ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή θετικών και τεχνολογικών επιστημών

Τομέας Βιοχημείας- Τμήμα Χημείας

Μεταπτυχιακό δίπλωμα

Απομόνωση και πρωτεομική ανάλυση των ετεροκυστών από το κυανοβακτήριο *Anabaena sp.* PCC 7120.

Μαναρωλάκη Ευτυχία

Χημικός, MSc

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014

UNIVERSITY OF CRETE

Faculty of Sciences and Engineering

Department of Chemistry-Biochemistry

<u>Master's Degree</u>

Isolation and proteomic amalysis of heterocysts from cyanobacteria *Anabaena sp.PCC7120*.

Manarolaki Eftychia

Chemist, MSc

Heraklion 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη δυνατότητα που μου παρήχε να πραγματοποιήσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Γεώργιο Τσιώτη, επιστημονικό υπεύθυνο του εργαστηρίου Βιοχημείας για την ανάθεση της παρούσας εργασίας καθώς και για την άριστη συνεργασία όλων αυτών των χρόνων.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής,τον καθηγητή κ.Δημήτριο Γανωτάκη του Τμήματος Χημείας καθώς και τον καθηγητή κ. Κυριάκο Κοτζαμπάση του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης που δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Επίσης τον καθηγητή κ. Αθανάσιο Κουτσολέλο του Τμήματος Χημείας που μας παρήχε τον φασματογράφο μάζας MALDI-TOF/TOF MS/MS για την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας την Αντιγόνη Νικολάκη,Κατερίνα Αρβανίτη,Ελένη Κασσωτάκη, Δημήτρη Δέδογλου, Παναγιώτα Μάρκου, Ειρήνη Μαθιουδάκη για το όμορφο κλίμα και την άψογη συνεργασία καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Τα άτομα του εργαστηρίου Βιοχημείας του κ.Γανωτάκη,τον Δρ.Δημήτρη Στεφανάκη, Θεοχάρη Νάζο, τον Άρη Μίχογλου και την Ελευθερία Βαλσαμή για τη υπέροχη συνεργασία.

Ευχαριστώ θερμά τους φίλους από το Ηράκλειο Γιάννη Κορναράκη, Ειρήνη Μπαλασκά, Κατερίνα Ακτουδιανάκη και Θεοχάρη Νάζο για τη στήριξη τους όλα τα χρόνια και για όλα όσα περάσαμε μαζί. Καθώς και φίλους από τα Χανιά που μου στάθηκαν ιδιαιτέρως.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους γονείς μου Στέλιο και Κατερίνα καθώς και την αδερφή μου Αγγελίνα για την υποστηρίξη τους και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Στους γονείς μου Στέλιο και Κατερίνα

Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ 8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 10
ABSTRACT 12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 –ΕΙΣΑΓΩΓΗ 13
1.1 Φωτοσύνθεση 13
1.2 Κυανοβακτήρια 14
1.2.1 Ταξινόμηση κυανοβακτηρίων 15
1.2.2 Δομή και οργάνωση 16
1.3 Nostoc sp. στέλεχος PCC 7120 ή *Anabaena sp.* στέλεχος PCC 7120 17
1.4 Φωτοσύνθεση και αναπνοή στο *Anabaena sp.*PCC 7120 19
1.4.1 Φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων στα κυανοβακτήρια 21
1.5 Τα φυκοχολοσώματα ως μοριακοί φωταγωγοί 23
1.6 Από τα αγενή κύτταρα στις ετεροκύστες 26
1.7 Παραγωγή υδρογόνου στα κυανοβακτήρια 30
1.8 Ο μεταβολισμός του άνθρακα και του αζώτου στις ετεροκύστες 34
1.9 Πρωτεομική προσέγγιση 36
1.9.1 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization(MALDI) 37
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ 41
2.1 Υλικά 41
2.2 Μέθοδοι 44
2.2.1 Οργανισμός 44
2.2.2 Καλλιέργεια του Anabaena sp.PCC7120 45
2.2.3 Καλλιέργεια για την ανάπτυξη των ετεροκυστών 47
2.2.4 Απομόνωση ετεροκυστών 47
2.2.5 Διάρρηξη απομονωμένων κυττάρων ετεροκυστών με ανιονικό επιφανειοδραστικό Sodium-N-Lauroylsarcosinate 49
2.2.6 Τεχνική χρώσης κυττάρων ετεροκυστών- Alcian Blue 49
2.2.7 Μικροσκοπία-Οπτικό μικροσκόπιο, Φθορισμός 49
2.3 Αναλυτικές μέθοδοι 50

2.3.1 Φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού 50
2.3.1.1 Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνικής συγκέντρωσης..... 50
2.3.1.2 Κατακρήμνιση των πρωτεϊνών 51
2.3.1.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χλωροφύλλης a 52
2.3.2 Μέτρηση Υδρογόνου με αέρια χρωματογραφία GC 52
2.4 Μέθοδοι ανάλυσης και χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών 53
2.4.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών 53
2.4.1.1 SDS-Tricine ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου..... 54
2.4.1.2 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση με διπλή SDS-Tricine –PAGE..... 55
2.4.1.3 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση με ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing- IEF) και SDS-PAGE (2DE)..... 56
2.4.1.4 Χρώση πηκτών με Coomassie κολλοειδές..... 58
2.4.2 Πρωτεόλυση εντός της πηκτής με θρυψίνη 58
2.4.3 Ανάλυση πρωτεϊνών με MALDI φασματοσκοπία μάζας 59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 60
3.1 Μέτρηση αερίου υδρογόνου στα Βακτήρια 61
3.2 Καλλιέργεια και ανάπτυξη ετεροκυστών στα διαφορετικά στελέχη του *Anabaena sp*.PCC7120..... 62
3.3 Καμπύλες ανάπτυξης 64
3.4 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ετεροκυστών 66
3.4.1 Χρήση φασματοσκοπίας ορατού 67
3.4.2 Ανάλυση ετεροκυστών με ηλεκτροφόρηση..... 70
3.5 Κλασματοποίηση ετεροκυστών με διαλυτοποίηση- Χαρακτηρισμός των υποπρωτεομάτων..... 70
3.6 Χαρτογράφηση των διαλυτοποιημένων κλασμάτων των ετεροκυστών στα διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-SDS PAGE) 72
3.6.1 Πρωτεομική ανάλυση του διαλυτού κλάσματος 73
3.6.2 Πρωτεομική ανάλυση του μη διαλυτού κλάσματος 78
3.7 Δυσδιάστατος πρωτεομικός χάρτης ολόκληρων των ετεροκυστών 81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 85
4.1 Παραγωγή αερίου Υδρογόνου από τα Anabaena sp.PCC 7120 86

4.2 Ανάπτυξη του *Anabaena sp*.PCC 7120 και ανάλυση της ανάπτυξης με φασματοσκοπία ορατού 87

4.3 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ετεροκυστών 89

4.4 Συγκριτική μελέτη των δυο υποπρωτεομάτων, μετά τη κλασματοποίηση των ετεροκυστών 90

4.5 Πρωτεομική ανάλυση ολόκληρων ετεροκυστών 94

Βιβλιογραφία 96

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 101

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACN: ακετονιτρίλιο

APS: υπερθετικό αμμώνιο

ATP: αδενοσινο-5-τριφωσφορικός εστέρας

CHAPS:3-[(3-χολαμιδοπρόπυλο)διμεθυλαμμώνιο]1προπανοσουλφονικό

Chla: χλωροφύλλη α

CO_2: διοξείδιο του άνθρακα

DNA: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

DTT: διθειοθρεϊτόλη

EDTA: αιθυλενο-διάμινο-τετραοξικό οξύ

Fd: φερεδοξίνη

GS: γλουταμινική συνθάση

HCCA: α-κυανο-4-υδροξυκιναμινικό οξύ

HEP: ειδική στιβάδα πολυσακχαριτών ετεροκυστών

HEPES: 4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ

HGL: ειδική γλυκολιπιδική στιβάδα ετεροκυστών

Hox: αμφίδρομη υδρογενάση

Hup: υδρογενάση πρόσληψης

HupL: μεγάλη υπομονάδα της υδρογενάσης πρόσληψης

HupS: μικρή υπομονάδα της υδρογενάσης πρόσληψης

IEF: ισοηλεκτρική εστίαση

IPG: ακινητοποιημένη διάθμιση Ph

kDa: kilodalton

m RNA : αγγελιαφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ

MALDI: ιονισμός με laser απόπτυση, υποβοηθούμενη με υπόστρωμα

MS: φασματοσκοπία μάζας

NADPH: νικοτιναμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο-φωσφορικής οξειδάσης

OM: εξωτερική μεμβράνη

PAGE: ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου

PC: πλαστοκυανίνη

Pheo: φαιοφυτίνη

PI: ισοηλεκτρικό σημείο

PMSF: φαινυλο-μέθυλο-σουλφόνυλο-φθόριο

PQ: πλαστοκινόνη

PSI: φωτοσύστημα τύπου I

PSII: φωτοσύστημα τύπου II

RET: αναπνευστική μεταφορά ηλεκτρονίων

Rubisco: διφωσσφορική καρβοξυλάση της ριβουλόζης

SDH: ηλεκτρική αφυδρογονάση

SDS: δωδεκυλοθειϊκό νάτριο

SPS-A: συνθετάση της φωσφορικής σουκρόζης -A

SPS-B: συνθετάση της φωσφορικής σουκρόζης- B

TCA: τριχλωροοξικό οξύ

TEMED: N,N,N',N'-τετραμεθυλοδιαμίνη

TFA: τριφθοροξικό οξύ

TOF: ανιχνευτής χρόνου πτήσης

Tricine: N-τρις-(υδροξυμέθυλο)-μέθυλο-γλυκίνη

Tris: τρις-υδροξυμέθυλ-αμινομεθάνιο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Anabaena sp*.PCC7120 ανήκει στην κατηγορία των αρνητικών κατά Gram κυανοβακτηρίων, το οποίο έχει την ικανότητα να επιτελεί οξυγονική φωτοσύνθεση αλλά και καθήλωση αζώτου. Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά αυτού του βακτηρίου, είναι η κυτταρική πολυπλοκότητα, λόγω της ανάπτυξης δύο ειδών κυττάρων (αγενή κύτταρα και ετεροκύστες). Συγκεκριμένα ο ανθεκτικός κυτταρικός τύπος των ετεροκυστών, σε συνθήκες στέρησης αζώτου παράγει μοριακό υδρογόνο. Η διερεύνηση της διαφοροποίησης ή μη των κυττάρων σε ετεροκύστες κατά τη στέρηση, πραγματοποιήθηκε με το να αναπτυχθεί το βακτήριο για πέντε ημέρες σε θρεπτικό μέσο BG11 και στη συνέχεια άλλες δυο ημέρες σε θρεπτικό μέσο BG11^{o}. Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην εφαρμογή πρωτοκόλου απομόνωσης των ετεροκυστών και στην πραγματοποίηση δυο προσεγγίσεων για την πρωτεομική τους μελέτη. Με την πρώτη προσέγγιση επετεύχθει επιλεκτική διαλυτοποίηση της εσωτερικής μεμβράνης των απομονωμένων ετεροκυστών με ανιοντικό επιφανειοδραστικό, για τέσσερα διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου (WTPCC7120, hupL^{-} , hoxH^{-}, hupL^{-} / hoxH^{-}). Για την ανάλυση και το χαρακτηρισμό τους,στα κλάσματα που προέκυψαν, το διαλυτοποιημένο και το μη διαλυτοποιημένο εφαρμόστηκε δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Tricine SDS PAGE και τα πρωτεϊνικά στίγματα που διακρίθηκαν ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας. Οι διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών στα διαφορετικά στελέχη ήταν εμφανής. Ταυτοποιήθηκαν βασικές πρωτείνες των μεταβολικών μονοπατικών για την ανάπτυξη και επιβίωση των ετεροκυστών όπως η **All2269, Alr4550** και η **Alr2887**, με μεγαλύτερο ποσοστό στο στέλεχος που δεν είναι γενετικά τροποποιημένο. Ο αριθμός των πρωτεινών μειώνεται για τα υπόλοιπα στελέχη και παρατηρούμε και την έκφραση μοναδικών πρωτεϊνών σε αυτά. Με τη δεύτερη προσέγγιση αναλύθηκαν πρωτεομικά, ολόκληρες οι ετεροκύστες, χωρίς να έχει προηγηθεί διάρηξη των εξωτερικών μεμβρανών με τις μεμβράνες των θυλακοειδών και την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση των απομονωμένων ετεροκυστών του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε με 2DE IEF/SDS-PAGE. Η διαδικασία έδειξε επιτυχή διαχωρισμό των μεμβρανικών πρωτεϊνών, εφόσον το ποσοστό που ταυτοποιήθηκαν ήταν ίσο με το ποσοστό των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Επιπλέον στη δεύτερη μέθοδο ταυτοποιήθηκαν πρωτείνες που

εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των αγενών κυττάρων σε ετεροκύστες όπως και στην πρώτη προσέγγιση. Αυτό μας επέτρεψε να εκτιμήσουμε ότι η απομόνωση τους επετεύχθει ως ένα βαθμό και έτσι να προσπαθήσουμε να κατανοήσουμε καλύτερα των μεταβολισμό τους και την πρωτεομική σύνθεση και λειτουργία μιας ενιαίας εξωτερικής μεμβράνης για τα δυο είδη κυττάρων. Επιπροσθέτως μελετήθηκε η παραγωγή υδρογόνου από τα στελέχη του κυττάρου και παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη ποσότητα για το στέλεχος hupL^{-}.

ABSTRACT

Anabaena sp.PCC7120 is a Gram negative cyanobacterium, which is able to perform oxygenic photosynthesis and nitrogen fixation. The main characteristic of this bacterium is the complexity of the cell due to the growth of two types of cells (vegetative cells and heterocysts). Specifically, the resistant cell types heterocysts, in nitrogen starvation conditions, produce molecular hydrogen. To investigate the differentiation or not the cells into heterocysts during deprivation was performed by the grow of bacterium for five days in medium BG11 and then two more days in medium $BG11^{o}$.The present study focused on the implementation of an isolation protocol of heterocysts and to execute two methods for proteomic study. With the first method was achieved selective solubilization of the inner membrane of isolated heterocysts with anionic surfactant, for four different strains of the bacterium (WTPCC7120, $hupL^{-}$, $hoxH^{-}$, $hupL^{-}$ / $hoxH^{-}$). For the analysis and characterization of the fragments obtained, the soluble and insoluble, applied dimensional Tricine SDS PAGE electrophoresis and identified the protein spots which were distinguished by mass spectrometry. Differences in the expression of proteins in different strains was evident. Were identified basic proteins of metabolic pathways for the development and survival of heterocysts such as **Alr2269**, **Alr4550 and Alr2887** with a higher percentage in the strain which is not genetically modified. The number of proteins decreases for other strains and so we can observe the expression of unique proteins in them. By the second method analyzed proteomic, whole heterocysts without prior rupture of outer membranes or the thylakoid membranes and the cytoplasmic membrane. The two-dimensional electrophoresis of isolated bacterium heterocysts was performed by 2D IEF / SDS-PAGE. The procedure showed the successful separation of membrane proteins, since a satisfactory percentage were identified. Additional with the second method identified proteins involved in the differentiation of vegetative cells to heterocysts as in the first method. This allowed us to estimate that the isolation was achieved to some extent and thus to understand better their metabolism and the proteomic composition and operation of a single outer membrane of both cell types. Additionally, we have investigated the hydrogen production from the cell strains and we observe a significantly higher amount of strain $hupL^{-}$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 –ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φωτοσύνθεση

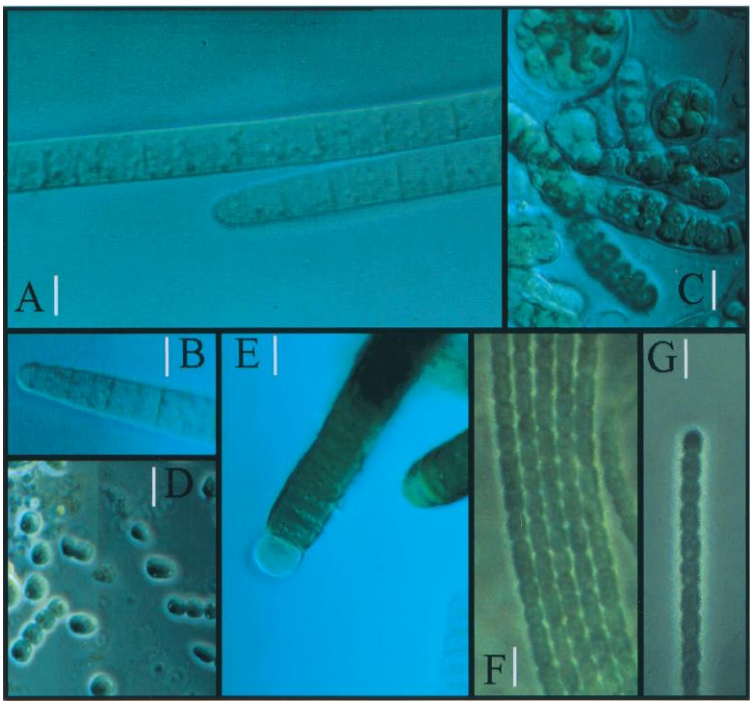
Φωτοσύνθεση είναι η βιολογική διαδικασία κατά την οποία η ηλιακή ακτινοβολία μετατρέπεται σε χημική ενέργεια. Η διεργασία αυτή έχει καθορίσει τη σημερινή σύσταση της ατμόσφαιρας μετά το πέρας αρκετών εκατομμυρίων ετών από την εμφάνιση της. Η φωτοσύνθεση προσδίδει το μεγαλύτερο μέρος της χρησιμοποιούμενης ενέργειας πάνω στη Γη, και αυτό γιατί είναι η μοναδική διαδικασία στη φύση που με τη βοήθεια της ηλιακής ενέργειας, ανάγει το διοξείδιο του άνθρακα, παράγοντας βιομόρια πλούσια σε ενέργεια και οξυγόνο [1, 2]. Η δέσμευση της φωτεινής ενέργειας κατά τη φωτοσύνθεση γίνεται από τη χλωροφύλλη και τις άλλες φωτοσυνθετικές χρωστικές. Μία γενικευμένη εξίσωση της φωτοσύνθεσης είναι η εξής:

$$6CO_2 + 12H_2O \xrightarrow[\text{χλωρ.}]{\text{φως}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 + 6H_2O$$

Η φωτοσυνθετική, πορεία έχει διαχωριστεί σε δύο αλληλοεξαρτώμενες κατηγορίες, τις φωτεινές και τις σκοτεινές αντιδράσεις. Οι φωτεινές αντιδράσεις αποτελούν το φωτοχημικό στάδιο της φωτοσύνθεσης (εξ'ού και η ονομασία τους), κατά το οποίο παράγεται ενέργεια και αναγωγική δύναμη με τη μορφή ATP και NADPH αντιστοίχως. Τα προϊόντα αυτά χρησιμοποιούνται για την αναγωγή του διοξείδιου του άνθρακα προς σχηματισμό υδατανθράκων (γλυκόζη) στο στάδιο των σκοτεινών αντιδράσεων της φωτοσυνθετικής διαδικασίας. Φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν σε οργανικές ενώσεις το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό ονομάζονται φωτοαυτότροφοι οργανισμοί. Οι οργανικές αυτές ενώσεις χρησιμοποιούνται για κυτταρικές λειτουργίες όπως η βιοσύνθεση και η αναπνοή. Ικανότητα φωτοσύνθεσης έχουν όλοι οι οργανισμοί που διαθέτουν φωτοσυνθετικές χρωστικές. Οργανισμοί που επιτελούν φωτοσύνθεση μπορεί να είναι ευκαρυωτικοί, φυτά και φύκη, και από τους προκαρυωτικούς σε ορισμένα βακτήρια και στα φωτοαυτότροφα κυανοφύκη (κυανοβακτήρια) [2].

1.2 Κυανοβακτήρια

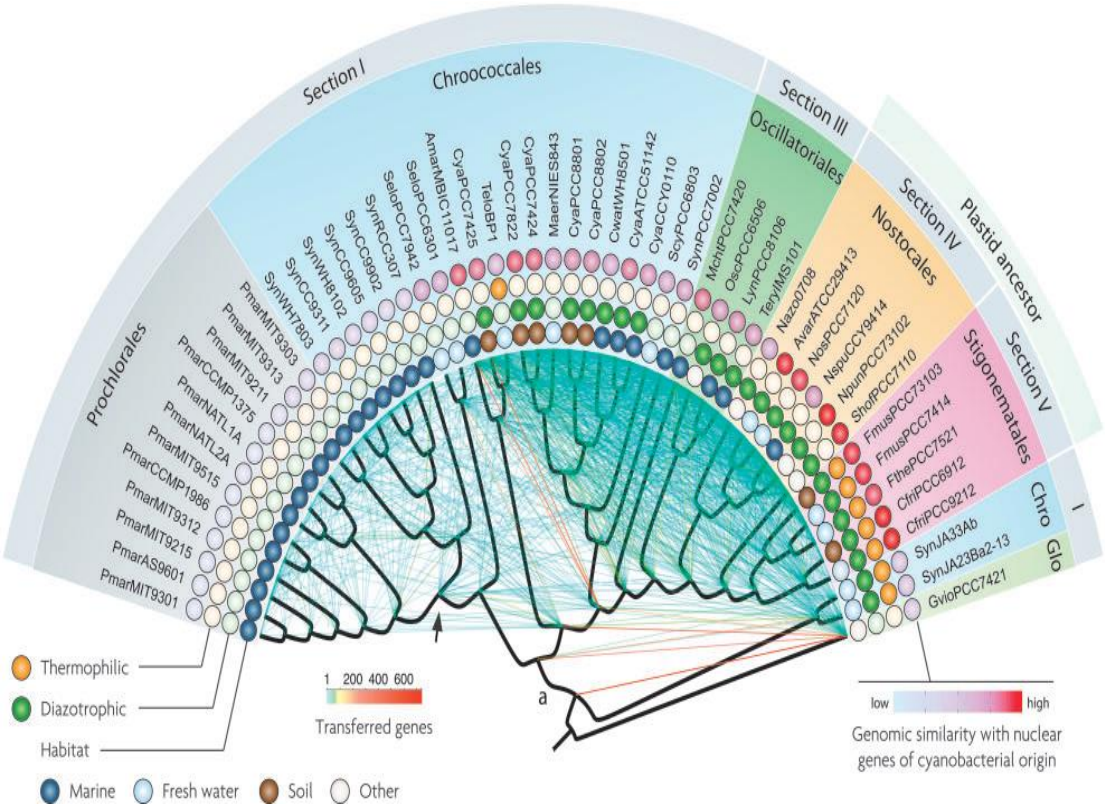
Κυανοβακτήρια ή συχνά αποκαλούμενα μπλε-πράσινα άλγη ή κυανοφύκη είναι μία μεγάλη και ευρέως διαδεδομένη ομάδα φωτοαυτότροφων μικροοργανισμών, οι οποίοι προήλθαν και εξελίχθηκαν νωρίς στην ιστορία της Γής. Τα κυανοβακτήρια είναι μια πολυάριθμη ομάδα μονοκύτταρων ή πολυκύτταρων φωτοσυνθετικών προκαρυωτικών οργανισμών. Ανήκουν στο βασίλειο των Eubacteria και μαζί με τα Archeobacteria συγκροτούν τα Prokaryota. Οι πρώτες μορφές που αποδίδονται σε αυτή την ομάδα βρέθηκαν σε ιζηματογενή πετρώματα που σχηματίστηκαν πριν από 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια[3]. Ένας βασικός λόγος για την εξελικτική ανθεκτικότητα των κυανοβακτηρίων είναι ο επιτυχής συνδυασμός τους σε αποτελεσματικές μεταβολικές οδούς. Τα κυανοβακτήρια εκτελούν οξυγονική φωτοσύνθεση και ορισμένα είδη κυανοβακτηρίων είναι σε θέση να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο. Οι οργανισμοί αυτοί αναπτύσονται σε μια ευρεία ποικιλία βιοτόπων, συμπεριλαμβανομένων υδρόβια (αλμυρού και γλυκού νερού), επίγεια και ακραία περιβάλλοντα (όπως ψυχρές λίμνες της Ανταρκτικής ή ζεστές πηγές). Υπερβολική ανάπτυξη των οργανισμών αυτών έχει ως αποτέλεσμα να συγκεντρώνονται σε μεγάλους αριθμούς σε επιφάνειες λιμνών, υδατοδεξαμενών και διακρίνονται ως πράσινοι επιπλέοντες κόκκοι. Σε αυτές τις συνθήκες μπορούν να απελευθερώσουν τοξίνες, γνωστές ως κυανοτοξίνες. Τα κυανοβακτήρια αποτελούν την μεγαλύτερη, την πιο ποικιλόμορφη και την ευρύτερα εξαπλωμένη ομάδα φωτοσυνθετικών προκαρυωτικών οργανισμών. Επίσης είναι οι μοναδικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί που επιτελούν οξυγονική φωτοσύνθεση παρόμοια με αυτή των φυτών. Τα περισσότερα κυανοβακτήρια είναι αερόβια και φωτοαυτότροφα. Ορισμένα στελέχη μπορούν να επιζήσουν σε απόλυτο σκοτάδι αλλά και κάποια άλλα που είναι ετερότροφα, δηλαδή συνθέτουν το οργανικό τους υλικό, είτε άμεσα είτε έμμεσα, από τη δραστηριότητα των αυτότροφων οργανισμών. Τα κυανοβακτήρια συμβιώνουν με μύκητες, ασπόνδυλα (σπόγγους) και φυτά (λειχήνες, βρυόφυτα, αγγειόσπερμα) [4].



Εικόνα 1: Ποικιλομορφία στη μορφολογία των κυανοβακτηρίων, (A,B) Λεπτομέρειες trichome μορφολογία του M. Vaginatus, (C) Chlorogloeopsis sp.εμπλουτισμένη καλλιέργεια από Nostoc αποικία, (D) Nostoc κύτταρα και κοντά ινίδια, (E) Scytonema sp, (F,G) κυανοβακτήρια trichomes 4 mm (A, B, F, G) και 8 mm (C, D, E).

1.2.1 Ταξινόμηση κυανοβακτηρίων

Έχουν απομονωθεί περίπου 2000 είδη κυανοβακτηρίων, τα οποία μπορούν να χωριστούν σε 150 γένη. Επειδή πολλά κυανοβακτήρια στερούνται ευδιάκριτων μορφολογικών χαρακτηριστικών, η ταξινόμηση τους είναι ιδιαίτερα δύσκολη και διαρκώς αναδιατάσσεται. Στο εγχειρίδιο Bergey's Manual of systematic Bacteriology η ταξινόμηση των κυανοβακτηρίων γίνεται σε πέντε υποκατηγορίες, οι οποίες είναι οι ακόλουθες :α) Τάξη Chroococcales , στην οποία συμπεριλαμβάνονται μονοκύτταρα κυανοβακτήρια που αναπαράγονται με απλή διχοτόμηση, β) Τάξη Pleurocapsales , στην οποία εμπεριέχονται μονοκύτταρα κυανοβακτήρια που αναπαράγονται με πολλαπλή διχοτόμηση, γ) Τάξη Oscillatoriales , δ) Τάξη Nostocales και ε) Τάξη Stigonematales. Οι τρεις τελευταίες Τάξεις περιέχουν τα νηματοειδή κυανοβακτήρια [5].

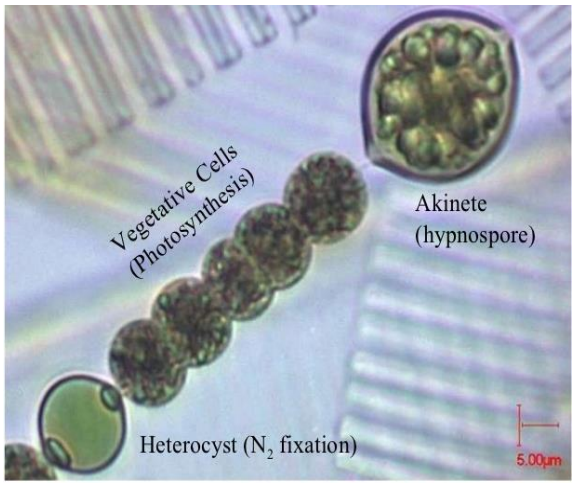


Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της εξέλιξης των γονιδίων σε γονιδιώματα κυανοβακτηρίων

1.2.2 Δομή και οργάνωση

Το μέγεθος των κυττάρων κυμαίνεται από 0,5-1 μικρόμετρα σε διάμετρο έως 60 μικρόμετρα σε μήκος δηλαδή το μέγεθος ενός τυπικού βακτηριακού κυττάρου. Το τοίχωμά τους μοιάζει με των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης γίνονται μέσα στο σύστημα της θυλακοειδούς μεμβράνης του κυττάρου. Επιπροσθέτως ως ξεχωριστές δομές του κυττάρου διακρίνονται διάφορα πολυφοσφωρικά σώματα που λειτουργούν σαν απόθεμα φωσφορικών αλάτων, καθώς και τα κενοτόπια που πληρούνται με αέριο και βοηθούν στη πλευστότητα των πολυφωσφορικών σωμάτων. Η αναπαραγωγή των κυανόφυτων είναι αγενής (απλή κυτταροδιαίρεση). Στις μονοκύτταρες και αποικιακές μορφές τα θυγατρικά κύτταρα αποχωρίζονται εκκρίνοντας μια νέα θήκη ή σχηματίζουν αποικίες ποικίλου σχήματος. Στις νηματοειδείς μορφές τα θυγατρικά κύτταρα παραμένουν ενωμένα και η μεταξύ τους επικοινωνία εξασφαλίζεται με λεπτές κυτταροπλασματικές προβολές (πλασμοδέσμες). Κανένα κυανοβακτήριο δεν φέρει

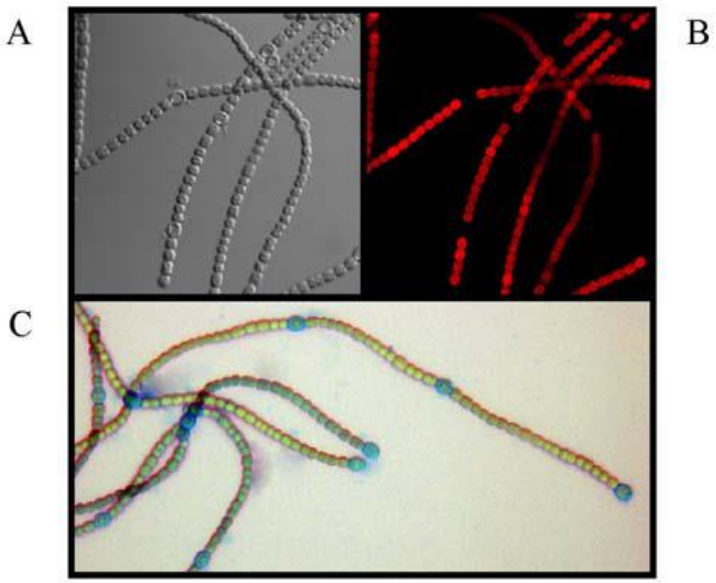
μαστίγια, ενώ ορισμένα έχουν δυνατότητα ολίσθησης. Μερικά δε εξ αυτών είναι μονοκύτταρα ενώ άλλα σχηματίζουν νηματοειδής (απλές ή διακλαδισμένες) δομές, [6] και παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο κυτταρικής διαφοροποίησης. Ως προκαρυώτες δεν διαθέτουν μεμβρανικές δομές και οργανίδια, ούτε διακριτό πυρήνα, ωστόσο περιέχουν χλωροφύλλη α και διεξάγουν οξυγονική φωτοσύνθεση [7]. Τα θυλακοειδή βρίσκονται ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα και όχι σε χλωροπλάστες. Τα κυανοφύκη έχουν μία μόνο κλάση την Cyanophyceae. Μεταξύ νηματοειδών κυανοβακτηρίων, υπάρχει ένας βαθμός κυτταρικής διαφοροποίησης. Μέσα στα νηματοειδή , αγενή κύτταρα μπορεί να αναπτύσσονται δομικά και λειτουργικά τροποποιημένα εξειδικευμένα κύτταρα: οι ακινέτες (κύτταρα σε ηρεμία) ή οι ετεροκύστες (κύτταρα που ειδικεύονται στην καθήλωση του αζώτου) [8].



