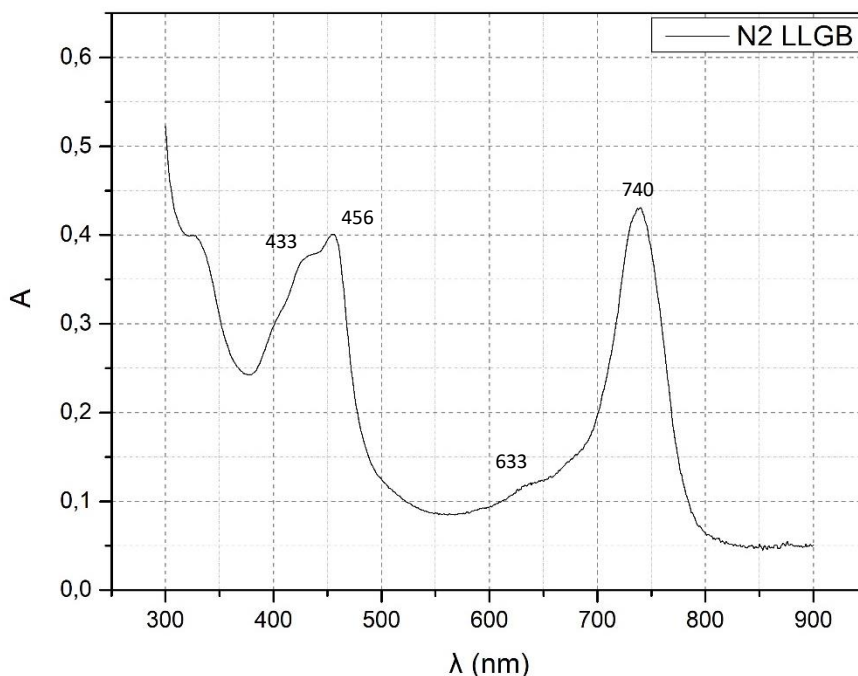
Εικόνα 3.3.3: Διάγραμμα απορρόφησης ως προς το μήκος κύματος της LGB του N1 βιολογικού



Εικόνα 3.3.4: Διάγραμμα απορρόφησης ως προς το μήκος κύματος της LGB του βιολογικού A6

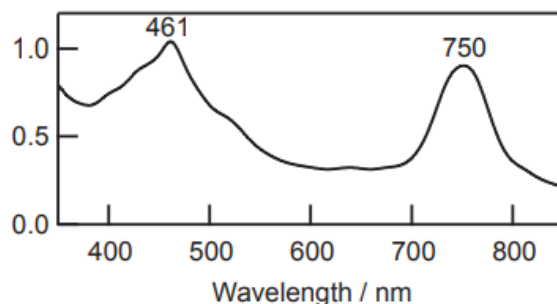


Εικόνα 3.3.5: Συγκριτικό διάγραμμα των απορροφήσεων ως προς το μήκος κύματος των δύο LGBs



Εικόνα 3.3.6: Διάγραμμα απορρόφησης ως προς το μήκος κύματος της LLGB του βιολογικού N2

Με βάση την βιβλιογραφία τα συσσωματώματα της BChl c εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στα 460nm και 740nm [25]. Οι κορυφές αυτές ανιχνεύθηκαν στην ανώτερη πράσινη μπάντα των τριών βιολογικών που υποδεικνύει την παρουσία καθαρών χλωροσωμάτων, ενώ είναι ελαφρώς μετατοπισμένες με διαφορετική μορφή στις κατώτερες πράσινες μπάντες που υποδεικνύει την παρουσία προσμείξεων, όπως και η μη αναμενόμενη κορυφή στα 673nm. Κορυφές κοντά στα 420nm και 630nm είναι αναμενόμενες σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Η παρουσία των χλωροσωμάτων ανιχνεύθηκε και στην κατώτερη ανοιχτή πράσινη μπάντα, αλλά με πολύ μικρή συγκέντρωση αφού δεν αραιώθηκε σε τετραπλάσιο όγκο σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μπάντες.



Εικόνα 3.3.7: Φάσμα απορρόφησης κυττάρων *C.teridum* υπό κανονικές συνθήκες [13]

Chlorobium species [BChl] ^a	Self-aggregates of BChls ^b				BChl-a
	Bx	By	Qx	Qy	Qy ^c
<i>phaeobacteroides</i> [e]	450	525 (400)	-	720 (630)	790
<i>phaeovibrioides</i> [e]	450	525 (400)	-	720 (630)	790
<i>vibrioforme</i> [c]	420	460	630	750 (≈690)	≈800
<i>vibrioforme</i> [d]	420	450	600	735 (≈670)	≈800
<i>tepidum</i> [c]	420	460	630	750 (≈690)	≈800
<i>tepidum</i> [d]	420	450	600	725 (≈670)	795

Εικόνα 3.3.8: Πίνακας με μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης για τις χρωστικές [25]

