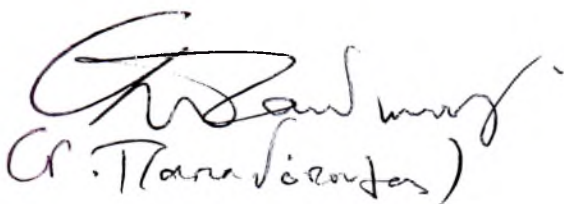


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Θέμα Διπλωματικής Εργασίας: Ο ρόλος της
εχινενόνης (echinenone) στην απόσβεση φθορισμού
συσσωματωμάτων IsiA από κυανοβακτήρια

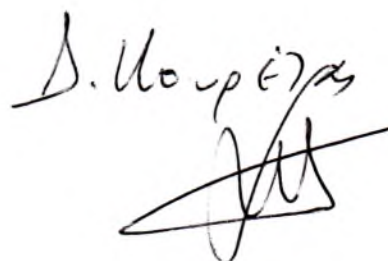
Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας: Κώστας
Τσουκάτος

Επιβλέποντες: Δρ. Γεώργιο Παπαδόπουλο με
συνεπιβλέποντες τον καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα
και την λέκτορα κυρία Μαρία Κοντού.


(Γ. Παπαδόπουλος)




(ΜΑΡΙΑ ΚΟΝΤΟΥ)


Δ. Κουρέτας



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

Αριθ. Εισ.: 7372/1
Ημερ. Εισ.: 05-10-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΤΣΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087186

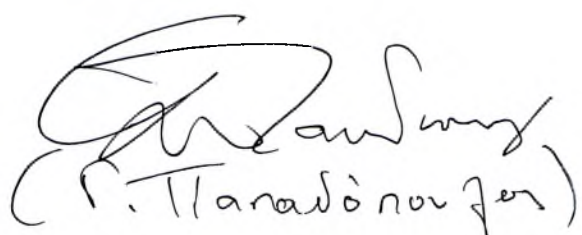
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Θέμα Διπλωματικής Εργασίας: Ο ρόλος της
εχινενόνης (echinenone) στην απόσβεση φθορισμού
συσσωματωμάτων IsiA από κυανοβακτήρια

Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας: Κώστας
Τσουκάτος

Επιβλέποντες: Δρ. Γεώργιο Παπαδόπουλο με
συνεπιβλέποντες τον καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα
και την λέκτορα κυρία Μαρία Κοντού.

Έτος 2009


(Γ. Παπαδόπουλος)



Περιεχόμενα

- 1.Εισαγωγή
Ταξινόμησης Lynn Margulis Karlene Schwartz
- 1.1 Περιγραφή της Αναπνευστικής Αλυσίδας των Κυανοβακτηρίων
Σύστημα Απορρόφησης Ηλιακής Ενέργειας Κυανοβακτηρίων (Phycobilisomes)
Φωτοσύστημα 2 (PSII)
Κυτόχρωμα b₆f
Φωτοσύστημα 1 (PSI)
Συνθετάση ATP (ATPase)
Περιγραφή της πορείας των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα
- 1.2 Σιδήρος και σημασία του για τα κυανοβακτήρια
Η έλλειψη σιδήρου και οι συνέπειες της στον μεταβολισμό των κυανοβακτηρίων
IsiA πρωτεΐνη και οι διάφορες δομές της
Καροτενοειδή και το βιοχημικό μονοπάτι παραγωγή τους στα κυανοβακτήρια
Στόχος πειράματος
- 2.Εργαστηριακό Μέρος
- 2.1 Φασματομετρία Απορρόφησης
- 2.2 Φθορισμομετρία
- 2.3 Χρωματογραφία
- 2.4 Θρεπτικό Μέσο ανάπτυξης των κυττάρων
- 2.4.1 BG –11 ως στερεό θρεπτικό μέσο
- 2.4.2 BG –11 ως υγρό θρεπτικό μέσο
Παρασκευή των 3 stock διαλυμάτων που απαιτούνται για την παρασκευή του BG –11 υγρού θρεπτικού υλικού
Παρασκευή BG-11 υγρού θρεπτικού από τα 3 stock διαλύματα
- 2.5 Από τα Crt0 *Synechocystis* PCC 6803 κύτταρα στην πρωτεΐνη IsiA
Ανάπτυξη Κυττάρων: Προπαρασκευή για τις υγρές κυτταρικές καλλιέργειες
Συνθήκες Ανάπτυξης των καλλιεργειών
Προ-καλλιέργειες
Ανάπτυξη κυττάρων χωρίς την παρουσία σιδήρου
Συλλογή των κυττάρων
Διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των κυττάρων
Θραύση των κυττάρων
Διαλυτοποίηση των μεμβρανών και απομόνωση των συμπλοκών τους
Ανάλυση των Χρωστικών Ουσιών
Μετρήσεις Φθορισμού
- 3.Αποτελέσματα
- 3.1 Φάσμα Απορρόφησης psaFJ κυττάρων σε θερμοκρασία δωματίου
- 3.2 Φάσματα φθορισμού σε θερμοκρασία 77K απομονωμένων συμπλοκών IsiA, και κυττάρων crtO *Synechocystis* 6803 υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου για 3, 7 και 40 μέρες
- 3.3 HPLC Ανάλυση
- 3.4 Φάσμα εκπομπής φθορισμού σε θερμοκρασία 5K από απομονωμένη πρωτεΐνη IsiA από crtO και psaFJ κύτταρα

- 3.5 Εκπομπή φθορισμού σε διάφορες θερμοκρασίες. πρωτεΐνη IsiA από crtO και psaFJ κύτταρα
- 3.6 Συγκριτικό διάγραμμα η παραγωγή ενέργειας φθορισμού από απομονωμένη IsiA και από τους 2 τύπους κυττάρων
- 4.Συζήτηση
- 5.Βιβλιογραφία

1. Εισαγωγή

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι μπορούν να ταξινομηθούν βάση διάφορων κριτηρίων. Χρησιμοποιώντας την προηγμένη γνώση στους τομείς της μοριακής βιολογίας και της γενετικής, τα βακτήρια μπορούν να ταξινομηθούν με τέτοιο τρόπο, ώστε να μπορούν να απεικονίζονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ τους. Οι Lynn Margulis και Karlene Schwartz εισήγαγαν ένα τέτοιο είδος ταξινόμησης, σύμφωνα με το οποίο όλα τα είδη ταξινομούνται σε πέντε βασιλεια, ένα εκ των οποίων είναι το βασίλειο των βακτηρίων. Αυτό το βασίλειο ανήκει στο υπερβασίλειο των προκαρυωτων και διαιρείται σε δύο υποβασιλεια, των αρχαίων και των ευβακτηρίων. Εδώ παρουσιάζονται τα φύλλα που ανήκουν σε κάθε υποβασίλειο:

Υποβασίλειο Αργαίων

Φύλλο 1 *Euryarchaeota* – παράγουν μεθάνιο και αναπτύσσονται σε περιβάλλον με άλατα

Φύλλο 2 *Crenarchaeota* – αναπτύσσονται σε όξινο περιβάλλον

Υποβασίλειο Ευβακτηρίων

Φύλλο 3 *Proteobacteria* – πορφυρά βακτήρια

Φύλλο 4 *Spirochaetae* – σπироχέτες (συμβιωτικά βακτήρια)

Φύλλο 5 *Cyanobacteria* – βακτήρια που παράγουν ενέργεια μέσω φωτοσύνθεσης

Φύλλο 6 *Saprospirae* – βακτήρια που κινούνται σε γλοιώδη επιφάνεια που παράγεται

από τα ίδια τα βακτήρια και παράγουν ενέργεια από ενζυμική ζύμωση

Φύλλο 7 *Chloroflexa* – πράσινα αυτότροφα που αναπτύσσονται σε περιβάλλον άνευ θείου

Φύλλο 8 *Chlorobia* – πράσινα αυτότροφα που αναπτύσσονται σε περιβάλλον με θείο

Φύλλο 9 *Aphragmabacteria* – βακτήρια με ελλιπή βακτηριακά τοιχωμάτων

Φύλλο 10 *Endospora* – βάκιλοι και παρόμοιες μορφές ενδοσπορίων

Φύλλο 11 *Pirellulae* – συμβιωτικά βακτήρια που εντοπίζονται στα τοιχώματα μίσχων

Φύλλο 12 *Actinobacteria* – μύκητες – παρόμοιοι οργανισμοί όπως τα βακτήρια

Φύλλο 13 *Deinococci* – ανθεκτικά στη ραδιενέργεια, μικρά σφαιρικής μορφής βακτήρια

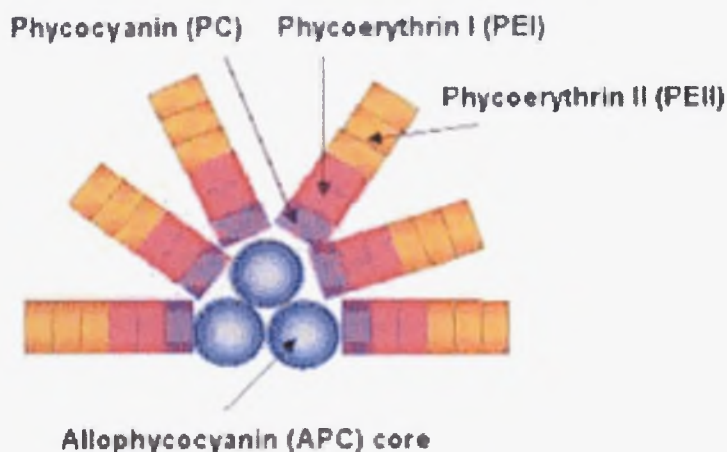
Φύλλο 14 *Thermotogae* – ενζυμικά θερμοφιλά

Τα κυανοβακτήρια ανήκουν στο υποβασίλειο των ευβακτηρίων, είναι άφθονα στους θαλάσσιους και υγρούς βιότοπους και έχουν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουν φωτοσύνθεση. Κατά τη φωτοσύνθεση χρησιμοποιείται η ηλιακή ενέργεια, ούτως ώστε να επέρχεται οξείδωση του νερού, προκειμένου να παραχθούν τα ηλεκτρόνια που μπορούν τελικά να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή υδατανθράκων. Περισσότερο από το μισό της πρωτογενούς παραγωγής παράγεται από τα κυανοβακτήρια και αυτός είναι ένας από τους λόγους που είναι τόσο σημαντικά. Άλλοι οργανισμοί που έχουν τη δυνατότητα της εκτέλεσης της αερόβιας φωτοσύνθεσης είναι τα ανώτερα φυτά και τα φύκη.

1.1 Η Αναπνευστική Αλυσίδα των Κυανοβακτηρίων

Επειδή τα κυανοβακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, όπως είναι αναμενόμενο έχουν φυσιολογικές διαφορές σε σύγκριση με τα ευκαριωτικά κύτταρα που επίσης πραγματοποιούν αερόβια φωτοσύνθεση (πχ. φυτά). Το γεγονός αυτό οδηγεί σε διαφοροποιήσεις ως προς τη δομή και λειτουργία των τμημάτων που απαρτίζουν το φωτοσυνθετικό σύστημα. Στα κυανοβακτήρια δεν υπάρχουν χλωροπλάστες, αλλά η

θυλακοειδής μεμβράνη, επέκταση της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου η οποία και εκτίθεται άμεσα στο κυτταρόπλασμα. Οι μεμβράνες αυτές κατανέμονται ανά ζεύγη εντός του κυττάρου δημιουργώντας δύο κυτταρικά διαμερίσματα: το πρώτο είναι η εσωτερική περιοχή των θυλακοειδών μεμβρανών που καλείται στρώμα και ένα δεύτερο το λούμεν. Μια επιπρόσθετη διαφορά είναι το σύστημα συγκομιδής της ηλιακής ενέργειας των κυανοβακτηρίων, το οποίο αποτελείται από μια ομάδα πολυπεπτιδίων (phycobiliproteins)



Εικόνα 1 : Σύστημα συγκομιδής ηλιακής ενέργειας των κυανοβακτηρίων. Παρουσιάζονται οι 2 κύριες δομές και τα 3 κύρια είδη πρωτεϊνών που το αποτελούν (PC, PE, AP)

που διαμορφώνει τη δομή των phycobilisome (PBS). Στην εικόνα1 παρατίθεται η δομή του και οι βασικές υπομονάδες που το αποτελούν. Τα phycobilisome είναι χαρακτηριστικά συνδεδεμένα με τη στρωματική επιφάνεια της θυλακοειδούς μεμβράνης. Οι σημαντικότερες κατηγορίες πρωτεϊνών που απαρτίζουν τα PBS είναι η phycoerythrin (PE), η phycocyanin (PC) και η allophycocyanin (AP). Κάθε phycobiliprotein συντίθεται από δύο διαφορετικές υπομονάδες, τις α και β. Η υπομονάδα α έχει μοριακή μάζα του 15 έως 20 kDa και β έχει μοριακή μάζα μεταξύ 17 έως 22 kDa. Μελέτες οι

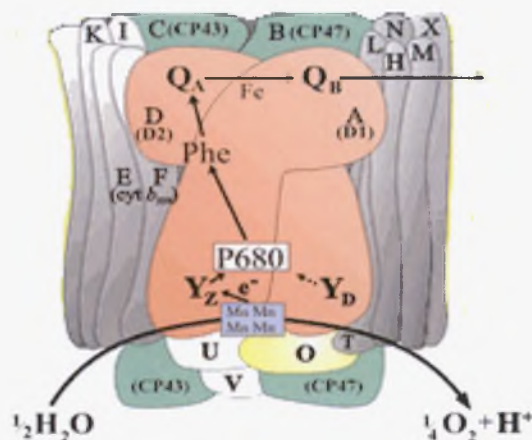
οποίες διεξήχθησαν για να εξακριβωθεί η δομή των PSB έδειξαν ότι αποτελούνται από τριμερή $(\alpha\beta)_3$ και εξαμερή $(\alpha\beta)_6$, ενώ η αρχιτεκτονική της πρωτεΐνης μπορεί να διαιρεθεί σε δύο περιοχές. Ο πυρήνας που συνίσταται από τρεις δομές σε σχήμα δακτυλίου οργανωμένες έτσι ώστε να σχηματίζουν τρίγωνο και μια δεύτερη περιοχή που αποτελείται από έξι ελικοειδείς δομές που ξεκινούν από τον πυρήνα. Και οι δύο δομές τους αποτελούνται από συσσωματώματα εξαμερών phycobiliprotein. Επιπλέον στο PSB εκτός από τις τρεις κύριες κατηγορίες πρωτεϊνών συναντώνται επίσης και συνδεδετικά πολυπεπτιδία, τα οποία αποτελούν μέχρι και το 15% της συνολικής πρωτεΐνης του PSB. Αυτές οι πρωτεΐνες συνδέονται έντονα με τα εξαμερή, ώστε να ενισχύεται η δομική σταθερότητα του σχηματισμού phycobiliprotein ενώ τροποποιούν και την απορρόφησή τους. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυπεπτιδικών συνδεδετικών πρωτεϊνών και των phycobiliproteins έχουν σαν συνέπεια την ιδιαίτερα αποδοτική μεταφορά της ενέργειας ανάμεσα στις πρωτεΐνες των PSB καθώς επίσης και από το PSB προς τα κέντρα αντίδρασης και των δύο φωτοσυστημάτων. Η αποδοτικότητα της ενεργειακής μεταφοράς στα κέντρα αντιδράσεων μπορεί να φτάσει μέχρι και το 95%. Επιπλέον στα

Χρωμοφόρα	Phycobiliviolin	Phycoerythrobilin	Phycourobilin	Phycocyanobilin
λ μεγίστου απορρόφησης	568 nm	535-567 nm	498 nm	590-670 nm

phycobiliproteins είναι συνδεδεμένες και χρωμοφόρα. Στον πίνακα.1 παρουσιάζονται τα χρωμοφόρα που συνδέονται στις phycobiliproteins και το μήκος κύματος του μεγίστου απορρόφησης.

Γενικά η πορεία που ακολουθεί η απορροφούμενη ηλιακή ενέργεια είναι: AP → PC → PE → χλωροφύλλη που είναι συνδεδεμένη στις φωτοσυνθετικές μεμβράνες. [1.2]

Το φωτοσυνθετικό σύστημα βρίσκεται στη θυλακοειδή μεμβράνη και αποτελείται από το φωτοσύστημα 2 (PSII), το κυτόχρωμα b6f, το φωτοσύστημα 1 (PSI) και μια

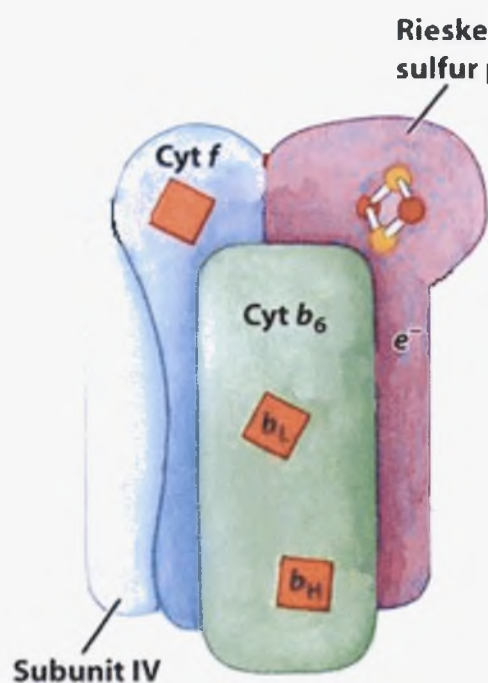


Εικόνα 2 Φωτοσυστήματος 2 (PSII). Είναι το πρωτεϊνικό σύμπλοκο παροχής των e^- που εισάγονται στην αναπνευστική αλυσίδα. Εδώ παρουσιάζονται οι κύριες υπομονάδες του καθώς επίσης και το σύμπλοκο παραγωγής ηλεκτρονίων που έχει ως υπόστρωμα το νερό.