Εικόνα 3: Χαρακτηριστική εικόνα οπτικού μικροσκοπίου στην οποία αποτυπώνονται τα τρία διαφορετικά είδη κυττάρων των κυανοβακτηρίων.

1.3 Nostoc sp. στέλεχος PCC 7120 ή *Anabaena sp.* στέλεχος PCC 7120

Το *Anabaena sp.* στέλεχος PCC 7120 ή αλλιώς γνωστό σαν Nostoc sp.PCC 7120 είναι ένα από τα πιο αντιπροσωπευτικά είδη κυανοβακτηρίων, ικανό να πραγματοποιεί οξυγονική φωτοσύνθεση. Αυτό το είδος, βρέθηκε σε μια δεξαμενή της Μασαχουσέτης και παρατηρήθηκε ότι είχε την ικανότητα να παράγει υδρογόνο σε αναερόβιο περιβάλλον [9].Το κυριότερο χαρακτηριστικό του *Anabaena sp*. PCC 7120 είναι η κυτταρική του πολυπλοκότητα [10]. Παρουσία συνδυασμένης πηγής αζώτου στο θρεπτικό του μέσο, αμμωνίας ή ενώσεων νιτρικού, το στέλεχος σχηματίζει μακρά ινίδια των 100 και περισσοτέρων πανομοιότυπων αγενών κυττάρων[11, 12].



Εικόνα 4: (A) *Anabaena sp.*PCC 7120 ινίδια άγριου τύπου σε φωτεινό πεδίο. Οι ετεροκύστες διακρίνονται ως τα μεγαλύτερα μορφολογικά διαφοροποιημένα κύτταρα στο ινίδιο (B) Αυτοφθορισμός του *Anabaena sp.* Μαύρα σημεία στην εικόνα είναι τα σημεία με τις μη-φωτοσυνθετικές ετεροκύστες (C) μακρά ινίδια αγενών κυττάρων με τις χρωματισμένες μπλε ετεροκύστες

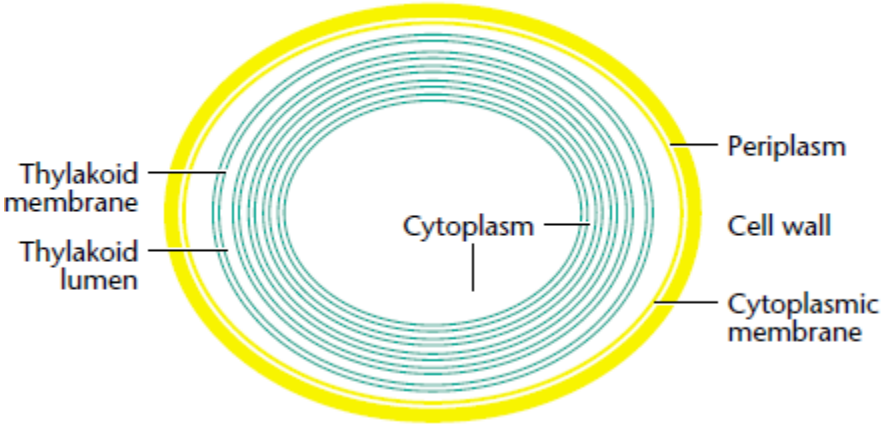
Όπως σε κάθε Gram-αρνητικό κύτταρο, το σύστημα μεμβρανών του *Anabaena sp*. περιλαμβάνει την εσωτερική ή πλασματική μεμβράνη και την εξωτερική μεμβράνη, οι οποίες διαχωρίζονται από το περιπλασματικό χώρο. Στο *Anabaena sp*. το μέγεθος του περιπλασματικού χώρου κυμαίνεται μεταξύ 30-40 nm σε σχέση με τα 7-25nm, που αναλογούν στην απόσταση της εσωτερικής από την εξωτερική μεμβρανική στα περισσότερα Gram αρνητικά βακτήρια [10]. Στο *Anabaena sp*. το κάθε ξεχωριστό κύτταρο έχει τη δική του εσωτερική μεμβράνη, ενώ η εξωτερική μεμβράνη εσωκλείει

όλο το ινίδιο και δεν εισέρχεται στα κενά μεταξύ γειτονικών κυττάρων[10]. Η εξωτερική μεμβράνη και ο περιπλασματικός χώρος είναι κοινά και συνεχόμενα για ολόκληρο το ινίδιο και οι δομές ανήκουν σε ένα μόνο κύτταρο στο ινίδιο. Δίπλα στην εξωτερική και στην εσωτερική μεμβράνη που περιβάλει τα κύτταρα καθώς και μέσα στα αγενή κύτταρα είναι ανεπτυγμένο το μεμβρανώδες σύστημα των θυλακοειδών, που φέρει τη φωτοσυνθετική μηχανή [11]. Το στέλεχος *Anabaena sp.* ανήκει στους μοναδικούς μικροοργανισμούς που είναι ικανοί όχι μόνο να εκτελούν οξυγονική φωτοσύνθεση αλλά και καθήλωση αζώτου. Η καθήλωση αζώτου λαμβάνει χώρα όταν καμία άλλη πηγή αζώτου δεν είναι διαθέσιμη, αλλά μόνο το ατμοσφαιρικό άζωτο. Σε αυτή την διαδικασία, το ατμοσφαιρικό άζωτο, ανάγεται σε αμμωνία και η αμμωνία αφομοιώνεται περαιτέρω σε γλουταμίνη, χρησιμοποιώντας το 2-οξογλουταρικό ως δέκτη της αμμωνίας [13, 14]. Η νιτρογενάση είναι το ένζυμο που καταλύει την μετατροπή του αζώτου (N_2), σε αμμωνία (NH_3) [12]. Το ένζυμο αυτό είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στο οξυγόνο και απενεργοποιείται ακόμα και σε μικρή συγκέντρωση αυτού. Για αυτό το λόγο η φωτοσύνθεση και η καθήλωση αζώτου είναι δυο μη συμβατές διαδικασίες και πρέπει να διαχωρίζονται χωροταξικά [15]. Για τη επίτευξη του διαχωρισμού, το *Anabaena sp.* δημιουργεί ένα δεύτερο τύπο κυττάρων τις ετεροκύστες σε συνθήκες στέρησης αζώτου (**Εικόνα 4**)[16, 17]. Οι ετεροκύστες αναπτύσσονται από προϋπάρχοντα αγενή κύτταρα, σε ημιτακτά διαστήματα κατά μήκος του ινιδίου, από τα οποία 5-10% των κυττάρων αυτών αργότερα θα μετατραπεί σε ετεροκύστες. Οι ετεροκύστες είναι διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία πεθαίνουν μετά από μερικές γενιές αγενών κυττάρων. Αυτοί προμηθεύουν τα γειτονικά κύτταρα, με άζωτο με τη μορφή της γλουταμίνης, σε αντάλλαγμα των προϊόντων της φωτοσύνθεσης, που δεν είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν.

1.4 Φωτοσύνθεση και αναπνοή στο *Anabaena sp.*PCC 7120

Τα κυανοβακτήρια μπορούν να πραγματοποιήσουν οξυγονική φωτοσύνθεση και αναπνοή ταυτόχρονα, στον ίδιο χώρο. Αυτός ο συνδυασμός των μεταβολικών μονοπατιών είναι ασυνήθιστος και αυτή η μεταβολική ευελιξία είναι υπεύθυνη για

την εξελικτική αντοχή των κυανοβακτηρίων, καθώς και για την ικανότητα τους να ευδοκιμούν κάτω από αντίξοες συνθήκες. Δύο διαδικασίες αντίστροφες, η οξυγονική φωτοσύνθεση (μετατροπή του διοξειδίου του άνθρακα και του νερού σε υδατάνθρακες χρησιμοποιώντας την ηλιακή ακτινοβολία) και η αναπνοή (μετατροπή υδατανθράκων σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό απελευθερώνοντας ενέργεια) απαιτούν μονοπάτια μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα οποία κατά ένα μεγάλο βαθμό καταλύονται από πρωτεϊνικά σύμπλοκα στις μεμβράνες του κυττάρου (**Εικόνα 5**). Η θυλακοειδής μεμβράνη, το εσωτερικό μεμβρανικό σύστημα το οποίο διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα από τους αυλούς της μεμβράνης, περιέχει τις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη στα περισσότερα κυανοβακτήρια περιέχει τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας, αλλά όχι φωτοσυνθετικά σύμπλοκα. Η φωτοσυνθετική μεταφορά ηλεκτρονίων λαμβάνει χώρα στις θυλακοειδής μεμβράνες, ενώ στην αναπνοή, η ροή των ηλεκτρονίων λαμβάνει χώρα στα κυτταροπλασματικά συστήματα [18]. Η κύρια αναπνευστική δραστηριότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην δεξαμενή των πλαστοκινονών στα θυλακοειδή των κυανοβακτηρίων περιλαμβάνει τη δράση της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH). Το επιστέγασμα της νέας αυτής έννοιας είναι ότι τα κυανοβακτήρια είναι σε θέση να παράγουν ηλεκτρικό ως αναπνευστικό ενδιάμεσο, και ως εκ τούτου θα πρέπει να έχουν έναν επιπλέον κύκλο, τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Όλα τα ηλεκτρόνια της αναπνευστικής οδού εισέρχονται στην δεξαμενή των πλαστοκινονών μέσω της δραστηριότητάς της SDH και όχι μέσω οξείδωσης του NADPH [19].

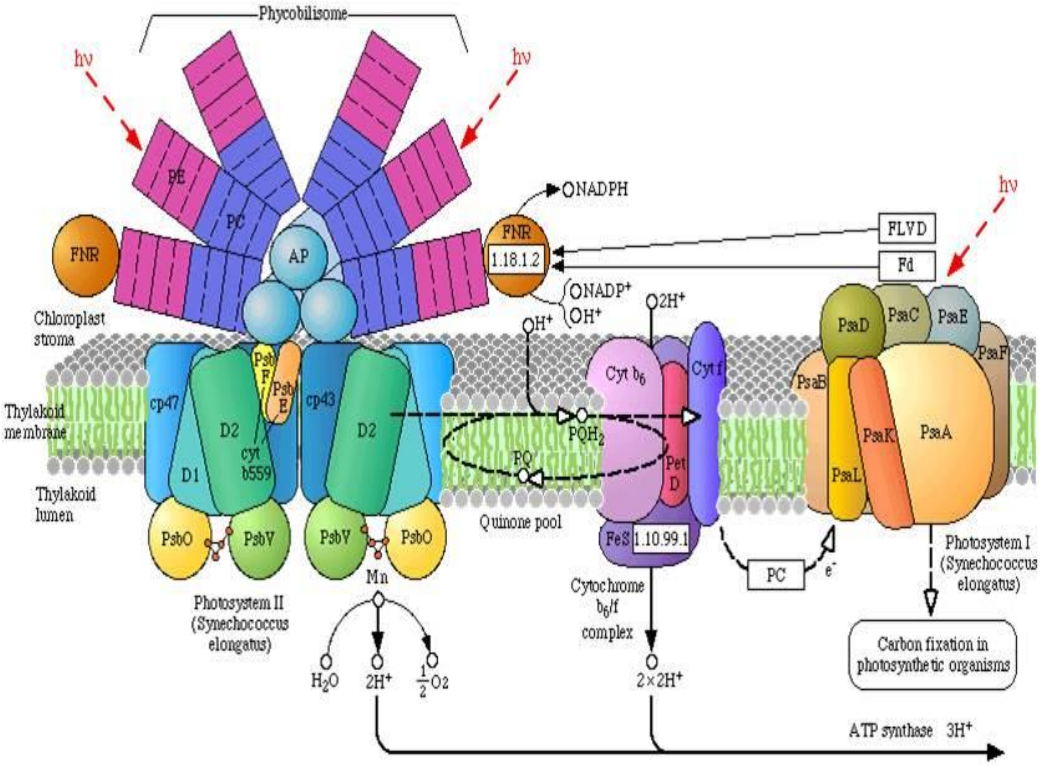


Εικόνα 5: Περίγραμμα των μεμβρανών και των διαμερισμάτων σε ένα κύτταρο κυανοβακτηρίου. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι κίτρινη λόγω των καροτενοειδών, οι θυλακοειδείς μεμβράνες περιέχουν χλωροφύλλη για αυτό είναι πράσινες, ο χώρος μεταξύ δύο θυλακοειδών είναι συνεχής με το κυτταρόπλασμα του κυττάρου.

1.4.1 Φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων στα κυανοβακτήρια

Η φωτοσυνθετική αλυσίδα ροής των ηλεκτρονίων στα κυανοβακτήρια μοιάζει με εκείνη των φυτών. Όπως φαίνεται και στην (**Εικόνα 6**), η απορροφούμενη φωτεινή ενέργεια καταλήγει στο φωτοσυστημα I και II, τα οποία και ιονίζει. Τα μόρια χλωροφύλλης απορροφούν το φως. Ένα ηλεκτρόνιο που έχει διεγερθεί προς μια κατάσταση υψηλής ενέργειας, με την απορρόφηση ενός φωτονίου μπορεί να μεταφερθεί σε γειτονικούς δέκτες ηλεκτρονίων. Το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μετακινείται από το ειδικό ζεύγος χλωροφυλλών, στη φαιοφυτίνη την οποία και ανάγει και στις κινόνες, πυροδοτώντας έτσι την έναρξη της γραμμικής ροής των ηλεκτρονίων, κατά μήκος της οξειδοαναγωγικής αλυσίδας των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης. Τελικά η ενέργεια διεγέρσεως αποσβένεται παράγοντας αναγωγική δύναμη υπό τη μορφή NADPH και η αναγωγή των κινονών οδηγεί στην παραγωγή βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων, η οποία ωθεί τη σύνθεση ATP, απελευθερώνοντας παράλληλα οξυγόνο ως παραπροϊόν. Η εν σειρά σύζευξη του PSII με το PSI αποτελεί τη βάση του λεγόμενου σχήματος Z των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης. Τα δυο φωτοσυστήματα καταλύουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων που προκύπτουν από την φωτόλυση του νερού προς τη φερεδοξίνη (Fd) και τελικά το NADP, δρώντας ως αναγωγάσες. Η μεταφορά πραγματοποιείται με τη διαμεσολάβηση του συμπλέγματος κυτοχρωμάτων b_6f και

των κινητών φορέων ηλεκτρονίων της πλαστοκινόνης (PQ) και πλαστοκυανίνης (PC) ή το κυτόχρωμα c_{553} στα κυανοβακτήρια.

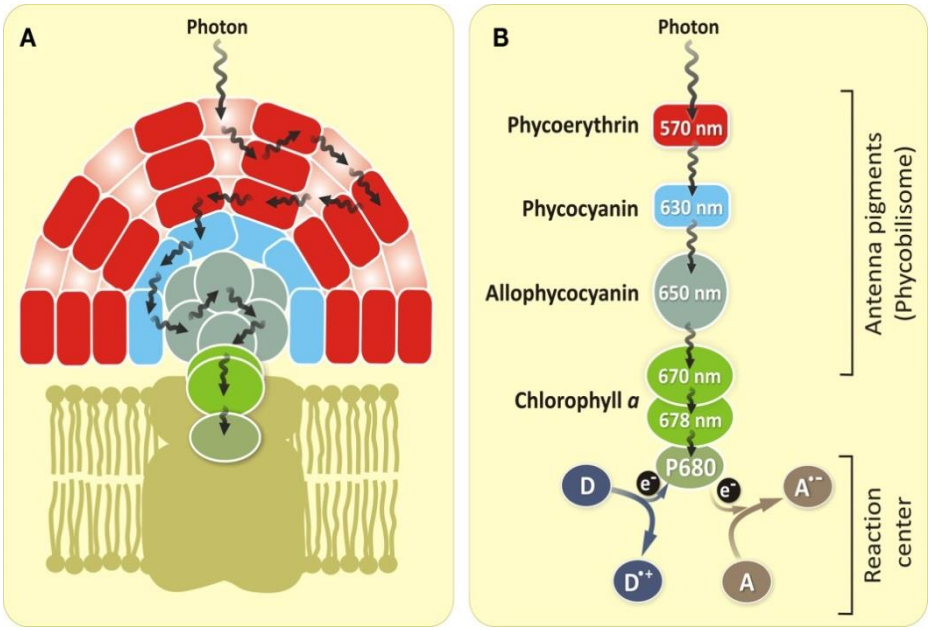


Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών συμπλόκων που συμμετέχουν στις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων για τις διαδικασίες φωτοσύνθεσης και αναπνοής. Φωτοσύστημα ΙΙ, σύμπλεγμα κυτοχρώματος b_6f, Φωτοσύστημα Ι.

Η ATP χρησιμοποιείται για την καθήλωση του CO_2 ,μέσω της δράσης της διφωσφορικής καρβοξυλάσης της ριβουλόζης (Rubisco) στον κύκλο του Calvin για τη σύνθεση των υδατανθράκων. Μια σημαντική διαφορά μεταξύ των κυανοβακτηρίων και των φυτών είναι ότι η στοιχειομετρία του PSI και του PSII. Το PSI είναι σε πλειονότητα, ενώ στα ανώτερα φυτά η αναλογία των PSI και PSII είναι ίση. Μια πιθανή εξήγηση για αυτή την ασυνήθιστη στοιχειομετρία στα κυανοβακτήρια είναι η συμμετοχή του PSI σε μία διαδικασία κυκλικής ροής ηλεκτρονίων, με την συμμετοχή του κυτόχρωματος b_6f της φερεδοξίνης Fd και της PQ [20].

1.5 Τα φυκοχολοσώματα ως μοριακοί φωταγωγοί

Τα κυανοβακτήρια περιέχουν συγκροτήματα πρωτεϊνών, τα φυκοχολοσώματα (phycobilisomes), τα οποία τους επιτρέπουν να συλλέγουν το προσπίπτον φως. Οι φυκοχολοπρωτεΐνες είναι πρωτείνες που απορροφούν στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στο ερυθρό και στο κυανό και αποτελούνται από ανοικτές τετραπυρρολικές αλυσίδες. Τα φυκολοσώματα είναι συνδεδεμένα στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των θυλακοειδών, όπου λειτουργούν ως φωτοαπορροφητικές κεραίες, διοχετεύοντας την ενέργεια φωτοδιέγερσης στα κέντρα αντίδρασης του PSII. Η χρωστική, γνωστή ως φυκοερυθρίνη (phycoerythrin), απορροφά ισχυρότερα το φως σε μήκη κύματος κοντά στα 550 nm, ενώ η φυκοκυανίνη (phycocyanin), απορροφά ισχυρότερα στα 620 nm. Μια τρίτη χρωστική είναι η αλλοφυκυανίνη (allophycocyanin). Τα φυκοχολοσώματα είναι πολύ μεγάλα συγκροτήματα αποτελούμενα από πολλές υπομονάδες φυκοχολοπρωτείνης και συγκροτούνται έτσι ώστε τα μόρια αλλοφυκοκυανίνης να έρχονται σε φυσική επαφή με τη φωτοσυνθετική μεμβράνη και να περιστοιχίζονται από μόρια φυκοκυανίνης και φυκοερυθρίνης. Η φυκοκυανίνη και η φυκοερυθρίνη απορροφούν φως μικρότερου μήκους κύματος (υψηλότερης ενέργειας), διαβιβάζουν την ενέργεια αυτή στην αλλοφυκοκυανίνη και, μέσω αυτής, στη χλωροφύλλη του κέντρου αντίδρασης με την οποία η αλλοφυκοκυανίνη είναι άμεσα συνδεδεμένη (**Εικόνα 7**). Συνεπώς, το φυκοχολόσωμα λειτουργεί ως ένας αποδοτικότατος μεταφορέας ενέργειας από το σύμπλοκο των φυκοχολοπρωτεϊνών στη χλωροφύλλη α [21].

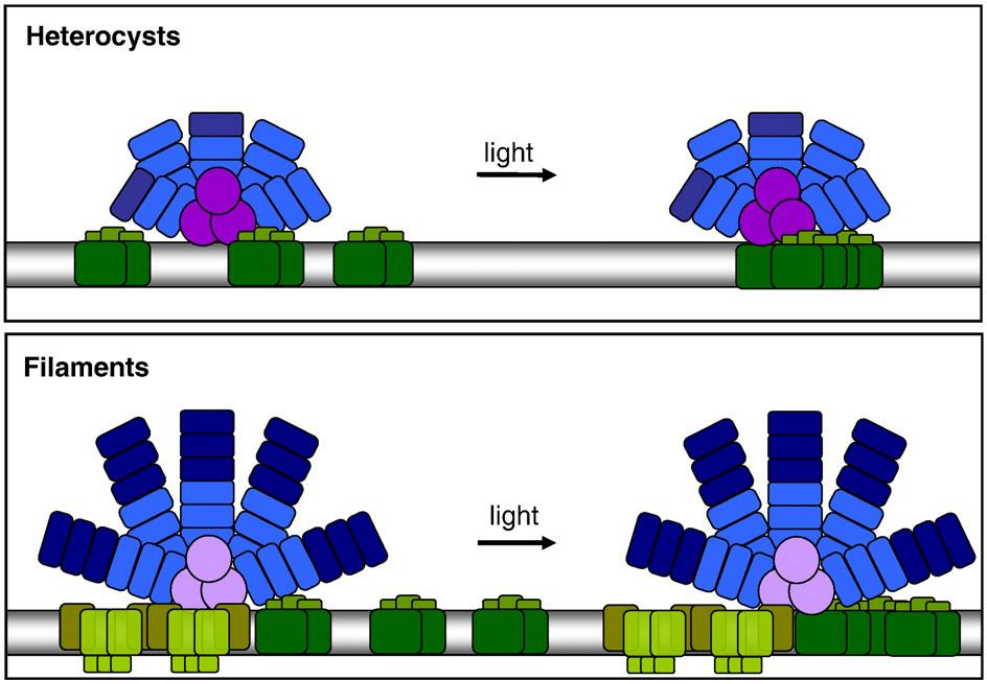


Εικόνα 7: Δομική οργάνωση του συστήματος κεραίας του PSII για κόκκινα φύκια και τα κυανοβακτήρια (A) τα βήματα μεταφοράς ενέργειας, συμπεριλαμβανομένου του διαχωρισμού φορτίου (φωτοχημική αντίδραση) στο κέντρο αντίδρασης του PSII (B) για τα κυανοβακτήρια, η ενέργεια των φωτονίων που απορροφάται περνάει διαμέσου ενός αριθμού μορίων κεραίας μέχρι να φτάσει στο κέντρο αντίδρασης Chla (P680). Οι αριθμοί μήκους κύματος (nm) στο εσωτερικό των κύκλων αντιπροσωπεύουν χρωστικές που αντιστοιχούν στο μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης αυτών των χρωστικών.

Στα κυανοβακτήρια ο τριμερισμός των συμπλοκών του PSI έχει δειχθεί ότι είναι σημαντικός για την ένωση και την αποδοτική μεταφορά ενέργειας από τα φυκοχολοσώματα στα PS [22]. Η ένωση PSI με τα φυκοχολοσώματα μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία του PSI στις PSII ανεπαρκείς ετεροκύστες. Γνωρίζουμε ότι η θυλακοειδής μεμβράνη των ετεροκυστών είναι εμπλουτισμένη με το PSI. Όμως έχουμε επίσης δείξει ότι οι ετεροκύστες, μπορεί να περιέχουν ανέπαφα συγκροτήματα του PSII. Παρά το γεγονός ότι καμία δραστηριότητα διάσπασης του νερού ανιχνεύθηκε, η φωτο-επαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων σε PSII μετρήθηκε. Παρά το μικρότερο ποσό των φυκοχολοπρωτεϊνών που βρέθηκαν σε ετεροκύστες, η μεταφορά της ενέργειας διέγερσης από τα φυκοχολοσωμάτα στο PSI λαμβάνει χώρα στις ετεροκύστες [23]. Επίσης οι ετεροκύστες είναι ικανοί να διατηρούν σταθερές συγκεντρώσεις ATP, κάτω από διαφορετικές εντάσεις φωτός και άλλους παράγοντες που επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση της πλαστοκινόνης. Ένας μηχανισμός που ρυθμίζει το ποσό της ενέργειας διέγερσης που μεταφέρεται στο PSI,

θα παρέχει έναν τρόπο για τις ετεροκύστες, να ανταποκρίνονται στην ποιότητα του φωτός, με σύζευξη ή με αποσύνδεση του φυκοχολοσώματος στο PSI, υποστηρίζοντας έτσι τη λειτουργία του PSI σε αυτές.

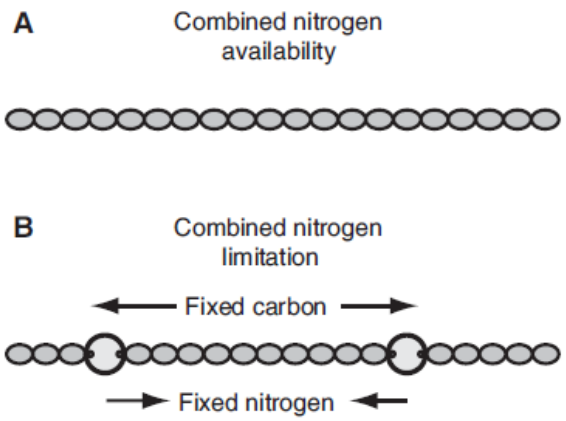
Τα φάσματα απορρόφησης, καθώς και τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης, υποδεικνύουν ότι η μείωση των φυκοχολοσωμάτων κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ετεροκυστών, δεν επηρεάζει όλα τα συστατικά των φυκοχολοσωμάτων εξίσου. Τα φάσματα απορρόφησης σε απομονωμένες ετεροκύστες, έδειξαν μειωμένη ένταση, σε ολόκληρη την περιοχή μεταξύ 550 και 650 nm, σε σύγκριση με εκείνη των αγενών κυττάρων. Η **Εικόνα 8** δείχνει μια σχηματική αναπαράσταση ενός μοντέλου, το οποίο θα μπορούσε να εφαρμοστεί αμφότερα στις ετεροκύστες (πάνω μοτίβο) οι οποίοι έχουν μια τροποποιημένη σύνθεση των φυκοχολοσωμάτων και στα αγενή κύτταρα (κάτω μοτίβο), με κανονική σύνθεση φυκοχολοσωμάτων. Αριστερά σε κάθε μοτίβο, φαίνεται η μετά την προ-φωτισμού κατάσταση με κόκκινο φως: το PSI είναι κατά κύριο λόγο μονομερές και τα φυκοχολοσώματα είναι αποσυνδεδεμένα ή μόνο ελαφρώς ενωμένα με το PSI. Μετά από τον κόκκινο φωτισμό, ο οποίος μπορεί να συγκομισθεί αποτελεσματικά από την κεραία του κέντρου αντίδρασης του PSI, τα φυκοχολοσώματα δεν απαιτούνται για τη βελτιστοποίηση της συλλογής φωτός. Δεξιά σε κάθε μοτίβο, χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό του τριμερούς στο PSI και η σύζευξη των φυκοχολοσωμάτων στα τριμερή του PSI.



Εικόνα 8: Γραφική αναπαράσταση των φυκοχολοσωμάτων. Το πάνω μοτίβο δείχνει την θυλακοειδή μεμβράνη των ετεροκυστών, με σύμπλοκα του κέντρο αντίδρασης, και τροποποιημένα φυκοχολοσώματα,, σε σύγκριση με τα αγενή κύτταρα. Στο πάνω μοτίβο φαίνονται μόνο τα κέντρα αντίδρασης του PSI, ενώ τόσο PSI και PSII απεικονίζονται στο κάτω μοτίβο. Τα αγενή κύτταρα (κάτω μοτίβο) έχουν μία τυπική κεραία φυκοχολοσωμάτων, ενώ τα φυκοχολοσώματα των ετεροκυστών, έχουν μικρότερους ράβδους και ένα αλλαγμένο πυρήνα αλλοφυκοκυανίνης.

1.6 Από τα αγενή κύτταρα στις ετεροκύστες

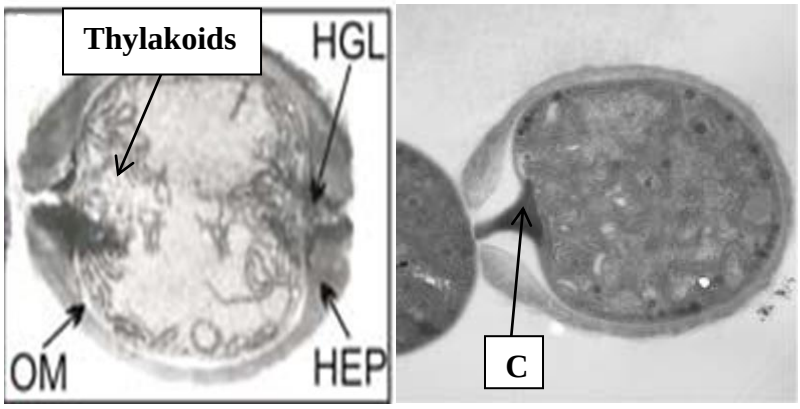
Σε συνθήκες στέρησης αζώτου το *Anabaena sp.*στέλεχος PCC 7120 μπορεί να διαφοροποιήσει το 5-10% των αγενών κυττάρων του, σε ετεροκύστες (**Εικόνα 9**). Η ανάπτυξη ετεροκυστών, προσφέρει ένα εντυπωσιακό παράδειγμα κυτταρικής διαφοροποίησης και αναπτυξιακής βιολογίας σε μια πολύ απλή μορφή. Τα κυανοβακτήρια χρησιμοποιούν κυρίως δύο μηχανισμούς για να διαχωρίσουν την φωτοσύνθεση και την δέσμευση του αζώτου :ένα βιολογικό ρολόι για να τους χωρίσει χρονικά, και πολυκυτταρικότητα σε συνδυασμό με κυτταρική διαφοροποίηση για να τους χωρίσει χωρικά.