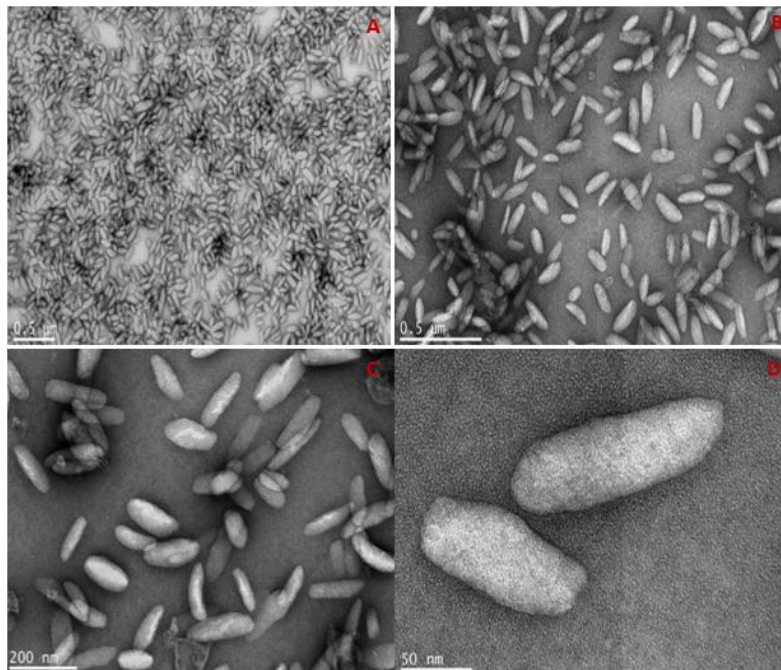
Για τις ανώτερες πράσινες μπάντες που περιέχουν τα καθαρά χλωροσώματα, προσδιορίστηκε η πρωτεϊνική συγκέντρωση με τη μέθοδο Bradford:

Πίνακας 3.3.1: Πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις UGBs

	N1	N2	A6
C (μg/μl)	9,5	3,22	2,83
Τυπική απόκλιση	1,9	0,99	0,22

3.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)

Από την παρατήρηση των δειγμάτων των χλωροσωμάτων που προέκυψαν από την συμπύκνωση των ανώτερων πράσινων μπαντών με TEM και αρνητική χρώση ελήφθησαν οι παρακάτω εικόνες:

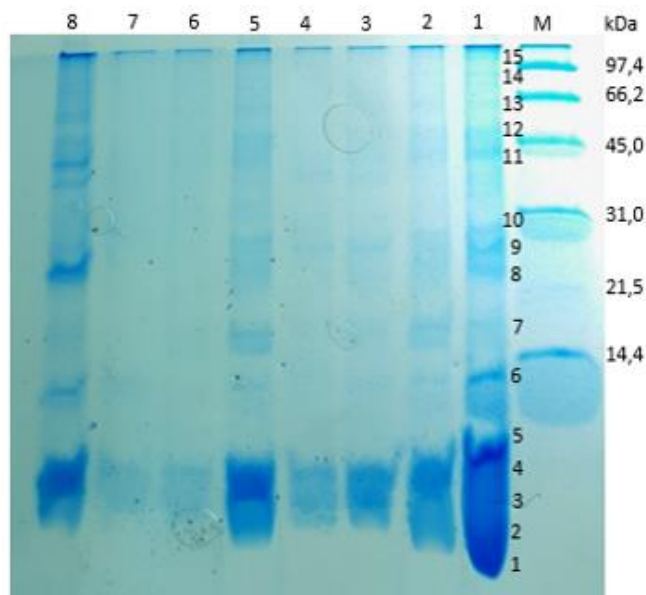


Εικόνα 3.4.1: Απεικόνιση χλωροσωμάτων με TEM σε κλίμακα 0,5μm (A,B), 200nm (C) και 50nm (D)

Από τις παραπάνω εικόνες επιβεβαιώνεται η παρουσία των χλωροσωμάτων, αφού με βάση την βιβλιογραφία πρόκειται για επιμήκεις δομές [7] με μήκος περίπου 200nm και πλάτος περίπου 50nm [9].

3.5 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Τα δείγματα των χλωροσωμάτων διαχωρίστηκαν με μία αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και οι λωρίδες που προέκυψαν μετά την εμφάνιση της πηκτής ήταν:



Εικόνα 3.5.1: Η πηκτή μετά την χρώση και οι θέσεις κοπής για πρωτεολυτική διάσπαση

Στη θέση M βρίσκεται ο μάρτυρας (M), του οποίου η σύσταση περιγράφεται στην παράγραφο 2.7, ενώ στις υπόλοιπες θέσεις βρίσκονται δείγματα χλωροσωμάτων που απομονώθηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο από διαφορετικά βιολογικά. Με βάση την εικόνα 1.4.2, τα μοριακά βάρη των χλωροσωμικών πρωτεϊνών κυμαίνονται από 6,2 έως 25,9kDa. Γι αυτόν τον λόγο χρησιμοποιήθηκε μία πηκτή με περιεκτικότητα 16,5%, δηλαδή με μικρούς πόρους, αφού πρόκειται για πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους.