συνθετάση ATP (ATPase). Το PSII (εικόνα 2) είναι ένα από τα δύο διαμεμβρανικά πρωτεϊνικά συγκροτήματα της αερόβιας φωτοσύνθεσης που βρίσκονται στη θυλακοειδή μεμβράνη και στην απεικονίζεται η δομή του. Η κύρια λειτουργία του PSII είναι η φωτοοξείδωση του νερού. Η δομή του PSII, όπως περιγράφεται και από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτινών X, περιέχει 19 πρωτεϊνικές υπομονάδες, 7 καροτενοειδή, 2 ομάδες αίμης (hemes), μια ομάδα αίμης χωρίς σίδηρο, δύο φαιοφιδίνες, και 36 χλωροφύλλες. Κεντρικά ως προς τη δομή του PSII βρίσκονται οι πρωτεΐνες D2 και D1 δεσμεύοντας από ένα μόριο φαιοφυτίνης η κάθε μια και διαμορφώνοντας τις περιοχές δέσμευσης QA και QB, αντίστοιχα. Επιπλέον, και οι 2 πρωτεΐνες D1 και D2 συμμετέχουν στην διάταξη της χλωροφύλλης στην καρδιά του PSII.

Το ενεργό κέντρο Mn4-Ca-Cl που καταλύει την οξείδωση νερού από την πλευρά όπου χορηγούνται τα e^- συντονίζεται από αμινοξέα των D1 και CP43 πρωτεϊνών. Η πλευρά του PSII από όπου χορηγούνται τα e^- σταθεροποιείται από πέντε τουλάχιστον εξωγενείς πρωτεΐνες. Τέλος το κυτόχρωμα β-559 είναι ένα ετεροδιμερές δύο πολυπεπτιδίων δεσμεύοντας μια ομάδα αίμης που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα και προστασία του PSII από τη φωτοοξείδωση. [3, 4]

Το κυτόχρωμα b_6f (εικόνα 3) είναι ο συνδετικός κρίκος στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το PSII προς το PSI κατά την αντίδραση της αερόβιας φωτοσύνθεσης για την παραγωγή ATP δημιουργώντας μια ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων ανάμεσα στις μεμβράνες. Η δομή του κυτοχρώματος b_6f συγκροτείται από τέσσερις υπομονάδες: το κυτόχρωμα b_6 που περιλαμβάνει δύο πρωτεΐνες αίμης, χαμηλής και υψηλής δυναμότητας αντίστοιχα (b_L και b_H), το κυτόχρωμα f με συνδεδεμένη μια



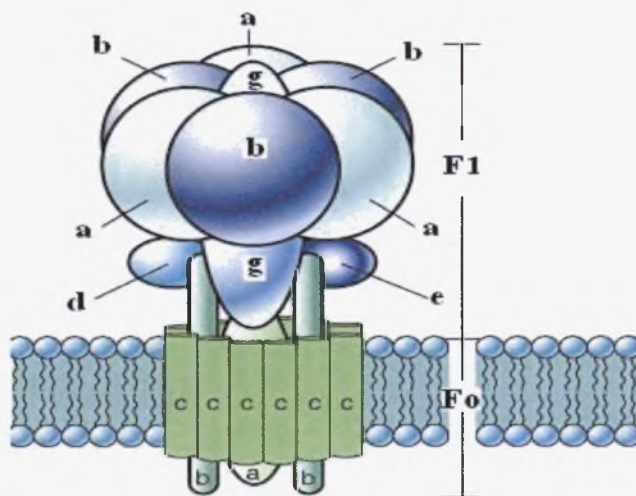
προσθετική ομάδα χαλκού (cu), την πρωτεΐνη σιδήρου-θείου Rieske (ISP) που περιέχει στο ενεργό κέντρο της $[Fe_2S_2]$ και την υπομονάδα IV (πρωτεΐνη 17 kDa). Η μεταφορά ηλεκτρονίων από το b_6f πρωτεϊνικό σύμπλοκο ξεκινά με την οξείδωση της πλαστοκινόνης και την παράλληλη αναγωγή της πλαστοκυανίνης ή του κυτοχρώματος c_6 . Το ηλεκτρόνιο που προέρχεται από την πλαστοκινόνη (PQH₂) εισέρχεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που αποτελείται από την σιδηρο-θειο-πρωτεΐνη Rieske και το κυτόχρωμα f , οδηγώντας δύο πρωτόνια στην απελευθέρωσή τους στο μονάδα λούμεν. Η πλαστοκυανίνη στη συνέχεια απελευθερώνεται μεταφέροντας ηλεκτρόνια στο PSI. Ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο που επίσης προέρχεται από την οξειδωμένη πλαστοκινόνη μεταφέρεται μέσω των δύο πρωτεϊνών αίμης, Cyt_bL και Cyt_bH (χαμηλού L και υψηλού δυναμικού αντίστοιχα), στο κυτόχρωμα b_6 και λαμβάνεται στην ηλεκτροαρνητική πλευρά της μεμβράνης, όπου επανεισέρχεται τελικά στον κύκλο. Τα πρωτόνια που

Εικόνα 3: Κυτόχρωμα b_6f . Είναι το πρωτεϊνικό σύμπλοκο που δημιουργεί την ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων. Παρουσιάζονται οι βασικές υπομονάδες της, το κυτόχρωμα f , η πρωτεΐνη Rieske, το κυτόχρωμα b_6 και η υπομονάδα IV.

απελευθερώνονται στο λούμεν δημιουργούν μια ηλεκτροχημική βαθμίδα πρωτονίων που χρησιμοποιείται για την τροφοδότηση της παραγωγής ATP μέσω της ATP συνθετάσης, ώστε να παράγουν ενέργεια για τις κυτταρικές μεταβολικές διεργασίες και για τη μετατροπή το CO_2 σε σάκχαρο μέσω του κύκλου του Calvin. [5]

Το PSI είναι το διαμεμβρανικό-πρωτεϊνικό συγκρότημα που καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την ανηγμένη πλαστοκυανίνη (ή το κυτόχρωμα c_6) προς την οξειδωμένη φεροδοξίνη (ή φλαβοδοξίνη). Ο πυρήνας του PSI αποτελείται από τις υπομονάδες PsaA και PsaB, στις οποίες είναι συνδεδεμένα 100 περίπου μόρια χλωροφύλλης a , 10 έως 12 β -καροτένια, την παροχή ηλεκτρονίων P700, και την αλυσίδα αποδεκτών ηλεκτρονίων (A0, A1, και FX). Στα κυανοβακτήρια το PSI εκτός από τις πυρηνικές πρωτεΐνες του περιέχει επιπλέον 9 μικρές υπομονάδες. Η υπομονάδα PsaC είναι συνδεδεμένη με δύο υποδοχείς ηλεκτρονίων FA και FB, οι οποίοι περιέχουν και οι

δύο στο ενεργό κέντρο τους μια προσθετική ομάδα [4Fe-4S]. Η υπομονάδα PsaD παρέχει μια πολύ σημαντική περιοχή δέσμευσης της φεροδοξίνης από την πλευρά όπου ανάγεται το PSI, παρέχοντας σταθερότητα ως προς το χώρο που καταλαμβάνουν οι υπομονάδες PsaC και PsaE στο σύμπλοκο το PSI. Η υπομονάδα PsaE παίρνει μέρος στην δέσμευση της φεροδοξίνης και στην κυκλική ροή ηλεκτρονίων στο PSI. Η υπομονάδα PsaF παρέχει μέρος της περιοχής δέσμευσης της πλαστοκυανίνης στο PSI των φυτών, αλλά όχι στο κυανοβακτηριακό. Η υπομονάδα PsaL είναι σημαντική για τον σχηματισμό τριμερών PSI στα κυανοβακτήρια. Οι υπομονάδες PsaI and PsaJ απαιτούνται για την σωστή οργάνωση των υπομονάδων PsaL και PsaF αντίστοιχα. Απουσία της υπομονάδας PsaM σε μεταλλαγμένα κυανοβακτήρια προκαλεί ανεπάρκεια ως προς την ανάπτυξη τους σε υψηλή ένταση φωτός και επηρεάζει την σταθερότητα της PsaD υπομονάδας. Ο ρόλος της PsaK υπομονάδας δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Το σύμπλεγμα του PSI έχει σχήμα επίμηκες με περιοχές τοπικής συμμετρίας. Οι υπομονάδες PsaC, PsaD και PsaE είναι οι περιφερειακές υπομονάδες τοποθετημένες στην κυτταροπλασματική πλευρά της φωτοσυνθετικής μεμβράνης με την PsaC υπομονάδα να βρίσκεται στο κέντρο του άξονα συμμετρίας κάθε μονομερούς PSI. Οι πρόσφατες κρυσταλλικές μελέτες που διεξήχθησαν στο PSI έδειξαν τον χώρο στον οποίο βρίσκεται το καταλυτικό κέντρο [4Fe-4S] των πρωτεϊνών FX, FA, and FB, τα 71 μόρια χλωροφύλλης α, οι 31 διαμεμβρανικές α-έλικες καθώς επίσης 9 επιφανειακές και 3 στρωματικές α-έλικες. Το μονομερές PSI αποτελείται από την “καταλυτική” και μια μικρότερη σε έκταση “συνδετική” περιοχή, η οποία συνδέει τα μονομερή ώστε να δημιουργήσουν ένα τριμερές PSI. Η συνδετική περιοχή εμπεριέχει τρεις διαμεμβρανικές έλικες οι οποίες ανήκουν στις PsaL και PsaI υπομονάδες. Οι υπόλοιπες έλικες ανήκουν στον πυρήνα του PSI και άλλων υπομονάδων της καταλυτικής περιοχής. Οι 22 διαμεμβρανικές και 8 περιφερειακές έλικες στην



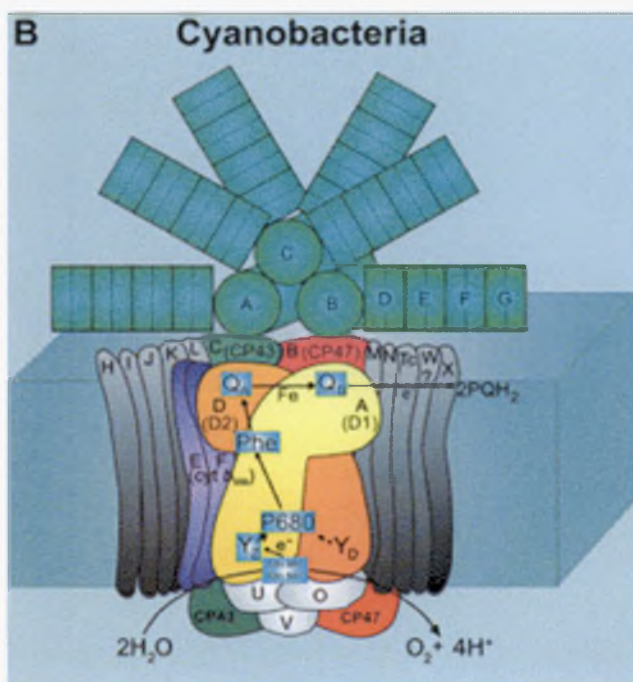
Εικόνα 4: Συνθετάση του ATP. Είναι το πρωτεϊνικό σύμπλοκο παραγωγής ATP που χρησιμοποιεί ως ενέργεια την πρωτονιακή βαθμίδωση. Τα 2 κύρια μέρη της είναι τα F_1 και F_0 με κύριες υπομονάδες τις a , b , d , e και g .

καταλυτική περιοχή είναι συμμετρικά οργανωμένες. [4, 5, 6]

Η συνθετάση του ATP (εικόνα 4) καταλύει την παραγωγή ATP από ADP και φώσφορο μια διαδικασία η οποία οδηγείται από την ηλεκτροχημική βαθμίδα των πρωτονίων και τη ροή αυτών διαμέσου της μεμβράνης. Η ροή πρωτονίων έχει κατεύθυνση από την θετικά φορτισμένη (υψηλή συγκέντρωση πρωτονίων) προς την αρνητικά φορτισμένη πλευρά. Η αντίδραση, η οποία καταλύεται από την ATPase, είναι πλήρως αναστρέψιμη, ώστε η υδρόλυση του ATP να παράγει μια αντίστροφη ηλεκτροχημική βαθμίδα πρωτονίων. Η αντίδραση που καταλύεται από την ATPase περιγράφεται από την εξίσωση: $ADP + P_i + nH^+_p \rightleftharpoons ATP + nH^+_N$. Η δομή της ATPase μπορεί

να χωριστεί σε δύο τμήματα, F_1 και F_0 . Το F_1 είναι το διαλυτό τμήμα της ATPase και περιέχει 5 υπομονάδες σε στοιχειομετρία 3a:3b:1g:1d:1e. Οι τρεις περιοχές δέσμησης του υποστρώματος βρίσκονται στις b-υπομονάδες. Η ρυθμιστική περιοχή εντοπίζεται στις a-υπομονάδες, που λειτουργούν ως επιπρόσθετη περιοχή δέσμησης των νουκλεοτιδίων αδενίνης. Το τμήμα F_1 καταλύει την αντίδραση υδρόλυσης του ATP, αλλά όχι την παραγωγή του. Το δεύτερο τμήμα που απαρτίζει την ATPase είναι το F_0 . Αποτελείται από 3 υπομονάδες τις a, b και c με στοιχειομετρία 1:2:9-12. Οι c-υπομονάδες έχουν υδρόφοβο χαρακτήρα δημιουργώντας το μοτίβο έλικας-στροφής-έλικας που διαπερνά την μεμβράνη 2 φορές, με τον υδρόφιλο βρόγχο στην πλευρά σύνδεσης της F_1 . Επίσης υπάρχει και ένα συντηρημένο όξινο υπόλειμμα έξω από την μεμβράνη στον c-τελικό έλικα. Στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων εκτός από τα 3 κύρια πρωτεϊνικά σύμπλοκα που περιγράφηκαν, είναι επίσης παρόν και τρεις κινούμενοι φορείς ηλεκτρονίων; η πλαστοκινίνη η οποία μεταφέρει ηλεκτρόνια από το PSII στο κυτόχρωμα b6, η πλαστοκυανίνη η οποία μεταφέρει ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c6 στο PSI και η φεροδοξίνη η οποία μεταφέρει ηλεκτρόνια από το PSI στην αναγωγή του NAPH. [7].

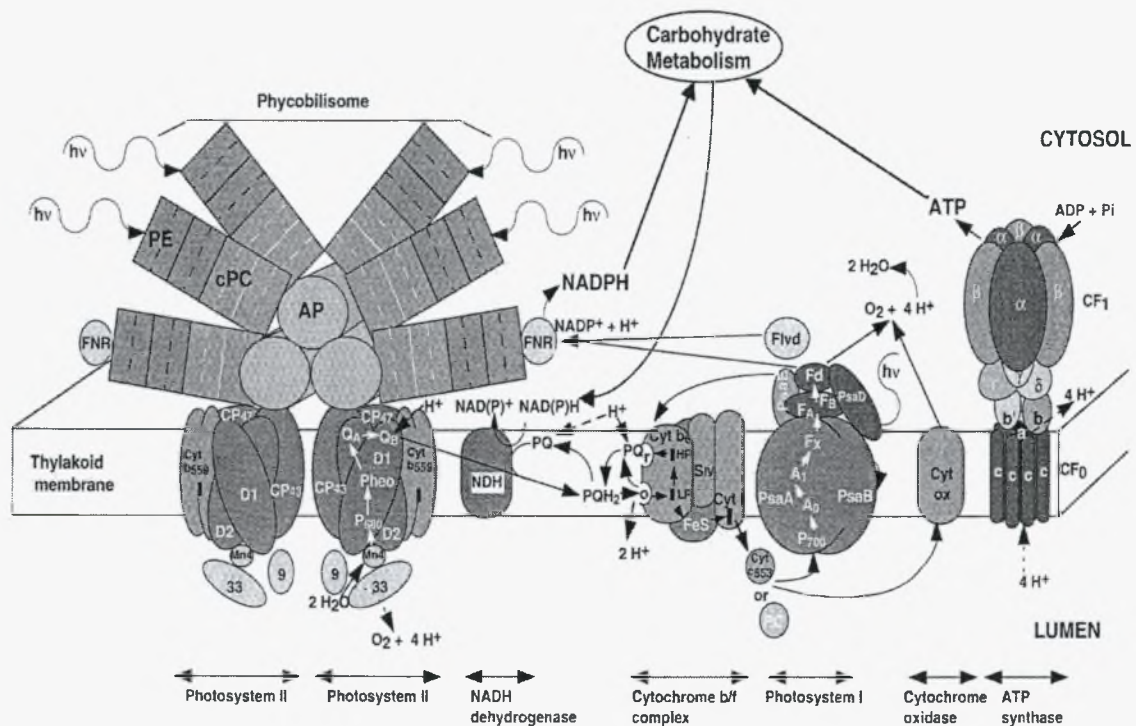
Στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς η διαδικασία της φωτοσύνθεσης ξεκινά με την απορρόφηση του φωτός. Στα κυανοβακτήρια η απορρόφηση του φωτός



Εικόνα 5: Παρουσιάζει την αλληλεπίδραση του συστήματος συγκομιδής ηλιακής ενέργειας των κυανοβακτηρίων (rhycobilisomes) με το PSII καθώς επίσης και την πορεία των e^- που προέρχονται από το νερό.