Εικόνα 9: Ανάπτυξη ετεροκυστών στα *Anabaena sp.* PCC7120 (A) Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει μια πηγή συνδυασμένου αζώτου οπότε μεγαλώνουν σε νημάτια φωτοσυνθετικών αγενών κυττάρων (B) Απουσία πηγής αζώτου, οι ετεροκύστες διαφοροποιούνται, σχηματίζοντας ένα αναπτυξιακό μοτίβο μιας ετεροκύστης κάθε 10 έως 20 αγενή κύτταρα κατά μήκος των νημάτων.

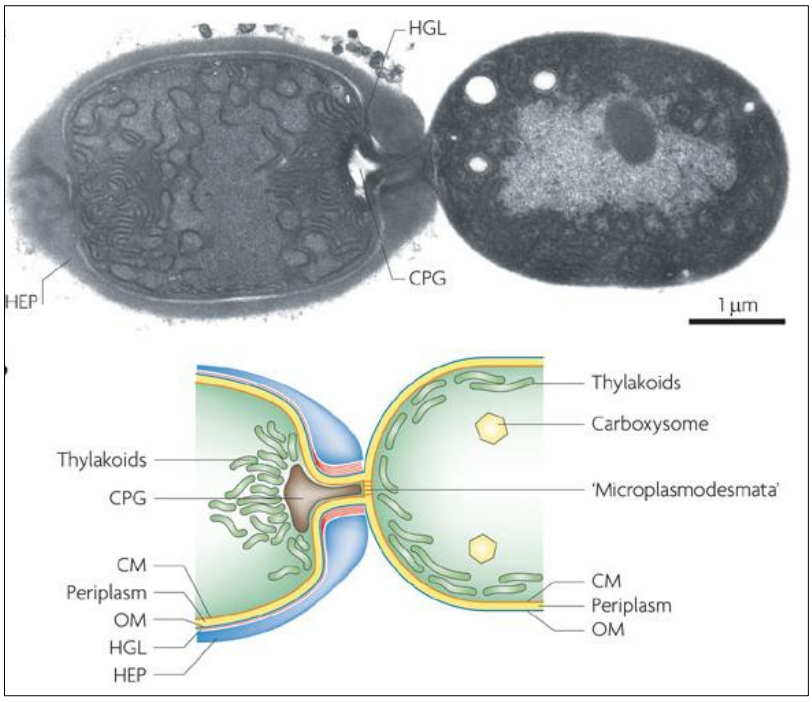
Η ανάπτυξη ετεροκυστών περιλαμβάνει την ενσωμάτωση πολλών εξωτερικών και εσωτερικών σημάτων, την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων σε ένα νήμα, και τέλος τη χρονική και χωρική ρύθμιση των γονιδίων και των κυτταρικών διαδικασιών. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να διανέμονται σε ένα ημι κανονικό σχέδιο κατά μήκος του νήματος [11] και εξειδικεύονται στην καθήλωση του μοριακού αζώτου [12, 24]. Οι ετεροκύστες προμηθεύουν τα αγενή κύτταρα με σταθερό άζωτο, ενώ η δική τους λειτουργία στηρίζεται σε μια πηγή άνθρακα και αναγωγικών, τα οποία και λαμβάνουν από τα αγενή κύτταρα αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη ετεροκυστών επιτρέπει στα κυανοβακτήρια να προσαρμοστούν σε συνθήκες περιορισμένου αζώτου και αντικατοπτρίζει την απαίτηση για ένα μικροοξικό ενδοκυτταρικό περιβάλλον, ώστε να μην επηρεάζεται η λειτουργία της νιτρογενάσης[25]. Στις ετεροκύστες η παραγωγή οξυγόνου μειώνεται με την αποσυναρμολόγηση του PSII. Το PSI παραμένει λειτουργικό και συνεισφέρει μέσω της κυκλικής μεταφοράς ηλεκτρονίων στην παραγωγή ATP [26]. Για την καταστροφή μορίων οξυγόνου που εισέρχονται στα κύτταρα των ετεροκυστών, οι ετεροκύστες διαθέτουν ένα υψηλότερο ρυθμό αναπνοής, σε σχέση με τα αγενή κύτταρα [17]. Τα κυανοβακτήρια έχουν ένα κατά Gram-αρνητικών βακτηρίων κυτταρικό τοίχωμα το οποίο περιλαμβάνει δύο διακριτές μεμβράνες, τη μεμβράνη του κυτταροπλάσματος, μία εξωτερική μεμβράνη (OM), και ένα στρώμα πεπτιδογλυκάνης, το οποίο είναι παχύτερο από ό, τι σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια, και εμπεριέχεται μεταξύ αυτών των δυο μεμβρανών [27]. Οι ετεροκύστες μορφολογικά χαρακτηρίζονται από δύο επιπλέον στοιβάδες στην εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το κύτταρο σε σχέση με τα υπόλοιπα Gram αρνητικά βακτήρια (**Εικόνα 10**). Η μία στοιβάδα αποτελείται από γλυκολιπίδια (HGL) και μειώνει την διαπερατότητα του οξυγόνου. Η άλλη στοιβάδα περιλαμβάνει πολυσακχαρίτες (HEP), οι οποίοι προστατεύουν την εύθραυστη γλυκολιπιδική στοιβάδα [28]. Ως εκ τούτου, η αναδιαμόρφωση του κυτταρικού τοιχώματος είναι μία από τις πρώτες διαδικασίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ετεροκυστών. Το οξυγόνο που διαπερνά το εμπόδιο της γλυκολιπιδικής στοιβάδας, απομακρύνεται μαζί με το μοριακό άζωτο μέσω της αυξανόμενης αναπνευστικής δραστηριότητας ή συζευγνύεται από οξυγενάσες [28]. Η ειδική γλυκολιπιδική στοιβάδα των ετεροκυστών αποτελείται από πολύ-υδροξυ-αλκοόλες με 26 εως 28 άτομα άνθρακα, γλυκοζιτικώς συνδεδεμένα με τη γλυκόζη στον C-1. Το Anabaena sp.έχει δυο

γλυκολιπιδικές στοιβάδες. HGL1 ή 1-(O-α-D-glucopyranosyl)-3,25-hexacosanediol και HGL2 ή 1-(O-α-D-glucopyranosyl)-3-keto-25-hexacosanol[29].



Εικόνα 10: Μικρογραφία διέλευσης ηλεκτρονίου τομών, ενός κυττάρου ετεροκύστης του άγριου τύπου *Anabaena sp*. PCC 7120 όπου OM: εξωτερική μεμβράνη, HGL :στοιβάδα γλυκολιπιδικών, HEP: στοιβάδα πολυσακχαριτών ετεροκυστών, C: κόκοι κυανοφυκίνης και τα θυλακοειδή.

Επειδή υπάρχει συνέχεια της εξωτερικής μεμβράνης μεταξύ αγενών κυττάρων και ετεροκυστών, προτάθηκε η ανταλλαγή μεταβολιτών μεταξύ τους μέσω του περιπλασματικού χώρου [10]. Άνθρακας μετακινείται από τα αγενή κύτταρα στις ετεροκύστες και άζωτο μετακινείται από τις ετεροκύστες στα αγενή κύτταρα. Στη μεταφορά του άνθρακα παρατηρείται ότι εμπλέκεται η σακχαρόζη [30].Επίσης, τα αγενή κύτταρα παρέχουν γλουταμινικό στις ετεροκύστες το οποίο και μετατρέπουν σε γλουταμίνη και άλλα αμινοξέα με τα οποία τροφοδοτούν τα αγενή κύτταρα [31]. Η ανταλλαγή μορίων πραγματοποιείται μέσω διακυτταρικών συνδέσεων (μικροπλασμοδέσματα) ή διαύλων απευθείας συνδέοντας το κυτταρόπλασμα των παρακείμενων κυττάρων. Τα μικροπλασμοδέσματα είναι κανάλια που σχηματίζονται από ολιγομερή πρωτεϊνών. Εγκαθίστανται στο διάφραγμα μεταξύ των δύο κυττάρων, καθώς και στην διαφράγματα μεταξύ των αγενών κυττάρων κατά μήκος του νήματος. Οι διαφορετικές κατανομές των θυλακοειδών στους δύο τύπους κυττάρων (περιφερικό σε φυτικά κύτταρα και πολικών στις ετεροκύστες), διαφοροποιεί τις δομές τους [32](**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11: Μικρογραφία μετάδοσης ηλεκτρονίου που δείχνει μια τερματική ετεροκύστη (αριστερά) και τα παρακείμενα αγενή κύτταρα του (δεξιά) από ένα νήμα του *Anabaena sp.* PCC 7120. CPG: κόκκοι κυανοφυκίνης, CM: κυτταροπλασματική μεμβράνη, OM :εξωτερική μεμβράνης

Το χρονοδιάγραμμα της ανάπτυξης των ετεροκυστών, αρχίζει με τον αισθητό περιορισμό συνδυασμένου αζώτου και κορυφώνεται με την καθήλωση του στις ώριμες ετεροκύστες. Η ανάπτυξη είναι πλήρης σε περίπου 20 ώρες στους 28^0C και εμπλέκει κυτταρική διαφοροποίηση των επιλεγμένων αγενών κυττάρων σε ετεροκύστες ,και λιγότερο προφανείς αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και το μεταβολισμό στα υπόλοιπα αγενή κύτταρα [33]. Η ανίχνευση της έλλειψης αζώτου εντός του κυττάρου, πραγματοποιείται από το 2-οξογλουταρικό (ή α-κετογλουταρικό) ένα ενδιάμεσο στον κύκλο του Krebs. Ο κύκλος του Krebs στα κυανοβακτήρια είναι ελλιπής λόγω της έλλειψης της αφυδρογονάσης 2-οξογλουταρικού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η κύρια λειτουργία του 2-οξογλουταρικού να περιορίζεται στο να χρησιμεύσει ως πρόδρομο μόριο σε μια ποικιλία βιοσυνθετικών αντιδράσεων. Επίσης είναι ο δέκτης του αμμωνίου (NH_4^+) με την δημιουργία μεταβολικής διασταύρωσης μεταξύ άνθρακα και αζώτου στα κυανοβακτήρια [34]. Βάση του ρόλο ως αισθητήρα συνθήκης στέρησης αζώτου, η τεχνητή αύξηση του, επάγει το σχηματισμό ετεροκυστών στο *Anabaena sp.* PCC 7120 [35]. Η ανάλυση των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης των αγενών

κυττάρων και των ετεροκυστών, αποκάλυψε υψηλή ομοιότητα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σχετική πρωτεϊνική συγκέντρωση εντός της εξωτερικής μεμβράνης μπορεί να διαφέρει μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων, αλλά όχι η σύσταση της. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε (α) μεταγωγή σήματος, (β) σύνθεση, και (γ) μεταφορά [36]. Η εξωτερική μεμβράνη του *Anabaena sp.* PCC 7120 περιλαμβάνει ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες και λιποπρωτείνες που με το αμινο-τερματικό άκρο του προσδένουν λιπίδια. Αυτές οι μεμβρανικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν πρωτεΐνες τύπου πορίνες, καθώς και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταφορά μεταβολιτών και τη συναρμολόγηση. Στο *Anabaena sp.* PCC 7120, οι χαρακτηριστικές πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης είναι All4499 και All4550, που εντοπίστηκαν στις μεμβράνες των αγενών κυττάρων και ήταν και οι πλέον άφθονες πρωτεΐνες στις ετεροκύστες [37]. Γονιδιωματική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων μετά τη στέρηση αζώτου έδειξε μία αύξηση στην έκφραση της all4499 οκτώ ώρες μετά τη στέρηση. Η έκφραση της All4550 μειώνεται εικοσιτέσσερις ώρες μετά την εξάντληση του αζώτου. Σε πολλά κυανοβακτήρια, η νιτρογενάση το ένζυμο που καθηλώνει το άζωτο συντίθεται μόνο στις ετεροκύστες, όπου δεν υπάρχει οξυγόνο. Η νιτρογενάση είναι ένα καλά διατηρημένο ένζυμο σε όλους τους άζωτο-καθορισμένους οργανισμούς και αποτελείται από δύο συνιστώσες: τη δινιτρογενάση (MoFe πρωτεΐνη ή πρωτεΐνη I που κωδικοποιείται από τα γονίδια nifDα,β και nifKα,β) και την αναγωγάση της δινιτρογενάσης (πρωτεΐνη Fe ή πρωτεΐνη II, που κωδικοποιείται από το γονίδιο nifH). Η αναγωγάση της δινιτρογενάσης χρησιμεύει για να μεταφέρει ηλεκτρόνια από δότες ηλεκτρονίων όπως η φερεδοξίνη στη δινιτρογενάση. Η ανάπτυξη ετεροκυστών συνοδεύεται και από αλλαγές στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό και τον μεταβολισμό του άνθρακα, για να τροφοδοτεί με ATP και χαμηλό αναγωγικό δυναμικό την δέσμευση του αζώτου [17].

1.7 Παραγωγή υδρογόνου στα κυανοβακτήρια

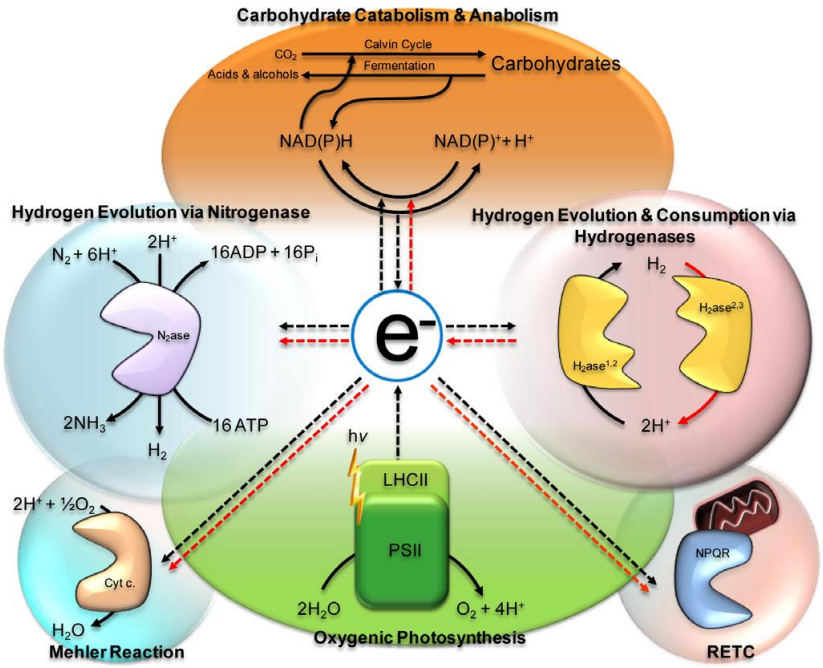
Πολλά είδη κυανοβακτηρίων μπορούν να μετατρέπουν το άζωτο σε αμμωνία και ταυτόχρονη αναγωγή των πρωτονίων σε υδρογόνου [25]. Η συνολική αντίδραση που λαμβάνει χώρα φαίνεται παρακάτω:

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16\ Pi$$

Μόνο το 75% των ηλεκτρονίων μεταφέρονται για την μείωση του αζώτου, ενώ το υπόλοιπο 25% των ηλεκτρονίων εμπλέκεται στην παραγωγή του μοριακού υδρογόνου, το οποίο είναι παραπροϊόν της καθήλωσης του αζώτου. Ωστόσο, το μοριακό υδρογόνο μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί από ένα σύστημα επανοξείδωσης υδρογόνου, το οποίο ελέγχεται από το ένζυμο uptake-υδρογενάση (hup).Επίσης, υπάρχει και μια αντιστρεπτή αμφίδρομη υδρογενάση (bidirectional hydrogenase ή hox), η οποία έχει την ικανότητα να καταλύει την πρόσληψη και την εξέλιξη του μοριακού υδρογόνου ανάλογα με το δυναμικό οξειδοαναγωγής του διαμερίσματος του κυττάρου στο οποίο είναι εντοπισμένη η hox, με τα $NADP^+$ / NADPH ως συνεργάτες της αντίδρασης [8]. Η αμφίδρομη υδρογενάση είναι αγκυροβολημένη στην μεμβράνη του κυττάρου και παρατηρείται εξίσου και στα αγενή κύτταρα και στις ετεροκύστες [38]. Η προσθήκη αζώτου στο θρεπτικό μέσο του βακτηρίου, έχει μικρή επίδραση στη δράση του ενζύμου, δείχνοντας ότι η λειτουργία του είναι ανεξάρτητη της δράσης της νιτρογενάσης. Η δραστηριότητα του ενζύμου στις ετεροκύστες αυξάνει σημαντικά σε αναερόβιες ή μικροαερόβιες συνθήκες [39]. Επίσης, έχει προταθεί ότι το ένζυμο αυτό λειτουργεί σαν τόπος εναπόθεσης για τα χαμηλού δυναμικού ηλεκτρόνια, τα οποία δημιουργούνται κατά τη φωτοσύνθεση, εμποδίζοντας έτσι την επιβράδυνση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων υπό συνθήκες στρες [40]. Οι υδρογενάσες και η νιτρογενάση είναι πολύ ευαίσθητα ένζυμα στο οξυγόνο και γρήγορα αδρανοποιούνται υπό την παρουσία του. Ως εκ τούτου, τα κυανοβακτήρια έχουν αναπτύξει διαφορετικούς τρόπους για να διατηρήσουν τη δραστικότητα των ενζύμων διαχωρίζοντας τη νιτρογενάση από τη φωτοσύνθεση είτε χωρικά, μέσω των ετεροκυστών και των αγενών κυττάρων, ή χρονικά, με τη φωτοσύνθεση κατά τη διάρκεια της ημέρας και της καθήλωσης αζώτου κατά τη διάρκεια της νύχτας. Οπότε η νιτρογενάση και η uptake-υδρογενάση είναι δύο ένζυμα που εμπλέκονται άμεσα στην παραγωγή και την κατανάλωση του H_2. Η uptake-υδρογενάση δείχνει επαρκή ικανότητα πρόσληψης, του σύνολο του υδρογόνου που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της καθήλωσης άζωτο όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:

$$H_2 \xrightarrow{\text{Hydrogenase}} 2H^+ + 2e^-$$

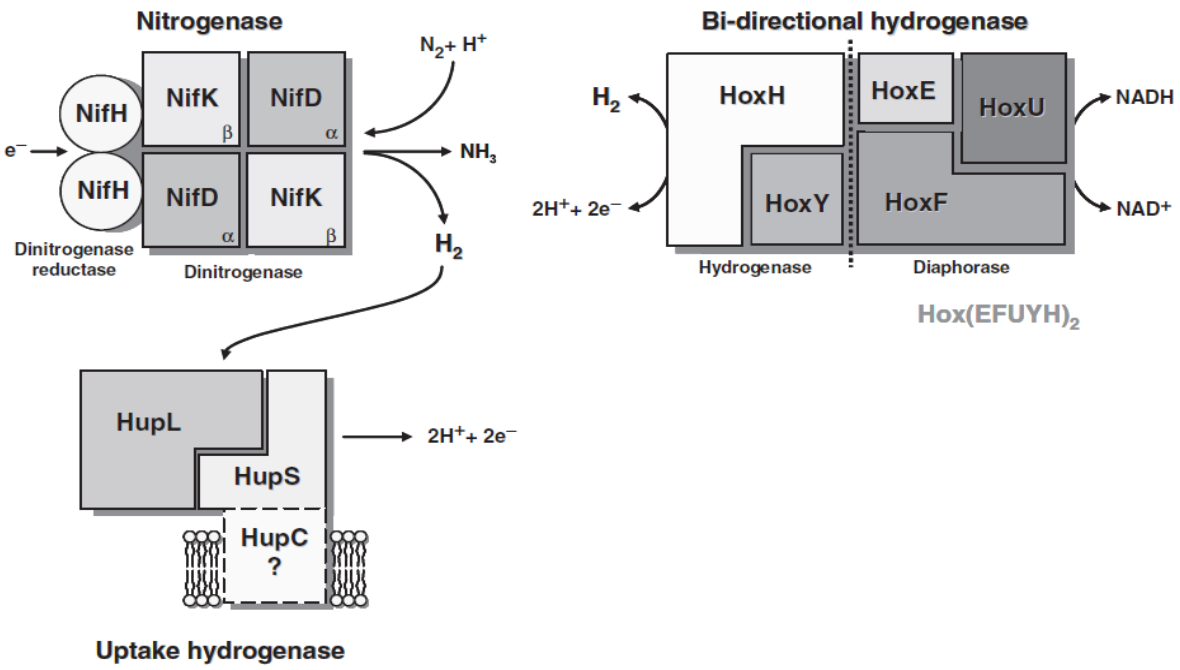
Τα ηλεκτρόνια που αποκτήθηκαν από τη πρόσληψη υδρογόνου ανακυκλώνονται πίσω στην φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, μέσω της πλαστοκινόνης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το κυτόχρωμα c οξειδάσης για τη μετατροπή του O_2 σε νερό ή τη μεταφορά τους πίσω στη νιτρογενάση, μέσω του PSI και της ειδικής φερεδοξίνης των ετεροκυστών [9] **Εικόνα 12.** Στα κυανοβακτήρια, τα ηλεκτρόνια μπορούν επίσης να παραχθούν μέσω της κατανάλωσης του υδρογόνου (βέλη σε κόκκινο) και της διπλής κατεύθυνσης των υδρογενασών. Τα κόκκινα βέλη αντιπροσωπεύουν τη χημική αντίδραση και τις ροές ηλεκτρονίων που συνδέονται με την κατανάλωση υδρογόνου, ενώ με μαύρα βέλη αντιδράσεις που σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση και τον καταβολισμό των υδατανθράκων.



Εικόνα 12: Επισκόπηση των πιθανών ροών ηλεκτρονίων .Τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για παραγωγή υδρογόνου, αποκτήθηκαν είτε μέσω της φωτοσυνθετικής οξείδωσης του νερού ή του καταβολισμού των ενδογενών υδατανθράκων.

Η νιτρογενάση, είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του κύκλου του αζώτου, δεδομένου ότι το στοιχείο αυτό συχνά περιορίζει την ανάπτυξη των οργανισμών. Σε ορισμένα νηματοειδή στελέχη, η υδρογενάση εκφράζεται στις ετεροκύστες, ενώ έχει μικρή ή καμία δραστηριότητα στα φωτοσυνθετικά αγενή κύτταρα. Ο κύριος ρόλος της uptake-υδρογενάσης στα κυανοβακτήρια είναι η πρόσληψη του μοριακού

υδρογόνου που παράγεται από τις διαδικασίες καθήλωσης του αζώτου από τη νιτρογενάση και η επαναχρησιμοποίηση των ηλεκτρονίων από το H_2. Τρια οφέλη αυτού του συστήματος έχουν αναφερθεί: (α) ανακτά στον οργανισμό ATP ενέργεια που αναπόφευκτα χάνεται κατά τη παραγωγή υδρογόνου από την κατάλυση της νιτρογενάσης (β) αφαιρεί οξυγόνο από τη νιτρογενάση, προστατεύοντας την από αδρανοποίηση, μέσω της αναπνευστικής οξυ-υδρογόνου αντίδρασης (Knallgas) (γ) προμηθεύει με ηλεκτρόνια για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες και (δ) αποτρέπει τη μη τοξική συσσωρεύση υψηλής συγκέντρωσης υδρογόνου, που επηρεάζει τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης [41]. Έχει προταθεί ότι το ένζυμο uptake-υδρογενάση βρίσκεται στις μεμβράνες των θυλακοειδών των ετεροκυστών ή στα φυτικά κύτταρα, ή στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το ένζυμο διαθέτει δύο υπομονάδες με διαφορετικά μεγέθη, συμπεριλαμβανομένων των HupS (35kDa) και HupL (60kDa). Η HupS συμμετέχει στην μεταφορά ηλεκτρονίων και η HupL που περιέχει το ενεργό κέντρο. Επιπλέον η υποθετική υπομονάδα HupC συμπληρώνει το σύμπλοκο, βοηθώντας στην αγκυροβόληση του ετεροδιμερούς HupSL στη μεμβράνη (**Εικόνα 13**).



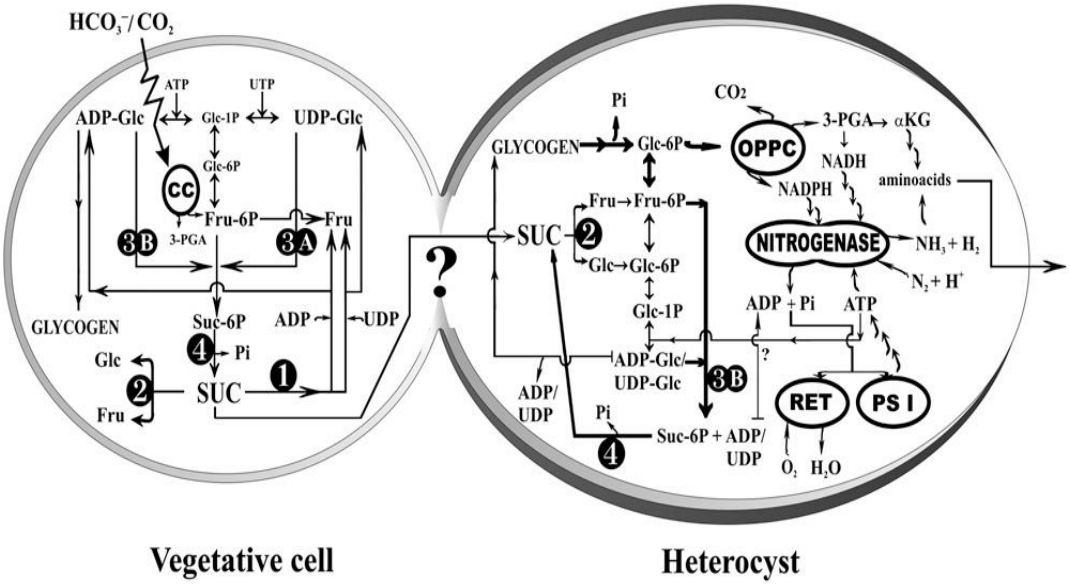
Εικόνα 13: Ένζυμα που εμπλέκονται άμεσα στο μεταβολισμό του υδρογόνου στα κυανοβακτήρια.

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι επιπτώσεις της διαγραφής γονιδίων της υδρογενάσης, στη βασιζόμενη από την νιτρογενάση παραγωγικότητα H_2 από τις ετεροκύστες, έχουν μελετηθεί τρία μεταλλάγματα του βακτηρίου *Anabaena sp*.PCC7120. Το $hupL^-$ στέλεχος (έλλειψη της uptake υδρογενάσης), $hoxH^-$ στέλεχος (έλλειψη της αμφίδρομης υδρογενάσης) και $hupL^-/hoxH^-$ στέλεχος (έλλειψη και των δυο γονιδίων). Στο στέλεχος $hupL^-$, η απενεργοποίηση του γονιδίου οδηγεί σε μία μικρή μείωση της δράσης της νιτρογενάσης. Όπως είναι κατανοητό ότι η υδρογενάση θα μπορούσε να επωφελεί την νιτρογενάση, επειδή μπορεί να την προστατεύσει από το οξυγόνο, παγιδεύοντας τη διάχυση του στις ετεροκύστες [25].

1.8 Ο μεταβολισμός του άνθρακα και του αζώτου στις ετεροκύστες

Το πιο σημαντικό είναι η καθήλωση του άνθρακα μέσω της οποίας ανάγεται CO_2 ,για να συνθέσει γλυκόζη και τις μορφές των πολυμερών της στα αγενή κύτταρα. . Η ανηγμένη Fd μπορεί να δώσει ηλεκτρόνια στην αναγωγάση της φερεδοξίνης και έτσι να ανάγει το $NADP^+$ σε NADPH. Μαζί με ATP, εισάγεται στον κύκλο του Calvin για να καθηλώσει CO_2 και να σχηματίσει παράγωγα γλυκόζης ή αποθήκες γλυκογόνου.
Οι ετεροκύστες λαμβάνουν τις ενώσεις άνθρακα και ενδεχομένως υπό τη μορφή των δισακχαριτών, όπως μαλτόζη, προκειμένου να παράγουν NADPH, με τη βοήθεια των ενζύμων του οξειδωτικού μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών. Η γλουταμίνη που δημιουργείται μέσω της συμπύκνωσης της αμμωνίας με γλουταμικό από το ένζυμο συνθάση της γλουταμίνης (GS), μεταφέρεται στο αγενές κύτταρο, όπου σχηματίζει γλουταμινικό μέσω της συνθάσης του γλουταμικού. Το γλουταμικό παράγεται είτε από ενδογενή σύνθεση ή με μεταφορά από το αγενές κύτταρο. Οι ετεροκύστες και τα αγενή κύτταρα, αποδεικνύουν την πρώιμη εξελιγμένη μορφή της κυτταρικής εξειδίκευσης. Σουκρόζη μετατοπίζεται από τα αγενή κύτταρα εντός των ετεροκυστών και μπορεί να λειτουργήσει ως οργανικό υπόστρωμα [17, 42]. Οι προκύπτουσες εξόζες, μετά από φωσφορυλίωση από εξοκινάσες, μπορούν να εισέλθουν στον οξειδωτικό κύκλο των φωσφορικών πεντοζών και στην διαδικασία της αναπνοής, και να παράγουν NADPH και ανθρακικούς σκελετούς για την αφομοίωση του αμμωνίου. Επίσης δρουν ως πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση του γλυκογόνου. Η ανίχνευση της μεταφερόμενης σουκρόζης, παρατηρείται με τα αυξημένα επίπεδα της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης και της 6-φωσφογλυκονικής

αφυδρογονάσης. Η ανασύνθεση της σουκρόζης από τη SPS-B (sucrose-phosphate-synthase-B) μπορεί να λάβει χώρα στις ετεροκύστες, πιθανόν από την αποδόμηση των προϊόντων του γλυκογόνου, συμβάλλοντας σε ένα λειτουργικό κυκλικό μηχανισμό σουκρόζης. Το SPS-B συμβάλλει στην δεξαμενή ADP και ως εκ τούτου, η υψηλή αναλογία ADP-ATP αναφέρεται στις ετεροκύστες και πιθανότατα διαμορφώνει τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14: Σχηματική αναπάρασταση του μονοπατιού της σουκρόζης των ετεροκυστών κατά τη διάρκεια της καθήλωσης του αζώτου στα *Anabaena sp.* PCC 7120 [43]. Φωτοσυνθετική καθήλωση του άνθρακα C μέσω του κύκλου του Calvin (CC) εμφανίζεται στα αγενή κύτταρα και θα μπορούσε να οδηγήσει σε βιοσύνθεση του γλυκογόνου και σουκρόζης. Οι ετεροκύστες λειτουργούν ως δεξαμενή υδατανθράκων από τα αγενή κύτταρα και ως πηγή σταθερού αζώτου [17]. Στις ετεροκύστες συντίθεται γλυκογόνο και σουκρόζη, τα αναγωγικά για μείωση N_2 και O_2 που παράγεται από την δραστικότητα του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών (OPPC) η ειδική NADPH-ferrodoxin των ετεροκυστών και η αναπνευστική μεταφορά ηλεκτρονίων (RET) καθώς και η σύνθεση ATP από κυκλική φωσφορυλίωση (PSI). Τα ένζυμα της σουκρόζης (1) Sus (2) A / N-Inv (3A) SPS-A (3B) SPS-B και (4) SPP a-Κετογλουταρικό [44]

Μελέτες για τη σχέση μεταξύ C και N στο μεταβολισμό των ετεροκυστών έχουν επικεντρωθεί στο ρόλο του γλυκογόνου στη καθήλωση N_2 [45]. Κατά τη φωτεινή φάση, τα περισσότερα στελέχη των κυανοβακτηρίων συσσωρεύουν ένα υψηλό επίπεδο γλυκογόνου, το οποίο κινητοποιείται για να παράγει αναγωγικά και ATP κατά τη διάρκεια της νύχτας, είτε στα αγενή κύτταρα είτε στις ετεροκύστες. Καθήλωση του N_2 μπορεί, ως εκ τούτου, να λάβει χώρα τη νύχτα, ακόμη και σε πολύ

μικρό ποσοστό. Η σύνθεση του γλυκογόνου γίνεται μέσω συμβολής του ADP-Glc. Αυτή ρυθμίζεται κυρίως στο επίπεδο της σύνθεσης του ADP-Glc καταλυόμενο από τη ADP-Glc πυροφωσφορυλάση (AGPase). Η δραστικότητα της AGPase δείχθηκε να ρυθμίζεται αλλοστερικά από το 3-φωσφογλυκερικό και το ανόργανο φωσφορικό στο *Anabaena sp.* PCC 7120. Επίσης η δέσμευση του CO_2 κατά τη φωτοσύνθεση, είναι ρυθμιζόμενη από μία πηγή N-εξαρτώμενη από την ανάπτυξη των ετεροκυστών. Η παρουσία των δύο SPS_S (SPS-A και SPS-B) συμβάλλει στην σύνθεση της σουκρόζης σε αγενή κύτταρα, ενώ μόνο το SPS-B είναι ενεργό στις ετεροκύστες.