3.6 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών και MALDI – TOF

Στην εικόνα 3.5.1 απεικονίζεται η πηκτή με τις θέσεις κοπής των μπαντών για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της παραγράφου 2.9. Με την βοήθεια της φασματομετρίας MALDI – TOF ταυτοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

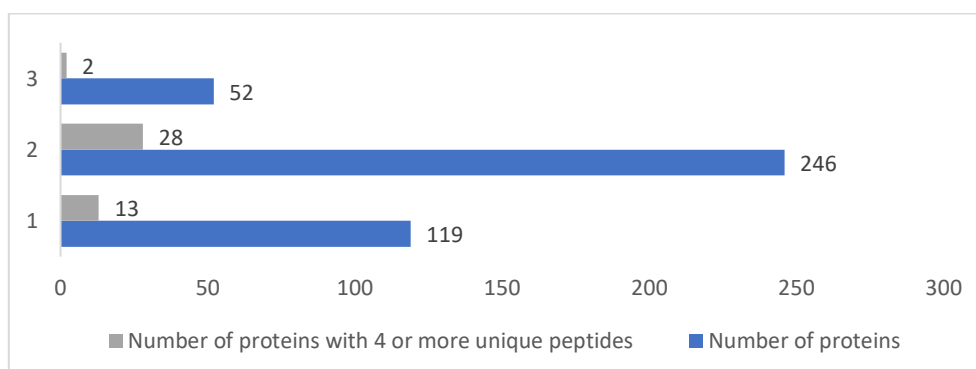
Πίνακας 3.6.1: Ονομασία πρωτεΐνης, ονομασία γονιδίου, accession number και αριθμός PSMs για κάθε πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε για κάθε θέση κοπής στη πηκτή

Θέση κοπής	Όνομα πρωτεΐνης	Όνομα γονιδίου	Accession Number	PSMs
1	Chlorosome envelope protein B	CsmB	Q46383	8
2	Bacteriochlorophyll c-binding protein	CsmA	P0A314	3
3	Bacteriochlorophyll c-binding protein	CsmA	P0A314	5
4	Bacteriochlorophyll c-binding protein	CsmA	P0A314	2
5	Bacteriochlorophyll c-binding protein	CsmA	P0A314	3
6	Chlorosome protein C	CsmC	Q46367	3
10	Chlorosome protein I	CsmI	O68988	1
11	Chlorosome protein I	CsmI	O68988	1
12	Cytochrome bc complex cytochrome b subunit	CT0303	Q9F721	1
13	Photosystem P840 reaction center, large subunit	CT2020	Q8KAY0	1

Για τις θέσεις 7,8,9,14 και 15 δεν υπήρξε καμία ταυτοποίηση.

3.7 Πρωτεομική ανάλυση

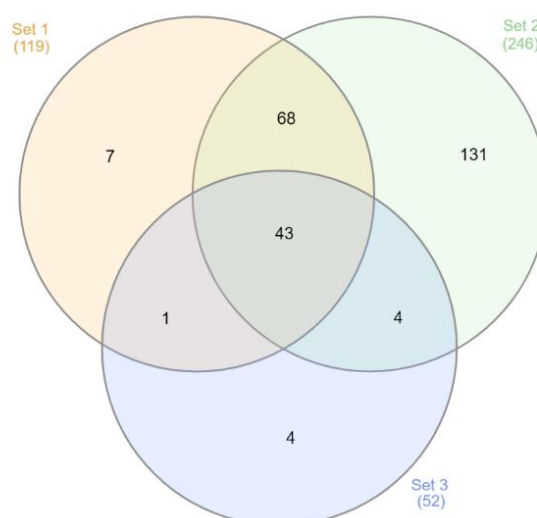
Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν για κάθε δείγμα και ο αριθμός των πρωτεϊνών με τέσσερα ή παραπάνω μοναδικά πεπτίδια μήκους τουλάχιστον επτά αμινοξέων:



Εικόνα 3.7.1: Συνολικός αριθμός πρωτεϊνών και αριθμός πρωτεϊνών με τέσσερα ή παραπάνω μοναδικά πεπτίδια

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα, για το δείγμα 1 ταυτοποιήθηκαν 119 πρωτεΐνες από τις οποίες οι 13 είχαν τέσσερα ή παραπάνω μοναδικά πεπτίδια, για το δείγμα 2 ταυτοποιήθηκαν 246 πρωτεΐνες από τις οποίες οι 28 είχαν τέσσερα ή παραπάνω μοναδικά πεπτίδια και για το δείγμα 3 ταυτοποιήθηκαν 52 πρωτεΐνες από τις οποίες οι 2 είχαν τέσσερα ή παραπάνω μοναδικά πεπτίδια. Ο αριθμός των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών διαφέρει σημαντικά μεταξύ των τριών δειγμάτων και γι αυτό είναι αναγκαία η επανάληψη της διαδικασίας με όσο το δυνατόν πιο όμοιες συνθήκες στην λήψη και επεξεργασία των δειγμάτων.