πραγματοποιείται από τα rhycobilisomes. Όλες οι πρωτεΐνες των rhycobilisomes απορροφούν άμεσα το φως, αλλά επιπλέον συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ενέργειας εντός των ιδίων: φυκοερυθρίνη -> φυκοκυανίνη-> αλλοφυκοκυανίνη-> στην χλωροφύλλη a των κέντρων αντίδρασης των PSI και PSII. Μετά την μεταφορά της ενέργειας του φωτός μεταφέρεται στο PSII (εικόνα 5) τα ηλεκτρόνια στην πλαστοκινίνη μέσω μιας σειράς από οξειδοαναγωγικούς συμπαράγοντες. Από την πλευρά αποδοχής ηλεκτρονίων, η φαιοφυτίνη προσλαμβάνει 1 ηλεκτρόνιο από τη χλωροφύλλη που βρίσκεται στο κέντρο αντίδρασης του PSII. Το ηλεκτρόνιο στην συνέχεια μεταφέρεται στην QA και τελικά στην QB κινίνη. Από την πλευρά του PSII από όπου προσφέρονται τα ηλεκτρόνια, το οξειδωμένο PSII αποσπά 1 ηλεκτρόνιο από την D1-Yz τυροσίνη, η οποία αποσπά 1 ηλεκτρόνιο με τη σειρά της από το

σύμπλεγμα μαγγανίου. Κάθε κύκλος αντίδρασης απαιτεί την απορρόφηση 4 φωτονίων ώστε να ολοκληρώσει την οξείδωση 2 μορίων νερού, την παραγωγή ενός μορίου οξυγόνου και την αναγωγή των 2 πλαστοκινονών. Στην συνέχεια τα ηλεκτρόνια περνούν στο σύμπλεγμα του κυτοχρώματος b6f. Το κυτόχρωμα b6f είναι μέρος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων από το PSI στο PSII κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης. Για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά αυτή η πρωτεΐνη είναι επιφορτισμένη με το να οξειδώνει την πλαστοκινόνη και να ανάγει την πλαστοκυανίνη ή το κυτόχρωμα c6. Το κυτόχρωμα b6f μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο από την ανηγμένη πλαστοκινόνη (PQH2) μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που αποτελείται από την πρωτεΐνη Rieske και το κυτόχρωμα f, διαδικασία που οδηγεί στην απελευθέρωση 2 πρωτονίων στο lumen. Στη συνέχεια η πλαστοκυανίνη απελευθερώνεται και μεταφέρει ηλεκτρόνια στο PSI. Το δεύτερο ηλεκτρόνιο από την ανηγμένη πλαστοκινόνη (PQH2) μεταφέρεται από δύο πρωτεΐνες αίμης, CytbL και CytbH (χαμηλού L και υψηλού δυναμικού H αντίστοιχα), στο κυτόχρωμα b6 συνεχίζοντας στην ηλεκτραρνητική πλευρά της μεμβράνης από όπου τελικά επανεισέρχεται στον κύκλο, που είναι γνωστός ως κύκλος Q. Στο PSI η ενέργεια απορροφάται από ζεύγη χλωροφύλλης a στο κέντρο αντίδρασης του, που έχει σαν αποτέλεσμα την διέγερση τους και μετάβαση τους σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Από εκεί τα ηλεκτρόνια περνάνε στο σύμπλεγμα FeS₄, στη συνέχεια στη φερεδοξίνη και τελικά στη αναγωγή του NADPH. Εφόσον η αναγωγή του NADPH έχει αναχθεί από τα δύο ηλεκτρόνια αυτά μεταφέρονται στο NADP⁺ ανάγοντας το σε NADPH. Η διαδικασία κατά την οποία το PSII λειτουργεί με το PSI και 2 σειρές ενζύμων ενσωματωμένων στη θυλακοειδή μεμβράνη ώστε να μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια σε ενέργεια αποθηκευμένη σε χημικούς δεσμούς και ηλεκτροχημικές βαθμίδες, την οποία το βακτήριο μπορεί να χρησιμοποιήσει σε περαιτέρω διεργασίες, ονομάζεται μη κυκλική φωσφορυλίωση. Από την άλλη πλευρά αν παράγεται πολύ μικρή ποσότητα ATP συγκριτικά με το NADP, ακολουθείται ένα εναλλακτικό μονοπάτι όπου το ηλεκτρόνιο παίρνεται από την φερεδοξίνη του PSI μετακινώντας το στην πλαστοκινόνη του PSII αντί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας NADPH. Όταν το ενεργό κέντρο P700 του PSI δεχτεί το διεγερμένο ηλεκτρόνιο, στην συνέχεια αυτό κινείται σε μια σειρά από ένζυμα που συνδέονται με αντιδράσεις οξειδαναγωγής (περνώντας από ένα μόριο σε ένα δεύτερο με μεγαλύτερη συγγένεια για τα ηλεκτρόνια) με παράλληλη μεταφορά πρωτονίων από το στρώμα στον θυλακοειδή χώρο. Αυτό προκαλεί μια ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων. Ο μόνος τρόπος ώστε τα πρωτόνια να περάσουν πάλι πίσω στο χώρο του στρώματος είναι διαμέσου της ATPase. Η ATPase με τη σειρά της καταλύει την αντίδραση φωσφορυλίωσης του ADP σε ATP καθώς τα πρωτόνια περνούν διαμέσου αυτής. Με το πέρασμα των ηλεκτρονίων από ένζυμο σε ένζυμο χάνουν την ενέργεια διέγερσης τους και επιστρέφουν στο φωτοσύστημα από το ένζυμο πλαστοκυανίνη για να ολοκληρώσουν τον κύκλο τους και να μπορούν να τον επαναλάβουν από την αρχή. Η διαδικασία αυτή καλείται κυκλική φωσφορυλίωση. Στην εικόνα. 6 που ακολουθεί συνοψίζονται συνολικά όλες οι διεργασίες που πραγματοποιούνται κατά τη πορεία της αναπνευστικής αλυσίδας.[4, 8]



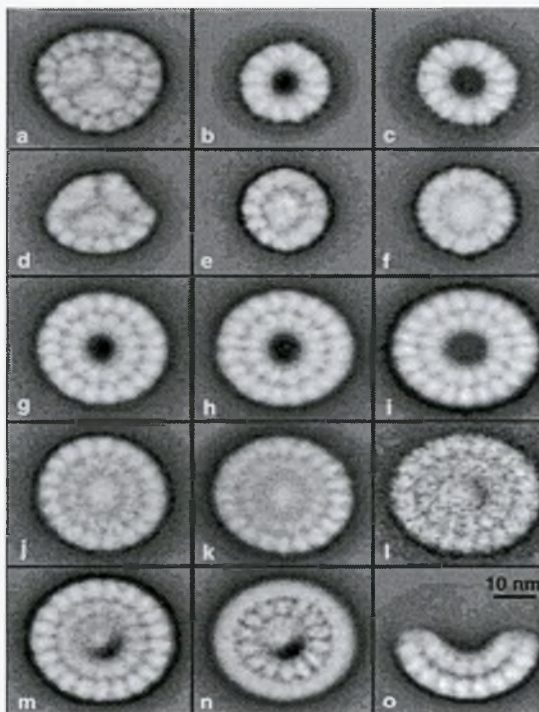
Εικόνα 6: Στην εικόνα παρουσιάζεται συνολικά η αναπνευστική αλυσίδα των κυανοβακτηρίων και η πορεία των ηλεκτρονίων κατά μήκος αυτής.

1.2 Σημασία του σιδήρου για τα κυανοβακτήρια

Ο σίδηρος είναι ένα πολύ σημαντικό στοιχείο για τις φωτοσυνθετικές πρωτεΐνες, αφού απαιτούνται από 22 έως 23 άτομα σιδήρου ώστε να σχηματιστεί ένα πλήρως λειτουργικό φωτοσυνθετικό σύστημα. Το PSII χρειάζεται 3 άτομα σιδήρου, το σύμπλοκο του cyt_{b6/f} 5, η πλαστοκυανίνη 1, το PSI 12 και η φερεδοξίνη 2. Εντούτοις, σε υδατικό περιβάλλον ο σίδηρος δεν είναι τόσο άφθονος και αυτό συμβαίνει διότι ο σίδηρος υπό τη μορφή Fe⁺² γρήγορα οξειδώνεται σε Fe⁺³, η οποία μορφή σε φυσιολογικό pH δημιουργεί αδιάλυτα υδροξείδια. Αυτό έχει ως συνέπεια ο σίδηρος να μην είναι προσβάσιμος υπό τη μορφή αυτή για τα κυανοβακτήρια και να δημιουργούνται συνθήκες στρες σε αυτά. Έτσι παράγονται μειωμένες ποσότητες φυκοκυανίνης, χλωροφύλλης και το ίδιο ισχύει και για τα phycobilisomes. Επιπλέον τα υπόλοιπα μέρη του φωτοσυνθετικού συστήματος που περιέχουν και αυτά σίδηρο όπως το κυτόχρωμα b-559 του PSII, το κυτόχρωμα b και f του κυτοχρώματος b_{6f} συμπλέγματος και όλα τα ενεργά κέντρα που περιέχουν Fe-S (ιδιαίτερα αυτό του PSI) παρουσιάζουν μείωση λόγω της απουσίας σιδήρου.[9]

Ωστόσο τα κυανοβακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να επιβιώνουν κάτω από τέτοιες συνθήκες. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς είναι η αύξηση της

παραγωγής των σιδηροφόρων, οι οποίες είναι πρωτεΐνες που διαλυτοποιούν τον σίδηρο μέσω της δέσμευσης του σε αυτές. Αυτά τα συμπλέγματα σιδήρου-πρωτεΐνης είναι συνδεδεμένα με συγκεκριμένους υποδοχείς στην εξωτερική πλευρά της βακτηριακής μεμβράνης και στην συνέχεια εισέρχονται στην κυτταροπλασματική πλευρά αυτής μέσω μεταφορικών πρωτεϊνών. Επιπροσθέτως τα κυανοβακτήρια μειώνουν τις ανάγκες τους σε σίδηρο με αντικατάσταση των πρωτεϊνών που τον χρειάζονται ή τον περιέχουν. Για παράδειγμα η φερεδοξίνη η οποία περιέχει ένα σύμπλεγμα σιδήρου-θείου αντικαθίσταται από τον κινητό φορέα ηλεκτρονίων φλαβοδοξίνη. Το γονίδιο της φλαβοδοξίνης καλείται *isiB* και είναι το δεύτερο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης στο οπερόνιο του οποίου η έκφραση είναι στενά συνδεδεμένη από το σίδηρο. Το πρώτο γονίδιο του οπερονίου είναι η *isiA*, η οποία κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την πρωτεΐνη CP43 του PSII. Η *IsiA* είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 37 kDa, η οποία διαθέτει 6 διαμεμβρανικές έλικες. Οι ομοιότητες μεταξύ της *IsiA* και της CP43 μπορεί να υποδεικνύει ότι έχουν παρόμοιες λειτουργίες. Όλες οι υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης CP43 είναι συντηρημένες στο γονίδιο της *isiA*, το οποίο υποδηλώνει παρόμοιο τρόπο με τον οποίο η πρωτεΐνη διαπερνά τη μεμβράνη. Επιπλέον η συντήρηση των αμινοξέων ιστιδίνης δείχνει παρόμοια δυνατότητα δέσμευσης της χλωροφύλλης με την πρωτεΐνη *IsiA* να είναι ικανή να δεσμεύσει 12 μόρια χλωροφύλλης. Η πιο σημαντική διαφορά είναι η έλλειψη 100 περίπου αμινοξέων από την πρωτεΐνη *IsiA* σε σχέση με τη CP43, η οποία έχει ως συνέπεια την απουσία του πέμπτου υδρόφιλου βρόγχου. Για αυτό το λόγο η *IsiA* πρωτεΐνη αποτελείται από 342 αμινοξέα, ενώ η πρωτεΐνη CP43 από 472. Η έκφραση του οπερονίου αυτού ελέγχεται από μία πρωτεΐνη καταστολέα, η οποία συνδέεται σε μια εξειδικευμένη αλληλουχία του προαγωγέα, τον χειριστή, μη επιτρέποντας τη μεταγραφή του γονιδίου παρουσία σιδήρου. [9]



Εικόνα 7: Οι διάφορες δομές της IsiA. Συνδεδεμένη σε τριμερές PSI (a,d) μονομερές PSI (e,j,k,l,m,n) και σε ελεύθερη μορφή (g,h,i,o)

Από μελέτες που έχουν είδη διεξαχθεί έχουν προταθεί τουλάχιστον τρεις λειτουργίες για την πρωτεΐνη *IsiA*. Καταρχήν λειτουργεί ως αποθήκη της χλωροφύλλης υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου, ως σύστημα απορρόφησης φωτός για το PSI και τέλος προστατεύει το PSII από την οξείδωση με τη σκίαση αυτού. Αυτές οι τρεις λειτουργίες είναι πολύ σημαντικές, ιδιαίτερα υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου, αφού επιτρέπει στα κύτταρα να αυξάνονται παρά την απώλεια σημαντικών πρωτεϊνικών συστημάτων. Η δομική ανάλυση της *IsiA* έδειξε ότι μπορεί να δημιουργεί δακτύλιο από 18 μονομερή της πρωτεΐνης γύρω από το τριμερές PSI $(PSI)_3(IsiA)_{18}$, δομή η οποία

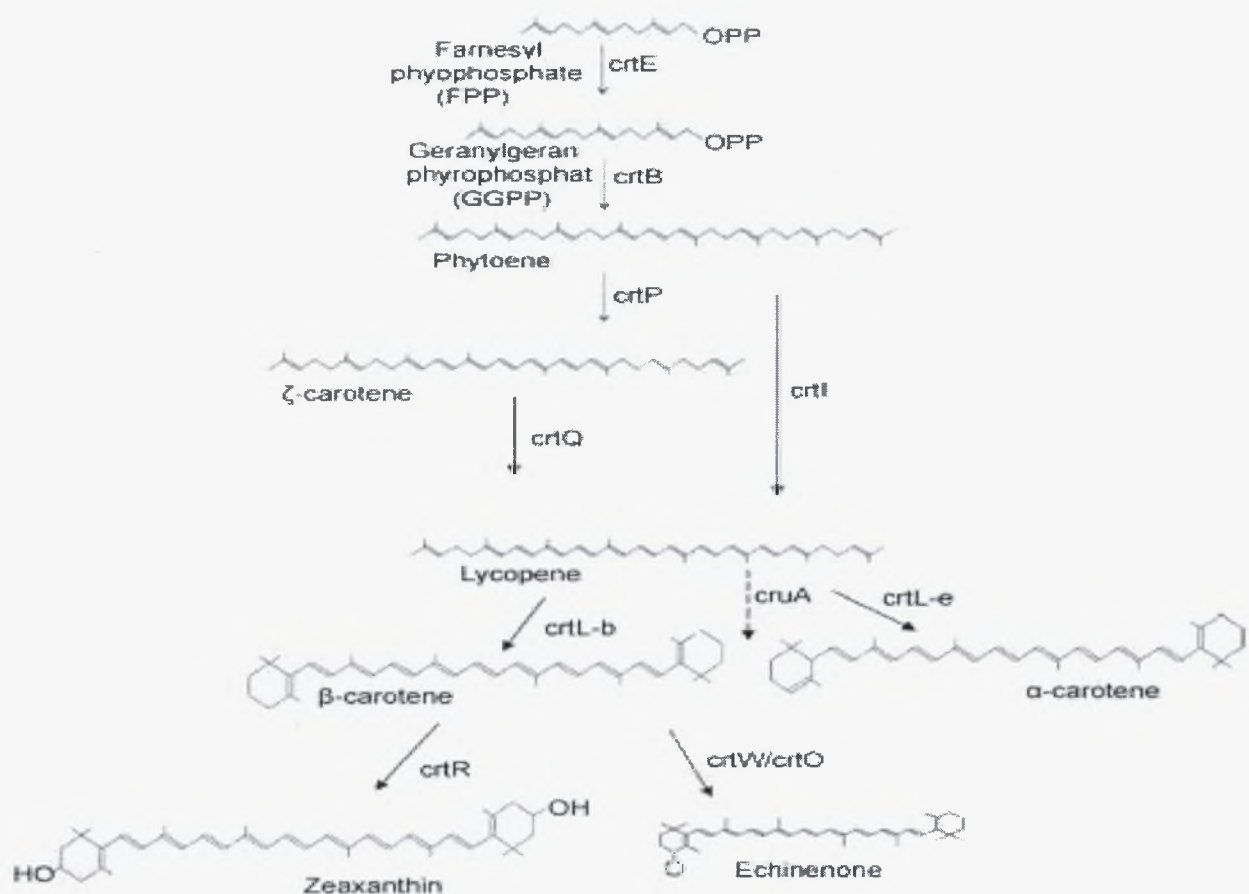
αποδείχθηκε να εξυπηρετεί τη λειτουργία συγκομιδής φωτός υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Εντούτοις η πρωτεΐνη IsiA έχει την ικανότητα να δημιουργεί δομές που να αποτελούνται από περισσότερα από 18 ολιγομερή γύρω από μονομερή PSI ή και με απόλυτη απουσία αυτών ιδιαίτερα υπό συνθήκες παρατεταμένης έλλειψης σιδήρου. Αυτά τα ιδιαίτερα μεγάλα σύμπλοκα αποτελούνται από 12 έως 14 υπομονάδες στο εσωτερικό δακτύλιο και από 19 έως 21 στο εξωτερικό. Πιθανότατα λειτουργούν ως αποθήκες χλωροφύλλης και/ή διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο διασκορπισμό της ενέργειας διέγερσης. Στην εικόνα. 7 παρουσιάζονται όλες οι εναλλακτικές μορφές της IsiA [10].