1.9 Πρωτεομική προσέγγιση

Πρωτεομική είναι η μεγάλης κλίμακας μελέτη των πρωτεϊνών, ιδιαίτερα των δομών και των λειτουργιών τους. Ο όρος πρωτεομική αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1997, με σκοπό να πραγματοποιηθεί ένας παραλληλισμός με τη γονιδιωματική, δηλαδή τη μελέτη του γονιδιώματος. Το πρωτέομα είναι το σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται από έναν οργανισμό. Αυτό το σύνολο ποικίλλει ανάλογα με το χρόνο και τις διακριτές απαιτήσεις, ή καταπονήσεις, που υφίσταται ένα κύτταρο ή ένας οργανισμός [46]. Το πρωτέομα είναι πιο περίπλοκο από ό, τι το γονιδίωμα, λόγω του διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο και από καιρό σε καιρό. Στο παρελθόν, η ταυτοποίηση πρωτεϊνών γινόταν με ανάλυση του mRNA, αλλά αυτή βρέθηκε να μην συσχετίζεται με την περιεκτικότητα των πρωτεϊνών. Είναι γνωστό ότι το mRNA, δεν μεταφράζεται πάντα σε πρωτεΐνη, και η ποσότητα της πρωτεΐνης που παράγεται για μια δεδομένη ποσότητα mRNA, εξαρτάται από το γονίδιο από το οποίο μεταγράφεται. Η πρωτεομική επιβεβαιώνει την παρουσία της πρωτεΐνης και βοηθάει στην ποσοτικοποίηση της. Έτσι παρατηρούμε ότι η πρωτεομική δίνει ένα διαφορετικό επίπεδο κατανόησης σε σχέση με την γονιδιωματική για πολλούς λόγους:

- Το επίπεδο της μεταγραφής ενός γονιδίου, δίνει μόνο μια πρόχειρη εκτίμηση του επιπέδου της μετάφρασης σε πρωτεΐνη. Ένα mRNA που παράγεται σε αφθονία μπορεί να αποικοδομείται ταχέως ή να μεταφράζεται ανεπαρκώς, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μια μικρής ποσότητας πρωτεΐνης.

- Πολλές πρωτεΐνες υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν τις δραστηριότητες τους. Μεθοδολογίες όπως phosphoproteomics και glycoproteomics χρησιμοποιούνται για τη μελέτη αυτών των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.
- Πολλές πρωτεΐνες σχηματίζουν σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες ή μόρια RNA, και λειτουργούν μόνο υπό την παρουσία αυτών των μορίων. Ο ρυθμός αποικοδόμησης της πρωτεΐνης, παίζει σημαντικό ρόλο στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες.

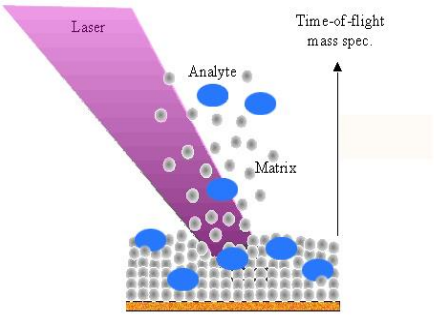
Η πιο μεγάλη λοιπόν πρόκληση στον τομέα της πρωτεομικής ανάλυσης είναι η δημιουργία μεθοδολογιών, με τις οποίες θα καταστεί δυνατή η ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού διακριτών πρωτεϊνικών μορίων, τα περισσότερα εκ των οποίων συναντώνται σε χαμηλά επίπεδα, ενώ πολλά από αυτά υπάρχουν σε πολλαπλές τροποποιημένες μορφές. Για τη μελέτη του πρωτεόματος, αναπτύχθηκαν τεχνολογίες υψηλής απόδοσης σε πρωτεΐνες. Οι βασικές τεχνικές της πρωτεομικής είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών και η φασματομετρία μάζας MS για ανάλυση αυτών. Πολύ συχνά το πρώτο βήμα στη μελέτη ενός άγνωστου πρωτεόματος είναι η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση(2D-PAGE), η οποία σε συνδυασμό με MS ανάλυση, παρέχει σχετικά γρήγορα την ταυτοποίηση ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών και με το πλεονέκτημα της ορατής εντόπισης τους (χαρτογράφηση) [47, 48]. Πιο αναλυτικά, στην αρχή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ή δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-PAGE), έπειτα διασπώνται ενζυματικά και στη συνέχεια αναλύονται με MS για την ταυτοποίηση τους [49].

1.9.1 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization(MALDI)

Δύο διαφορετικές μεθόδοι ήπιου ιονισμού χρησιμοποιούνται στην πρωτεομική ανάλυση, απόπτυση με λέιζερ υποβοηθούμενη από υπόστρωμα (Matrix-Assisted Laser Desorption) και ο ηλεκτροψεκασμός (ElectroSpray). Η μέθοδος του Matrix-Assisted Laser Desorption αναπτύχθηκε ταυτόχρονα από τους Karas & Hillenkamp 1988 και τους Tanaka et al. 1988 [50, 51]. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ανάλυση βιομορίων (βιοπολυμερών όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες και σάκχαρα) καθώς και μεγάλων οργανικών μορίων, τα οποία τείνουν να είναι εύθραυστα όταν ιονίζονται με

άλλες συμβατικές μεθόδους ιονισμού. Στη μέθοδο αυτή, για να δημιουργηθεί η απαραίτητη αέρια φάση, τα πρωτονιωμένα βιομόρια και συγκεκριμένη ποσότητα υποστρώματος (μήτρα), συγκρυσταλλώνονται με μόρια του αναλύτη πάνω σε μία μεταλλική πλάκα (**Εικόνα 15**). Η μήτρα είναι συνήθως ένα οργανικό μόριο που εμφανίζει απορρόφηση στο μήκος κύματος του λέιζερ που χρησιμοποιείται ώστε να αποφεύγεται η αποδόμηση της ουσίας. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα είναι το α-κυάνο-4-υδροξυκιναμινικό οξύ (HCCA), όταν αναλύονται μικρά μόρια (π.χ πεπτίδια) και το διυδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB), για την περίπτωση μεγάλων μορίων (π.χ πρωτεΐνες). Χαρακτηριστικό όλων τους είναι η οξύτητα και γιαυτό αποτελούν πηγή πρωτονίων, βοηθώντας στον ιονισμό της εκάστοτε ουσίας. Οι κρύσταλλοι ακτινοβολούνται από παλμό λέιζερ, συνήθως αζώτου με μήκος κύματος 337 nm. Η διαδικασία ιονισμού που επιτυγχάνεται στο MALDI παραμένει ως ένα μεγάλο βαθμό ακόμα άγνωστη, ενώ η ένταση του σήματος που ανιχνεύεται, εξαρτάται από την ποσότητα των πεπτιδίων στον κρύσταλλο, τη δυνατότητα του βιομορίου να προσλάβει ή να δώσει ένα πρωτόνιο κατά τη διαδικασία της απόπτυσης, από τις χημικές ιδιότητες των πεπτιδίων καθώς και από ένα μεγάλο αριθμό άλλων παραγόντων γνωστών και άγνωστων. Για το λόγο αυτό είναι δύσκολη η αντιστοιχία της κορυφής του πεπτιδίου με την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται. Ο πιο διαδεδομένος τύπος φασματόμετρου μάζας που χρησιμοποιείται με το MALDI είναι το TOF (time of flight).

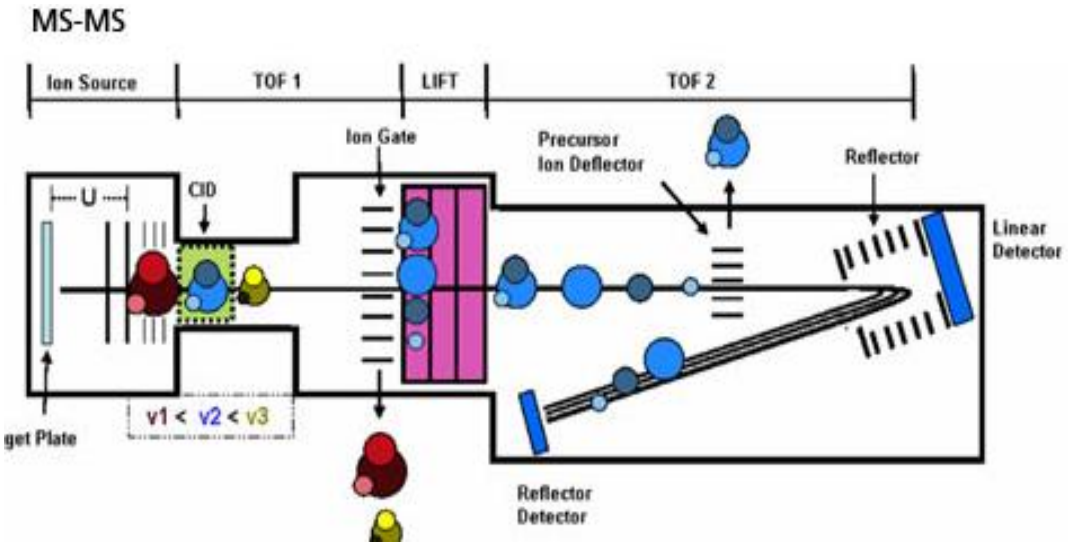
α



β

Εικόνα 15: (α) Παρουσιάζεται η μεταλλική επιφάνεια πάνω στην οποία εφαρμόζονται τα δείγματα (β)) το συγκρυσταλλωμένο επάνω στη μεταλλικό πλάκα δείγμα με τη μήτρα ακτινοβολείται με δέσμη λέιζερ και επιτυγχάνεται η εξάχνωση του και ο ιονισμός των πεπτιδίων.

Για τον προσδιορισμός της αλληλουχίας αμινοξέων στα πεπτίδια, χρησιμοποιείται η φασματομετρία μάζας σε σειρά (MS/MS), η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί εφαρμόζοντας δύο φορές την ίδια αρχή διαχωρισμού των ιόντων ή συνδυάζοντας δύο διαφορετικές αρχές (**Εικόνα 16**). Τα δείγματα ακτινοβολούνται από παλμό λέιζερ, δημιουργώντας μία μικρή δέσμη ιόντων. Τα ιόντα επιταχύνονται με καθορισμένο ποσό κινητικής ενέργειας και στη συνέχεια ταξιδεύουν στο σωλήνα πτήσης. Τα μικρότερα ιόντα έχουν μεγαλύτερη ταχύτητα και φτάνουν στον ανιχνευτή πριν από τα μεγαλύτερα ιόντα, παράγοντας το φάσμα του χρόνου πτήσης. Επίσης, έχει αναπτυχθεί η οργανολογία του MALDI LIFT TOF/TOF φασματογράφου μάζας, ο οποίος περιλαμβάνει τη διάταξη "lift". Μέσω της διάταξης αυτής αυξάνεται η δυναμική ενέργεια των ιόντων, προσαυξάνοντας έτσι την αρχική τους κινητική ενέργεια, προκειμένου να ανιχνευθούν κατόπιν της θραυσματοποίησης του αρχικού πρόδρομου ιόντος/πεπτιδίου. Σε ακολουθία βρίσκεται η διάταξη "post lift metastable suppressor" (PLMS), η οποία απομακρύνει τα εναπομείναντα πρόδρομα ιόντα που δεν έχουν θραυσματοποιηθεί, εμποδίζοντας το σχηματισμό μη επιθυμητών θραυσμάτων ιόντων, καθώς και ο δεύτερος αναλυτής μάζας χρόνου πτήσης . Η υψηλή ακρίβεια της μεθοδολογίας LIFT δίνει MS/MS φάσματα με υψηλή διακριτική ικανότητα, ενώ το σύνολο των πληροφοριών που προκύπτουν από τη διαδικασία του MS/MS μπορεί να ληφθεί στο επίπεδο του fmol εντός μερικών δευτερολέπτων.



Εικόνα 16: Φαίνεται η διάταξη ενός φασματογράφου μάζας που συνδυάζει τη μέθοδο ιονισμού απόπτυσης με λέιζερ υποβοηθούμενη από υπόστρωμα, με τη μέθοδο διαχωρισμού TOF/TOF.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το *Anabaena sp*.PCC 7120 ανήκει στην ευρεία οικογένεια των κυανοβακτηρίων και είναι ικανό να πραγματοποιεί οξυγονική φωτοσύνθεση αλλά και καθήλωση αζώτου. Το κυριότερο χαρακτηριστικό του *Anabaena sp*. PCC 7120 είναι η κυτταρική του πολυπλοκότητα, η οποία βασίζεται στο σχηματισμό δυο ειδών κυττάρων (αγενή κύτταρα και ετεροκύστες). Οι ετεροκύστες είναι ειδικά ανθεκτικά κύτταρα που σε συνθήκες απουσίας μοριακού αζώτου μπορούν να παράγουν μοριακό υδρογόνο.Η εύρεση του κατάλληλου μέσου καλλιέργειας για την ανάπτυξη των ετεροκυστών και η διερεύνηση της διαφοροποίησης των αγενών κυττάρων σε ετεροκύστες κατά τη στέρηση αζώτου στο θρεπτικό μέσο ήταν το πρώτο βήμα στη μελέτη. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε πρωτόκολο απομόνωσης των ετεροκυστών, κλασματοποίηση του πρωτεόματος αυτών και μελέτη τεσσάρων διαφορετικών στελεχών του *Anabaena sp*.PCC 7120: WTPCC7120 (άγριος τύπος), hupL$^-$, hoxH$^-$, hupL$^-$/ hoxH στις συνθήκες αυτές. Με τη διάτριση του κυτταρικού τοιχώματος της εσωτερικής μεμβράνης των ετεροκυστών έγινε προσπάθεια περαιτέρω πρωτεομικής μελέτης αυτών. Τέλος επιτεύχθηκε συγκριτική μελέτη για τα υποπρωτεόματα των τεσσάρων στελεχών, σε επίπεδο πρωτεομικής ανάλυσης, με στόχο την κατανόηση του μεταβολισμού κατά τη δημιουργία των ετεροκυστών και των πρωτεϊνών που εκφράζονται για να πραγματοποιηθεί αυτό. Παράλληλα έγινε η μελέτη της ποσότητας υδρογόνου που παρήγαγε το καθένα στέλεχος ξεχωριστά σε συνθήκες στέρησης αζώτου, με σκοπό να εκτιμηθεί η επίδραση απενεργοποίησης των συγκεκριμένων γονιδίων στη διαδικασία παραγωγής υδρογόνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Αντιδραστήρια- Διαλύματα

Τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη πραγματοποίηση των πειραμάτων της συγκεκριμένης εργασίας, που παρουσιάζονται παρακάτω προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Fluka, Sigma κ.α. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν απιονισμένο, με στήλη ιοντοανταλλακτικών ρητινών και υπερκάθαρο (nanopure) από ειδικό σύστημα αντίστροφης όσμωσης.

Ρυθμιστικό διάλυμα Α (Buffer solution A)-Διάλυμα απομόνωσης ετεροκυστών από τα αγενή κύτταρα

• Sucrose	0,4M
• Hepes/NaOH pH: 7,2	50 mM
• NaCl	10 mM
• EDTA	10 mM

Ρυθμιστικό διάλυμα Β (Buffer solution B)-Διάλυμα διαλυτοποίησης ετεροκυστών

• Hepes/NaOH pH:8	10 mM
• PMSF	1 mM

Πρότυπες πρωτείνες για SDS-PAGE (Biorad)

• Phosphorylase b	97,4 kDa
• Serum alboumin	66,2 kDa
• Ovalbumin	45 kDa
• Carbonic anhydrase	31 kDa
• Trypsin inhibitor	21,5 kDa

• Lysozyme	14kDa

<u>Διαλύματα παρασκευής πηκτών SDS-PAGE</u>

Ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο (AB-mix-solution)

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

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής (Gel Buffer) 3X

• Tris Base	3M
• SDS	0,3% (w/v)
• pH = 8,4	(ρύθμιση με HCl)

Ρυθμιστικό διάλυμα Ανόδου (10X)

• Tris-Base	1M
• pH = 8,9	(ρύθμιση με HCl)

Ρυθμιστικό διάλυμα Καθόδου (10X)

• Tris-Base	1M
• Tricine Base	1M
• SDS	1% (w/v)
• pH = 8,25	(χωρίς προσθήκη HCl)

Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (Sample Buffer)

• SDS	12% (w/v)
• Glycerol	10% (w/v)
• Mercaptoethanol	6% (w/v)
• Coomasie Brilliant Blue G-250	0,05% (w/v)
• Tris-HCl, pH= 7,0	150mM

Η μερκαπτοαιθανόλη προστίθεται στο διάλυμα για να πραγματοποιεί τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών στα μόρια των πρωτεϊνών.

Για την προετοιμασία των πηκτών διαχωρισμού SDS-PAGE,για μονοδιάστατη και δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση αντίστοιχα, χρειάστηκαν οι παρακάτω ποσότητες διαλυμάτων:

Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού 300 mL (10%)

• Urea	109.5g
• AB-mix solution	60 mL
• Gel buffer	99 mL (3x)
Προσθήκη νερού έως τελικού όγκου 300 mL ddH_2O	
• APS	1500μL (10% w/v)
• TEMED	150μL

Διάλυμα πηκτής επιστοίβασης 100mL (4%)

• AB-mix solution	8,3 mL
• Gel buffer 3x	25 mL
Προσθήκη νερού έως τελικού όγκου 100 mL ddH_2O	
• APS 10% w/v	750μL
• TEMED	75μL

Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού 300 mL (16%)

• Glycerol	30g
• AB-mix solution	100mL
• Gel buffer 3x	100 mL
Προσθήκη νερού έως τελικού όγκου 300 mL ddH_2O	
• APS 10% w/v	1.5mL
• TEMED	150μL

Διάλυμα επώασης για τη δεύτερη διάσταση

• Tris Base	100 mM
• pH= 2	(ρύθμιση με HCl)

Διάλυμα χρώσης πηκτών (Blue Silver)

• Coomassie Brilliant Blue G-250	0,12% (w/v)
• Ammonium sulfate	10%(w/v)
• Phosphoric acid	10% (w/v)
• Methanol	20% (w/v)

Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτών

• Methanol	5% (v/v)
• Acetic acid	7% (v/v)

Διαλύματα για τη διαδικασία της ισοηλεκτρικής εστίασης (isoelectric focusing –IEF)

IEF Ρυθμιστικό

• Urea	7M
• Thiourea	2M
• CHAPS	4% (w/v)
• DTT	50 mM

Διάλυμα ισσοροπίας μετά την εστίαση-Equilibrium buffer

• Urea	6M
• Tris/ HCl pH= 8,8	0,375M
• SDS	2%(w/v)
• Glycerol	20% (v/v)

Διάλυμα πηκτής για 2D-Ηλεκτροφόρηση (30 mL)

• Glycerol	3g
• AB-mix solution	8 mL
• Gel-Buffer	10 mL
Προσθήκη νερού έως τελικού όγκου 30ml ddH_2O	
• APS(10%)	170μL
• TEMED	17μL

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Οργανισμός

Ο οργανισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι το κυανοβακτήριο *Anabaena sp*.PCC7120. Ο άγριος τύπος του βακτηρίου WTPCC 7120 είναι ευγενική προσφορά του Prof. E. Schleif University of Frankfurt ενώ Τα μεταλλαγμένα στελέχη του βακτηρίου που μελετήθηκαν, $hupL^-$,$hoxH^-$ και $hupL^-$/$hoxH^-$ είναι ευγενική προσφορά του Prof.H.Sakurai, University of Kanagawa,Tokyo.

2.2.2 Καλλιέργεια του Anabaena sp.PCC7120

Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο BG11. Για την παρασκευή του θρεπτικού χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα που φαίνονται στους πίνακες.

Διάλυμα 1	
Αντιδραστήριο	**Ποσότητες(g/L)**
Na_2MG EDTA	0,1
Ferric ammonium citrate	0,6
Citric acid*1H_2O	0,6
$CaCl_2$ * 2H_2O	3,6
Φιλτράρεται και αποστειρώνεται σε φιάλη	

Διάλυμα 2	
Αντιδραστήριο	**Ποσότητες g/L**
$MgSO_4$* 7H_2O	7,5
Φιλτράρεται και αποστειρώνεται σε φιάλη	

Διάλυμα 3	
Αντιδραστήριο	**Ποσότητες g/L**
K_2HPO_4	3,05
Φιλτράρεται και αποστειρώνεται σε φιάλη	

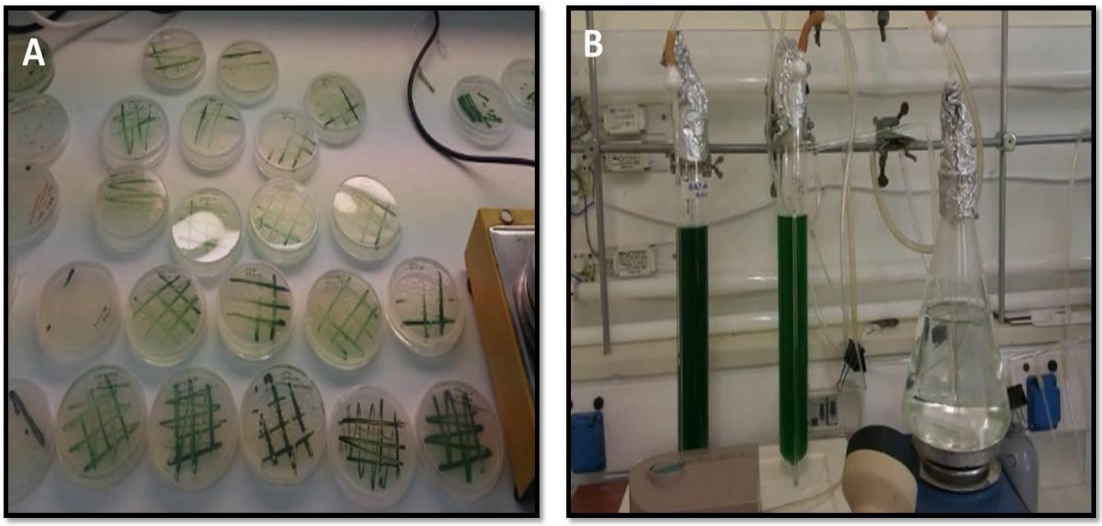
Διάλυμα (Microelements)	
Αντιδραστήριο	**Ποσότητες g/L**
H_3BO_3	2,86
$MnCl_2$ *4H_2O	1,81
$ZnSO_4$ *7H_2O	0,222
$CuSO_4$* 5H_2O	0,079
$COCl_2$*6H_2O	0,050
MoO_4 (85%)	0,018
Φιλτράρεται και αποστειρώνεται σε φιάλη	

Στη συνέχεια αναμιγνύονται τα διαλύματα για την παρασκευή του βασικού BG11 όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Διάλυμα solution	**Ανά λίτρο θρεπτικού medium**

Διάλυμα 1	10 mL
Διάλυμα 2	10 mL
Διάλυμα 3	10 mL
Na_2CO_3	0,02g
Διάλυμα 5	1,0 mL
$NaNO_3$	1,5g

Μετά την ανάμειξη των διαλυμάτων, ρυθμίζεται το pH του καινούργιου διαλύματος στο 7.5 και αποστειρώνεται μέσα στη συσκευή που θα αναπτυχθεί το βακτήριο (σαξόφωνο) σε 500ml θρεπτικό και κλείνεται με βαμβακερά stopers. Για την παρασκευή των στερεών καλλιεργειών προστίθεται 1,5% agar στο διάλυμα που προέκυψε μετά την ανάμειξη των διαλυμάτων και αποστειρώνεται. Για την παρασκευή του θρεπτικού $BG11^0$ που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των ετεροκυστών, δεν προστίθεται $NaNO_3$ κατά την ανάμειξη των διαλυμάτων για το BG11, πριν την αποστείρωση . Τα κύτταρα του *Anabaena sp*.PCC7120 και στα τέσσερα διαφορετικά στελέχη αναπτύχθηκαν στο αποστειρωμένο θρεπτικό, όπου γινόταν η μεταφορά αποικίας από στερεή καλλιέργεια τρυβλίου ανά 500 mL BG11. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 5 μέρες στα σαξόφωνα, όπου διοχετευόταν παράλληλα αέρας, μέσω αντλίας, σε κάθε σαξόφωνο ξεχωριστά. Επιπλέον ο κατάλληλος φωτισμός επετεύχθη από λάμπες οι οποίες φώτιζαν συνεχώς με μία ένταση φωτός 70-80 μmol φωτόνια m^{-2} s^{-1} και η θερμοκρασία στο δωμάτιο καλλιεργειών ήταν 25±2°C (**Εικόνα 17**). Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για τα περαιτέρω πειράματα είχαν φτάσει στην τελευταία φάση της εκθετικής τους ανάπτυξης και είχαν αποκτήσει ένα σκούρο πράσινο χρώμα.



Εικόνα 17: (A) Στερεές καλλιέργειες του βακτηρίου σε τρυβλία με θρεπτικό BG11 και agar 1,5%(w/v) (B) Σύστημα ανάπτυξης υγρής καλλιέργειας του *Anabaena sp.*PCC7120 σε σαξόφωνα.

2.2.3 Καλλιέργεια για την ανάπτυξη των ετεροκυστών

Τα κύτταρα μετά την ανάπτυξη τους σε θρεπτικό BG11 για 5 μέρες και έχοντας αποκτήσει την κατάλληλη συγκέντρωση Chl_a, συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 7000g σε θερμοκρασία 17 ^{0}C για 10min. Έπειτα πραγματοποιούνται 3 πλύσεις ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις με το θρεπτικό $BG11^0$, όπου του στερείται πηγή αζώτου για να μπορέσουν να αναπτυχθούν οι ετεροκύστες. Αυτές οι πλύσεις γίνονται με φυγοκέντρηση στα 7000 g για 10 min η καθεμία και αποσκοπούν στην όσο καλύτερη απομάκρυνση του προηγούμενου θρεπτικού [52]. Στη συνέχεια ξαναεμβολιάζονται τα κύτταρα στο ίδιο θρεπτικό και τα αφήνουμε να αναπτυχθούν για ακόμα 48 ώρες.

2.2.4 Απομόνωση ετεροκυστών

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της Chl_a (βλ§.2.3.1.3) (1,35 μg/ mL Chl_a για το στέλεχος WTPCC7120, 1,135 μg/ mL Chl_a για το στέλεχος $hupL^-$, 1,55 μg/ mL Chl_a για το στέλεχος $hoxH^-$ και 2,58 μg/ mL Chl_a για το στέλεχος $hupL^-/hoxH^-$) και αμέσως φυγοκεντρήθηκαν τα κύτταρα στους 4°C τα κύτταρα στα 7000g για 10min. Έγινε επαναιώρηση του ιζήματος που προέκυψε με ρυθμιστικό διάλυμα A σε όγκο που υπολογίστηκε, ώστε η τελική συγκέντρωση της Chl_a να είναι 150μg/ mL [23]. Πριν τη λύση των κυττάρων, το διάλυμα του ιζήματος που έχει αραιωθεί με το

ρυθμιστικό διάλυμα Α, επωάστηκε υπό ανάδευση για 30 min στους 4°C στο σκοτάδι. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε φρέσκο διάλυμα λυσοζύμης (SIGMA,from chicken egg white), προστέθηκε στο διάλυμα με τα κύτταρα, σε συγκέντρωση 1mg/ml και επωάστηκε υπό ανάδευση στους 37^{0} C στο σκοτάδι για 1 ώρα. Το επόμενο βήμα ήταν η επεξεργασία με υπερήχους Broxon ultrasonic processor (90-100 Watt), η οποία γίνεται έξι φορές σε τακτά χρονικά διαστήματα κάθε 10 sec. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πάγο ώστε να διατηρηθεί η θερμοκρασία του διαλύματος κάτω από 10° C. Το διάστημα των 50 sec όπου πραγματοποιείται η διακοπή της λειτουργίας των υπερήχων είναι απαραίτητο ώστε να επέλθει θερμική ισορροπία στο διάλυμα και για αυτό το λόγο άλλωστε πρέπει καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας να υπάρχει και ο πάγος. Μετά το πέρας των 10 sec και για τις 6 φορές, το εναιώρημα παρατηρήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο. Έτσι μετά από συνολικό χρόνο κατεργασίας με υπερήχους 1min (6 * 10sec), μόνο οι ετεροκύστες παρέμειναν ανέπαφοι. Οι ετεροκύστες διατήρησαν το χρώμα τους και τις κυτταρικές τους δομές όπως όλα τα πολικά σώματα μετά από την συγκεκριμένη κατεργασία. Μετά την κατεργασία με τους υπερήχους, το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στους 4° C, στα 1000g για 5 min και το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει υλικό από τα διαταραγμένα αγενή κύτταρα, απορρίπτεται. Το ίζημα που προκύπτει, το οποίο και περιέχει τις άθικτες ετεροκύστες, ομογενοποιείται ομαλά με χειροκίνητο γυάλινο ομογενοποιητή και επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα Α. Το διάλυμα που δημιουργείται, φυγοκεντρείται στα 500g για 5min και με το καινούργιο υπερκείμενο που δημιουργείται, να απορρίπτεται. Δύο επιπρόσθετες πλύσεις πραγματοποιούνται όπως και παραπάνω, με τη μόνη διαφορά στη δύναμη g, όπου μειώνεται στα 250g για 3 min η κάθε πλύση. Η χαμηλή ταχύτητα και οι μικρές σε διάρκεια φυγοκεντρήσεις στα τελευταία βήματα των πλύσεων, έχουν σκοπό την αποφυγή της συν-καθίζησης των μεμβρανών του κυτταρικού τοιχώματος των αγενών κυττάρων. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση το πλέον άχρωμο υπερκείμενο απορρίπτεται και το τελικό ίζημα επαναιωρείται σε μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Α. Οι φυγοκεντρήσεις για τις πλύσεις γίνονται στους 4° C. Το εναιώρημα των απομονωμένων ετεροκυστών ελέγχθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο και φυλάχθηκε στους -80^{0} C.