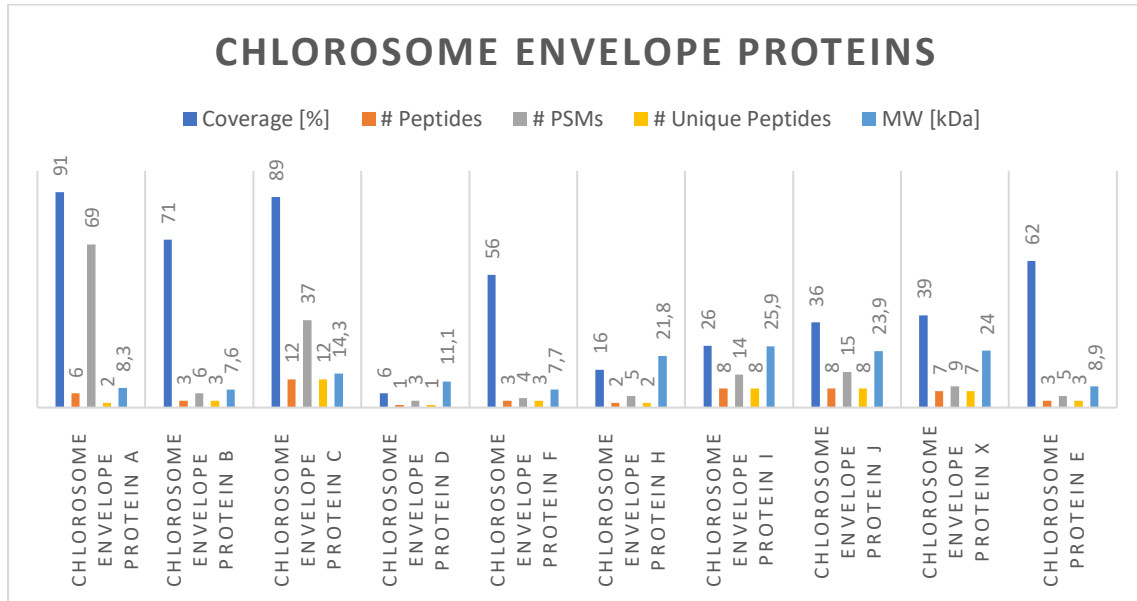
Για την σύγκριση των τριών δειγμάτων κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα Venn με τον συνολικό αριθμό πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με ένα πεπτίδιο και εμφανίζεται στην παρακάτω εικόνα [26]:



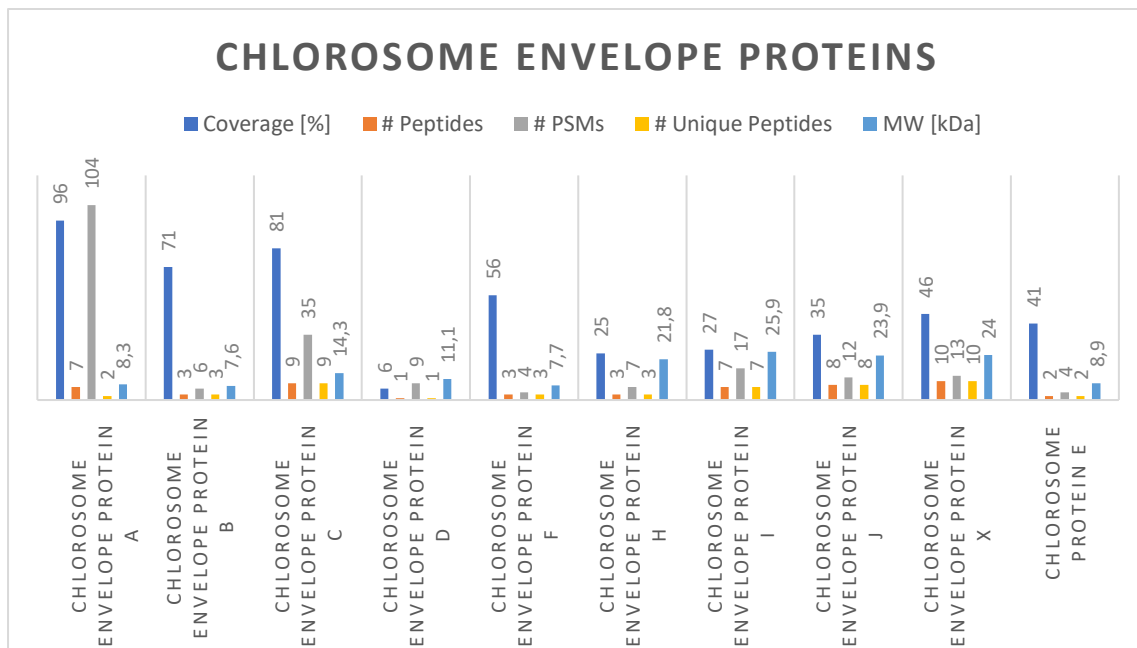
Εικόνα 3.7.2: Διάγραμμα Venn για τον προσδιορισμό των κοινών πρωτεϊνών μεταξύ των τριών δειγμάτων