Τα κυανοβακτήρια ως φωτοσυνθετικοί οργανισμοί παράγουν και αυτά καροτενοειδή. Τα καροτενοειδή παράγονται από όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς όπως φυτά, φύκη και βακτήρια καθώς επίσης και πολλά είδη μη-φωτοσυνθετικών ευβακτηρίων. Τα καροτενοειδή στα κυανοβακτήρια έχουν 2 κύριες λειτουργίες: χρησιμεύουν για την συγκομιδή φωτός κατά την φωτοσύνθεση και προστατεύουν ενάντια της φωτοξείδωσης. Ο μηχανισμός της φωτοπροστασίας περιλαμβάνει την απόσβεση των διεγερμένων μορίων χλωροφύλλης τρίτης τάξης, που είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας οξειδωσης. Επίσης τα καροτενοειδή μπορούν να συγκεντρώσουν άμεσα ρίζες οξυγόνου. Εκτός από τη φωτοπροστασία, τα καροτενοειδή επίσης απορροφούν φως στην περιοχή του ορατού φωτός, όπου η απορροφητική ικανότητα της χλωροφύλλης δεν είναι αποτελεσματική. Κατόπιν η προσβληθείσα ενέργεια μεταφέρεται με μεγάλη αποτελεσματικότητα σε άλλα συστατικά και τελικά εγκλωβίζεται στο ενεργό κέντρο του φωτοσυστήματος. Η διαδικασία μεταφοράς ενέργειας επιτυγχάνεται μέσω διέγερσης των καροτενοειδών και μεταφορά της στα μόρια χλωροφύλλης. Ο τρόπος με τον οποίο κατανέμεται η ενέργεια στα καροτενοειδή είναι πολύ σημαντικός, διότι τους επιτρέπει να φέρουν εις πέρας με μεγάλη αποτελεσματικότητα τόσο την απορρόφηση του φωτός όσο και την προστασία έναντι αυτού, διότι σε σύγκριση με τις χλωροφύλλες η μονήρης διεγερμένη κατάσταση τους έχει ενέργεια υψηλότερη και η κατάσταση τριπλέτας μικρότερη. Η πλειονότητα των καροτενοειδών προέρχεται από ανθρακικές αλυσίδες 40 ατόμων άνθρακα και μπορούν να διαχωριστούν σε 2 κατηγορίες:

1. Τα μόρια που στο τελικό τους άκρο είναι συνδεδεμένα κυκλικές ενώσεις και καλούνται καροτένια
2. Την κατηγορία όπου η υδατανθρακική αλυσίδα των καροτενοειδών συμπληρώνεται με λειτουργικές ομάδες που περιέχουν οξυγόνο και καλούνται ξανθοφύλλες

Ο μηχανισμός βιοσύνθεσης καροτενοειδών είναι παρόμοιος μεταξύ φυτών και κυανοβακτηρίων. Εδώ παρουσιάζεται το μονοπάτι βιοσύνθεσης καροτενοειδών στα κυανοβακτήρια (εικόνα. 8).

Εικόνα 8: Το βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής καροτενίων στα κυανοβακτήρια.



Η πρώτη αντίδραση που λαμβάνει χώρα στο μονοπάτι σύνδεσης των καροτενοειδών είναι η αντίδραση σύνδεσης μεταξύ των μορίων FPP και C₅-ισοπρενίου που καταλύεται από το ένζυμο crtE με τελικό προϊόν το GGPP, ένα μόριο 20 ατόμων άνθρακα. Στη συνέχεια ακολουθεί μια αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ 2 μορίων GGPP δίνοντας ένα μόριο 40 ατόμων άνθρακα, αντίδραση η οποία καταλύεται από το ένζυμο crtB. Τα διαδοχικά βήματα αποκορεσμού και κυκλοποίησης στα τελικά άκρα για την παραγωγή καροτενίων καταλύονται από τα ένζυμα crtP/crtI, crtQ και κυκλάση του λυκοπενίου. Τελικά τα καροτένια τροποποιούνται περαιτέρω από ένζυμα, όπως είναι το crtW ή το crtO και το crtR, ώστε να παραχθούν διάφορα παράγωγα καροτενίων.[11, 12]

Τα κυανοβακτήρια έχουν επίσης αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να αντιμετωπίζουν την έκθεση τους στο υπερβολικό φως, μια διαδικασία που ονομάζεται “απόσβεση” (quenching). Γενικότερα ο όρος απόσβεση μπορεί να διαχωριστεί σε 2 κατηγορίες, την φωτοχημική απόσβεση (photochemical quenching, PQ) και την μη φωτοχημική

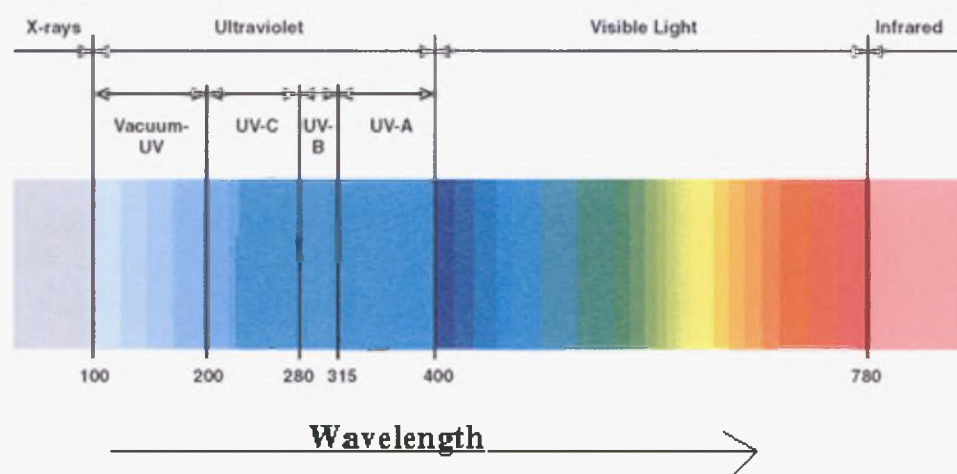
απόσβεση (non photochemical quenching, NPQ). Κατά τη διάρκεια της φωτοχημικής απόσβεσης η επιπλέον ενέργεια μεταφέρεται διαμέσου της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, ενώ κατά τη μη φωτοχημική απόσβεση η επιπλέον ενέργεια δεν οδηγείται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, αλλά απελευθερώνεται μέσω θερμότητας.

Στόχος αυτής της εργασίας είναι να εξακριβωθεί εάν το καροτενοειδές εχινενόνη είναι σημαντικό μόριο για την διαδικασία απόσβεσης της επιπλέον ενέργειας ή όχι. Για να εξακριβώσουμε το ενδεχόμενο αυτό χρησιμοποιήθηκαν 2 τύποι κυανοβακτηρίων, το μεταλλαγμένο στέλεχος crtO *Synechocystis* της κυτταρικής σειράς PCC 6803 (crtO) και το μεταλλαγμένο στέλεχος psaFJ *Synechocystis* της κυτταρικής σειράς PCC 6803 (psaFJ). Στο στέλεχος crtO απουσιάζει το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του καροτενοειδούς εχινενόνη, ενώ στο στέλεχος psaFJ απουσιάζουν οι υπομονάδες psaF και psaJ από το PSI που βρίσκονται στην περιφέρεια του τριμερούς PSI. Η παρουσία αυτών των 2 υπομονάδων δεν είναι υποχρεωτική για τον σχηματισμό του τριμερούς PSI. Η υπομονάδα psaJ διαθέτει μία διαμεμβρανική α-έλικα και δεσμεύει μόρια χλωροφύλλης παρέχοντας κομμάτι του μονοπατιού μεταφοράς ενέργειας από τους περιφερειακούς δέκτες στον πυρήνα του PSI. Η υπομονάδα psaF βρίσκεται σε επαφή με την υπομονάδα psaJ, η οποία επίσης διαθέτει μια διαμεμβρανική έλικα και αλληλεπιδρά με διάφορα α-καροτένια που βρίσκονται στον πυρήνα του PSI. Μια επίσης πιθανή λειτουργία της υπομονάδας psaF είναι η σταθεροποίηση της θέσης σύνδεσης της φεροδοξίνης και την αλληλεπίδραση με την το εξωτερικό σύμπλεγμα των rhycobilisomes. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν αυτά τα 2 στελέχη είναι ότι και τα 2 έχουν την ικανότητα παραγωγής της IsiA πρωτεΐνης με το στέλεχος psaFJ να έχει την ικανότητα να την παράγει σε μεγάλες ποσότητες σε πολύ μικρό χρόνο, καθώς επίσης και πιο σημαντικό ότι τα στελέχη crtO δεν μπορούν να παράξουν το καροτενοειδές εχινενόνη ενώ τα psaFJ μπορούν.

Κατά την πειραματική διαδικασία ανεπτύχθησαν κυτταρικές καλλιέργειες και των δύο στελεχών υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου ώστε να παραχθεί και να απομονωθεί η πρωτεΐνη IsiA. Στην συνέχεια ακολουθήθηκε ανάλυση της πρωτεΐνης και των θυλακοειδών μεμβρανών για τη σύσταση τους ως προς τα καροτενοειδή καθώς επίσης μετρήσεις φθορισμού για να εξακριβωθεί αν το καροτενοειδές εχινενόνη είναι το σημαντικό καροτενοειδές στη διαδικασία απόσβεσης της επιπλέον ενέργειας.

Εργαστηριακό Μέρος Φασματοφωτομετρία απορρόφησης

Η φασματοφωτομετρία απορρόφησης πραγματοποιείται τόσο στην υπεριώδη (UV) όσο και την ορατή περιοχή (VIS) του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (εικόνα 1). Αυτή η διαδικασία μετρά την απορροφημένη ακτινοβολία κατά τη μετάβασή της μέσω ενός αερίου, ενός υγρού ή ενός στερεού. Το μήκος κύματος γενικά κυμαίνεται από τα 190 έως τα 1000 nm, και το μέσο το οποίο απορροφά την ακτινοβολία βρίσκεται συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου. Εντούτοις οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν και σε θερμοκρασίες οι οποίες είναι υψηλότερες ή χαμηλότερες από αυτή. Στο φάσμα υποδεικνύονται οι περιοχές και τα μήκη κύματος στα οποία αντιστοιχούν οι διαφορετικές ακτινοβολίες.



Εικόνα 1: Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με καθορισμό των επιμέρους περιοχών της

Μόρια που απορροφούν φωτόνια που αντιστοιχούν σε μήκη κύματος από 190 έως 1000 nm παρουσιάζουν UV/VIS φάσματα απορρόφησης. Διαφορετικά μόρια απορροφούν ακτινοβολία διαφορετικού μήκους κύματος. Η εσωτερική κβαντική ενέργεια E_{int} ενός μορίου στη μη διεγερμένη ή ακόμη και στη διεγερμένη κατάσταση του μπορεί να προσεγγιστεί υπολογιστικά, με ικανοποιητική ακρίβεια από την εξίσωση $E_{int} = E_{el} + E_{vib} + E_{rot}$. Η E_{el} αντιπροσωπεύει την ενέργεια των ηλεκτρονίων του μορίου, περιγράφοντας τη φυσική κατάσταση των ηλεκτρονίων του συστήματος όπως τις θέσεις και τους προσανατολισμούς της ιδιοπεριστροφής. Η E_{vib} αντιπροσωπεύει την δονητική ενέργεια του μορίου λόγω των ταλαντώσεων των ατόμων του και η E_{rot} για την περιστροφική ενέργεια. Όταν ένα μόριο απορροφά ενέργεια, τα ηλεκτρόνια του προάγονται από το χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο στο οποίο βρίσκονται σε μια διεγερμένη κατάσταση. Η απορρόφηση αυτή μπορεί να μετρηθεί με το νόμο Beer-Lambert-Bouguer που μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια και μόνο ουσία σε αέρια κατάσταση ή σε μορφή διαλύματος..

Η μορφή της εξίσωσης είναι:

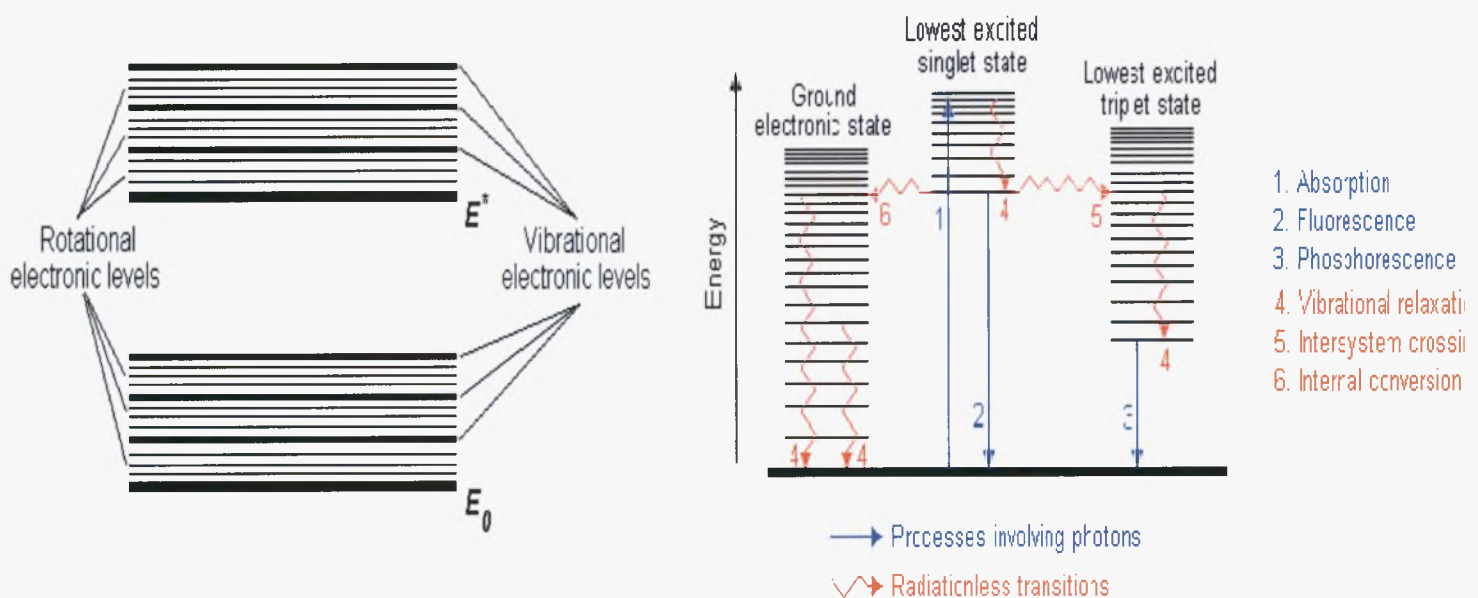
$$-\log_{10}(\Phi_t / \Phi_0) = -\log_{10}T = \epsilon cb = A$$

όπου Φ_t η ισχύς της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το από την ουσία, Φ_0 η ισχύς της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που προσπίπτει σε αυτή, ϵ είναι ο γραμμομοριακός συντελεστής απορρόφησης της ουσίας, το c είναι η συγκέντρωση της ουσίας που αναλύεται, b το μήκος της ακτινοβολίας στο διάλυμα και το A η απορρόφηση. Ένα όργανο για τη μέτρηση των μοριακών φασμάτων απορρόφησης (UV/VIS) συνήθως αποτελείται από μια πηγή ακτινοβολίας, ένα διαμέρισμα δειγμάτων, έναν ανιχνευτή ακτινοβολίας και ένα σύστημα για την συλλογή και επεξεργασία των στοιχείων. Μέσα για διαμόρφωση της έντασης ή/και διαμόρφωση του μήκους κύματος μπορούν επίσης να είναι μέρος του οργάνου.

Φθορισμομετρία

Η φθορισμομετρία είναι επίσης μια φασματομετρική μέθοδος, η οποία επικεντρώνεται στις ηλεκτρονικές και δονητικές καταστάσεις του μορίου. Γενικά το μήκος κύματος της φωτεινής πηγής φθορισμού βρίσκεται στην υπεριώδη περιοχή διεγείροντας τα ηλεκτρόνια και στη συνέχεια τα διεγερμένα ηλεκτρόνια επανεκπέμπουν την απορροφούμενη ενέργεια σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Τα ηλεκτρόνια των μορίων μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες. Ηλεκτρόνια στην μονήρη (singlet) κατάσταση, κατά την οποία τα spin όλων τους είναι ζευγαρωμένα και στην κατάσταση τριπλέτας (triplet) κατά την οποία τα spin των ηλεκτρονίων είναι αζευγάρωτα.. Όταν τα ηλεκτρόνια ενός μορίου απορροφήσουν ακτινοβολία UV, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα ηλεκτρόνια να διεγείρονται και να μεταπηδούν σε υψηλότερες δονητικές καταστάσεις. Κατόπιν τα ήδη διεγερμένα ηλεκτρόνια του μορίου θα μεταπέσουν γρήγορα σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο με απώλεια ενέργειας μέσω της σύγκρουσης με άλλα μόρια (εικόνα .2). Το μόριο μπορεί επίσης να απολέσει την επιπλέον ενέργεια με άλλους πιθανούς τρόπους δόνησης και περιστροφής. Το φαινόμενο του φθορισμού εμφανίζεται όταν το διεγερμένο μονήρες ηλεκτρόνιο επιστρέψει στην E_0 ενεργειακή στάθμη με την εκπομπή ενός φωτονίου (εικόνα . 3). Εάν ένα μόριο που έχει απορροφήσει UV ακτινοβολία δεν φθορίσει, αυτό σημαίνει ότι πρέπει να έχει χάσει την ενέργειά του με κάποιο άλλο τρόπο σε μια διαδικασία που καλείται μεταφορά ενέργειας “χωρίς ακτινοβολία”.

Εικόνες 2 και 3: Στην εικόνα 2 παρουσιάζονται οι διεγερμένες δονητικές και περιστροφικές καταστάσεις των e^- ενώ στην εικόνα 3 παρουσιάζονται γραφικά οι πιθανοί τρόποι με τους οποίους τα ηλεκτρόνια μπορούν να απολέσουν την ενέργεια διέγερσης τους.