2.2.5 Διάρρηξη απομονωμένων κυττάρων ετεροκυστών με ανιονικό επιφανειοδραστικό Sodium-N-Lauroylsarcosinate

Το εναιώρημα των ετεροκυστών διαλυτοποιείται με 2% (w/v) Sodium-N-Lauroylsarcosinate (LS) (Fluka 61744) ένα ανιονικό επιφανειοδραστικό σε ρυθμιστικό διάλυμα B [53]. Η αρχική πρωτεϊνική συγκέντρωση είναι 300μg πρωτεΐνης και ο λόγος επιφανειοδραστικού προς πρωτεΐνης 60. Η διαλυτοποίηση περιλαμβάνει την επώαση των δειγμάτων στον πάγο υπό ήπια ανάδευση για 60 min, ενώ ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση για 90min, σε 40323 g, στους 4º C. Στη συνέχεια συλλέγονται το υπερκείμενο το οποίο έχει χρώμα ελαφρώς κίτρινο και το σκούρο καφέ ίζημα. Το υπερκείμενο περιέχει τις διαλυμένες εσωτερικές μεμβράνες των ετεροκυστών μαζί με τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος τους και το ίζημα μέρος των εξωτερικών μεμβρανών του κυττάρου των ετεροκυστών. Το ίζημα ομογενοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα B και τα δύο κλάσματα αυτά, στη συνέχεια κατακρημνίζονται με TCA εφόσον πρόκειται να διαχωριστούν σε συνθήκες αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης **(**SDS – Tricine/ PAGE).

2.2.6 Τεχνική χρώσης κυττάρων ετεροκυστών- Alcian Blue

Η Alcian Blue 8GX (SIGMA) χρησιμοποιείται για να βάφει μπλε την ειδική στοιβάδα πολυσακχαριτών που υπάρχει μόνο στις ετεροκύστες (HEP),μέσω πρόσδεσης σε αυτή. Ένα υδατικό διάλυμα 0,5% της χρώσης Alcian Blue διαλύεται σε 50% αιθανόλη-νερό και αναμιγνύεται με ίσο όγκο από τα κύτταρα του *Anabaena sp*.PCC7120. Μετά από επώαση 10 min, γίνεται παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο [54]. Η συγκεκριμένη χρώση επιβεβαιώνει ότι οι ετεροκύστες είναι ώριμες και λειτουργικές.

2.2.7 Μικροσκοπία-Οπτικό μικροσκόπιο, Φθορισμός

Τα *Anabaena sp*.PCC7120 παρατηρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο φθορισμού. Η λήψη των φωτογραφιών με το οπτικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800 και με το πρόγραμμα ProgRes CF, JENOPTIK, Germany, ενώ τα πειράματα φθορισμού πραγματοποιήθηκαν με λάμπα υδραργύρου.

2.3 Αναλυτικές μέθοδοι

2.3.1 Φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού

Η ύπαρξη της Chl_a στο βακτήριο, καθιστά υλοποιήσιμη τη μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού. Οι απορροφήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis(UV-1700/SHIMADZU).

2.3.1.1 Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη με τις συγκεντρώσεις που προκύπτουν από τη μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm σε δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης αλβουμίνης που προέρχεται από ορό βοδιού (Bovine Serum Albumin, BSA) [55]. Αρχικά λαμβάνονται εις τριπλούν 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20μL από το πρότυπο διάλυμα της πρωτεΐνης BSA (2mg/mL) και αραιώνονται μέχρι τα 100μL με ρυθμιστικό διάλυμα Α ή Β ανάλογα από ποιο στάδιο των διαδικασιών θέλουμε να μετρήσουμε την συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Παρασκευάζεται ακόμα ένα δείγμα το οποίο περιέχει μόνο 100μL ρυθμιστικού και χρησιμοποιείται ως τυφλό. Σε αυτά προστίθεται 900μL αντιδραστηρίου Bradford και μετά από ισχυρή ανάδευση (vortex) τα διαλύματα αφήνονται σε ηρεμία για 8 min. Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση των συγκεκριμένων δειγμάτων στα 595nm, στο μήκος κύματος όπου απορροφά το σύμπλοκο χρωστική-πρωτεΐνη. Η τιμή της απορρόφησης του τυφλού δείγματος αφαιρείται από τις τιμές των υπολοίπων δειγμάτων και με αυτό τον τρόπο κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς συναρτήσει της μάζας του BSA σε μg. Η πρωτεϊνική πυκνότητα των δειγμάτων υπολογίζεται με βάση την παραπάνω πρότυπη καμπύλη. Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν η πρότυπη καμπύλη είναι της μορφής:

$$\mathbf{y=ax + \beta}$$

με α= 0,0359 και β=0,0351 για το ρυθμιστικό διάλυμα Α

ή με α= 0,0122 και β= 0,0063 για το ρυθμιστικό διάλυμα Β

ή με α=0,036 και β= 0,002 για το ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl pH=6.8

όπου το x αντιστοιχεί στη συγκέντρωση και το y στην απορρόφηση

Κατά τη διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford το διάλυμα Bradford πρέπει να φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος, η μέτρηση της απορρόφησης να έχει πραγματοποιηθεί μέσα σε μία ώρα και όλα τα πρωτεϊνικά δείγματα να βρίσκονται σε χαμηλή θερμοκρασία.

2.3.1.2 Κατακρήμνιση των πρωτεϊνών

Η ανάλυση ενός πρωτεϊνικού δείγματος σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου προϋποθέτει συγκεκριμένη πρωτεϊνική συγκέντρωση. Δείγματα έχουν χαμηλότερη συγκέντρωση από την απαιτούμενη, υπόκεινται συμπύκνωση με τη χρήση τριχλωροοξικού οξέος (TCA). Στο κάθε πρωτεϊνικό δείγμα προστίθεται υποδεκαπλάσιος όγκος 100% TCA και το διάλυμα παραμένει στους 4° C όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 13.000g για 10 min και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Στη συνέχεια προστίθεται κρύα ακετόνη, σε ίσο όγκο με αυτόν του πρωτεϊνικού δείγματος. Το διάλυμα φυγοκεντρείται πάλι στα 13.000g για 10min και απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο. Η διαδικασία πλύσης με την ακετόνη λαμβάνει χώρα δυο ακόμα φορές. Το ίζημα που προκύπτει αφήνεται τα στεγνώσει για περίπου 30min στον απαγωγό. Τέλος επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος ηλεκτροφόρησης SDS-Tricine (sample buffer), το οποίο επωάζεται σε λουτρό υπερήχων για 30min, με ενδιάμεσα διαλύματα των 5 min, προτού φορτωθεί στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Για τη διαδικασία της ισοηλεκτρικής εστίασης και την προετοιμασία των δειγμάτων έγινε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με κρύα ακετόνη. Στην ποσότητα του εκάστοτε πρωτεϊνικού διαλύματος προστίθενται τριπλάσιος όγκος ακετόνης παραμένει στους -20 ^{o}C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13000 g, για 15 min σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Eppendorf,Centrifuge 5415 C) στους 4° C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για λίγη ώρα στον αέρα (air dry) και επαναδιαλύεται σε 120 μL ρυθμιστικό διάλυμα IEF.(βλ.§2.1)

2.3.1.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χλωροφύλλης a

Για τον καθορισμού της συγκέντρωσης της Chl_a, 50μL από την καλλιέργεια του *Anabaena sp*.PCC 7120 αναμείχθηκε με 1ml methanol και αναδεύεται (vortex) για 1min. Στη συνέχεια το 1 mL φυγοκεντρήθηκε στα 13.000g για 5min για την καταβύθιση των κυττάρων σε μορφή ιζήματος. Η οπτική πυκνότητα του καθαρό υπερκείμενου μετρήθηκε στα 665nm [37].Η συγκέντρωση της Chl_a υπολογίστηκε σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση και ο συντελεστής αραίωσης είναι 21:

μg Chl a/ mL = 13,43 * OD_{665nm} *συντελεστής αραίωσης

2.3.2 Μέτρηση Υδρογόνου με αέρια χρωματογραφία GC

Οι μετρήσεις έγιναν στο Εργαστήριο Βιοχημείας φυτών και Φωτοβιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το όργανο είναι της Schimadzu GC 2010 Plus, όπου χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD) και τριχοειδής στήλη Vici Metronics MC (Ponlsbo, USA)μήκους 30 μέτρων, διαμέτρου 0,53 χιλιοστών, στατικής φάσης πάχους 20μm. Για το διαχωρισμό του H_2 από το O_2 χρησιμοποιήθηκε αέριο αργό (Ar) ως φέρον αέριο, με πίεση 5bar. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν στους 120° C, του TCD στους 200° C και του injector 180° C. Για την ποσοτικοποίηση του H_2 κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με προσθήκη γνωστών ποσοτήτων. Σε φιαλίδια τοποθετήθηκαν 50 mL καλλιέργειας του κάθε στελέχους, αφού είχαν αναπτυχθεί 2 μέρες στο θρεπτικό $BG11^0$. Η μεταφορά έγινε σε αποστειρωμένες συνθήκες και αμέσως τα φιαλίδια κλείστηκαν αεροστεγώς με πώματα και σφραγίστηκαν. Στη συνέχεια το κάθε φιαλίδιο απαερώθηκε με αέριο Ar για 2min και το αφήσαμε στους 28^0 C σε αργή ανάδευση, υπό φωτισμό 70-80 μmol φωτόνια m^{-2} s^{-1} , για μια εβδομάδα. Μετά μετρήθηκε το συσσωρευμένο αέριο υδρογόνο που είχε παραχθεί (**Εικόνα 18**).

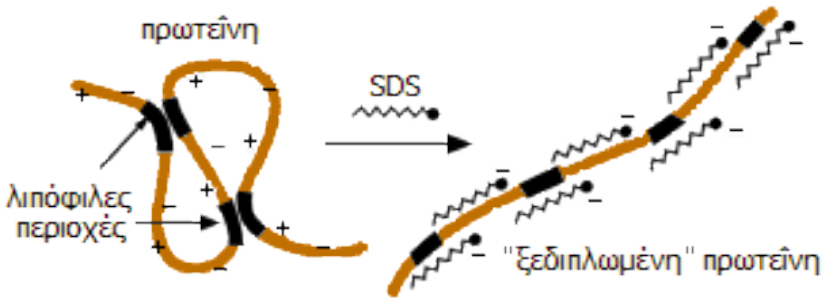
Εικόνα 18: Φιαλίδια με 50 mL καλλιέργειας, 2 μέρες αφού είχαν αναπτυχθεί στο θρεπτικό $BG11^0$ κλείστηκαν αεροστεγώς και μετά από μια εβδομάδα μετρήθηκε το συσσωρευμένο αέριο υδρογόνο που είχε παραχθεί.

2.4 Μέθοδοι ανάλυσης και χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών

2.4.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μακρομορίων, όπως δείγματα που μπορούν να κουβαλάνε φορτίο – από ολόκληρα κύτταρα έως πρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), αμινοξέα, φαρμακευτικές ουσίες, οργανικά οξέα και βάσεις και πολλά άλλα. σύμφωνα με το μέγεθος, το σχήμα και το ισοηλεκτρικό τους σημείο, με πολλές εφαρμογές στην μοριακή βιολογία, βιοχημεία, πρωτεϊνική χημεία. Η βασική αρχή στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από την σταθερά pK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση. Ο διαχωρισμός των μακρομορίων με ηλεκτροφόρηση

βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάση του μοριακού τους βάρους. Για να πραγματοποιηθεί αυτό πρέπει να γίνει μετουσίωση των πρωτεϊνών με SDS(sodium dodecyl sulfate, Fluka), ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται με τις πρωτεΐνες (1,4g ανά g πρωτεΐνης). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη της τεταρτοταγούς και δευτεροταγούς δομής και την πρόσδοση αρνητικού φορτίου σε όλες τις πρωτεΐνες. Το τελευταίο εξαλείφει την επιρροή του φορτίου στην κινητικότητα και οι πρωτεΐνες κινούνται μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος (**Εικόνα19**).



Εικόνα 19: Στην εικόνα παρατηρείται η διαδικασία της μετουσίωσης της πρωτεΐνης με τη βοήθεια του απορρυπαντικού SDS. Αρχικά υπάρχει μια φορτισμένη πρωτεΐνη, ενώ στη συνέχεια παρουσιάζεται η αλλαγή που επιφέρει το απορρυπαντικό, διαταράσσοντας τις υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης και φορτίζοντας την αρνητικά. Έτσι πετυχαίνεται ένα γραμμικό αποτέλεσμα.

2.4.1.1 SDS-Tricine ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Η πρωτεϊνική σύσταση των δειγμάτων εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου (PAGE). Η Tricine-SDS-PAGE χρησιμοποιείται συνήθως για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με εύρος μάζας 1-100 kDa. Είναι το προτιμώμενο ηλεκτροφορητικό σύστημα για την ανάλυση των πρωτεϊνών με μάζα μικρότερη από 30 kDa. Οι συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου που χρησιμοποιούνται στα πηκτώματα αυτά είναι χαμηλότερες από ό, τι σε άλλα ηλεκτροφορητικά συστήματα. Αυτές οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις διευκολύνουν την αποτύπωση υδρόφοβων πρωτεϊνών και την αναγνώριση τους με φασματομετρία μάζα [56]. Η σύσταση και ο τελικός όγκος των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και επιστοίβαξης για 4 gels είναι η εξής:

Αντιδραστήρια (mL)	Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (10%)	Διάλυμα πηκτής στοίβαξης (4%)
AB-mix	60 mL	8,3 mL
Gel-buffer (3X)	100 mL	25 mL
Glycerol	30g	-
τελικός όγκος με προσθήκη ddH_2O	300 mL	100 mL
APS 10% (w/v)	1,5 mL	0,75 mL
TEMED	0,15 mL	0,075 mL

Αρχικά το διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού τοποθετείται μεταξύ δυο γυάλινων πλακών (διαστάσεις 20cm x 22 cm, 1 mm πάχος διαχωριστικού μεταξύ τους) και από πάνω τοποθετείται βουτανόλη για τη δημιουργία ευθείας επιφάνειας . Μετά τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου αφαιρείται η βουτανόλη και εγκαθιστάται το διάλυμα της πηκτής επιστοίβαξης, μέσα στο οποίο προσαρμόζεται το χτενάκι για τη δημιουργία των πηγαδιών. Στο κάθε πηγάδι φορτώνεται 80 μL δείγματος με συνολική ποσότητα πρωτεΐνης 160 μg, εφόσον προηγουμένως έχει επωαστεί 30min, και πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση με σταθερή τάση 70 V/πηκτή για 14-16h. Η χρώση των πηκτών έγινε με Coomassie Blue Silver για 24h [57].

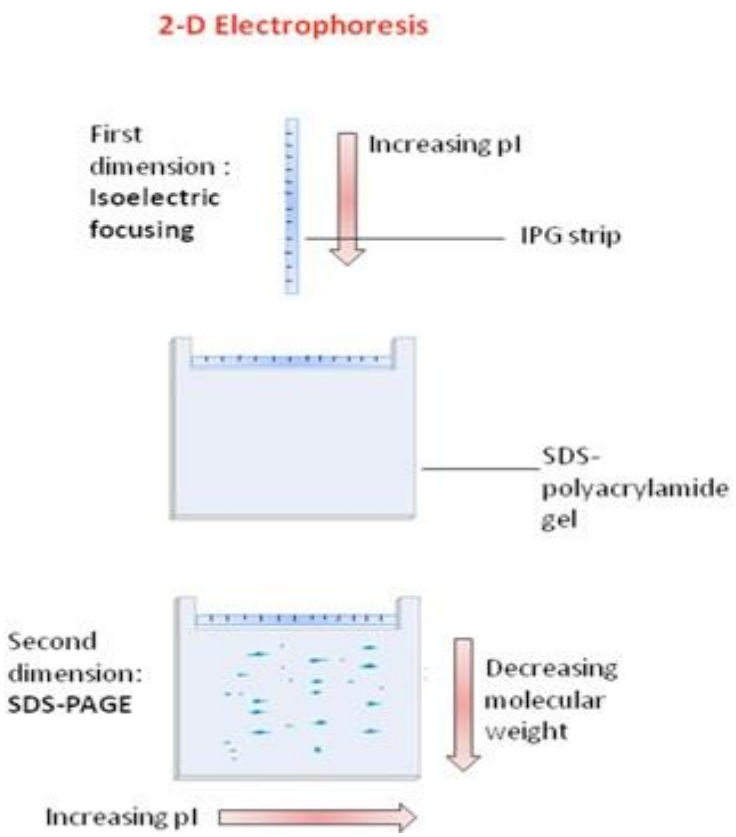
2.4.1.2 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση με διπλή SDS-Tricine –PAGE

Για να πραγματοποιηθεί αυτή η μέθοδος συνδυάστηκαν δυο Tricine-SDS πηκτές σε ένα δισδιάστατο σύστημα ηλεκτροφόρησης. Από την κάθε Tricine-SDS πηκτή της πρώτης διάστασης κόπηκαν οι επιθυμητές λωρίδες και επωάστηκαν για 30 min συνολικά σε όξινο διάλυμα 100 mM Tris-HCl με pH=2 [58]. Με τη χρήση διηθητικού χαρτιού απορροφήθηκε η υγρασία και οι λωρίδες τοποθετήθηκαν οριζόντια σε σχέση με την πηκτή διαχωρισμού της δεύτερης διάστασης, με μία μικρή κλίση ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες που θα επηρεάσουν τον πολυμερισμό της πηκτής. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100V/πηκτή για 24 h. Η χρώση της πηκτής έγινε με Coomassie Blue Silver για 24 h. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ανάλυση των πρωτεϊνών σε μία διαγώνιο, με τις πιο υδρόφοβες πρωτεΐνες να αποκλίνουν αυτής.

2.4.1.3 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση με ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing-IEF) και SDS-PAGE (2DE)

Σε μία τέτοια πηκτή, μια πρωτεΐνη, κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, θα κινηθεί προς το σημείο της πηκτής όπου το καθαρό της φορτίο θα είναι μηδέν (εστίαση). Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση το pI των πρωτεϊνών. Μια πρωτεΐνη με θετικό καθαρό φορτίο θα κινηθεί προς την κάθοδο, όπου και γίνεται σταδιακά λιγότερο θετικά φορτισμένη καθώς κινείται μέσα στη διαβάθμιση του pH μέχρι να βρει την τιμή όπου το φτάνει pH=pI της. Θετικά φορτισμένες σε τιμές pH<pI και αρνητικά φορτισμένες σε τιμές pH> pI τους. Σε pH=pI το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν. Η ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης πραγματοποιείται σε ταινία με πηκτή η οποία έχει pH προοδευτικά μεταβαλλόμενο. Η διαβάθμιση του pH μέσα στη πηκτή ακρυλαμιδίου δημιουργείται με την προσθήκη μικρής ποσότητας αμφολυτών. Οι αμφολύτες είναι φορείς μικρού μοριακού βάρους πολυμερή με υψηλή ρυθμιστική ικανότητα κοντά στο pI τους. Οι αμφολύτες είναι η κύρια πηγή ιόντων στο σύστημα. Όταν εφαρμοστεί δυναμικό σε μια πηκτή η οποία περιέχει ένα μείγμα αμφολυτών τότε αυτοί θα αρχίσουν να κινούνται σύμφωνα με την κατανομή του φορτίου τους. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μια διαβάθμισης pH. Σε δείγματα απομονωμένων κυττάρων ετεροκυστών όπου είχαν απομονωθεί και φυλαχθεί στους -80^0 C, εφαρμόστηκε η συγκεκριμένη μέθοδος. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl pH=6,8 στα ιζήματα όλων των στελεχών από τις απομονωμένες ετεροκύστες, ώστε να απομακρυνθεί η σουκρόζη του ρυθμιστικού διαλύματος Α που είχε παραμείνει από την διαδικασία της απομόνωσης (σε 1mL κυττάρων προστέθηκαν 3mL ρυθμιστικό Tris/HCl pH=6,8). Η φυγόκέντρηση είχε διάρκεια 5min στα 7000g. Τα υπερκείμενα μετά τις πλύσεις ήταν γαλάζια, πράγμα που σημαίνει ότι αποβλήθηκαν πρωτεΐνες που περιέχουν χρωστικές. Σε κάθε ίζημα που προέκυψε από την φυγοκέντρηση προστέθηκαν 300 μl ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl pH=6,8, για την διαλυτοποίηση. Ακολούθησαν 5 κύκλοι ψύξης- απόψυξης, 5min σε υγρό άζωτο και 5 min σε υδατόλουτρο (37^0 C), ο κάθε κύκλος και 3 φορές επί 10-15 sec σε λουτρό υπερήχων, για να γίνει η διάσπαση των ετεροκυστών. Έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του κάθε δείγματος. . Για λωρίδες (IPG strips) μήκους 7 cm πάρθηκαν 200μg πρωτεΐνης από το κάθε δείγμα και διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα φόρτωσης για ισοηλεκτρική εστίαση (IEF sample buffer), προστέθηκαν 2% (v/v) αμφολύτες pH: 3-10 και 6μL αναστολείς

πρωτεασών (PIs). Οι λωρίδες κατόπιν ενυδατώνονται με το παραπάνω διάλυμα για 16h σε θερμοκρασία δωματίου και σε ειδική συσκευής επώασης, εφόσον καλυφθούν πλήρως με ειδικό λάδι (Bio-Rad). Την επόμενη μέρα απομακρύνθηκαν οι λωρίδες από τη συσκευή επώασης και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στη συσκευή ισοηλεκτρικής εστίασης (Protein IEF Cell System, Bio-Rad Amadora,Portugal). Η διαδικασία της ισοηλεκτρικής εστίασης πραγματοποιήθηκε ως εξής: (α) 250V με γρήγορη αύξηση για 15min (β) 4.000Vμε γραμμική αύξηση για 1h (γ) 4.000V με γρήγορη αύξηση για 5h (δ) 500V με γρήγορη αύξηση για 5h για λωρίδα 7cm (~15.700 Vh). Οι λωρίδες φυλάχθηκαν αμέσως μετά το πέρας της εστίασης σε ζελατίνα και αλουμινόχαρτο στους -80° C για όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα τα IPG strips επωάστηκαν σε διάλυμα ισορροπίας μετά την εστίαση (Διάλυμα Α) (βλ.§ 2.1) για 15min το οποίο περιέχει 2% w/v Dithiothreitol (DTT), και για επιπλέον 15 min σε Διάλυμα Α το οποίο περιέχει 2,5% Ιωδοακεταμίδιο (IAA). Μετά η λωρίδα στεγνώνει σε διηθητικό χαρτί. Η δεύτερη διάσταση πραγματοποιήθηκε σε πηκτές SDS-πολυακρυλαμιδίου με σύσταση που αναφέρεται παραπάνω (βλ.§2.1). Παράλληλα σε διάλυμα καθόδου προστίθεται 0,5% (w/v) Agarose και 0,003% (w/v) bromophenol blue. Αυτό το διάλυμα τοποθετείται πάνω από τη λωρίδα μετά τις επωάσεις και εφόσον έχει τοποθετηθεί στη πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 30V/πηκτή για 1h και 80V/πηκτή για τις υπόλοιπες 4 h. Σύνολο 5h (**Εικόνα 20**). Η χρώση της πηκτής έγινε με Coomassie Blue Silver για 24 h.



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης σε συνδυασμό με ισοηλεκτρική εστίαση. Στην πρώτη διάσταση διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες με βάση το φορτίο τους και στη δεύτερη διάσταση με βάση το μοριακό τους βάρος.

2.4.1.4 Χρώση πηκτών με Coomassie κολλοειδές

Η χρώση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών έγινε με την χρώση Coomassie Brilliant Blue G-250 για 12-18h και αποχρωματίστηκαν με διάλυμα αποχρωματισμού 2 φορές. (βλ.§2.1)

2.4.2 Πρωτεόλυση εντός της πηκτής με θρυψίνη

Η θρυψίνη είναι μία σερινοπρωτεάση η οποία έχει την ικανότητα να υδρολύει πρωτεΐνες και πιο ειδικά να διασπάει τον C-τερματικό των πεπτιδικών δεσμών των αμινοξέων αργινίνης και λυσίνης. Η διάσπαση των πρωτεϊνών λαμβάνει χώρα στην πηκτή πολυακριλαμιδίου (in situ) μετά από αποδιατακτική Tricine-SDS

ηλεκτροφόρηση και χρώση με κολλοειδή Coomassie (Blue Silver). Τα βήματα του πρωτοκόλου που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

(1) Αποκοπή των πρωτεϊνικών στιγμάτων από τις πηκτές μέγεθος (1×1 cm)

(2) Αποχρωματισμός με 50% v/v ACN και 50mM διττανθρακικό αμμώνιο

(3) Τρεις πλύσεις εναλλάξ διάρκειας 15min η καθεμία

(4) Προσθήκη 100% ACN και επώαση για 10min

(5) Αναγωγή των ξηραμένων πηκτών με 10 mM DTT σε 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο και επώαση για 45min στους 56ºC

(6) Πλύσεις με 50% v/v ACN και 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο, εναλλάξ διάρκειας 10min η καθεμία

(7) Προσθήκη 100% ACN και επώαση για 10min

(8) Αλκυλίωση με 55 mM ιοδοακεταμίδιο σε 50mM διττανθρακικό αμμώνιο για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι

(9) Πλύσεις στα κομμάτια της πηκτής με ACN (50% v/v) και διττανθρακικό αμμώνιο (50mM), όπως και στη διαδικασία του αποχρωματισμού

(10) Αφυδάτωση των κομματιών της πηκτής με 100% ACN και επώαση για 15min

(11) Στα αφυδατωμένα κομμάτια της πηκτής προστίθεται 25-30μL του ρυθμιστικού διαλύματος της πρωτεόλυσης το οποίο περιέχει 20μg θρυψίνης από πάγκρεας χοίρου και αφήνονται για 30-90 min στον πάγο

(12) ακολουθεί επώαση για 14-16h στους 37° C

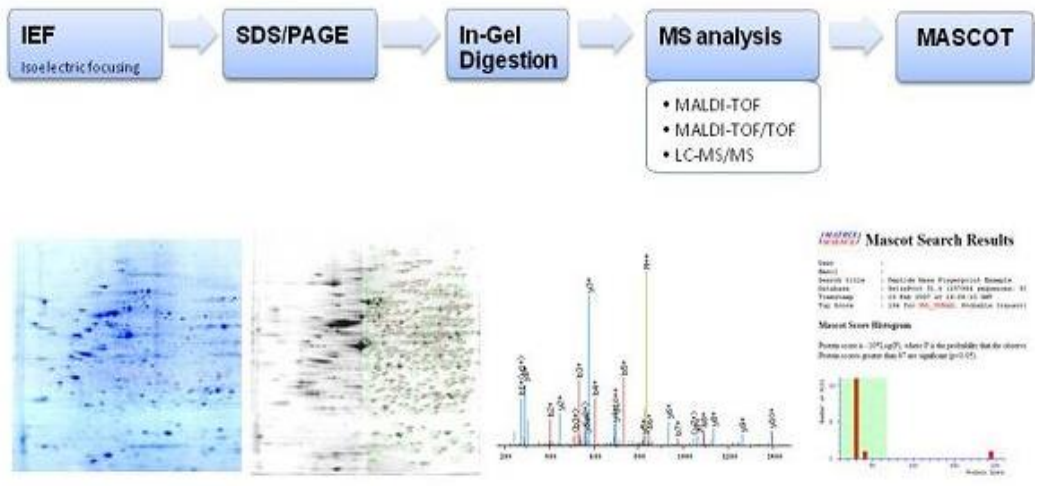
(13) Την επόμενη μέρα τα πεπτίδια από τα κομμάτια της πηκτής ανακτώνται με διαδοχικά βήματα ένωσης των υπερκειμένων που προκύπτουν από δύο διαδοχικές επωάσεις 30min, στην αρχή με διάλυμα 50% ACN 0.1% TFA και μετά σε διάλυμα 100% ACN

(13) Το τελικό συνολικό διάλυμα που προκύπτει ξηραίνεται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα και τα πεπτίδια που σχηματίζονται τοποθετούνται στους -20° C μέχρι να εφαρμοστούν στο στόχο [59].

2.4.3 Ανάλυση πρωτεϊνών με MALDI φασματοσκοπία μάζας

Κάθε δείγμα, μετά την διαδικασία της πρωτεόλυσης διαλυτοποίηθηκε σε 5μl διαλύματος 50% ACN ,0,1% TFA. 1μl δείγματος συγκρυσταλλώθηκε με 1μl διαλύματος α-κυανο-4-υδροξυκινναμικού οξέος (8,3 mg/mL), 50% ACN, 0,1% TFA και τοποθετήθηκαν πάνω στη μεταλλική πλάκα, η οποία θα εισαχθεί σε

φασματογράφο μάζας Ultraflextreme (Bruker Daltonics). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της αργής εξαγωγής (delayed extraction) και με τη χρήση του ανακλαστήρα με τις παρακάτω παραμέτρους: laser smartbeam II συχνότητας 200Hz, για τα φάσματα MS με τάση επιτάχυνσης 20,15kV για την ion source 1 και 18,10kV για την ion source 2, 90ns καθυστέρηση και πύλη χαμηλ**ο**ύ μοριακού βάρους 600kDa, για τα φάσματα MS/MS με τη μεθοδολογία LIFT με τάση επιτάχυνσης 19,06kV για την ion source 1 και 3,80kV για την ion source 2. Ο ανακλαστήρας τέθηκε στην κατάσταση ανάλυσης θετικών ιόντων με κλάσμα τάσης 2,3 και ελήφθησαν φάσματα με εύρος μαζών από 700-3900 kDa. Για κάθε τελικό φάσμα μάζας αθροίστηκαν 1000 έως και 2000 επιμέρους φάσματα.. Όλα τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό flexanalysis 3.3 (Bruker Daltonics) για την εξομάλυνσή τους, το φιλτράρισμα του θορύβου και την επιλογή των μονο-ισοτοπικών κορυφών, ενώ μέσω του λογισμικού BioTools version 3.2 (Sequence editor version) έγινε η αναζήτηση στο Mascot server για τα βακτήρια Anabaena sp.PCC 7120. Η πηγή για την αλληλουχία των γονιδίων και οι πληροφορίες για τα γονίδια των κυανοβακτηρίων ήταν στη Cyanobase- Η Βάση Δεδομένων για το γονιδίωμα για τα κυανοβακτήρια του Kazusa- DNA Ινστιτούτο Ερευνών. (http:// bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase).