Σύμφωνα με το διάγραμμα Venn, οι πρωτεΐνες που εμφανίζονται και στα τρία δείγματα είναι 43. Οι πρωτεΐνες που εμφανίζονται στα δείγματα 1 και 2, αλλά όχι στο 3 ήταν 68, οι πρωτεΐνες που εμφανίζονται μόνο στα δείγματα 1 και 3, αλλά όχι στο 2 ήταν 1 και οι πρωτεΐνες που εμφανίζονται μόνο στα δείγματα 2 και 3, αλλά όχι στο 1 ήταν 4.

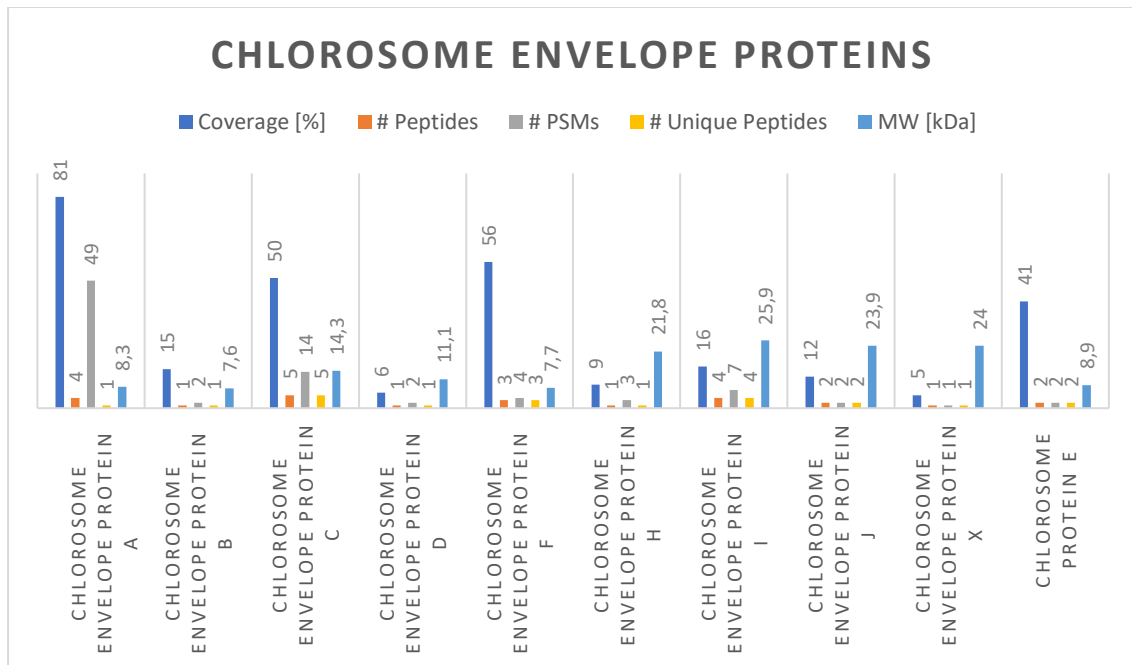
Η ταυτοποίηση των δέκα χλωροσωμικών πρωτεϊνών ήταν επιτυχής και στα τρία δείγματα. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται το ποσοστό της κάλυψης (δηλαδή το ποσοστό της πρωτεϊνικής αλληλουχίας που καλύφθηκε με τα πεπτίδια που ταυτοποιήθηκαν), ο αριθμός των πεπτιδίων, ο αριθμός των PSMs (Peptide Spectrum Match), ο αριθμός των μοναδικών πεπτιδίων και το μοριακό βάρος (MW) της πρωτεΐνης:



Εικόνα 3.7.3: Διάγραμμα ποσοστού κάλυψης, αριθμού πεπτιδίων, αριθμού PSMs, αριθμού μοναδικών πεπτιδίων και μοριακού βάρους πρωτεΐνης για το δείγμα 1