Για τη μέτρηση του φθορισμού υπάρχουν δύο είδη οργάνων. Τα φθορισμόμετρα που χρησιμοποιούν φίλτρα ώστε να απομονωθεί το προσπίπτον φως από το φως φθορισμού και τα φασματοφθορισμόμετρα που χρησιμοποιούν μονοχρωμάτορα διάθλασης για τον ίδιο σκοπό. Παρά τη διαφορά αυτή και τα δύο όργανα λειτουργούν βάση της ίδιας αρχής. Η πηγή εκπέμπει φως που μέσω ενός φίλτρου ή μονοχρωμάτορα προσπίπτει στο δείγμα. Μέρος της ακτινοβολίας απορροφάται από το δείγμα και κατόπιν τα διεγερμένα μόρια του δείγματος φθορίζουν, εκπέμποντας φωτόνια προς όλες τις κατευθύνσεις. Τελικά μέρος της φθορίζουσας ακτινοβολίας περνά μέσω ενός δεύτερου φίλτρου ή μονοχρωμάτορα και φθάνουν στον ανιχνευτή, που βρίσκεται σε γωνία 90° σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος διαβίβασης προσπίπτοντος φωτός στον ανιχνευτή.

Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία μπορεί να περιγραφεί ως μια φυσική μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος, διαχωρισμός ο οποίος βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους μεταξύ δύο φάσεων, μία εκ των οποίων είναι η σταθερή φάση ενώ η δεύτερη η κινητή φάση κινείται μέσω αυτής προς μια καθορισμένη κατεύθυνση. Οι ουσίες πρέπει να αλληλεπιδράσουν με τη σταθερή φάση ώστε να δεσμευτούν και να διαχωριστούν από αυτή. Οι μέθοδοι χρωματογραφίας μπορούν να διαιρεθούν σε διαφορετικές κατηγορίες είτε βάση του μηχανικού μέρους που χρησιμοποιούν (χρωματογραφία στήλης, TLC, χρωματογραφία αερίου) ή βάση του φαινομένου που χρησιμοποιούν προκειμένου να διαχωριστούν τα συστατικά των μιγμάτων (χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής, χρωματογραφία κατανομής, χρωματογραφία προσρόφησης). Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας νέες τεχνικές έχουν σχεδιαστεί, οι οποίες συνδυάζουν τις ιδιότητες των τεχνικών που προαναφέρθηκαν. Στα πειράματα της ανά χειράς εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά είδη χρωματογραφίας η χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής (IEC), η ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (FPLC) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η IEC χρωματογραφία είναι η μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης μειγμάτων διαφορετικών συστατικών σύμφωνα με τη συγγένεια τους για σταθερούς χημικά αλλά πολύ δραστικούς συνθετικούς ανταλλάκτες, οι οποίοι αποτελούνται κυρίως από πολυστυρόλιο και κυτταρίνη. Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιεί έναν απορροφητή με ιοντίζουσες ομάδες και προσαρμόζει την ανταλλαγή ιόντων μεταξύ του διαλύματος που περιέχει τις ουσίες προς ανάλυση και τον απορροφητή. Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια προηγμένη μορφή υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό σύνθετων μειγμάτων από μόρια που συναντώνται σε χημικά και βιολογικά συστήματα, προκειμένου να γίνει καλύτερα κατανοητός ο ρόλος αυτών των μεμονωμένων μορίων. Στην υγρή χρωματογραφία, το μίγμα των μορίων σε διάλυμα (κινητή φάση) διαχωρίζεται στα συστατικά του μέσω διαβίβασής του σε στήλη που περιέχει συμπαγώς στοιβαγμένα μόρια στερεού (σταθερή φάση). Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται επειδή κάθε συστατικό του μίγματος αλληλεπιδρά διαφορετικά με τη σταθερή φάση. Τα μόρια που αλληλεπιδρούν ισχυρά με τη σταθερή φάση θα κινηθούν αργά μέσω της στήλης, ενώ τα μόρια που αλληλεπιδρούν λιγότερο ισχυρά θα κινηθούν γρηγορότερα. Αυτή η διαφοροποίηση στον ρυθμό μετακίνησης διευκολύνει τον διαχωρισμό των μορίων. Τα πλεονεκτήματα της HPLC από τις άλλες μορφές υγρής χρωματογραφίας είναι αρκετά. Επιτρέπει να πραγματοποιηθεί η ανάλυση σε συντομότερο χρονικό διάστημα και επιτυγχάνει έναν υψηλότερο βαθμό διακρίτοτητας, δηλαδή πληρέστερο διαχωρισμό των συστατικών. Επιπλέον, επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση των στηλών αρκετές φορές χωρίς να χρειάζεται να αντικατασταθούν, και τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι επαναλήψιμα σε μεγάλο βαθμό. Ένα περαιτέρω πλεονέκτημα της HPLC είναι ότι

επιτρέπει την αυτοματοποίηση τόσο των οργάνων όσο και της ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων.

1. Μέσο ανάπτυξης των κυττάρων

➤ BG-11 σε στερεό μέσο

Τα κυανοβακτήρια αρχικά αυξάνονται σε πιάτα με BG-11 ως στέρεο θρεπτικό υλικό. Για την προετοιμασία 1 λίτρου θρεπτικού υλικού προστίθενται 10 ml 100x BG-11 χωρίς σίδηρο, φωσφορικό άλας, ανθρακικό άλας, 1 ml 1000x άλας σιδηρούχο αμμώνιο, 1 ml 1000x Na_2CO_3 , 1 ml 1000x όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4), 10 ml διαλύματος TES/NaOH συγκέντρωσης 1M και pH 8.2, διατηρημένα σε κρύο δωμάτιο, 3 g δυσουλφίδιο του νατρίου, 15 g βακτηριακού άγαρ και στη συνέχεια το τοποθετείται σε κλίβανο για 1 ώρα. Εάν χρειάζεται να προστεθούν επιπλέον στο θρεπτικό μέσο BG-11 άγαρ γλυκόζη, ατραζίνη ή αντιβιοτικά τότε αποστειρώνεται το θρεπτικό μέσο στους 55 °C σε υδατόλουτρο. Για κάθε λίτρο θρεπτικού υλικού προστίθενται μέσω φίλτρου 10 ml διαλύματος γλυκόζης 1M και/ή το κατάλληλο αντιβιοτικό και στο τέλος ρίχνονται 30 με 50 ml θρεπτικού υλικού σε κάθε πιάτο.

➤ BG-11 υγρό θρεπτικό υλικό

Μετά την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων σε πιάτα με θρεπτικό υλικό BG-11, η ανάπτυξή τους συνεχίζεται σε υγρές καλλιέργειες. Για την παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού BG-11 απαιτείται να παρασκευαστούν 3 διαλύματα εκ των προτέρων.

Διάλυμα Α: Μεταλλικά Στοιχεία (από stock διαλύματα 1000 φορές συγκεντρωμένα)

Για την προετοιμασία 1 λίτρου θρεπτικού υλικού προστίθενται 900 ml καθαρού νερού και 2.86 g βορικού οξέος (H_3BO_3), 1.81 g τετραϋδρίτη χλωριούχου μαγγανίου ($\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$), 0.22 g επταϋδρίτη θεικού ψευδαργύρου ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), 0.39 g διϋδρίτη μολυβδαινικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), 0.079 g πενταϋδρίτη θεικού χαλκού ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$), 0.049 g εξαϋδρίτη νιτρικού κοβαλτίου [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$]. Αφού προστεθούν όλα τα συστατικά διαλυτοποιούνται τα και συμπληρώνονται με καθαρό νερό μέχρι την πλήρωση ενός λίτρου.

Διάλυμα Β: Θρεπτικό Υλικό BG-11 (από stock διαλύματα 100 φορές συγκεντρωμένα) με μεταλλικά στοιχεία αλλά απουσία σιδήρου, φωσφόρου και ανθρακικών αλάτων

Για την προετοιμασία 1 λίτρου διαλύματος προστίθενται 700 ml καθαρού νερού, κατά προτίμηση mili-q ή bidest, όχι απλά demi προκειμένου να διατηρηθεί η υψηλότερη δυνατή καθαρότητα. Επιπλέον προστίθενται 2.86 g βορικού οξέος (H_3BO_3), 0.22 g επταϋδρίτη θεικού ψευδαργύρου $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.39 g διϋδρίτη μολυβδαινικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), 0.079 g πενταϋδρίτη θεικού χαλκού ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$),

0.049 g εξαυδρίτη νιτρικού κοβαλτίου $[\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}]$. Αφότου προστεθούν όλα τα συστατικά, αφήνονται να διαλυτοποιηθούν και συμπληρώνονται με καθαρό νερό μέχρι την πλήρωση ενός λίτρου

Διάλυμα Γ (1 2 3): Διαλύματα που περιέχουν Σίδηρο, Ανθρακικά άλατα, Φώσφορο (από stock διαλύματα 100 φορές συγκεντρωμένα)

Διάλυμα Γ1: Για την παρασκευή διαλύματος σιδήρου προστίθενται 600 mg σιδηρούχου Αμμωνίου κιτρικού οξέος $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$ συγκεντρωμένου κατά 1000 φορές ανά 100 ml διαλύματος

Διάλυμα Γ2: Για την παρασκευή διαλύματος ανθρακικού άλατος προστίθενται 2 g ανθρακικού άλατος του νατρίου Na_2CO_3 συγκεντρωμένο κατά 1000 φορές ανά 100 ml διαλύματος.

Διάλυμα Γ3: Για την προετοιμασία διαλύματος φωσφορικού άλατος προστίθενται 3.05 g K_2HPO_4 όξινου φωσφορικού καλίου συγκεντρωμένου κατά 1000 φορές ανά 100 ml διαλύματος.

Αυτά τα 3 stock διαλύματα κατανέμονται σε φιαλίδια των 5ml. Κάθε ένα από τα φιαλίδια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή 5 λίτρων θρεπτικού υλικού BG-11. Στην συνέχεια τα φιαλίδια αποστειρώνονται και αποθηκεύονται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου ή σε ένα κρύο θάλαμο μέχρι τη χρήση τους και δεν χρειάζεται η προσθήκη χλωροφορμίου. Επίσης η προσθήκη αυτών των διαλυμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω αποστειρωμένων φίλτρων διαμέτρου 0.2 μm , ώστε να μη χρειασθεί η αποστείρωση.

➤ **Παρασκευή BG11 θρεπτικού υλικού από τα stock διαλύματα**

Για την παρασκευή ενός λίτρου θρεπτικού υλικού BG11 από τα stock διαλύματα εισάγονται 10 ml από το διάλυμα B, συμπληρώνεται με καθαρό νερό έως ένα λίτρο και αποστειρώνεται σε κλίβανο στους 121 °C για 1 ώρα. Στη συνέχεια αφήνεται το διάλυμα να κρυώσει και προστίθενται από τα αποστειρωμένα stock διαλύματα ή μέσω φίλτρου διαμέτρου 0.2 μm 1 ml σιδηρούχου Αμμωνίου κιτρικού οξέος, 1 ml ανθρακικού άλατος του νατρίου και 1 ml όξινου φωσφορικού καλίου. Κάθε ένα από αυτά τα διαλύματα είναι κατά 1000 φορές συμπυκνωμένα.

**Από τα κύτταρα στην πρωτεΐνη IsiA
Crt0 κύτταρα (No Echinonone) από *Synechocystis* PCC 6803**

Ανάπτυξη Κυττάρων:

Προπαρασκευή για τις κυτταρικές καλλιέργειες

Αρχικά προσθέστε σε κάθε κωνική φιάλη 10 ml Makromix και καθαρό νερό (περίπου 60 ml) ώστε να διαλυτοποιηθεί. Εφόσον διαλυτοποιηθεί το Makromix προστίθεται 1 ml διάλυμα μεταλλικών στοιχείων συμπυκνωμένο 1000 φορές και συμπληρώνεται με Mili Q

απιοντισμένο νερό έως ένα λίτρο. Στην συνέχεια αποστειρώνεται στον κλίβανο στους 121°C για 20 λεπτά και αφήνεται το να κρυώσει. Αφού έχει κρυώσει προστίθενται

φώσφορος και ανθρακικά άλατα μέσω αποστειρωμένου φίλτρου διαμέτρου 0.2 mm:
1 ml/l όξινου φωσφορικού καλίου K_2HPO_4 (1000 φορές συμπυκνωμένο)
1 ml/l ανθρακικού άλατος νατρίου Na_2CO_3 (1000 φορές συμπυκνωμένο – προστίθεται από πριν αλλιώς συμμετέχει σε χημική αντίδραση).

Σε περίπτωση που τα κύτταρα αναπτύσσονται κάτω από κανονικές συνθήκες προστίθεται $Fe(NH_4)_3(C_6H_5O_7)$ (διάλυμα συμπυκνωμένο κατά 1000 φορές, συντηρημένο στο σκοτάδι- χρώματος κίτρινο) σε αντίθετη περίπτωση παραλείπεται ο σίδηρος. Για την εκλεκτική ανάπτυξη των crtO κυττάρων προστίθεται πάντα το αντιβιοτικό καναμισίνη (συντηρημένο στους - 20°C και συγκέντρωσης Km 50 mg/ml). Για 1 L διαλύματος προστίθενται 0.4 ml (αραίωση κατά 2500 φορές), ώστε η τελική συγκέντρωση να έχει τιμή 20 mg/l.

Συνθήκες Ανάπτυξης των καλλιέργειών

Τα κύτταρα αναπτύσσονται κάτω από συνεχή ανάδευση (100 rpm) με ένταση φωτός 50 μmol φωτονίων $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, στους 30°C

Προ-καλλιέργειες

Μια προ-καλλιέργεια των 50 ml με θρεπτικό υλικό το BG-11 που περιέχει σίδηρο εμβολιάζεται με κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε πιάτο. Για την ανάπτυξη μεταλλαγμένων στελεχών προστίθεται το θρεπτικό υλικό σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη και προστίθεται αντιβιοτικό, ώστε η συγκέντρωση του στο διάλυμα να είναι 20 mg/l.

Ανάπτυξη κυττάρων χωρίς την παρουσία σιδήρου

Επειδή τα κύτταρα πρέπει να αναπτύσσονται σε περιβάλλον χωρίς σίδηρο, ώστε να περάσουν σε κατάσταση στρες, κάθε υπόλειμμα σιδήρου θα πρέπει να απομακρυνθεί από την κωνική φιάλη. Για να επιτευχθεί αυτό πρώτα πλένονται οι κωνικές φιάλες με υδροχλωρικό οξύ HCl 15 %, ξεπλένονται με νερό βρύσης και στη συνέχεια με απιοντισμένο νερό. Μετά το πλύσιμο των κωνικών φιαλών προστίθενται 200 ml θρεπτικού υλικού χωρίς σίδηρο και 5 ml από τις προ-καλλιέργειες που έχουν αναπτυχθεί με σίδηρο. Η οπτική πυκνότητα θα πρέπει να είναι 1A/cm στα 680 nm το οποίο είναι σύνηθες για καλλιέργειες μιας εβδομάδας, διότι σε αντίθετη περίπτωση αν τα κύτταρα από την προ-καλλιέργεια είναι γερασμένα ή η οπτική πυκνότητα πολύ χαμηλή τα κύτταρα θα πεθάνουν. Η αραίωση των κυττάρων στο διάλυμα θα καθορίσει το βαθμό στρεσαρίσματος. Αν μεγαλύτερη ποσότητα κυττάρων που αναπτύχθηκαν με σίδηρο προστεθεί στο θρεπτικό υλικό τότε το στρες που θα προκληθεί δε θα είναι τόσο έντονο. Στην διάρκεια των επόμενων 2 εβδομάδων ή και περισσότερο που θα αναπτύσσονται οι καλλιέργειες, θα πρέπει σε τακτά χρονικά διαστήματα να μετρείται η οπτική τους πυκνότητα στα 680 nm και 750 nm ώστε να παρακολουθείται η πορεία ανάπτυξής τους. Για να ελεγχθεί εάν τα κύτταρα της καλλιέργειας έχουν παράξει την πρωτεΐνη IsiA πραγματοποιείται φασματομετρική μέτρηση απορρόφησης σε δείγμα από την καλλιέργεια, αλλά η τελική επιβεβαίωση πραγματοποιείται με τη μέτρηση του φθορισμού του δείγματος σε θερμοκρασία 77K και με δέσμη διέγερσης στα 420nm. Στο φάσμα απορρόφησης θα πρέπει να παρατηρείται μια ζώνη γύρω στα 673 nm που

υποδεικνύει την παρουσία της πρωτεΐνης IsiA [13]. Στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των κυττάρων σε περιβάλλον χωρίς σίδηρο η ζώνη φθορισμού που προέρχεται από το PSI θα μετατοπισθεί προς το μπλε. Η αύξηση της ζώνης φθορισμού της IsiA στα 682 nm με μείωση της ζώνης φθορισμού που προέρχεται από το PSI θα προκύψει όταν η πρωτεΐνη IsiA δεν περικλείει το PSI στα κύτταρα. Όταν πλέον ο φθορισμός από το PSI εκλείπει τότε τα κύτταρα περιέχουν κυρίως συγκροτήματα πρωτεΐνης IsiA.

Συλλογή των κυττάρων

Όταν η ανάπτυξη των κυττάρων έχει ολοκληρώσει το χρόνο που απαιτείται, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε ταχύτητα 9000 x g (7000 rpm) σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος Mannitol που περιέχει 300mM mannitol, 10mM Bis Tris pH 6.5, 10mM NaCl, 5mM EDTA και φυγοκεντρώνται ξανά για 10 λεπτά σε ταχύτητα 7000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού έχει ολοκληρωθεί η συλλογή των κυττάρων μετρείται το βάρος του υγρού ιζήματος και τελικά επαναδιαλυτοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα Mannitol.

Διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των κυττάρων

Για να απομονωθεί η πρωτεΐνη IsiA, θα πρέπει πρώτα να διασπαστούν τα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή ξεκινά με τη πέψη των κυτταρικών τους τοιχωμάτων με το ένζυμο λυσοζύμη, του οποίου η τελική συγκέντρωση θα πρέπει να είναι 2mg για κάθε γραμμάριο κυτταρικού ιζήματος. Η επώαση πραγματοποιείται στο σκοτάδι στους 37°C για 30 λεπτά

Θραύση των κυττάρων

Πριν την θραύση των κυττάρων θα πρέπει να ανασταλεί η δράση των πρωτεασών των βακτηρίων, ώστε να μην αποδομήσουν τις πρωτεΐνες και ιδιαίτερα την IsiA. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού προστίθενται αναστολείς των πρωτεασών. Για κάθε γραμμάριο κυτταρικού ιζήματος θα πρέπει να προστεθούν 10.75 mg αναστολέα αραιωμένου σε 50 μl DMSO. Μετά τη μίξη τους προστίθενται 200 μl απιοντισμένου νερού και η τελική συγκέντρωση των αναστολέων παίρνει την τιμή 250μl/g κυτταρικού ιζήματος.

Θραύση των κυττάρων:

Μετά την προσθήκη του αναστολέα των πρωτεασών τα κύτταρα θραύονται με τη χρήση της γαλλικής πρέσας σε πίεση 10.000 psi, διαδικασία η οποία επαναλαμβάνεται τουλάχιστον 3 φορές. Για τη διάσπασή τους χρησιμοποιείται μικρός κύλινδρος ο οποίος είναι χωρητικότητας από 1.4 έως 3.7 ml. Το εάν η διαδικασία θραύσης τους είναι επιτυχής μπορεί να επιβεβαιωθεί από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης, το οποίο θα πρέπει να έχει χρώμα μπλε μετά την φυγοκέντρωση λόγω των πρωτεϊνών των rhycobilisomes.

Διαλυτοποίηση των μεμβρανών και απομόνωση των συμπλοκών τους

Μετά το σπάσιμο των κυττάρων ακολουθεί η διαλυτοποίηση των μεμβρανών, η οποία για να πραγματοποιηθεί, θα πρέπει να είναι γνωστή η συγκέντρωση της χλωροφύλλης *a*. Για να επιτευχθεί αυτό παίρνεται δείγμα 10 μl από τα σπασμένα κύτταρα και προστίθεται σε διάλυμα 1ml που περιέχει 80% ακετόνη με αποτέλεσμα την εξαγωγή των χρωστικών ουσιών από τις μεμβράνες. Στην συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση και μετράται η απορρόφηση του υπερκείμενου της φυγοκέντρωσης στα 750 nm, 663.6nm και στα 646.6 nm. Η μέτρηση της απορρόφησης στα 663.6-750/cm και 646.6-750/cm υπολογίζεται για διόρθωση της απορρόφησης από την ακετόνη και την κυψελίδα. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης *a* δίνεται από τον τύπο [15]:

$$\text{Chl } a \text{ (mg/ml)} = (0.01225 \times \text{Abs}_{663.6} - 0.00255 \times \text{Abs}_{646.6}) \times 100 \text{ (συντελεστής αραίωσης)}$$

Από τη στιγμή που έχει υπολογιστεί η συγκέντρωση της χλωροφύλλης *a* οι μεμβράνες διαλυτοποιούνται με την προσθήκη 1% n-dodecyl β-D-maltoside για κάθε 1mg/ml χλωροφύλλης *a* με επώαση για 5 λεπτά αφού πρώτα έχει προηγηθεί μίξη τους και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά. Τελικά το υπερκείμενο διαχωρίζεται από το ίζημα πριν την εισαγωγή του στην στήλη Mono Q.

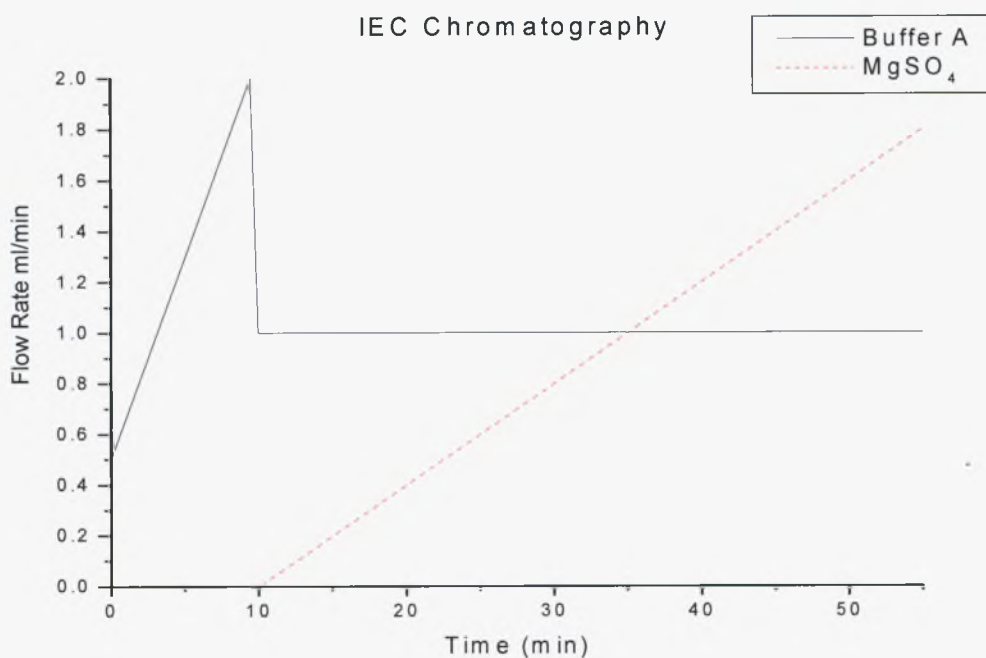
Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής πραγματοποιείται με την στήλη Mono Q με χρήση 2 διαλυμάτων:

Ρυθμιστικό Διάλυμα A (buffer A): 20mM Bis Tris pH 6.5, 10mM MgCl₂, 20mM NaCl, 10mM CaCl₂, 1.5% taurine, 0.03% β-DM (buffer A).

Διάλυμα B: MgSO₄

Στα πρώτα 10 λεπτά ακολουθείται μία γραμμική αύξηση της ροής του ρυθμιστικού διαλύματος A, που ξεκινά από 0.5ml/λεπτό και φτάνει τα 2ml/λεπτό και από κει σε μια γραμμική μείωση της ροής του που φτάνει το 1 ml/λεπτό και παραμένει σταθερή από το δέκατο λεπτό και μετά. Στο δέκατο λεπτό ξεκινά η ροή του διαλύματος B με γραμμική αύξηση της ροής του έως ότου η τελική συγκέντρωσή του φτάσει τα 0.5M και τελικά συλλέγονται κλάσματα έκλυσης των 0.5ml. Στο διάγραμμα 1 που ακολουθεί παρουσιάζεται η ροή των διαλυμάτων συναρτήσει του χρόνου.

Οι μεμβράνες και τα συμπλέγματα πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από την χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής αναλύονται στην συνέχεια με FPLC χρωματογραφία με τη χρήση της στήλης Superdex 200 HR 10/30 column (Pharmacia). Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται αποτελείται από 20 mM Bis Tris (pH6.5), 5 mM MgCl₂, 0.03% β-DM με σταθερή ροή 0.45ml/min.



Διάγραμμα . 1: Ροή των ρυθμιστικών διαλυμάτων της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής σε συνάρτηση με το χρόνο

Ανάλυση των Χρωστικών Ουσιών

Η ανάλυση των χρωστικών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία του Gilmore [14]. Κατά τη διαδικασία αυτή οι χρωστικές ουσίες απομακρύνθηκαν από τις μεμβράνες με τη χρήση ακετόνης συγκέντρωσης 80%, που ακολουθήθηκε από φυγοκέντρηση και φόρτωση τελικά του δείγματος σε στήλη RP-HPLC-column (Lichrosorb C18, 10 micron, 250 x 4,6mm) ώστε να πραγματοποιηθεί η χρωματογραφία HPLC. Κατά την χρωματογραφία HPLC χρησιμοποιούνται 3 ρυθμιστικά διαλύματα:

Ρυθμιστικό διάλυμα Α:(85% ακετονιτρίλιο, 13.5% μεθανόλη, 1.5% 0.2 M Tris/HCl pH 8.0

Ρυθμιστικό διάλυμα Β: 83.3% μεθανόλη, 16.7% n-εξάνιο)

Ρυθμιστικό διάλυμα Γ: μεθανόλη

Κατά τα πρώτα 15 λεπτά χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα Α με ροή 1ml/λεπτό χρόνος κατά τον οποίο εκλούνται τα καρτενοειδή μυξοξανθοφύλλη, ζεαξανθίνη και κρυπτοξανθίνη. Μετά το πέρας 15 λεπτών ακολουθούν 3 λεπτά όπου το σύστημα περνά στο ρυθμιστικό διάλυμα Β. Το ρυθμιστικό διάλυμα Β τρέχει για 40 λεπτά

και εκλούνται γλωροφύλλη α, εχινενόνη και β-καροτένιο. Στη συνέχεια και για 10 λεπτά η στήλη ξεπλύθηκε με μεθανόλη και μετά εξισορροπήθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα Α. Το σύστημα της HPLC είναι εξοπλισμένο με φασματοφωτόμετρο απορρόφησης, το οποίο επέτρεψε την αναγνώριση των ζωνών του χρωματογραφήματος μέσω των φασμάτων απορρόφησης τους.

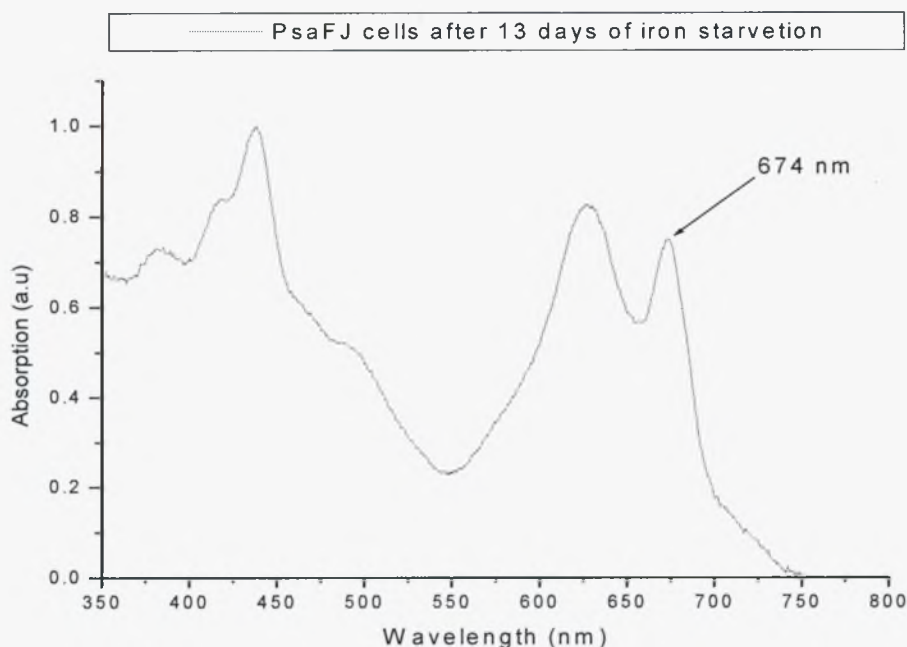
Μετρήσεις Φθορισμού

Η θερμοκρασία 77K επιτεύχθηκε με κρυοστάτη Oxford ο οποίος συμπληρώθηκε με υγρό άζωτο. Οι μετρήσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 4K πραγματοποιήθηκαν με τον κρυοστάτη Utrex, ο οποίος προψύχθηκε με υγρό άζωτο και στην συνέχεια συμπληρώθηκε με ήλιο. Οι θερμοκρασίες από τα 4K έως τα 240K επιτεύχθηκαν με τη χρήση οργάνου ελέγχου της θερμοκρασίας μέσω ροής αερίου. Η απορρόφηση των δειγμάτων ήταν μικρότερη του 0.1. Για τις μετρήσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες όλα τα δείγματα αραιώθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης συγκέντρωσης 66% (v/v) και ως προς τα σύμπλοκα IsiA προστέθηκε επίσης διάλυμα 20 mM Bis-Tris (pH 6.5), 20 mM NaCl, 0.06% β-DM, ενώ για τα κύτταρα 300mM mannitol, 10mM Bis Tris pH 6.5, 10mM NaCl, 5mM EDTA.

Οι μετρήσεις φθορισμού σε θερμοκρασίες 77K και δωματίου πραγματοποιήθηκαν με το φασματοφωτόμετρο Jobiny Yvon.

Οι μετρήσεις απορρόφησης στα 77K πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο Perkin ενώ στα 5K από όργανο που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο. Τα φάσματα φθορισμού κατεγράφησαν με διάταξη που επίσης κατασκευάστηκε στο εργαστήριο, εφοδιασμένο με απεικονιστικό φασματογράφο 0.5m και κάμερα CCD (Chromex Chromcam I). Η ακτίνα διέγερσης προερχόταν από λαμπτήρα αλογόνου βολφραμίου (Oriel) και φίλτρο εύρους 15 nm. Τα φάσματα παρουσίαζαν ανάλυση 0.3nm. Τα καταγεγραμμένα φάσματα φθορισμού διορθώθηκαν ως προς την εξαρτώμενη από το μήκος κύματος ευαισθησία του συστήματος ανίχνευσης.

Αποτελέσματα

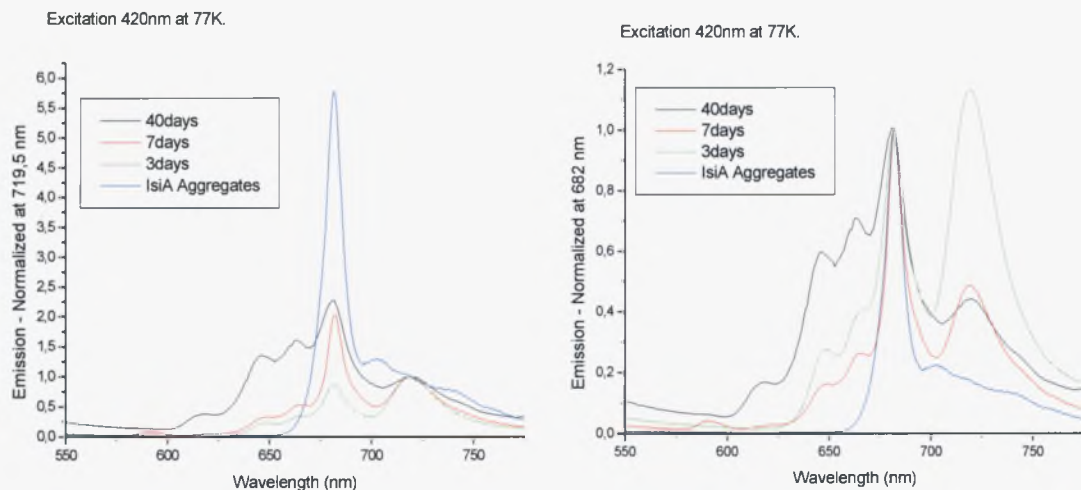


Εικόνα 1: Φάσμα απορρόφησης κυττάρων PsaFJ σε θερμοκρασία δωματίου

Στην εικόνα.1 παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης κυττάρων psaFJ σε θερμοκρασία δωματίου μετά από 13 μέρες ανάπτυξης άνευ σιδήρου. Στην περιοχή μεταξύ 450 nm και 550 nm βρίσκεται η περιοχή απορρόφησης των καροτενοειδών και το μέγιστο που παρουσιάζεται γύρω στα 620 nm προέρχεται από τα rhycobilisomes και συγκεκριμένα από τις πρωτεΐνες φυκοκυανίνης. Το μέγιστο που παρουσιάζεται στα 674 nm ανήκει στην πρωτεΐνη IsiA. Η απορρόφηση προερχόμενη από τα φωτοσυστήματα PSI and PSII στα 700 nm and 680 nm αντίστοιχα δεν είναι ορατή σε θερμοκρασία δωματίου λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης τους στα κύτταρα, παρόλα αυτά υφίστανται ακόμα. Η παραγωγή της πρωτεΐνης IsiA ξεκινά από την πρώτη ημέρα έλλειψης σιδήρου και συνεχίζει έως ότου φτάσει σε μια μέγιστη ποσότητα περίπου την δέκατη μέρα.

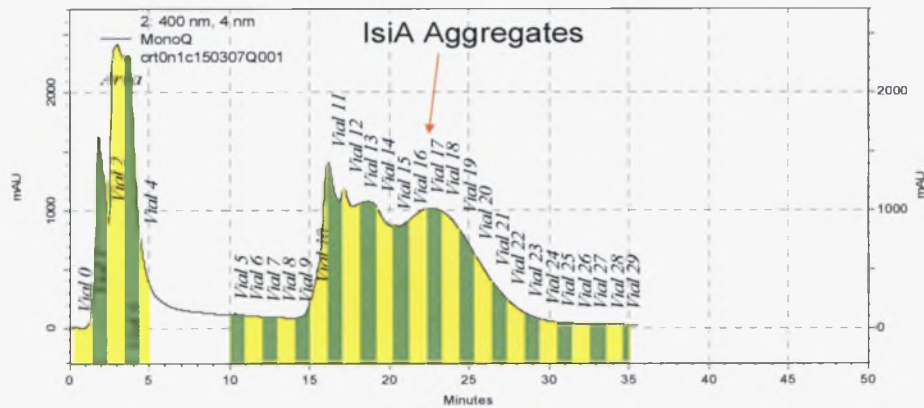
Καλλιέργειες κυττάρων crtO επίσης ανεπτύχθησαν υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Στις εικόνες 1 και 2 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού σε θερμοκρασία 77K με φωτεινή δέσμη διέγερσης στα 420 nm τριών διαφορετικών καλλιεργειών crtO και συγκρίνονται με σύμπλοκα της πρωτεΐνης IsiA. Οι καλλιέργειες βρισκόντουσαν υπό έλλειψη σιδήρου για 3, 7 και 40 μέρες αντίστοιχα και η εικόνα του φάσματος 2 έχει υποστεί αναγωγή στη μέγιστη τιμή στα 719.5nm ενώ η εικόνα του φάσματος 3 στα 682 nm. Σε θερμοκρασία 77K η πρωτεΐνη IsiA δίνει μία μεγάλη ισχυρή ζώνη φθορισμού γύρω στα 685 nm και το φωτοσύστημα

PSI περίπου στα 719 nm με 720 nm. Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται η προοδευτική παραγωγή της πρωτεΐνης IsiA με το πέρασμα των ημερών και στην εικόνα 3 παρουσιάζεται η μείωση του PSI στα κύτταρα, λόγω της μεγαλύτερης περιόδου έκθεσής τους στην έλλειψη σιδήρου. Καθώς ήδη έχει ειπωθεί ο σίδηρος είναι πολύ σημαντικό στοιχείο του PSI και από τη στιγμή που ο σίδηρος απουσιάζει αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της επαγωγής του PSI στα κύτταρα.