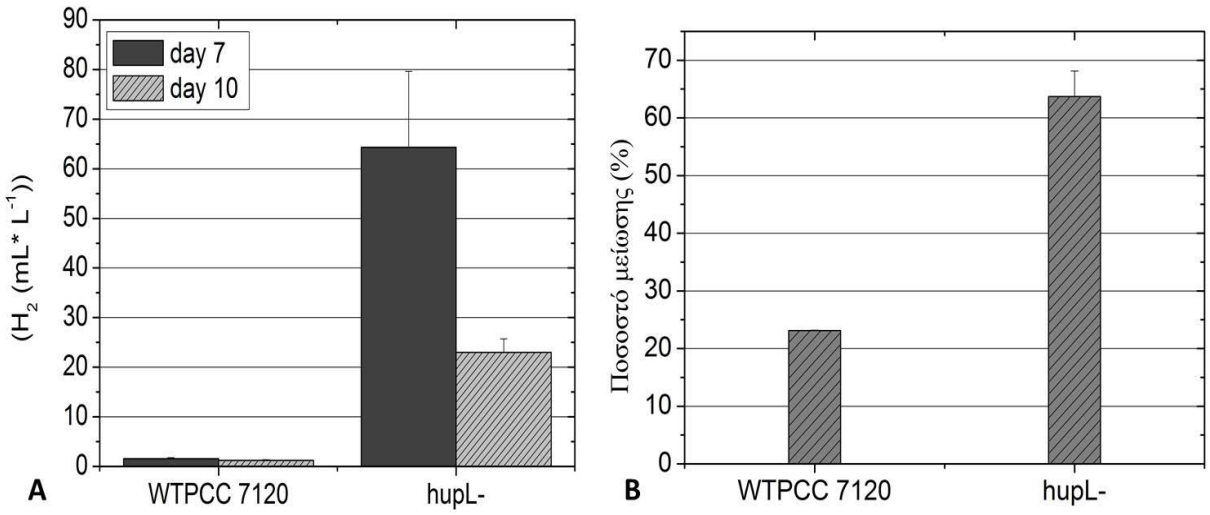


Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση όλων των διαδικασιών που ακολουθήθηκαν μέχρι την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών από το πρόγραμμα βιοπληροφορικής MASCOT.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μέτρηση αερίου υδρογόνου στα Βακτήρια

Η διαδικασία μέτρησης πραγματοποιήθηκε με βάση το υποκεφάλαιο 2.3.2. Οι μετρήσεις έγιναν μετά από μία εβδομάδα ήπιας ανάδευσης των κυττάρων σε θρεπτικό $BG11^{O}$, υπό ατμόσφαιρα αερίου Ar, για τα στελέχη WTPCC7120 και $hupL^{-}$ και τα αποτελέσματα φαίνονται στην **Εικόνα 22**:



Εικόνα 22: Μέρος Α παρουσιάζεται το διάγραμμα παραγόμενης ποσότητας H_2 για τα στελέχη WTPCC7120 και $hupL^{-}$ και στο μέρος Β παρουσιάζεται το ποσοστό μείωσης (%) του παραγόμενου υδρογόνου και για τα δυο στελέχη από τη $7^{η}$ ημέρα μέχρι τη $10^{η}$ ημέρα.

Αντικαθιστώντας το άζωτο με αέριο Ar, όλα τα ηλεκτρόνια διατίθεται για την μείωση των πρωτονίων, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εξίσωση:

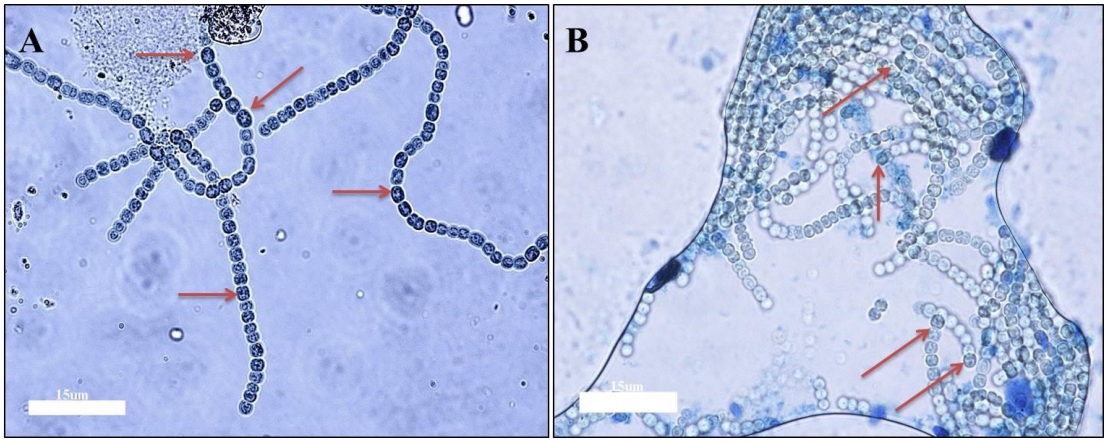
$$\mathbf{2e^{-} + 2H^{+} + 4ATP \rightarrow H_2 + 4(ADP + Pi)}$$

Έτσι, αναμαίνεται η δράση της νιτρογενάσης στις ετεροκύστες, να αυξήσει την παραγωγή υδρογόνου, ανακατευθύνοντας τη ροή ηλεκτρονίων, ώστε να μειωθούν τα πρωτόνια και να αποφευχθεί η μείωση του μοριακού αζώτου [60]. Παρατηρείται λοιπόν, ότι και τα δύο στελέχη παρουσιάζουν σχετικά υψηλή παραγωγή υδρογόνου κατά την $7^{η}$ ημέρα η οποία εμφανίζεται μειωμένη την $10^{η}$ ημέρα. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι έχει μειωθεί ο πληθυσμός των κυττάρων λόγω κατανάλωσης του θρεπτικού μέσου.Το ποσοστό μείωσης του υδρογόνου για το στέλεχος $hupL^{-}$ είναι μεγαλύτερο από το στέλεχος WTPCC7120. Σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα υδρογόνου παρατηρείται για το στέλεχος $hupL^{-}$ σε σχέση με το στέλεχος WTPCC7120. Αυτό το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο, διότι με την απενεργοποίηση του γονιδίου της uptake υδρογενάσης του στελέχους $hupL^{-}$ το

υδρογόνο που παράγεται από τη νιτρογενάση δεν διασπάται και επιπλέον το μειωμένο οξυγόνου δεν καταστέλλει τη δράση αυτού του ενζύμου. Να αναφερθεί ότι μετρήσεις για την ποσότητα του παραγόμενου υδρογόνου πραγματοποιήθηκαν και για τα άλλα δυο στελέχη $hoxH^-$ και $hupL^-/hoxH^-$, αλλά η ποσότητα του υδρογόνου που παρήχθει ήταν σε μικρή συγκέντρωση και επομένως μη ανιχνεύσιμη από τον αέριο χρωματογράφο.

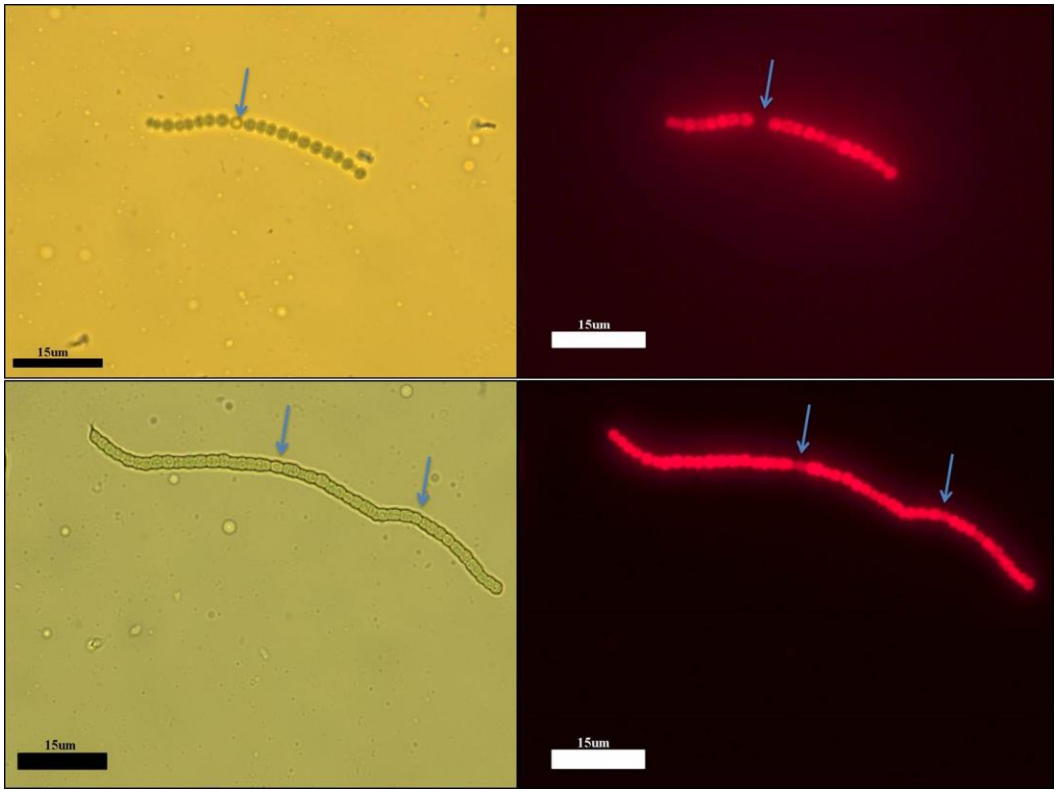
3.2 Καλλιέργεια και ανάπτυξη ετεροκυστών στα διαφορετικά στελέχη του *Anabaena sp*.PCC7120

Τα τέσσερα στελέχη του *Anabaena sp*.PCC7120 καλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό μέσο BG11 για 5 μέρες. Τα κύτταρα στη συνέχεια πλύθηκαν 3 φορές με το θρεπτικό $BG11^0$, το οποίο στερείται την πηγή αζώτου και τα αφήσαμε 48h ακόμα να αναπτυχθούν (βλ.§2.2.3). Η κυτταρική συγκέντρωση εκφράστηκε ως μg Chl_a/ mL καλλιέργειας. Οι ποσότητες των κυττάρων πριν την αλλαγή του θρεπτικού αντιστοιχούν σε 2,6 μg Chl_a / mL καλλιέργειας για το στέλεχος WTPCC7120, 1.8 μg Chl_a/ mL καλλιέργειας για το στέλεχος $hupL^-$, 2.4 μg Chl_a/ mL καλλιέργειας για το στέλεχος $hoxH^-$ και 2,8 μg Chl_a/ mL καλλιέργειας για το στέλεχος $hupL^-/hoxH^-$. Η κυτταρική συγκέντρωση, εφόσον προηγήθηκε αλλαγή του θρεπτικού και μεσολάβησε χρονικό διάστημα 48 h για τη διαφοροποίηση των ετεροκυστών , ανήλθε σε 1,35 μg Chl_a/ mL καλλιέργειας για το στέλεχος WTPCC7120, 1,135 μg Chl_a /ml καλλιέργειας για το στέλεχος $hupL^-$, 1,55 μg Chl_a/ml καλλιέργειας για το στέλεχος $hoxH^-$ και 2,58 μg Chla/ ml καλλιέργειας για το στέλεχος $hupL^-/hoxH^-$. Παρατηρείται και για τα 4 στελέχη μία μικρή σταθερή μείωση στη τιμή της συγκέντρωση της Chl_a, μετά την ανάπτυξη των κυττάρων στο θρεπτικό που στερείται την πηγή αζώτου. Αυτό μπορεί να έγκειται στο γεγονός ότι μετά την αλλαγή του θρεπτικού τα κύτταρα περνάνε μία φάση προσαρμογής.

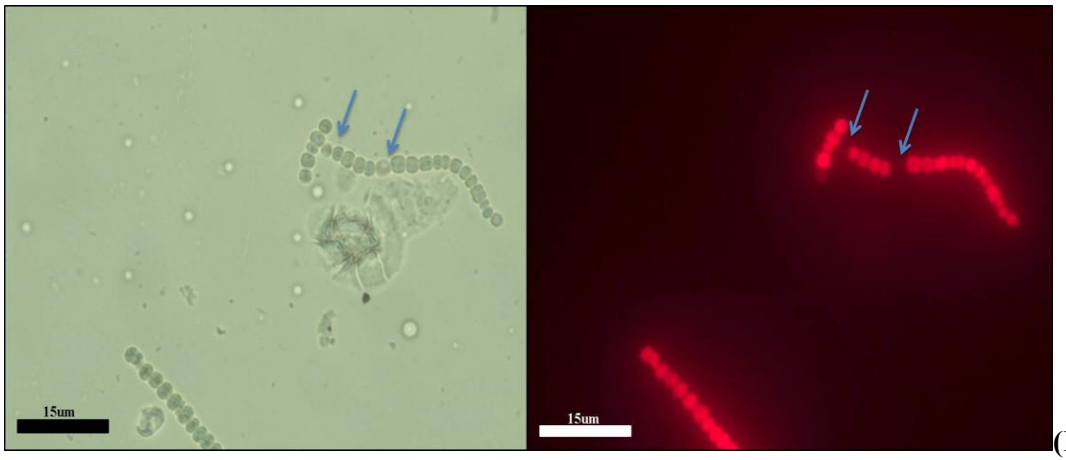


Εικόνα 23: Στις εικόνες (A) και (B) παρουσιάζεται το στέλεχος WTPCC7120 μετά την ανάπτυξη σε θρεπτικό $BG11^0$, όπου φαίνονται βαμμένες με πιο έντονο μπλε, οι ετεροκύστες που έχουν αναπτυχθεί. Η χρώση Alcian Blue επιβεβαιώνει ότι οι ετεροκύστες είναι ώριμες και λειτουργικές, μέγεθος μπάρας: 15μm

Τα κυανοβακτήρια πραγματοποιούν τη συγκομιδή της ενέργειας του φωτός σε πολλά μήκη του ορατού φάσματος χρησιμοποιώντας τις φυκοχολοπρωτεϊνες, οι οποίες οργανώνονται στα φυκοχολοσώματα, που μεταφέρουν την ενέργεια κυρίως στα κέντρα αντίδρασης του PSII. Η μεταφορά ενέργειας μπορεί να παρακολουθηθεί με την μέτρηση εκπομπής φθορισμού από τις φυκοχολοπρωτεϊνες ή Chl_α μετά από διέγερση σε ένα μήκος κύματος που απορροφάται από αυτές [61]. Οποιαδήποτε βλάβη στις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταφορά ενέργειας θα οδηγήσει σε μεταβολή των φασμάτων εκπομπής φθορισμού. Η απουσία απορρόφησης των φυκοχολοπρωτεινών στις ετεροκύστες, προβλέπει ότι η διέγερση σε ένα μήκος κύματος που απορροφάται από μια φυκοχολοπρωτεΐνη δεν θα αποδώσει εκπομπή από τη Chl_α στις ετεροκύστες. Αυτό θα έχει σαν αποτέλεσμα να μην φθορίζουν οι ετεροκύστες όσο τα αγενή κύτταρα όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στις εικόνες του φθορισμού. Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι μετά που θα μετατραπούν τα αγενή κύτταρα σε ετεροκύστες κατά τις συνθήκες στέρησης αζώτου, το PSII υπάρχει σε πολύ μικρό ποσοστό σε απενεργοποιημένη μορφή έως και καθόλου. Στο PSII υπάρχει η Chla στο κέντρο αντίδρασης, η οποία εκπέμπει μία σταθερή ένταση εκπομπής φθορισμού, ανάλογη της έντασης της ακτινοβολίας διέγερσης. Έτσι οι ετεροκύστες με διαφορετική συγκέντρωση Chla ή τροποποιημένο το κέντρο αντίδρασης της Chla, δεν έχουν την ικανότητα να φθορίζουν όπως τα αγενή κύτταρα, πράγμα που μας διευκολύνει να κατανοήσουμε καλύτερα τη θέση τους μέσα στο κύτταρο (**Εικόνα 24**) [62].



(A)

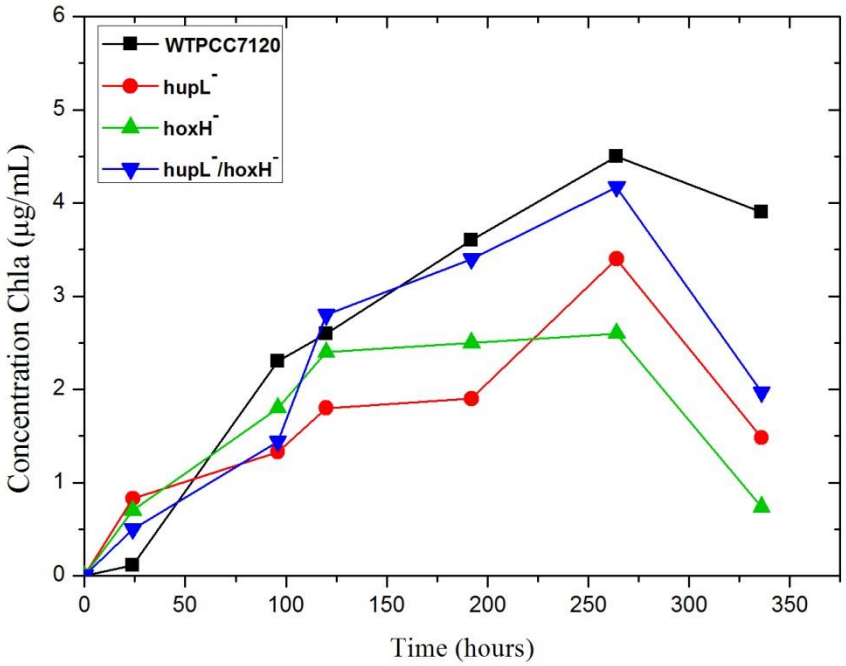


(B)

Εικόνα 24: (A),(B) Εκπομπή φθορισμού του στελέχους hupL$^-$ των κυττάρων *Anabaena sp.* PCC7120 στο ίδιο ινίδιο 1 ημέρα μετά τη μεταφορά από το BG11 θρεπτικό μέσο στο BG11^0. Τα βελάκια δείχνουν τα σημεία με τις μη-φωτοσυνθετικές ετεροκύστες. μέγεθος μπάρας:15μm και για τα A και για τα B.

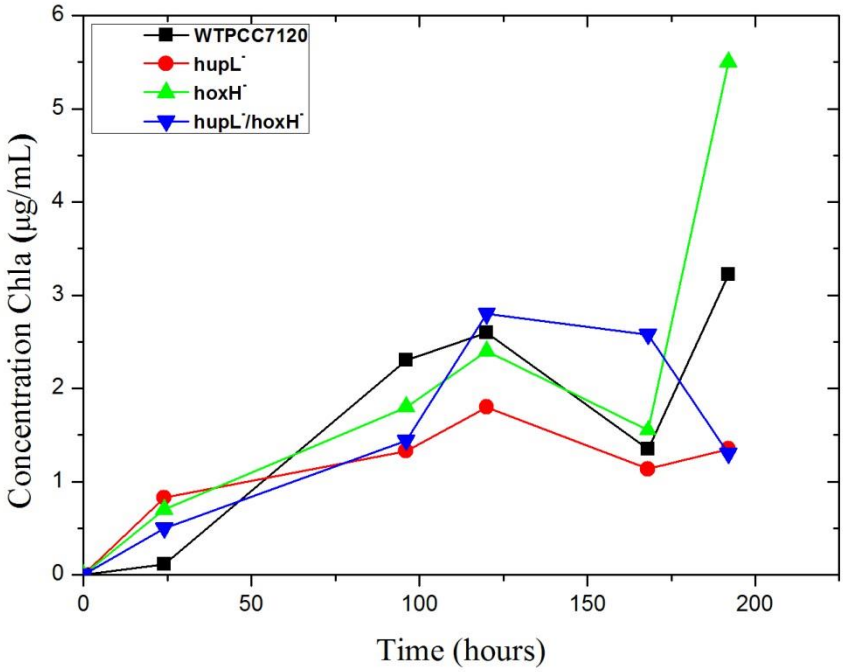
3.3 Καμπύλες ανάπτυξης

Στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν για τα τέσσερα στελέχη του *Anabaena sp*.PCC7120 μετρήθηκε η συγκέντρωση της Chl_a κατά την ανάπτυξη τους στο θρεπτικό μέσο BG11, σε εύρος ημερών 1-14. Οι μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρία ορατού και κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες ανάπτυξης (**Εικόνα 25**).



Εικόνα 25: Διάγραμμα των τεσσάρων στελεχών όπου γίνεται καταγραφή της ανάπτυξης τους στο θρεπτικό μέσο BG11 σύμφωνα με την Chl_a.

Από την $5^η$ ημέρα ως την $7^η$ ημέρα η συγκέντρωση της Chl_a κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα. Χαρακτηριστικά στην **Εικόνα 25** παρατηρούμε ότι την $11^η$ μέρα η ανάπτυξη είναι στο βέλτιστο βαθμό για όλα τα στελέχη και σταδιακά μετά την ημέρα αυτή η συγκέντρωση της Chl_a μειώνεται, συνεπώς η ταχύτητα ανάπτυξης των κυττάρων μειώνεται. Η καλλιέργεια πυκνώνει, το φως δεν φτάνει σε όλα τα κύτταρα, άρα δεν εκμεταλεύεται το PSII, με παράλληλη εισαγωγή των κυττάρων στη φάση θανάτου. Τέλος, η αδρανοποίηση των γονιδίων στα μεταλλαγμένα στελέχη παρατηρούμε ότι δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων στις συνθήκες καλλιέργειας [63].



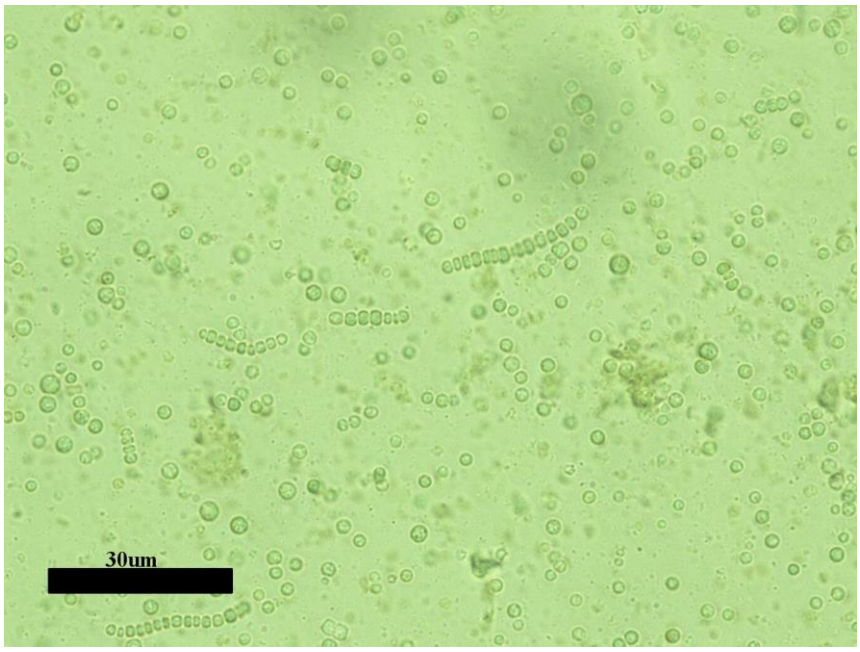
Εικόνα 26: Συγκεντρωτικό διάγραμμα και από τα 4 διαφορετικά στελέχη όπου γίνεται καταγραφή της ανάπτυξης τους στο θρεπτικό μέσο BG11 μέχρι την 5η ημέρα(120h) και στη συνέχεια η ανάπτυξη μετά την αλλαγή θρεπτικού 7η ημέρα (168h)σύμφωνα με την Chl_a.

Στην **Εικόνα 26** παρατηρούμε ότι μετά την αλλαγή του θρεπτικού την 5η ημέρα (120h) μέχρι την 7η ημέρα(168h) όπου γίνεται η συλλογή των κυττάρων, για την απομόνωση των ετεροκυστών σε όλα τα στελέχη παρατηρείται η μείωση της συγκέντρωσης της Chl_a (βλ.§3.2). Για τα στελέχη WTPCC7120 και $hoxH^-$ σε κάποιες καλλιέργειες που τα κύτταρα δεν είχαν μεγαλώσει επαρκώς την 7η ημέρα αλλά τα αφέθηκαν για ακόμα 1 ημέρα(8η ημέρα-192h) και η συλλογή τους έγινε τότε, η συγκέντρωση της Chl_a παρατηρούμε ότι αυξήθηκε σημαντικά, ενώ στο στέλεχος $hupL^-$ αυξήθηκε ελάχιστα και τέλος στο στέλεχος $hupL^-/hoxH^-$ μειώνεται. Αυτό συμφωνεί με τις αυξανόμενες τιμές στη συγκέντρωση της Chl_a και όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται στο θρεπτικό BG11 (**Εικόνα 25**), όπου πάλι παρατηρείται από την 8η μέχρι την 11η ημέρα αύξηση στις τιμές. Πιθανός λοιπόν και στις δυο συνθήκες ανάπτυξης, το βακτήριο συνολικά να συμπεριφέρεται παρόμοια.

3.4 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ετεροκυστών

Η προϋπόθεση για την επιτυχή απομόνωση του κυτταρικού τοιχώματος καθαρών ετεροκυστών ή των εξωτερικών μεμβρανών των ετεροκυστών, ήταν η εξασφάλιση

ενός καθαρού κλάσματος από απομονωμένες ετεροκύστες απαλλαγμένες από τα σπασμένα αγενή κύτταρα όσο το δυνατόν. Με βάση την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.4.



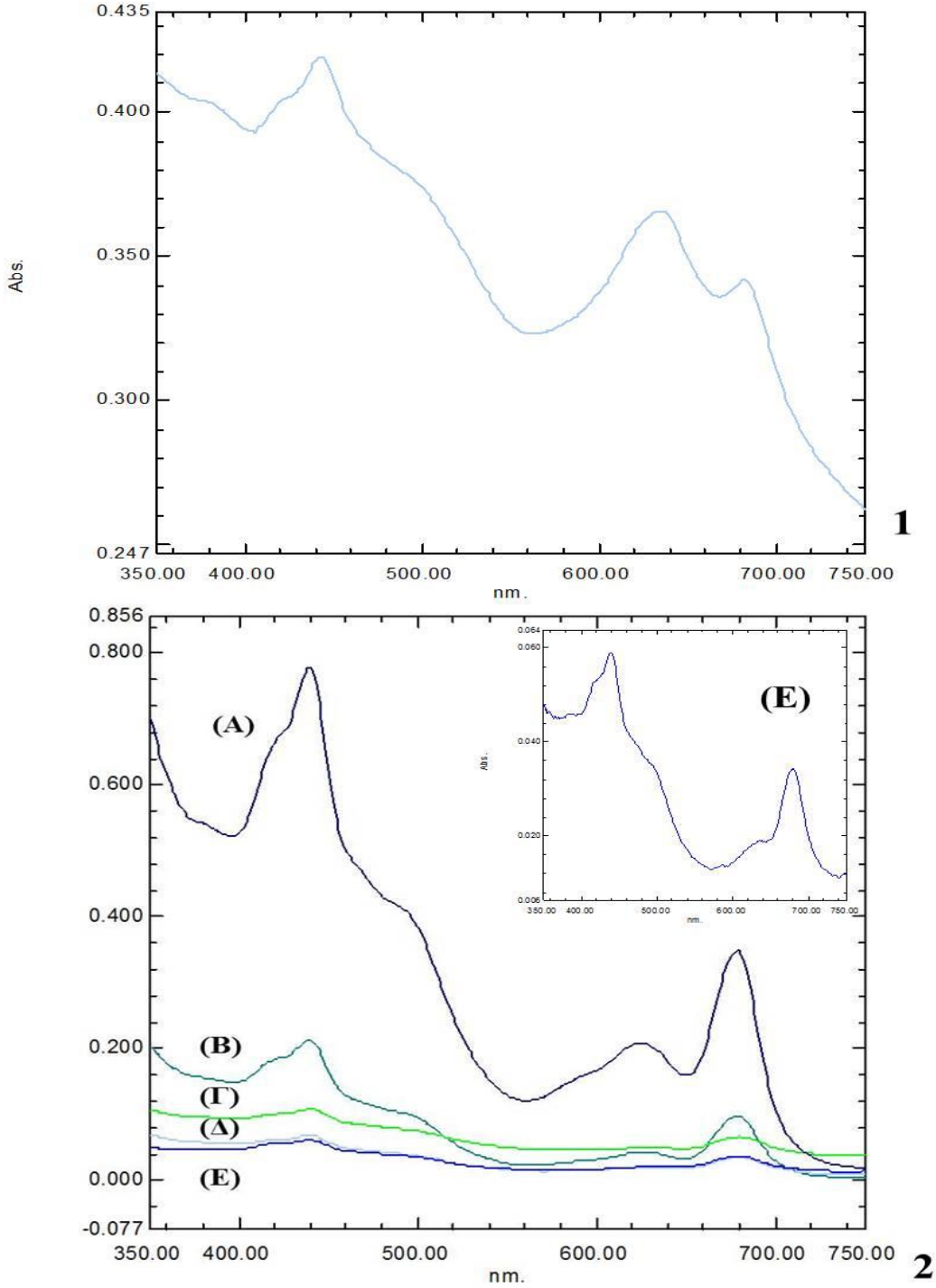
Εικόνα 27: Εναιώρημα κυττάρων *Anabaena sp.*PCC 7120 μετά την επεξεργασία με υπερήχους, όπου παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο, το σπάσιμο των κυττάρων και ο διαχωρισμός των αγενών κυττάρων από τις ετεροκύστες. μέγεθος μπάρας: 30μm

Η καθαρότητα των απομονωμένων ετεροκυστών ελέγχθηκε με δυο τρόπους, με τη χρήση φασματοσκοπίας ορατού και με ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE).