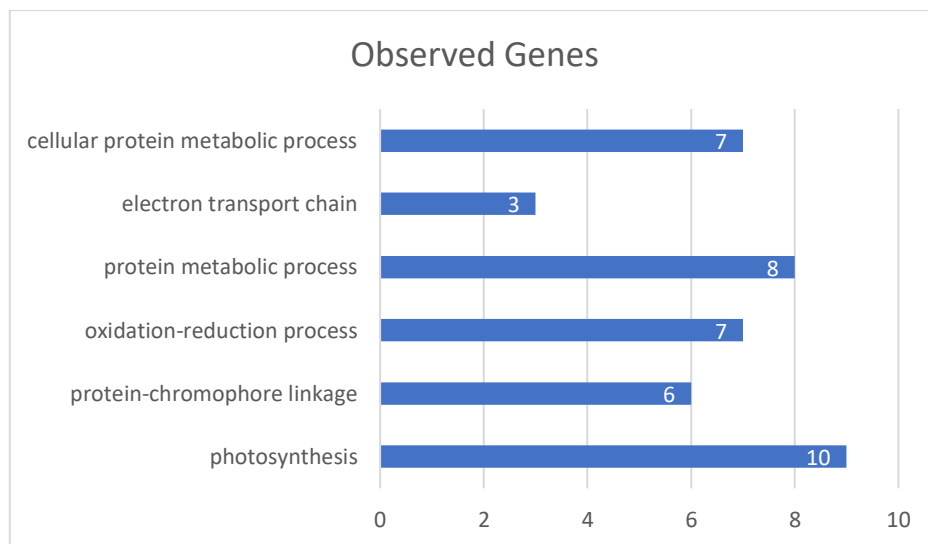


Εικόνα 3.7.4: Διάγραμμα ποσοστού κάλυψης, αριθμού πεπτιδίων, αριθμού PSMs, αριθμού μοναδικών πεπτιδίων και μοριακού βάρους πρωτεΐνης για το δείγμα 2



Εικόνα 3.7.5: Διάγραμμα ποσοστού κάλυψης, αριθμού πεπτιδίων, αριθμού PSMs, αριθμού μοναδικών πεπτιδίων και μοριακού βάρους πρωτεΐνης για το δείγμα 3

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα με βάση τις λειτουργίες των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν και στα τρία δείγματα:



Εικόνα 3.7.6: Λειτουργική ανάλυση κοινών πρωτεϊνών

Από την εικόνα 3.7.6 προκύπτει ότι δέκα πρωτεΐνες σχετίζονται με την φωτοσύνθεση (CT0075, CsmJ, CsmF, FmoA, PscC, CsmA, csmB, CsmC, CsmE, CsmI), έξι με την σύνδεση πρωτεΐνης – χρωμοφόρου (CsmF, FmoA, CsmA, CsmC, CsmB, CsmE), επτά με την οξειδοαναγωγική διαδικασία (CT0075, CsmJ, FmoA, PscC, CT1747, CsmA, CsmE), οκτώ με την μεταβολική διεργασία (CsmF, FmoA, CsmA, CsmC, CsmB, CsmE, RpsE, ClpB-1), τρεις με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (CT0075, CsmJ, PscC) και επτά με την κυτταρική μεταβολική διαδικασία που αφορά μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη (CsmF, FmoA, CsmA, CsmC, CsmB, CsmE, RpsE). Επομένως, οι πρωτεΐνες αυτές σχετίζονται άμεσα με την λειτουργία των χλωροσωμάτων και ενδεχομένως την βιογένεσή τους.

4. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, από την μελέτη της ανάπτυξης του βακτηρίου με την ποσοτικοποίηση της BChl c ως προς τον χρόνο προκύπτει ότι η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης είναι από 0-10h, της εκθετικής φάσης από 10-40h και της στατικής φάσης από 40-50h. Ενώ, με την ποσοτικοποίηση του στοιχειακού θείου ως προς τον χρόνο προκύπτει ότι η μέγιστη παραγωγή θείου λαμβάνει χώρα στις 20h.

Η λήψη εικόνων με SEM σε συνδυασμό με την στοιχειακή ανάλυση EDS έδειξε ότι δεν παρατηρούνται σφαιρίδια στοιχειακού θείου 10 ώρες μετά την επώαση. Ακόμη, υποδεικνύεται η κατανάλωση των σφαιριδίων από το βακτήριο από την μείωση του μεγέθους τους από τις 30 στις 50 ώρες μετά την επώαση. Ακόμη, ανιχνεύθηκε η παρουσία του άνθρακα και του οξυγόνου που μπορεί να οφείλεται στην χρήση της ταινίας άνθρακα, στην ύπαρξη πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του θείου, στον ατελή καθαρισμό ή την παρατήρηση των δειγμάτων σε ατμόσφαιρα και όχι σε κενό. Αντίθετα, δεν ανιχνεύθηκε άζωτο που αποτελεί βασικό συστατικό των πρωτεϊνών.