Εικόνες 2 και 3: Φάσματα φθορισμού σε θερμοκρασία 77K και ακτίνα διέγερσης στα 420 nm απομονωμένων συμπλόκων IsiA, και κυττάρων *crtO Synechocistis 6803* υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου για 3, 7 και 40 μέρες

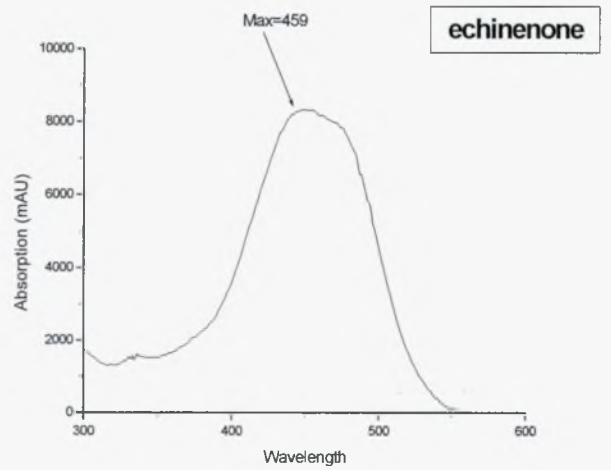
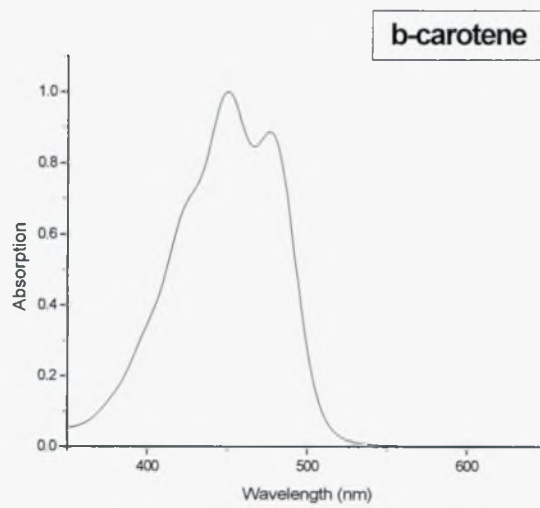
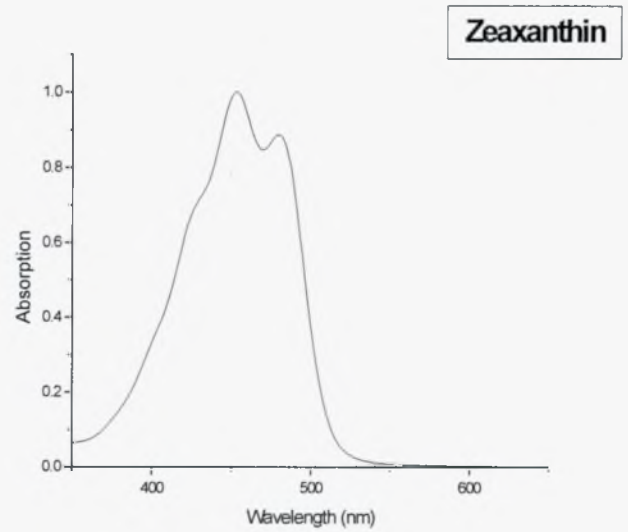
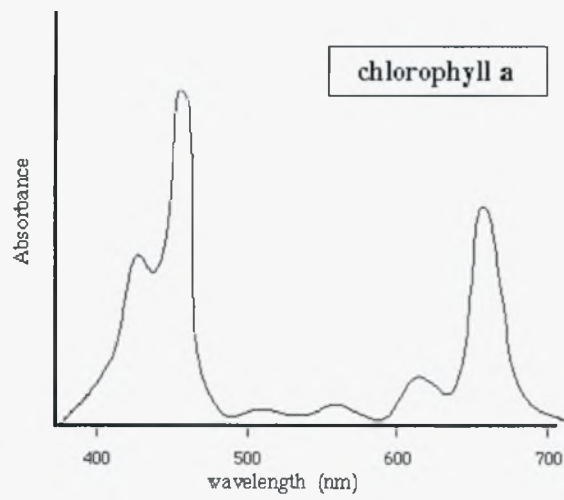
Δεδομένου ότι η παρουσία της IsiA εξακριβώθηκε και στις δύο κυτταρικές καλλιέργειες έπρεπε να απομονωθούν συσσωματώματα της IsiA καθώς και θυλακοειδείς μεμβράνες από τις δύο καλλιέργειες ώστε να επιβεβαιωθεί η σύστασή τους για τα καρτενοειδή και να ληφθούν μετρήσεις από καθαρά συσσωματώματα της IsiA. Για να επιτευχθεί ο στόχος αυτός, κύτταρα και των δυο τύπων κυττάρων διεργάγησαν και ακολούθησε χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής ώστε να διαχωρισθούν οι πρωτεΐνες από άλλα βιομόρια, διαδικασία η οποία ακολούθηθηκε από χρωματογραφία FPLC ώστε να απομονωθούν καθαρά συσσωματώματα πρωτεΐνης IsiA. Στην εικόνα 4 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα της FPLC και τα κλάσματα στα οποία η IsiA εκλούστηκε.

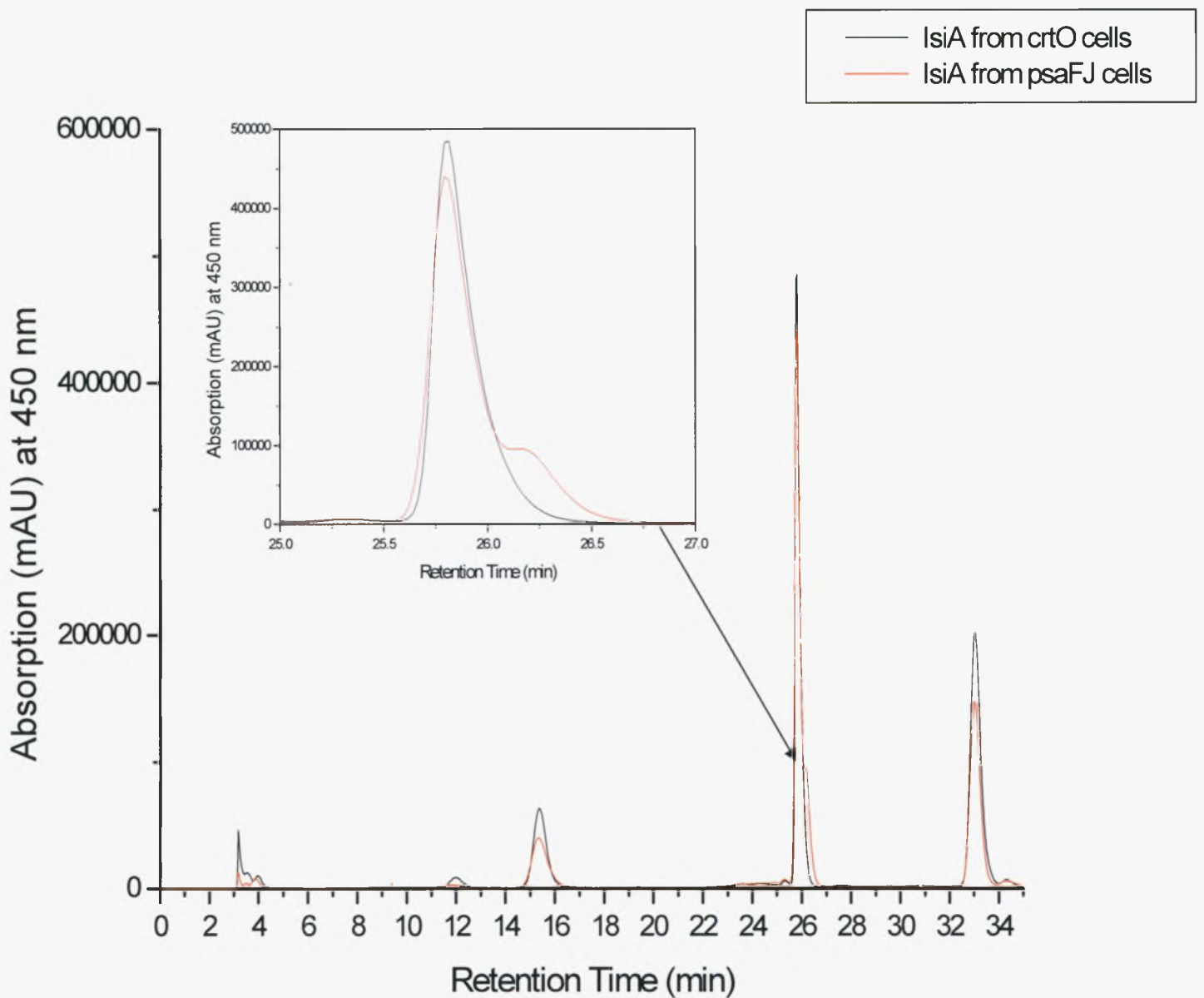


Εικόνα 4: FPLC χρωματογράφημα κυττάρων *crtO* σε περιβάλλον άνευ σιδήρου για 18 μέρες.

Η σύνθεση των απομονωμένων συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης IsiA από στελέχη κυττάρων τόσο *crtO* όσο και *psaFJ* σε χρωμοφόρα αναλύθηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία HPLC. Στην εικόνα 5 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα HPLC στα 450 nm της απομονωμένης πρωτεΐνης IsiA και από τα δύο είδη κυττάρων, όπου η IsiA που προέρχεται από κύτταρα *psaFJ* παρουσιάζει μία ζώνη που δεν είναι παρούσα στην αντίστοιχη από τα *crtO*. Η ζώνη αυτή προσδιορίστηκε ως το καρροτενοειδές εχινενόνη. Στο χρωματογράφημα παρουσιάζονται επίσης και τα υπόλοιπα κύρια μόρια που είναι συνδεδεμένα στην IsiA πρωτεΐνη που αντιστοιχούν στις ζώνες στα 16, 26 και 34 λεπτά και είναι αντίστοιχα η ζεαξανθίνη, η χλωροφύλλη α και το β-καροτένιο. Εδώ παρουσιάζονται και τα φάσματα απορρόφησης καθενός από τα μόρια αυτά.

Τα φάσματα απορρόφησης των 3 κύριων καροτενοειδών που είναι προσδεδεμένα στην *IsiA* καθώς επίσης και το φάσμα απορρόφησης της χλωροφύλλης *a*





Εικόνα 5: Χρωματογράφημα HPLC απομονωμένης πρωτεΐνης *IsiA* από κύτταρα *crtO* και *psaFJ*. Και οι 2 καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε περιβάλλον άνευ σιδήρου για 13 μέρες. Στο γράφημα υποδεικνύεται η διαφορά μεταξύ των δύο φασμάτων στο 26.5 λεπτό, όπου η κορυφή που εμφανίζεται στα *psaFJ* κύτταρα δεν υφίσταται στο αντίστοιχο των *crtO*.

Από την ανάλυση της σύνθεσης της πρωτεΐνης *IsiA* αποδεικνύεται η απουσία του καρροτενοειδούς εχινενόνης όπως ήταν αναμενόμενο από τα κύτταρα *crtO* και η παρουσία

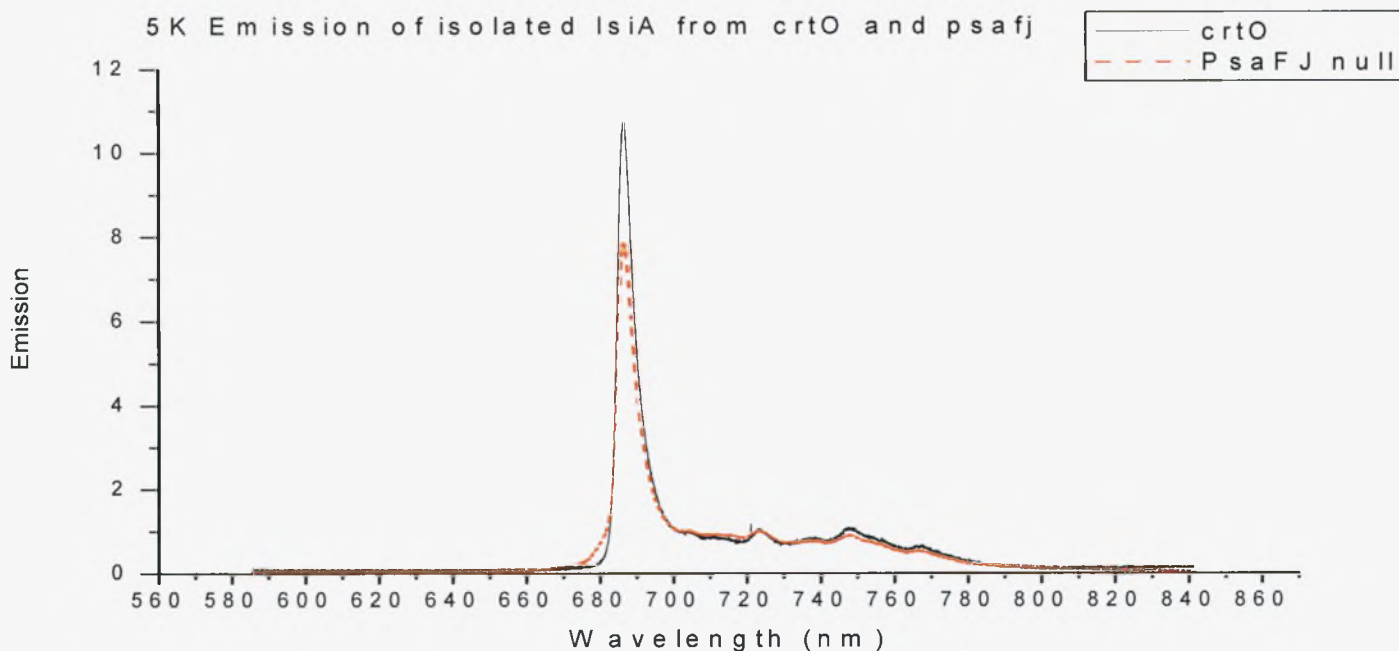
του αντίστοιχα στα κύτταρα psaFJ. Επίσης έδειξε την παρουσία 3 κύριων χρωστικών ουσιών που είναι κοινά και στα 2 είδη, της χλωροφύλλης α, της ζεαξανθίνης, και του β-καροτενίου. Κάθε μόριο IsiA έχει βρεθεί να δεσμεύει 16 μόρια χλωροφύλλης α και χρησιμοποιώντας το ως στοιχείο αναφοράς μπορούν να ποσοτικοποιηθούν τα υπόλοιπα μόρια. Στον πίνακα.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για κάθε τύπου κυττάρων.