3.4.1 Χρήση φασματοσκοπίας ορατού

Με τη χρήση φασματοσκοπίας ορατού στην περιοχή των 350nm-750nm, τόσο για τα κύτταρα πριν το διαχωρισμό των ετεροκυστών, όσο και για τα τέσσερα υπερκείμενα των πλύσεων και των απομονωμένων ετεροκυστών μελετήθηκε η επιτυχής απομόνωση των τελευταίων. Στην **Εικόνα 28** στο μέρος (1) παρατηρούμε το φάσμα απορρόφησης για τα κύτταρα του στελέχους hupL$^-$ πριν την απομόνωση ετεροκυστών και στο μέρος (2) φαίνονται για τα 4 υπερκείμενα οι απορροφήσεις τους στο ορατό. Τα φάσματα ελήφθησαν στο εύρος 350-750 nm με χαρακτηριστικές κορυφές σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Για το μέρος (1) της εικόνας ξεχωρίζουν χαρακτηριστικές κορυφές, στα 680nm που αντιστοιχεί στο φωτοσύστημα ΙΙ, στα 667

nm που αντιστοιχεί στη χλωροφύλη α και μια κορυφή στα 633 nm και στα 560 nm που υποδεικνύει την ύπαρξη φυκοχολοπρωτεινών, της φυκοκυανίνης και της φυκοερυθρύνης αντίστοιχα. Τέλος μια χαρακτηριστική κορυφή των καροτενοειδών να ανιχνεύεται στα 442 nm. Για το μέρος (2) της εικόνας το φάσμα (Α) αντιστοιχεί στο Υπερκείμενο 1 μια κορυφή στα 439 nm υποδηλώνει την ύπαρξη καροτενοειδών, η κορυφή στα 624nm αντιστοιχεί στη φυκοκυανίνη και η κορυφή στα 680nm αντιστοιχεί στο φωτοσύστημα ΙΙ. Το φάσμα (Β) αντιστοιχεί στο Υπερκείμενο 2 με την χαρακτηριστική κορυφή στα 439nm αντιστοιχεί στα καροτενοειδή με μειωμένη ένταση σε σχέση με το Υπερκείμενο 1. Μια κορυφή στα 625nm που αντιστοιχεί στη φυκοκυανίνη και μια κορυφή στα 678nm χαρακτηριστική για τη χλωροφύλλη α. Στο φάσμα (Δ) που αντιστοιχεί στο Υπερκείμενο 3 παρατηρούμε μια χαρακτηριστική κορυφή των καροτενοειδών στα 437nm, μια κορυφή στα 631nm που αντιστοιχεί στη φυκοκυανίνη και μια μειωμένη σε ένταση κορυφή στα 678nm σε σχέση με το φάσμα (Β), που αντιστοιχεί στη χλωροφύλλη α. Το φάσμα (Γ) αντιστοιχεί στο Υπερκείμενο 4 και παρατηρούμε τις ίδιες κορυφές όπως και στα υπόλοιπα υπερκείμενα απλά με μειωμένη ένταση. Έτσι παρατηρούμε μια κορυφή στα 439nm, μια στα 626nm και μια στα 678nm όπου αντιστοιχούν στα καροτενοειδή, στη φυκοκυανίνη και στη χλωροφύλη α αντίστοιχα.. Για το ίζημα (Ε) διακρίνονται μια κορυφή στα 439nm , μια στα 630nm και μια στα 678nm που είναι χαρακτηριστικές για τα καροτενοειδή, τη φυκοκυανίνη και τη χλωροφύλη α αντίστοιχα.



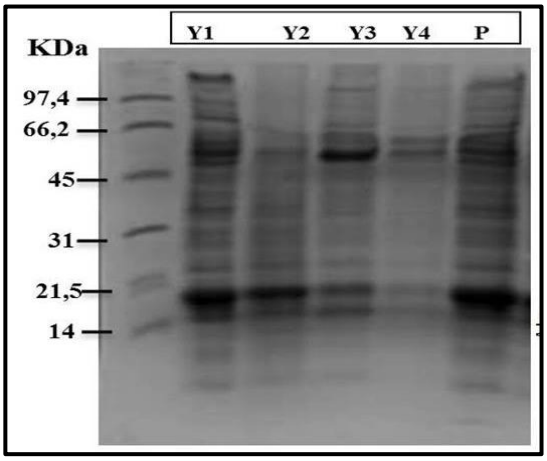
Εικόνα 28: (1) Φάσμα απορρόφησης για τα κύτταρα πριν την απομόνωση ετεροκυστών (2) Στέλεχος hupL⁻. (A): Y1, (B):Y2, (Γ): Y4, (Δ)Y3, (E) Ίζημα κατά τη διαδικασία απομόνωσης και μετά το τέλος αυτής.

Τα φάσματα δείχνουν χαρακτηριστικά ότι κατά τη διαδικασία απομόνωσης, η ένταση των φυκοχολοσωμάτων μειώνεται στις απομονωμένες ετεροκύστες, σε ολόκληρη την περιοχή μεταξύ 570 και 650 nm, σε σύγκριση με εκείνη των μη επεξεργασμένων

κυττάρων, όπως και των υπερκειμένων, που προκύπτουν μετά τις πλύσεις. Άρα παρατηρείται η απομάκρυνση των περισσοτέρων αγενών κυττάρων, τα οποία είναι εμπλουτισμένα με τις χρωστικές αυτές λόγω του PSII.

3.4.2 Ανάλυση ετεροκυστών με ηλεκτροφόρηση

Η ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση έδειξε σαφή διαφορά στο μοτίβο των πρωτεϊνικών ζωνών μεταξύ των τεσσάρων υπερκειμένων και των απομονωμένων ετεροκυστών.

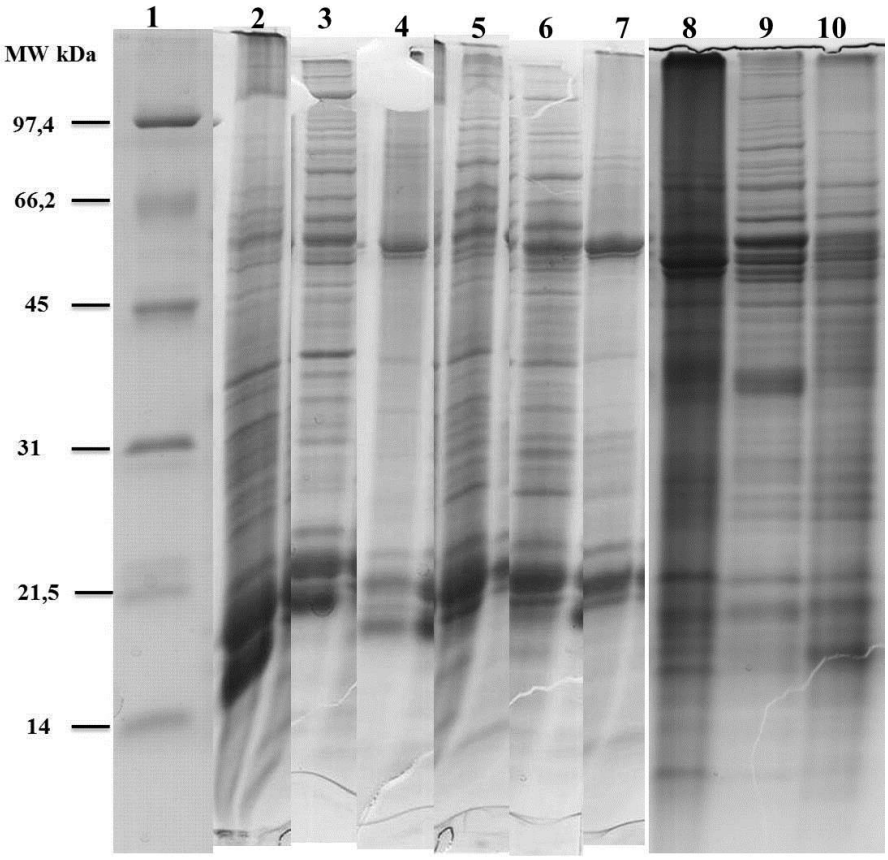


Εικόνα 29: Πηλτή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE η οποία χρωματίστηκε με Coomassie για το στέλεχος hupL$^-$ παρατηρούνται τα κλάσματα (20μg πρωτεΐνης) των 4 υπερκειμένων(Y1-Y4) και του ιζήματος

Στην **Εικόνα 29** παρατηρούμε ότι κατά της πλύσεις, όπου φαίνονται τα κλάσματα των υπερκειμένων, η διαφορά στις πρωτεϊνικές μπάντες σε σχέση με αυτές των ετεροκυστών είναι εμφανής. Ιδιαίτερα στο Y1(Υπερκείμενο 1) παρατηρούμε ότι αρκετές πρωτεΐνες απομακρύνονται και πιθανό να ανήκουν σε αυτές των αγενών κυττάρων (όπως πρωτεΐνες φυκοχολοσωμάτων) μετά από τη κατεργασία με τους υπερήχους. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των πλύσεων και πιο συγκεκριμένα στα Y2,Y3,Y4 πάλι παρατηρείται ότι απομακρύνονται και άλλες πρωτεΐνες , ιδιαίτερα στα 21,55 KDa και 45 KDa. Τελικά οι απομονωμένες ετεροκύστες έχουν διαφορετικό πρωτεϊνικό μοτίβο σε σχέση με τα υπερκείμενα των αγενών κυττάρων.

3.5 Κλασματοποίηση ετεροκυστών με διαλυτοποίηση- Χαρακτηρισμός των υποπρωτεομάτων

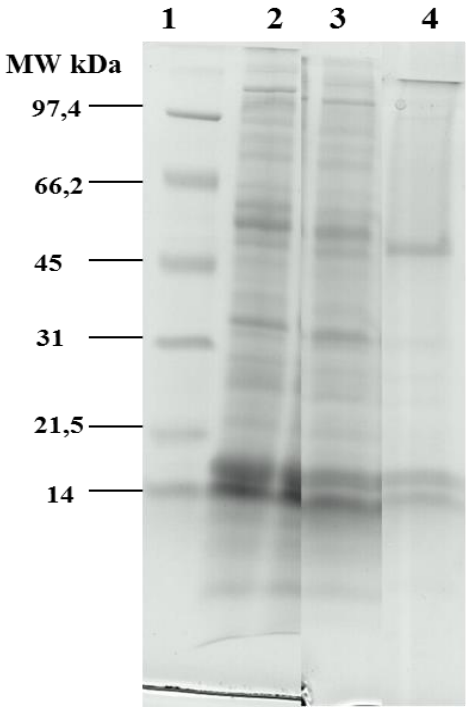
Το πρώτο βήμα για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών των υποπρωτεομάτων μετά την διαλυτοποίηση, είναι ο διαχωρισμός με Tricine-SDS-PAGE. Στην **Εικόνα 30,31** φαίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών των υποπρωτεομάτων πριν και μετά την διαλυτοποίηση, για όλα τα στελέχη του *Anabaena sp*.PCC7120.



Εικόνα 30: Tricine-SDS-PAGE απομονωμένων ετεροκυστών για το στέλεχος WTPCC7120 πριν τη διαλυτοποίηση με επιφανειοδραστικό (λωρίδα 2), υπερκειμένου για το στέλεχος WTPCC7120 μετά τη διαλυτοποίηση (λωρίδα 3), ιζήματος για το στέλεχος WTPCC7120 μετά τη διαλυτοποίηση (λωρίδα 4), απομονωμένων ετεροκυστών για το στέλεχος hupL$^-$ πριν τη διαλυτοποίηση με επιφανειοδραστικό (λωρίδα 5), υπερκειμένου για το στέλεχος hupL$^-$ μετά τη διαλυτοποίηση (λωρίδα 6), ιζήματος για το στέλεχος hupL$^-$ μετά τη διαλυτοποίηση (λωρίδα 7), απομονωμένων ετεροκυστών για το στέλεχος hoxH$^-$ πριν τη διαλυτοποίηση με επιφανειοδραστικό(λωρίδα 8), υπερκειμένου για το στέλεχος hoxH$^-$ μετά τη διαλυτοποίηση (λωρίδα 9), ιζήματος για το στέλεχος hoxH$^-$μετά τη διαλυτοποίηση (λωρίδα 10).

Από την **Εικόνα 30** παρατηρούμε ότι μετά την διαλυτοποίηση με το επιφανειοδραστικό, οι πρωτεΐνες από τις ολικές απομονωμένες ετεροκύστες διαχωρίστηκαν και ορισμένες παρουσιάζονται στο υπερκείμενο μετά τη διαδικασία και άλλες στο ίζημα. Το υπερκείμενο αποτελεί τις διαλυμένες εσωτερικές μεμβράνες

των ετεροκυστών μαζί με τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος τους και το ίζημα, το αδιάλυτο κομμάτι των εξωτερικών μεμβρανών του κυττάρου των ετεροκυστών αντίστοιχα. Βέβαια παρατηρείται ότι ο μεγαλύτερος αριθμός των πρωτεϊνών μετά τη διαλυτοποίηση βρίσκεται στο υπερκείμενο σε σχέση με το ίζημα για τα στελέχη WTPCC7120 και hupL$^-$.



Εικόνα 31: Tricine-SDS-PAGE απομονωμένων ετεροκυστών για το στέλεχος hupL$^-$/hoxH$^-$ πριν τη διαλυτοποίηση με επιφανειοδραστικό (λωρίδα 2), υπερκειμένου μετά τη διαλυτοποίηση (λωρίδα 3), ιζήματος μετά τη διαλυτοποίηση (λωρίδα 4)

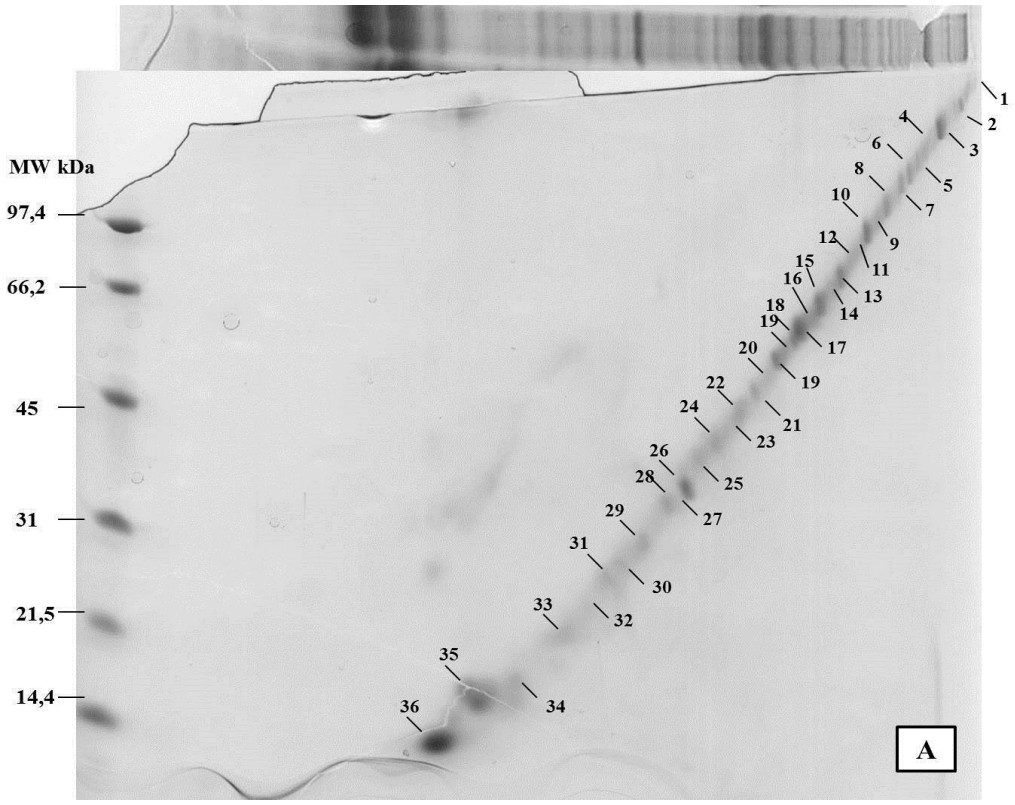
Το ίδιο παρατηρείται και για το στέλεχος hupL$^-$/hoxH$^-$ (**Εικόνα 31**) όπου το υπερκείμενο (λωρίδα 3) μετά την διαλυτοποίηση, είναι πιο πλούσιο σε πρωτεΐνες σε σχέση με το ίζημα (λωρίδα 4).

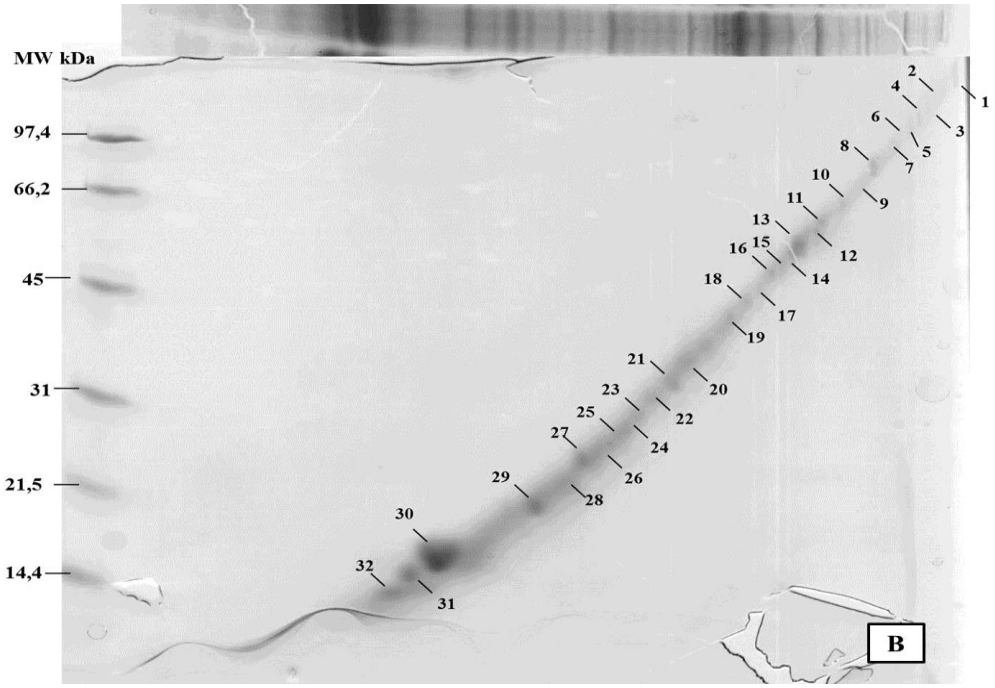
3.6 Χαρτογράφηση των διαλυτοποιημένων κλασμάτων των ετεροκυστών στα διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-SDS PAGE)

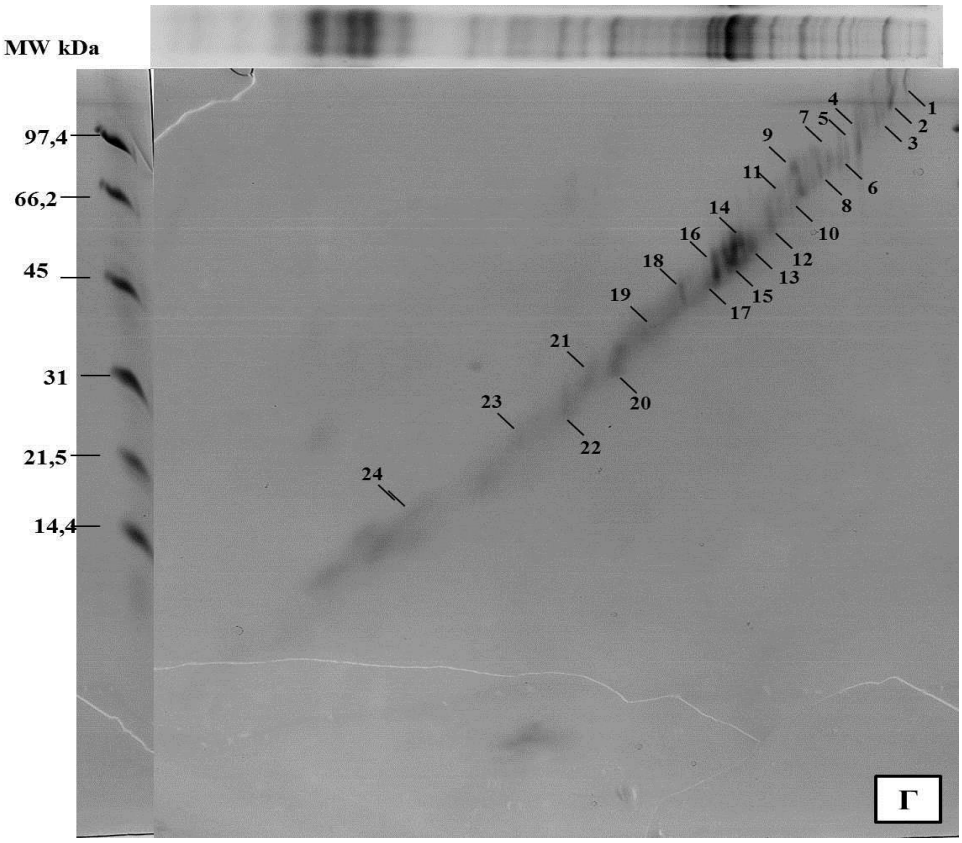
Στην **Εικόνα 32,35** φαίνονται οι ηλεκτροφορήσεις δυο διαστάσεων που πραγματοποιήθηκαν στα υποπρωτεόματα των τεσσάρων στελεχών Α: στέλεχος

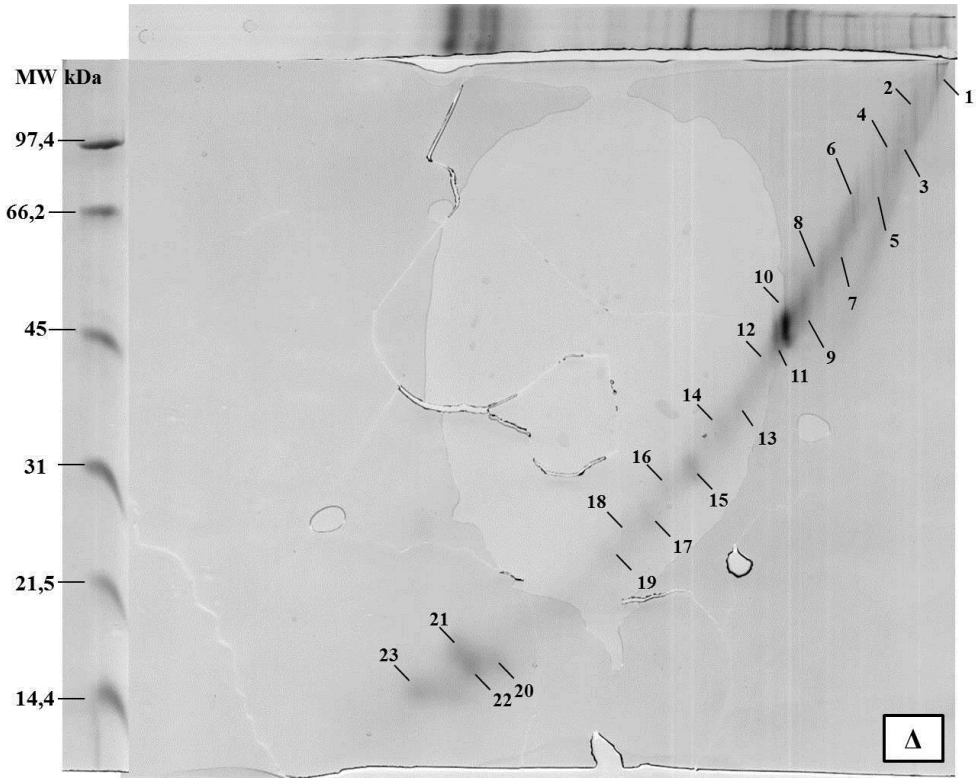
WTPCC7120, Β: στέλεχος hupL⁻, Γ: στέλεχος hoxH⁻, Δ: στέλεχος hupL⁻/hoxH⁻, μετά τη διαλυτοποίηση των απομονωμένων ετεροκυστών με επιφανειοδραστικό. Οι επισημασμένοι αριθμοί πάνω σε κάθε εικόνα, δείχνουν τα πρωτεϊνικά στίγματα που αποκόπηκαν και εφόσον προηγήθηκε πρωτεόλυση τους με θρυψίνη, αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας MALDI TOF/TOF MS/MS.

3.6.1 Πρωτεομική ανάλυση του διαλυτού κλάσματος



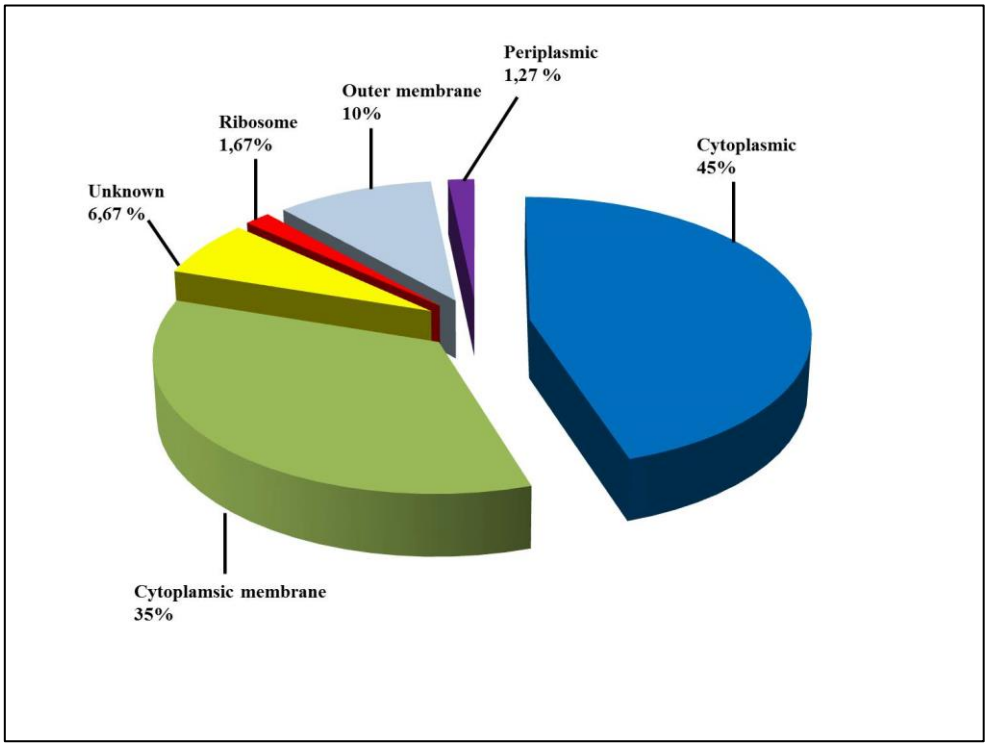

MW kDa
97,4
66,2
45
31
21,5
14,4
B


MW kDa
97,4
66,2
45
31
21,5
14,4
Г



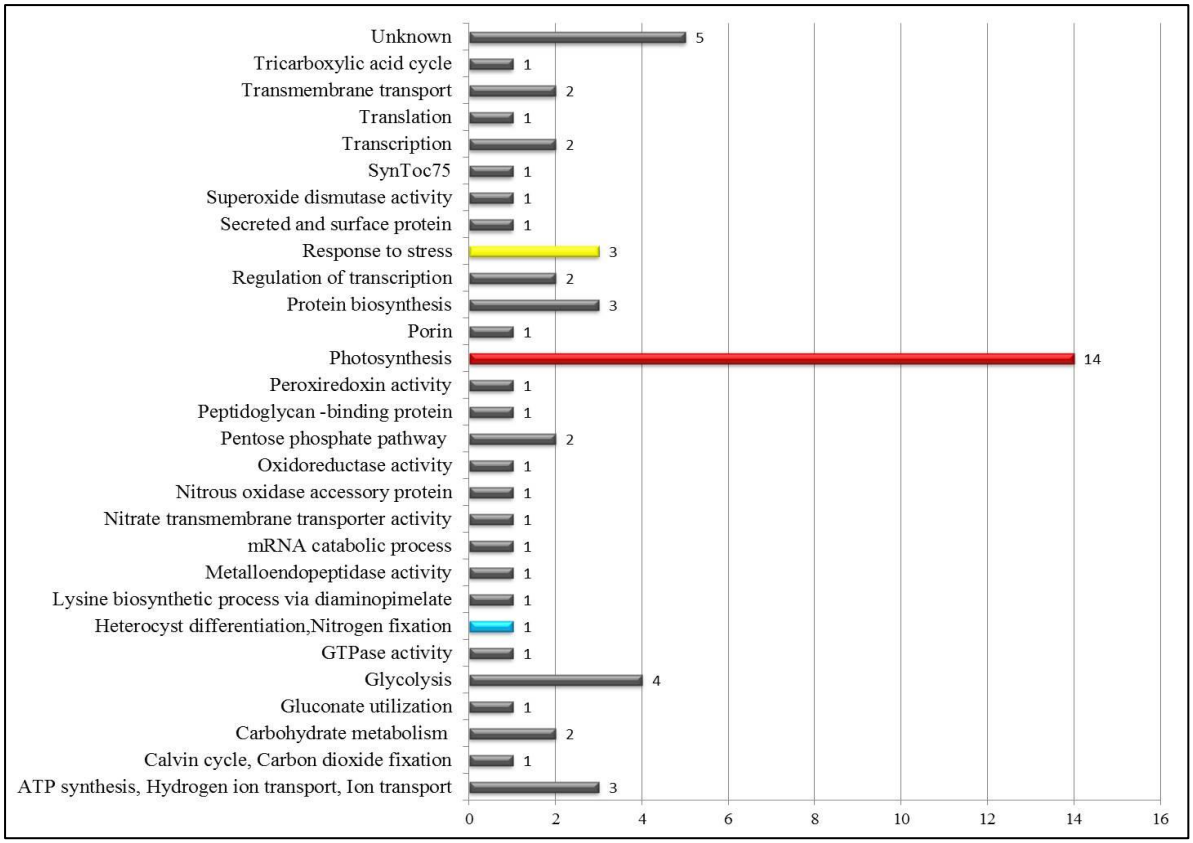
Εικόνα 32: Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Tricine-SDS των υπερκειμένων μετά τη διαλυτοποίηση με το επιφανειοδραστικό για τα τέσσερα στελέχη. Α: στέλεχος WTPCC7120, Β: στέλεχος hupL$^-$, Γ: στέλεχος hoxH$^-$, Δ: στέλεχος hupL$^-$/hoxH$^-$

Στην πηκτή του υπερκειμένου πρωτεόματος για το στέλεχος WTPCC7120 (Α) (**Εικόνα 32Α)** κόπηκαν 36 πρωτεϊνικά στίγματα τα οποία αναλύθηκαν με MALDI TOF/TOF MS/MS με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση και των 36 και από αυτά ταυτοποιήθηκαν 41 διαφορετικές πρωτεΐνες, (Παράρτημα, Πίνακας.1). Στην πηκτή του υπερκειμένου πρωτεόματος για το στέλεχος hupL$^-$ (Β) (**Εικόνα 32Β)** από 32 πρωτεϊνικά στίγματα, ταυτοποιήθηκαν 24 και από αυτά ταυτοποιήθηκαν 31 διαφορετικές πρωτεΐνες (Παράρτημα, Πίνακας.1). Στο στέλεχος hoxH$^-$ (Γ) (**Εικόνα 32Γ)** από 24 πρωτεϊνικά στίγματα ταυτοποίηθηκαν τα 20 και από αυτά ταυτοποιήθηκαν 22 διαφορετικές πρωτεΐνες (Παράρτημα, Πίνακας.1). Τέλος στο στέλεχος hupL$^-$/hoxH$^-$ (Δ) (**Εικόνα 32Δ)** από 23 πρωτεϊνικά στίγματα ταυτοποιήθηκαν τα 13 και από αυτά μόνο 9 διαφορετικές πρωτεΐνες (Παράρτημα, Πίνακας.1). Η τοπολογία στο κύτταρο των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών καθορίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος PSORTb καθώς και η προβλεπόμενη από το γονιδίωμα λειτουργία τους παρουσιάζεται στις **Εικόνες 33,34** και στον Πίνακα.1 του παραρτήματος.