Από την διαβάθμιση ζάχαρης προέκυψαν πράσινες μπάντες που υποδεικνύουν την παρουσία βακτηριοχλωροφυλλών. Η παρουσία των συσσωματωμάτων BChl c επιβεβαιώθηκε από την εμφάνιση των χαρακτηριστικών κορυφών στα 460nm και 740nm που υποδεικνύει την ύπαρξη των χλωροσωμάτων. Η ύπαρξη τους επιβεβαιώθηκε από την λήψη εικόνων με TEM που συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας για το μέγεθος και το σχήμα των χλωροσωμάτων. Οι πρωτεΐνες των δειγμάτων αυτών διαχωρίστηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και αναλύθηκαν περαιτέρω με φασματομετρία μάζας.

Με την φασματομετρία MALDI – TOF δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση και των δέκα χλωροσωμικών πρωτεϊνών, αλλά μόνο τριών, καθώς και δύο πρωτεϊνών που συνδεόνται με την φωτοσύνθεση.

Κατά την πρωτεομική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από την φασματομετρία μάζας ταυτοποιήθηκαν 119 πρωτεΐνες στο πρώτο δείγμα, 246 στο δεύτερο δείγμα και 52 στο τρίτο δείγμα. Οι κοινές πρωτεΐνες των τριών δειγμάτων ήταν 43, από τις οποίες οι 10 ήταν οι χλωροσωμικές.

5. Μελλοντικοί στόχοι

Στη συγκεκριμένη εργασία επιδιώχθηκε η απομόνωση των χλωροσωμάτων και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που περιέχουν. Στο μέλλον συστήνεται η πραγματοποίηση αντιδράσεων cross-linking τόσο με γλουταραλδεΐδη, όσο και με άλλες ενώσεις για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών. Ομοίως, θα μπορούσε να επαναληφθεί και η απομόνωση δειγμάτων για ανάλυση με LC-ESI-MS/MS με όσο το δυνατόν πιο όμοιες συνθήκες για την επαναληψιμότητα του αριθμού των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών.

Ακόμη, προτείνεται η ανάπτυξη του βακτηρίου σε συνθήκες στέρησης φωτός, αλλά και βιταμίνης B₁₂ και η παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (transmission electron microscopy, TEM) για την μελέτη της επίδρασης των συνθηκών στην δομή της φωτοσυνθετικής κεραίας.

6. Βιβλιογραφία

- [1] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Jr., G. G. J., & Stryer, L. (2015). *Βιοχημεία* (8th ed.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- [2] Ranjbar Choubeh, R., Koehorst, R. B., Bina, D., Struik, P. C., Pšenčík, J., & van Amerongen, H. (2019). *Efficiency of excitation energy trapping in the green photosynthetic bacterium Chlorobaculum tepidum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1860(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.12.004>
- [3] Keenleyside, W. (2019, July 23). *Microbiology: Canadian Edition*. Pressbooks.
- [4] Kushkevych, I., Procházka, J., Gajdacs, M., Rittmann, S. K. M. R., & Vítězová, M. (2021). *Molecular Physiology of Anaerobic Phototrophic Purple and Green Sulfur Bacteria*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6398. <https://doi.org/10.3390/ijms22126398>
- [5] Wahlund, T. M., Woese, C. R., Castenholz, R. W., & Madigan, M. T. (1991). *A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs, Chlorobium tepidum sp. nov.* *Archives of Microbiology*, 156(2), 81–90. <https://doi.org/10.1007/bf00290978>
- [6] Kudryashev, M., Aktoudianaki, A., Dedoglou, D., Stahlberg, H., & Tsiotis, G. (2014). *The ultrastructure of Chlorobaculum tepidum revealed by cryo-electron tomography*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(10), 1635–1642. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.06.002>
- [7] Adams, P. G., Cadby, A. J., Robinson, B., Tsukatani, Y., Tank, M., Wen, J., Blankenship, R. E., Bryant, D. A., & Hunter, C. N. (2013). *Comparison of the physical characteristics of chlorosomes from three different phyla of green phototrophic bacteria*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(10), 1235–1244. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.07.004>
- [8] Johnson, T. W., Li, H., Frigaard, N. U., Golbeck, J. H., & Bryant, D. A. (2013). *[2Fe-2S] Proteins in Chlorosomes: Redox Properties of CsmI, CsmJ, and CsmX of the Chlorosome Envelope of Chlorobaculum tepidum*. *Biochemistry*, 52(8), 1331–1343. <https://doi.org/10.1021/bi301455k>
- [9] Montañó, G. A., Bowen, B. P., LaBelle, J. T., Woodbury, N. W., Pizziconi, V. B., & Blankenship, R. E. (2003). *Characterization of Chlorobium tepidum Chlorosomes: A Calculation of Bacteriochlorophyll c per Chlorosome and Oligomer Modeling*. *Biophysical Journal*, 85(4), 2560–2565. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(03\)74678-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(03)74678-5)
- [10] Li, H., Frigaard, N. U., & Bryant, D. A. (2013). *[2Fe-2S] Proteins in Chlorosomes: CsmI and CsmJ Participate in Light-Dependent Control of Energy Transfer in Chlorosomes of Chlorobaculum tepidum*. *Biochemistry*, 52(8), 1321–1330. <https://doi.org/10.1021/bi301454g>
- [11] Tsukatani, Y., Mizoguchi, T., Thweatt, J., Tank, M., Bryant, D. A., & Tamiaki, H. (2016). *Glycolipid analyses of light-harvesting chlorosomes from envelope protein mutants of Chlorobaculum tepidum*. *Photosynthesis Research*, 128(3), 235–241. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0228-z>
- [12] Chen, J. H., Wu, H., Xu, C., Liu, X. C., Huang, Z., Chang, S., Wang, W., Han, G., Kuang, T., Shen, J. R., & Zhang, X. (2020). *Architecture of the photosynthetic complex from a green sulfur bacterium*. *Science*, 370(6519). <https://doi.org/10.1126/science.abb6350>
- [13] Saga, Y., & Yamashita, H. (2017). *Effects of exogenous isoprenoid diphosphates on in vivo attachment to bacteriochlorophyllide c in the green sulfur photosynthetic bacterium Chlorobaculum tepidum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(4), 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.05.004>