Πίνακας 1. Η σύνθεση ως προς τις χρωστικές μονομερούς πρωτεΐνης IsiA για τα psaFJ και crtO

Pigments	PsaFJ	CrtO
<i>Χλωροφύλλη α</i>	16	16
<i>Ζεαξανθίνη</i>	0.9	1.1
<i>Εχινενόνη</i>	1	-
<i>β-καροτένιο</i>	2.2	3

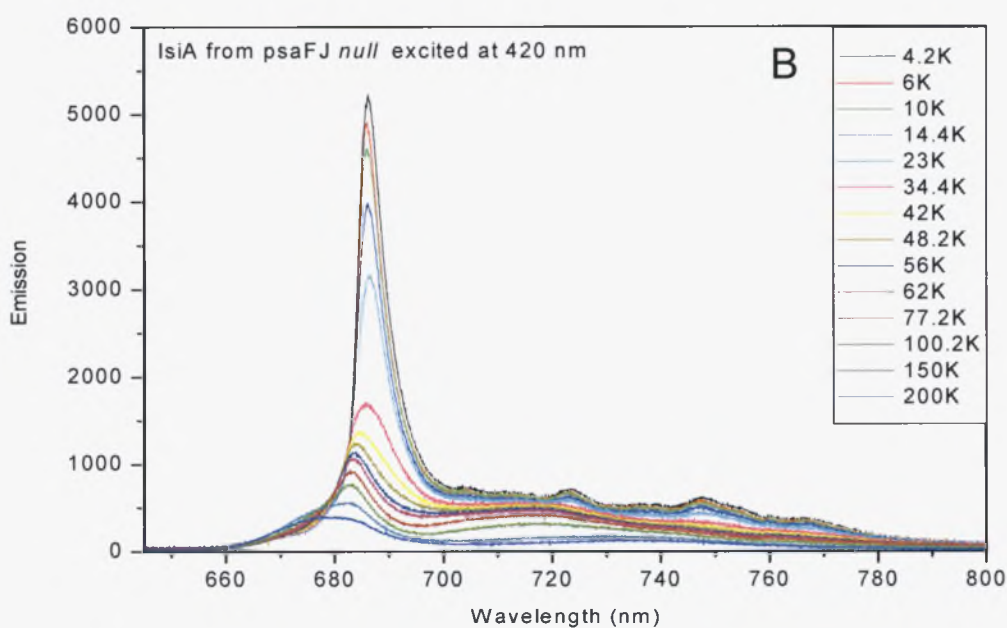
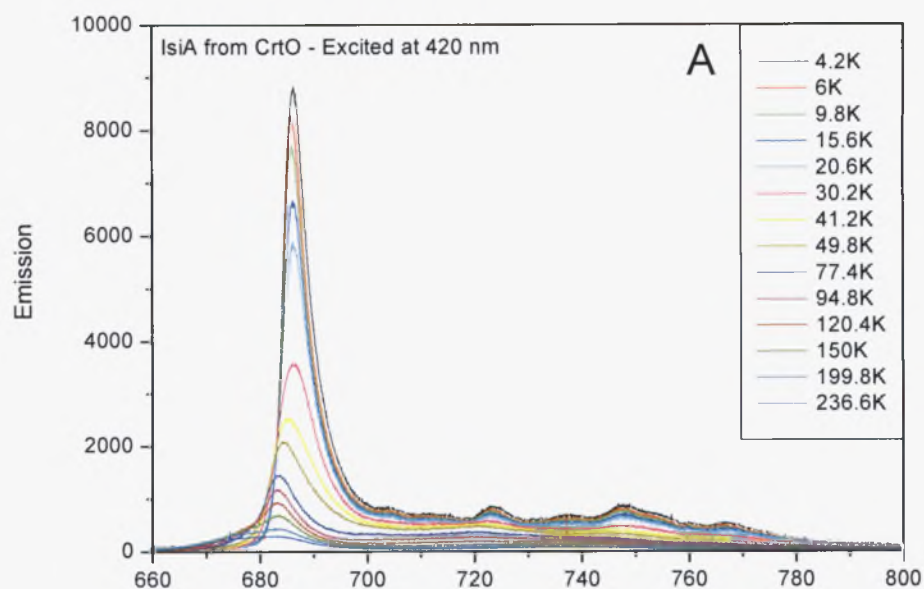
Από τις τιμές του πίνακα γίνεται εμφανές ότι η σύνθεση της πρωτεΐνης IsiA ως προς τις χρωστικές ουσίες είναι συγκρίσιμη για τους δύο τύπους κυττάρων, αλλά όχι ταυτόσημη. Για τα κύτταρα crtO, στα οποία απουσιάζει το καροτενοειδές εχινενόνη, υπάρχει μια αύξηση στην παραγωγή των υπολοίπων καροτενοειδών σε σύγκριση με τα κύτταρα psaFJ. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι θέσεις πρόσδεσης της εχινενόνης έχουν αντικατασταθεί κυρίως από το β-καροτένιο και σε μικρότερο βαθμό από τη ζεαξανθίνη.

Αφού είχε πλέον οριστεί η σύνθεση ως προς τα καροτενοειδή έπρεπε να ερευνηθεί εάν το καροτενοειδές εχινενόνη είναι το σημαντικό μόριο για την διαδικασία απόσβεσης ή εάν η απουσία του δεν έχει καμία επίπτωση. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φθορισμού στην απομονωμένη πρωτεΐνη IsiA και στους 2 τύπους κυττάρων. Στην εικόνα 6 παρουσιάζεται το φάσμα φθορισμού απομονωμένης πρωτεΐνης IsiA σε θερμοκρασία 5K και από τους 2 τύπους κυττάρων, όπου και οι 2 τύποι παρουσιάζουν παρόμοια φάσματα με μία στενή ζώνη φθορισμού στα 686 nm, που συνοδεύεται από δονητικές μεταπτώσεις σε μεγαλύτερα μήκη κύματος.



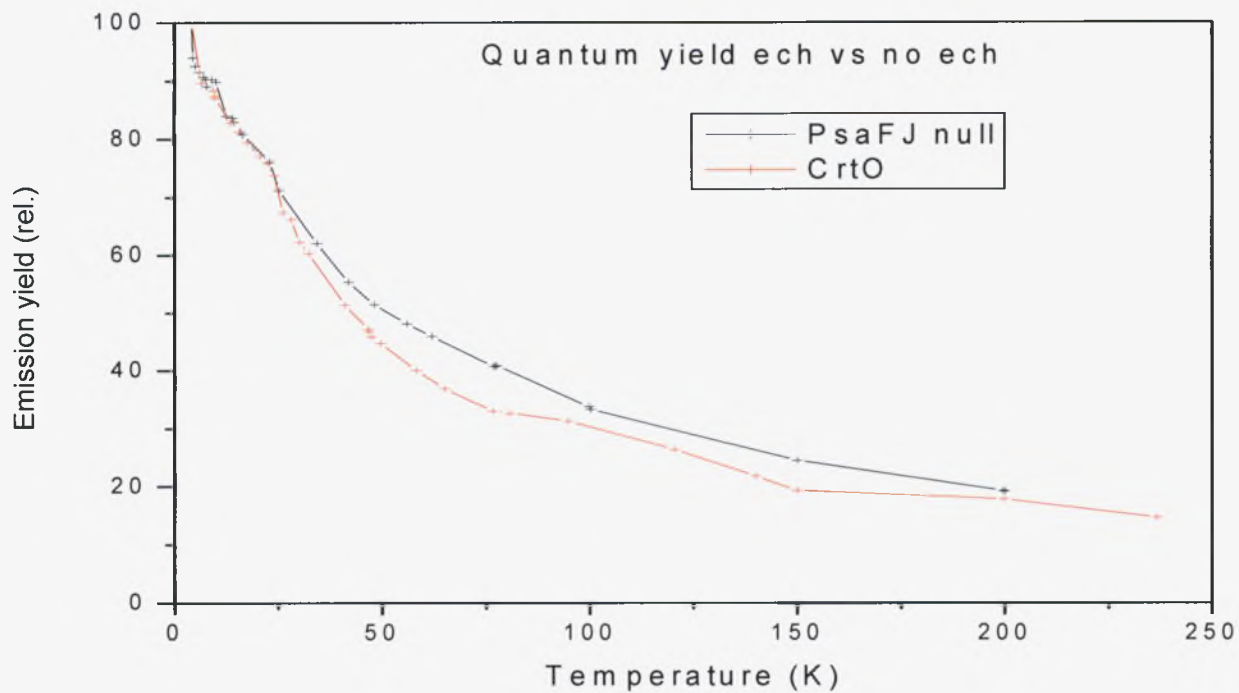
Εικόνα 6: Φάσμα εκπομπής φθορισμού σε θερμοκρασία 5K και ακτίνα διέγερσης στα 420 nm από απομονωμένη πρωτεΐνη IsiA από crtO και psafJ

Άλλες αποδείξεις που φανερώνουν ότι το καροτενοειδές εχινενόνη δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία απόσβεσης της επιπλέον ενέργειας προέρχονται από τις μετρήσεις φθορισμού σταθερής εκπομπής σε διάφορες θερμοκρασίες που πραγματοποιήθηκαν και στους 2 τύπους IsiA. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες μεταξύ 4.2K και 230K παρουσιάζονται στις εικόνες 7A και 7B. Σε θερμοκρασία 4.2K και τα 2 φάσματα παρουσιάζουν μια ζώνη με μέγιστο στα 686 nm με παρόμοια δονητική συμπεριφορά σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Επιπλέον παρουσιάζουν το ίδιο εύρος ζώνης στη θερμοκρασία αυτή. Εκτός αυτού και τα 2 φάσματα παρουσιάζουν παρόμοια μετατόπιση προς την κυανή περιοχή καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία καθώς επίσης και μια έντονη μείωση της εκπομπής φθορισμού. Όσον αφορά τη μείωση εκπομπής φθορισμού αυτό αποδεικνύεται αν συγκρίνουμε την παραγωγή ενέργειας φθορισμού στις διάφορες θερμοκρασίες σε σχέση με αυτή στους 4.2K. Η σύγκριση αυτή αποδεικνύει ότι η μείωση αυτή είναι παρόμοια σε μεγάλο βαθμό στις 2 περιπτώσεις και ιδιαίτερα στις χαμηλές θερμοκρασίες. Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται η κβαντική απόδοση φθορισμού στις 2 περιπτώσεις.



Εικόνα 7: Α) Εκπομπή φθορισμού σε διάφορες θερμοκρασίες της *IsiA* από κώτταρα *crtO*. Β) Εκπομπή φθορισμού σε διάφορες θερμοκρασίες της *IsiA* από κώτταρα *psaFJ*ς. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί και από τα γραφήματα το μέγιστο της ζώνης της *IsiA* αυξάνεται στις χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ μετά τα 40K το μέγιστο βρίσκεται σταθερά γύρω στα 690 nm.

Επίσης στις χαμηλότερες θερμοκρασίες από τα 4K μέχρι τα 40K η παρουσία του PSI μπορεί να παρατηρηθεί με μέγιστο γύρω στα 720 nm. Αυτή η ζώνη προκύπτει λόγω της μεταφοράς ενέργειας από την IsiA που είναι δεσμευμένη στο PSI.



Εικόνα 9: Συγκριτικό διάγραμμα της κβαντικής απόδοσης φθορισμού από συσσωματώματα IsiA και από τους 2 τύπους κυττάρων

Συζήτηση

Αυτή η μελέτη επιβεβαιώνει αποτελέσματα από προηγούμενα πειράματα, ότι δηλαδή η έλλειψη σιδήρου οδηγεί στην παραγωγή της πρωτεΐνης IsiA, η οποία διαδραματίζει πολλούς ρόλους στο φωτοχημικό σύστημα. Πιστεύεται ότι η IsiA λειτουργεί ως χώρος αποθήκευσης της χλωροφύλλης, ως κεραία φωτός για το PSI και ότι προστατεύει το PSII ενάντια στο φωτοχημικό στρες μέσω σκίασής του. Η πρωτεΐνη IsiA μπορεί να σχηματίσει υπερσύμπλοκα ποικίλης δομής με έναν ή δύο δακτυλίους, οι οποίοι περιβάλλουν ή όχι το PSI. Αλλά η έλλειψη σιδήρου στα κυανοβακτήρια έχει επίσης ως αποτέλεσμα την μείωση των PSI και PSII στην φωτοχημική μηχανή, λόγω της υψηλής σημασίας του σιδήρου για τη δομή και των δύο συστημάτων, που έχει τελικά σαν αποτέλεσμα τον θάνατο των κυττάρων.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο μεταλλαγμένα στελέχη κυανοβακτηρίων, το crtO *Synechocystis* της σειράς PCC 6803 και το psaFJ *Synechocystis* της σειράς PCC 6803. Από την ανάλυση της HPLC χρωματογραφίας η οποία πραγματοποιήθηκε σε μεμβράνες συσσωματωμάτων IsiA και από τα δύο στελέχη επιβεβαιώθηκε η απουσία του καροτενοειδούς εχινενόνη όπως ήταν αναμενόμενο από τα κύτταρα crtO. Στα μεταλλαγμένα στελέχη crtO απουσιάζει το γονίδιο της κετολάσης του β-καροτενίου, που είναι υπεύθυνο για την μετατροπή του β-καροτενίου σε εχινενόνη. Η απουσία αυτού του καροτενοειδούς έχει σαν συνέπεια την μεγαλύτερη παραγωγή των καροτενοειδών ζεαξανθίνη και β-καροτένιο, τα οποία το αντικαθιστούν στις θέσεις πρόσδεσής του στην IsiA. Όπως έχει ήδη δείχθει και από τα δεδομένα του πειράματος, η παραγωγή β-καροτενίου είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με αυτή από τη ζεαξανθίνη. Από την άλλη πλευρά τα μεταλλαγμένα στελέχη psaFJ έδειξαν να παράγουν ολόκληρη τη σειρά καροτενοειδών και μάλιστα σε ποσότητες που συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες.

Όσον αφορά τις ιδιότητες απόσβεσης ενέργειας του καροτενοειδούς εχινενόνη και την σημασία του στην διαδικασία απόσβεσης, από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν και στους 2 τύπους IsiA τόσο από την θερμοκρασιακή εξάρτηση του φθορισμού όσο και της κβαντικής απόδοσης συμπεραίνεται, ότι η αύξηση της παραγωγής των καροτενοειδών β-καροτενίου και ζεαξανθίνης ισοσταθμίζουν την απουσία της εχινενόνης και ότι μπορούν να λειτουργούν με την ίδια αποτελεσματικότητα ως αποσβέστες ενέργειας.

Αυτό το συμπέρασμα έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενα αποτελέσματα. Στο παρελθόν είχε δείχθει [16] ότι καροτενοειδή με 10 και 11 συζυγείς διπλούς δεσμούς παρουσιάζονταν πιο ισχυροί αποσβέστες ενέργειας σε σύγκριση με αυτούς που είχαν περισσότερους. Τα καροτενοειδή β-καροτένιο και ζεαξανθίνη έχουν μήκος 11 συζυγών διπλών δεσμών σε σύγκριση με τη εχινενόνη που διαθέτει 12, όμως από τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δεν φαίνεται καμία ιδιαίτερη διαφορά ως προς τις δυνατότητες απόσβεσης ενέργειας των 2 τύπων IsiA. Αυτό πολύ πιθανά οφείλεται στην διαφορετική σύσταση ως προς τα καροτενοειδή που έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή των ιδιοτήτων απόσβεσης της ενέργειας της πρωτεΐνης IsiA.

References

- [1] Arthur R. Grossman, Michael R. Schaefer, Gisela G. Chiang and Jackie L. Collier. The phycobilisome, a light harvesting complex responsive to environmental conditions. Department of plant biology, The Carnegie Institution of Washington. Microbiological reviews, Sept. 1993
- [2] Conrad W. Mullineaux. Phycobilisome-reaction center interaction in cyanobacteria. 6 October 2007
- [3] Athina Zouni, Horst-Tobias Witt, Jan Kern, Petra Fromme, Norbert Krauß, Wolfram Saenger, Peter Orth. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, vol 409, 8 February 2001, www.nature.com
- [4] B. Galatis, D. Ganotakis, K. Gani-Spyropoulou, G. Karampourniwiths, K. Kotsampasis, E-I. Konstantinidou, I. Manetas, K.A. Roumpelaki-Aggelaki. *Physiology of plants, from the molecule to the environment*. University Editions of Crete 2003
- [5] Stephan-Olav Wenk¹, Dirk Schneider^{1,5}, Ute Boronowsky¹, Cornelia Jäger¹, Christof Klughammer², Frank L. de Weerd³, Henny van Roon³, Wim F. J. Vermaas⁴, Jan P. Dekker³ and Matthias Rögner¹. 1 Plant Biochemistry, Faculty for Biology, Ruhr-University Bochum, Germany, 2 Institute for Botany, University of Würzburg, Germany, 3 Department of Physics and Astronomy, Vrije Universiteit, Amsterdam, the Netherlands, 4 School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ, USA, 5 Department of Biochemistry, Albert-Ludwigs-University Freiburg, Freiburg, Germany. Functional implications of pigments bound to a cyanobacterial cytochrome b6/f complex. *FEBS Journal* 272, 2005
- [6] Jan P. Dekker^a, Egbert J. Boekema^b, *Supramolecular organization of thylakoid proteins in green plants*. Elsevier 2005
- [7] Alberts Bray, Johnson Lewis, Raff Roberts Walter. *Basic principle of cell biology*. Medica Edition P.X. Pasxalidi
- [8] Lubert Stryer. *Biochemistry volume 1. Oxidative phosphorylation*. University Editions of Crete 1997
- [9] Fernando Ferreira & Neil A. Straus. Iron deprivation in cyanobacteria. *Journal of Applied Physiology* 6: 199-210, 1994
- [10] Nataliya Yeremenko, Roman Kouřil, Janne A. Ihalainen, Sandrine D'Haene, Niels van Oosterwijk, Elena G. Andrizhiyevkaya, Wilko Keegstra, Henk L. Dekker, Martin Hagemann, Egbert J. Boekema, Hans C. P. Matthijs, and Jan P. Dekker. *Supramolecular Organization and dual function of the IsiA chlorophyll-binding protein in cyanobacteria*. *Biochemistry* 2004
- [11] S. Takaichia,* and M. Mochimarub. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007
- [12] Chengwei Liang, Fangqing Zhao, Wei Wei, Zhangxiao Wen, Song Qin. Carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: Structural and evolutionary scenarios based on comparative Genomics. *International Journal of Biological Sciences* 2006
- [13] Andrizhiyevskaya E.G., Schwabe T.M.E., Germano M., D'Haene S., Kruij J., van Grondelle R., Dekker J.P. *Spectroscopic properties of PSI-IsiA supercomplexes from the cyanobacterium Synechococcus PCC 7942* *Biochim. Biophys. Acta* 1556, 2002, p. 265-272

- [14]Yeremenko N., Kouřil R., Ihalainen J.A., D'Haene S., van Oosterwijk N., Andrizhiyevskaya E.G., Keegstra W., Dekker H.L., Hagemann M., Boekema E.J., Matthijs H.C.P., Dekker J.P. *Supramolecular organization and dual function of the IsiA chlorophyll-binding protein in cyanobacteria* Biochemistry 43, 2004, p. 10308-10313
- [14] Dekker J.P., Germano M., van Roon H., Boekema E.J. *Photosystem II solubilizes as a monomer by mild detergent treatment of unstacked thylakoids membranes* Photosynthesis Research 72, 2002, p. 203-210
- [15]Porra R. J. et al., *Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy* Biochim. Biophys. Acta 975 (1989) 348-394
- [16]Fernandez-Gonzalez B. et al., *A New Type of Asymmetrically Acting β -carotene Ketolase Is Required for the Synthesis of Echinenone in the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803* J. Biol. Chem. 272 (15), 1997, 9728-9733
- [17]Schäfer L. et al., *Functional in situ evaluation of photosynthesis-protecting carotenoids in mutants of the Cyanobacterium Synechocystis PCC6803* Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 78 (2005) 195-201