- [14] Li, H., Frigaard, N. U., & Bryant, D. A. (2006b). *Molecular Contacts for Chlorosome Envelope Proteins Revealed by Cross-Linking Studies with Chlorosomes from Chlorobium tepidum*. *Biochemistry*, 45(30), 9095–9103. <https://doi.org/10.1021/bi060776y>
- [15] Eisen, J. A., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Heidelberg, J. F., Wu, M., Dodson, R. J., Deboy, R., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Durkin, A. S., Kolonay, J. L., Yang, F., Holt, I., Umayam, L. A., Mason, T., Brenner, M., . . . Fraser, C. M. (2002). *The complete genome sequence of Chlorobium tepidum TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9509–9514. <https://doi.org/10.1073/pnas.132181499>
- [16] Link, A. J., & LaBaer, J. (2009). In-Gel Trypsin Digest of Gel-Fractionated Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(2). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5110>
- [17] Hanson, T. E., Bonsu, E., Tuerk, A., Marnocha, C. L., Powell, D. H., & Chan, C. S. (2015). *Chlorobaculum tepidum growth on biogenic S(0) as the sole photosynthetic electron donor*. *Environmental Microbiology*, 18(9), 2856–2867. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12995>
- [18] Hallenbeck, P. C. (2017). *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Metabolism, Bioenergetics, and Omics* (1st ed. 2017 ed.). Springer.
- [19] Ακριβός Π. (2000). *Εργαστηριακές ασκήσεις Γενικής Χημείας*, Εκδόσεις ΖΗΤΗ
- [20] Stanier, R., & Smith, J. (1960). *The chlorophylls of green bacteria*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 41(3), 478–484. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0006-3002(60)90045-7)
- [21] Τερζάκης Σ., Τρικαλίτης Π. (2020), *Εισαγωγή στην Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης και Στοιχειακή Ανάλυση με Φασματοσκοπία Διασποράς Ενέργειας*, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας ΙΙ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- [22] Boyer, R. (2018). *Σύγχρονη Πειραματική Βιοχημεία* (3^η έκδοση). Εκδόσεις Κωσταράκη.
- [23] Clark, J. (1992). *Πειραματική Βιοχημεία*. 1^η έκδοση. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- [24] Χατζηχαραλάμπους, Χ. *Φασματομετρία μάζας και πρωτεομική ανάλυση*. Τμήμα Χημείας. Πανεπιστήμιο Κρήτης
- [25] Tamiaki, H., Tateishi, S., Nakabayashi, S., Shibata, Y., & Itoh, S. (2010). *Linearly polarized light absorption spectra of chlorosomes, light-harvesting antennas of photosynthetic green sulfur bacteria*. *Chemical Physics Letters*, 484(4–6), 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2009.12.018>
- [26] Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). *InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams*. *BMC Bioinformatics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>
- [27] Falkenby, L. G., Szymanska, M., Holkenbrink, C., Habicht, K. S., Andersen, J. S., Miller, M., & Frigaard, N. U. (2011). *Quantitative proteomics of Chlorobaculum tepidum: insights into the sulfur metabolism of a phototrophic green sulfur bacterium*. *FEMS Microbiology Letters*, 323(2), 142–150. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02370.x>
- [28] Source, C. F. X. O. A. L. (2009). *X-ray Data Book by the Center for X-Ray Optics and Light Source, Lawrence Berkeley National Laboratory* (3rd ed.). Lawrence Berkeley National Laboratory.
- [29] Jun, B. H. (2021). *Nanotechnology for Bioapplications*. Springer Publishing.

[30] Caballero, B., Finglas, P., & Toldra, F. (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd ed.). Academic Press.

[31] Skoog, D. A., Holler, J. F., & Crouch, S. R. (2014). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* (6^η έκδοση). Εκδόσεις Κωσταράκη.