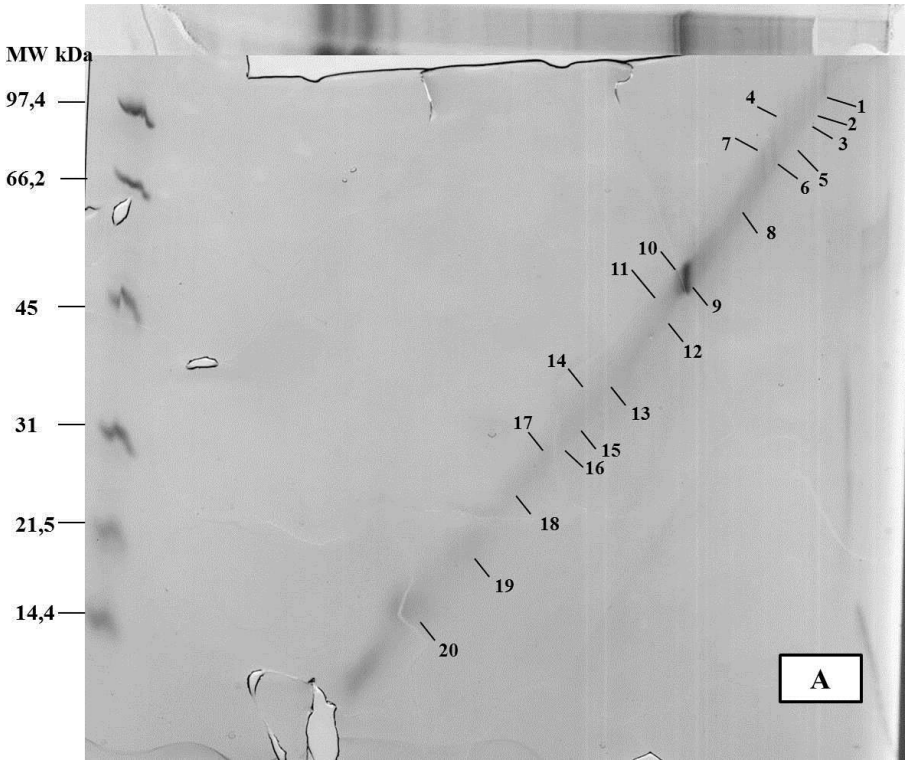
Εικόνα 33: Προβλεπόμενη τοπολογία του συνόλου των 60 διαφορετικών πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με 2D-Tricine-SDS-PAGE, για το υποπρωτέομα του υπερκειμένου, για όλα τα στελέχη, μετά τη διαλυτοποίηση των απομονωμένων ετεροκυστών με επιφανειοδραστικό.

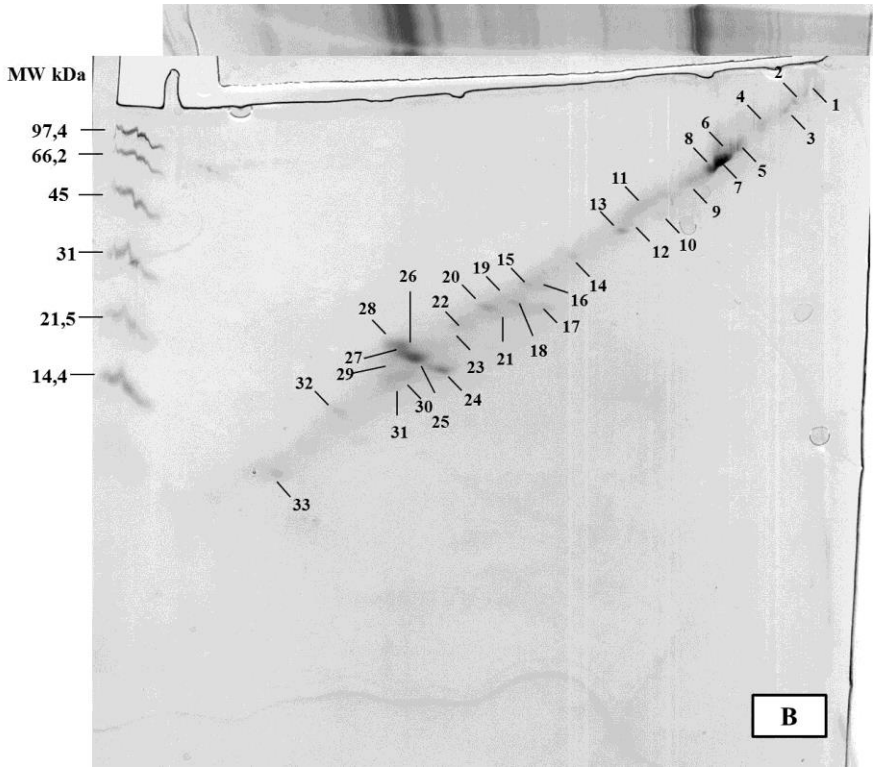
Στην **Εικόνα 33** παρατηρούμε ότι το 45% των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών χαρακτηρίστηκαν ως κυτταροπλασματικές, 35% κυτταροπλασματικής μεμβράνης, 10% πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης, 1,27% περιπλασματικές, ενώ 6,67% παρέμειναν αγνώστου τοπολογίας. Οι συνολικά 60 διαφορετικές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την προβλεπόμενη λειτουργία τους. **Εικόνα 34** Έτσι προέκυψαν 29 λειτουργικές κατηγορίες πρωτεϊνών.

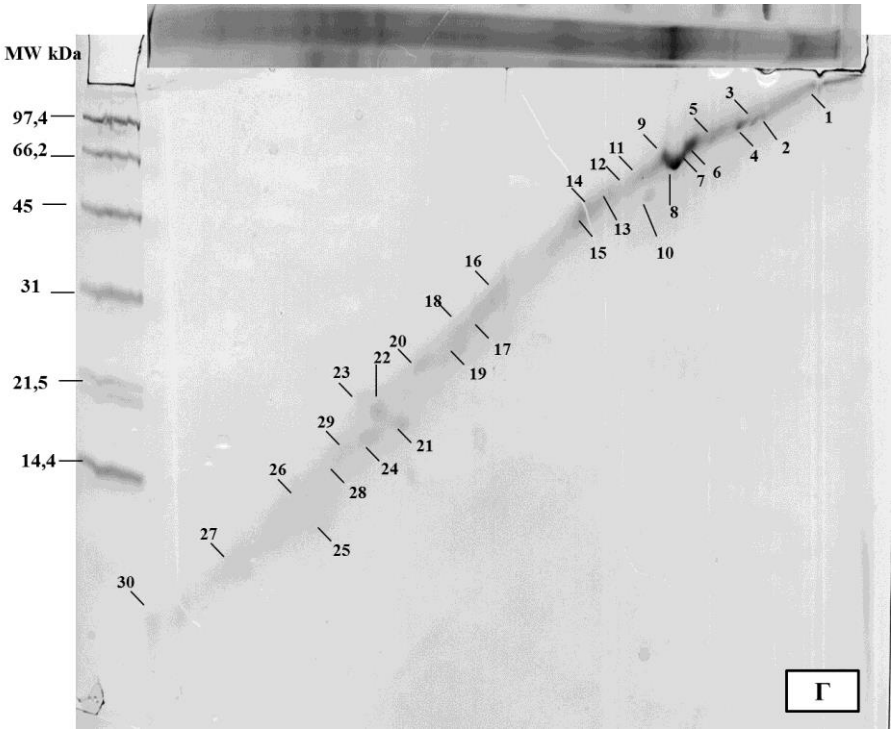


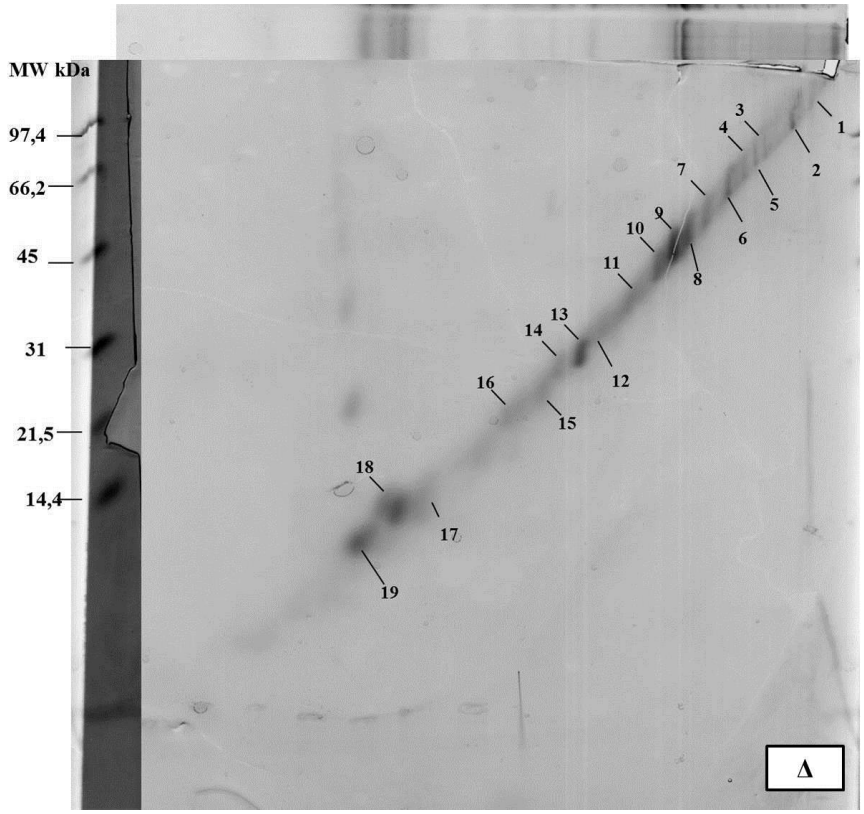
Εικόνα 34: Προβλεπόμενη λειτουργία των 60 διαφορετικών ταυτοποιημένων πρωτεϊνών με 2D-Tricine-SDS-PAGE για το υποπρωτέομα του υπερκειμένου, για όλα τα στελέχη, μετά τη διαλυτοποίηση των απομονωμένων ετεροκυστών με επιφανειοδραστικό του *Anabaena sp*.PCC7120.

3.6.2 *Πρωτεομική ανάλυση του μη διαλυτού κλάσματος*



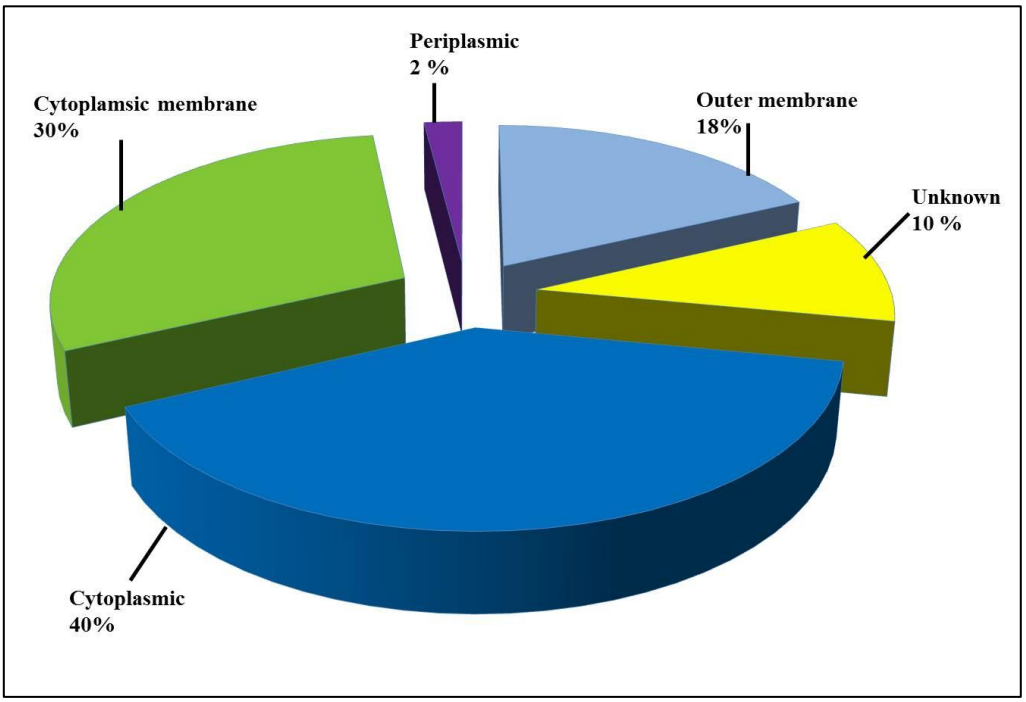






Εικόνα 35: Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Tricine-SDS των ιζημάτων μετά τη διαλυτοποίηση με το επιφανειοδραστικό για τα τέσσερα στελέχη. Α: στέλεχος WTPCC7120, Β: στέλεχος $hupL^-$, Γ: στέλεχος $hoxH^-$, Δ: στέλεχος $hupL^-/hoxH^-$

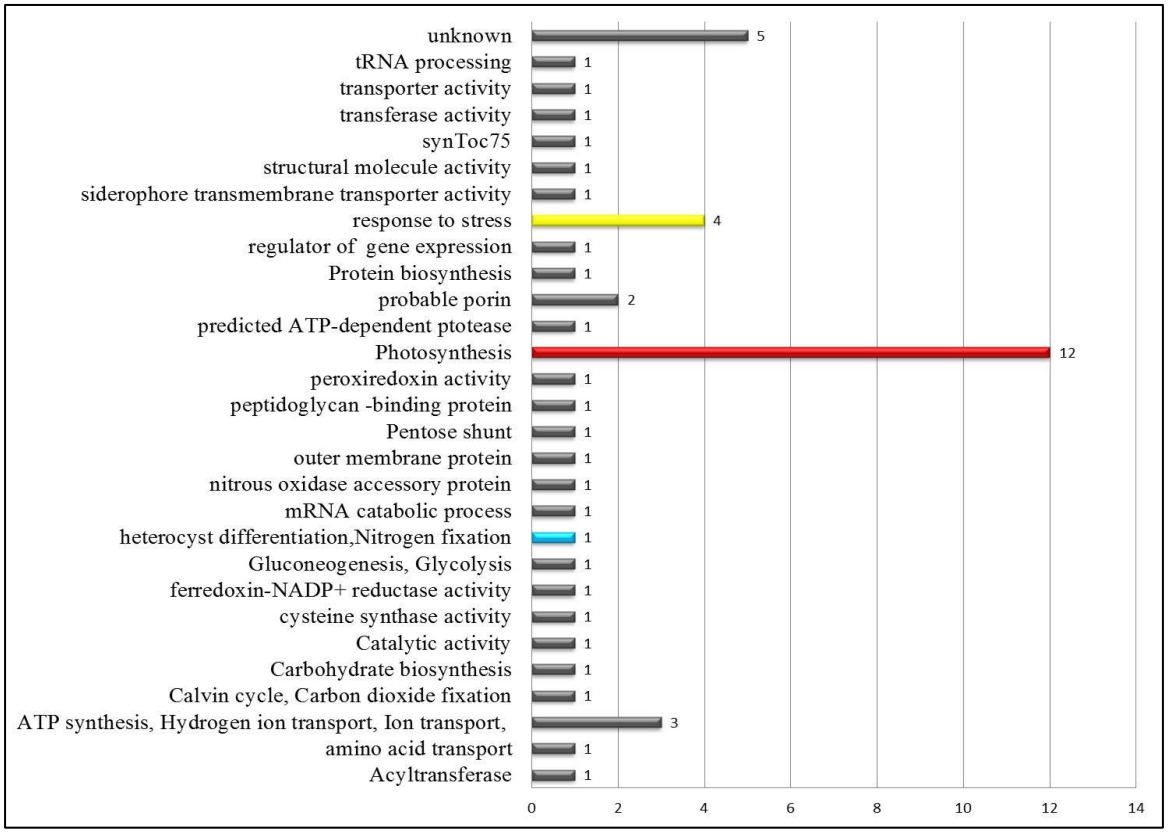
Στην πηκτή του πρωτεόματος για το ίζημα του στελέχους WTPCC7120 (A) **Εικόνα 35A** αποκόπηκαν 20 πρωτεϊνικά στίγματα τα οποία αναλύθηκαν με MALDI TOF/TOF MS/MS με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση των 16 και από αυτά ταυτοποιήθηκαν 20 διαφορετικές πρωτεΐνες (Παράρτημα, Πίνακας.2). Στην πηκτή του πρωτεόματος για το ίζημα του στελέχους hupL$^-$ (B) **Εικόνα 35B** από 33 πρωτεϊνικά στίγματα ταυτοποιήθηκαν και τα 33 και από αυτά ταυτοποιήθηκαν 27 διαφορετικές πρωτεΐνες (Παράρτημα ,Πίνακας.2). Στο στέλεχος hoxH$^-$ (Γ) **Εικόνα 35Γ** από 30 πρωτεϊνικά στίγματα ταυτοποιήθηκαν τα 17 και από αυτά ταυτοποίηθηκαν 18 διαφορετικές πρωτεΐνες (Παράρτημα, Πίνακας.2). Για το στέλεχος hupL$^-$/hoxH$^-$ (Δ) **Εικόνα 35Δ** από 19 πρωτεϊνικά στίγματα ταυτοποίηθηκαν τα 14 και από αυτά ταυτοποιήθηκαν 22 διαφορετικές πρωτεΐνες (Παράρτημα, Πίνακας.2). Η τοπολογία στο κύτταρο των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών καθορίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος PSORTb καθώς και η προβλεπόμενη από το γονιδίωμα λειτουργία τους φαίνεται στις **Εικόνες 36,37** και στον Πίνακα.2 του παραρτήματος.



Εικόνα 36: Προβλεπόμενη τοπολογία του συνόλου των 50 διαφορετικών πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με 2D-Tricine-SDS-PAGE, για το υποπρωτέομα του ιζήματος, για όλα τα στελέχη, μετά τη διαλυτοποίηση των απομονωμένων ετεροκυστών με επιφανειοδραστικό.

Στην **Εικόνα 36** παρατηρούμε ότι το 40% των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών χαρακτηρίστηκαν ως κυτταροπλασματικές, 30% κυτταροπλασματικής μεμβράνης,

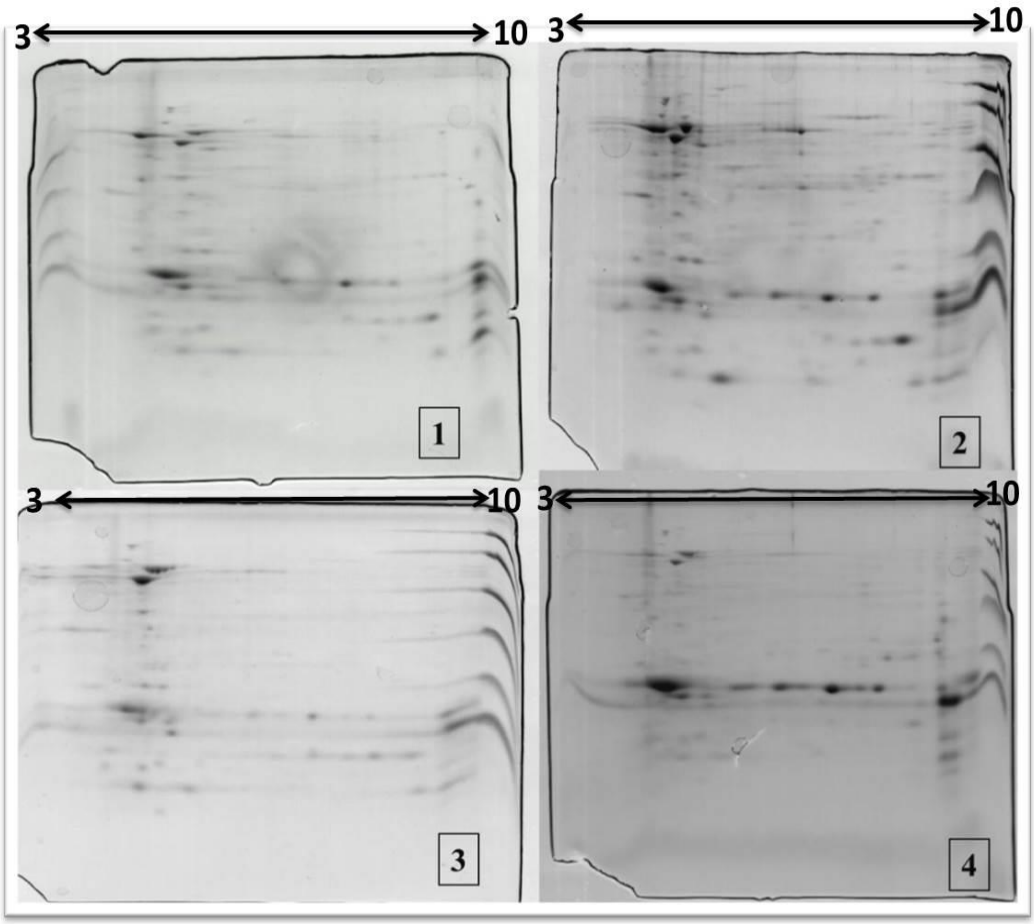
18% πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης, 2% περιπλασματικές, ενώ 10% παρέμειναν αγνώστου τοπολογίας. Οι συνολικά 50 διαφορετικές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την προβλεπόμενη λειτουργία τους. **Εικόνα 37** Έτσι προέκυψαν 29 λειτουργικές κατηγορίες πρωτεϊνών.



Εικόνα 37: Κατανομή των λειτουργικών κατηγοριών στο σύνολο των 50 διαφορετικών ταυτοποιημένων πρωτεϊνών με 2D-Tricine-SDS-PAGE για το υποπρωτέομα του ιζήματος, για όλα τα στελέχη, μετά τη διαλυτοποίηση των απομονωμένων ετεροκυστών με επιφανειοδραστικό του Anabaena sp.PCC7120.

3.7 Δυσδιάστατος πρωτεομικός χάρτης ολόκληρων των ετεροκυστών

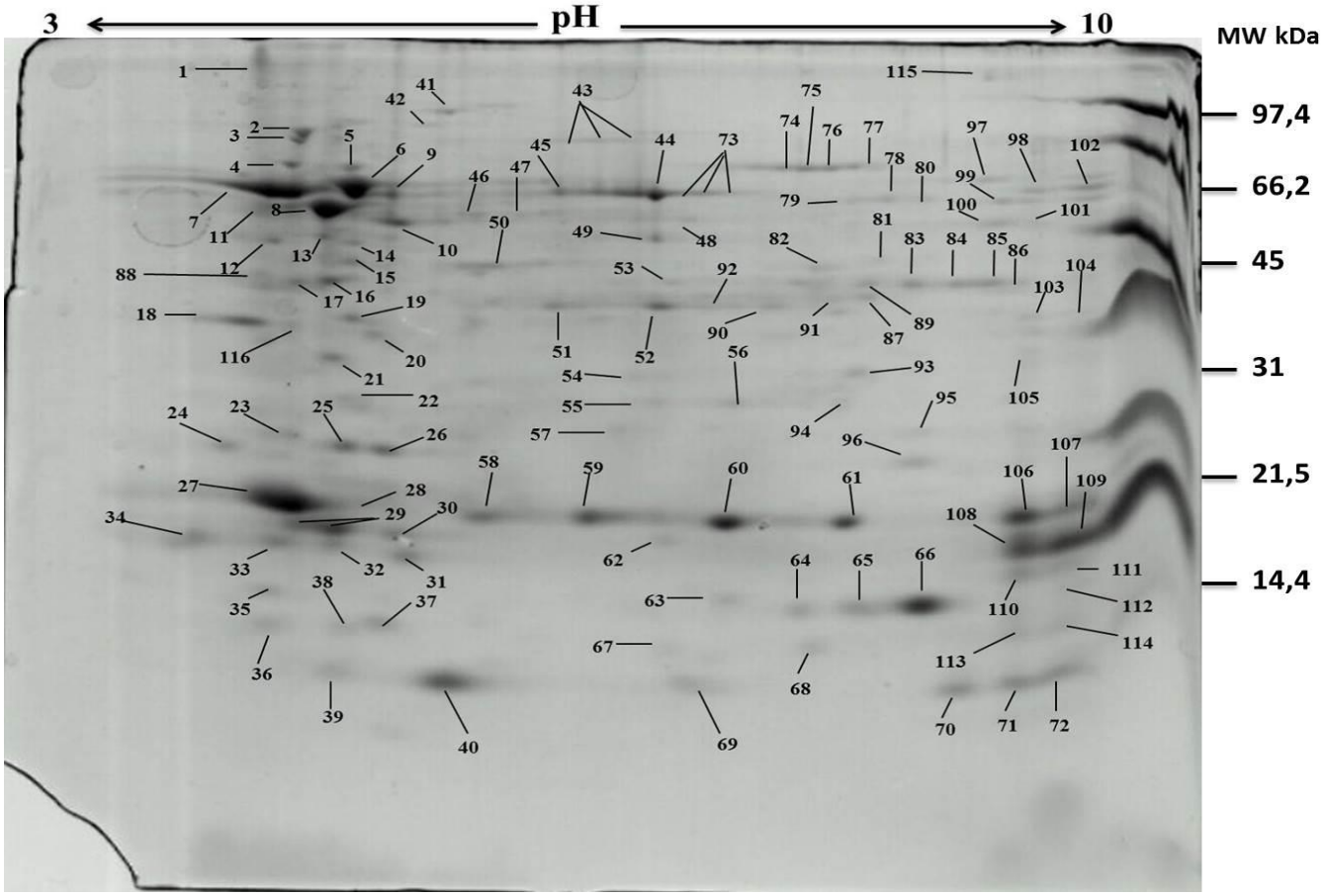
Η δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση των απομονωμένων ετεροκυστών του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε με 2DE IEF/SDS-PAGE. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα στελέχη, (**Εικόνα 39**). Παρατηρούμε ότι έχουμε επαναλαμβανόμενο μοτίβο πρωτεϊνών, αλλά η εικόνα της πηκτής για το στέλεχος hupL$^-$ είχε πιο ευδιάκριτα πρωτεϊνικά στίγματα, οπότε επιλέξαμε να πραγματοποιήσουμε τη πρωτεομική ανάλυση σε αυτή.



Εικόνα 38: Ο δυσδιάστατος πρωτεωμικός χάρτης των απομονωμένων ετεροκυστών του *Anabaena.sp*.PCC 7120 για όλα τα στελέχη. (1) WTPCC 7120 (2) hupL$^-$ (3) hoxH$^-$ (4) hupL$^-$ /hoxH$^-$

Πιο συγκεκριμένα, για το στέλεχος hupL$^-$ εμφανίστηκαν 116 πρωτεϊνικές κηλίδες σε δυσδιάστατη πηκτή ακρυλαμιδίου χρωματισμένες με κολλοειδή Coomassie brilliant blue **Εικόνα 39.** Οι πρωτεϊνικές κηλίδες οι οποίες επιλέχτηκαν για περαιτέρω ανάλυση ήταν εμφανείς σε τουλάχιστον δύο πηκτές από το ίδιο βιολογικό δείγμα *Anabaena sp*.PCC 7120. Οι εν λόγω κηλίδες αποκόπηκαν και συλλέχτηκαν από τις πηκτές, υπέστησαν πρωτεόλυση με θρυψίνη μέσα στην πηκτή, και ταυτοποιήθηκαν. Ο χαρακτηρισμός των φασμάτων των πεπτιδίων που προέκυψαν από την πρωτεόλυση έγινε στο φασματογράφο μάζας MALDI TOF/TOF MS/MS. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα.3 του παραρτήματος, ενώ η κάθε κηλίδα που ταυτοποιήθηκε σημειώθηκε πάνω στον δυσδιάστατο πρωτεομικό χάρτη. **Εικόνα 37** με τον αντίστοιχο αριθμό της από το (Παράρτημα, Πίνακας.3). Στη πηκτή διακρίθηκαν 116 πρωτεϊνικά στίγματα τα οποία αναλύθηκαν με MALDI TOF/TOF

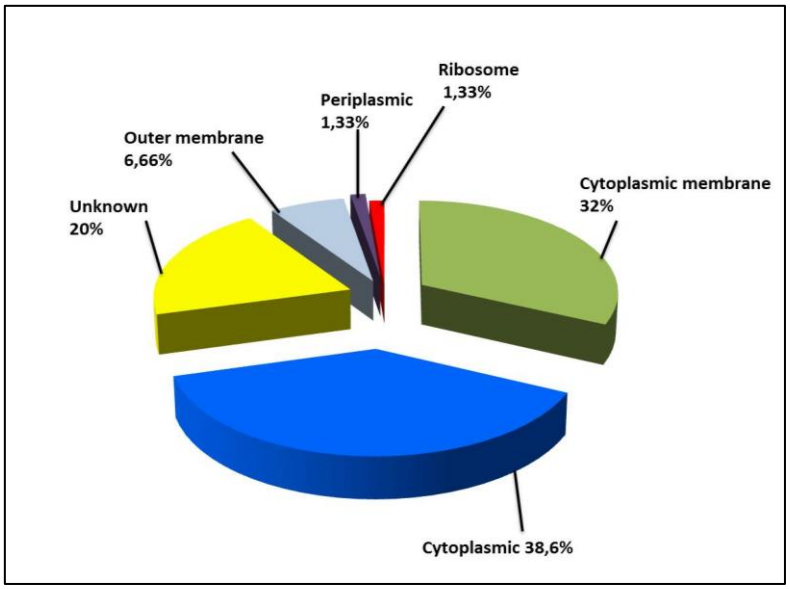
MS/MS, με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση των 87 και από αυτά ταυτοποιήθηκαν 75 διαφορετικές πρωτεΐνες για το στέλεχος hupL$^-$.



Εικόνα 39: Ο πρωτεομικός χάρτης των απομονωμένων ετεροκυστών του *Anabaena sp*.PCC 7120 ,του στελέχους hupL$^-$ με τα 116 πρωτεϊνικά spots που ταυτοποιήθηκαν. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του Πίνακα.3 του παραρτήματος.

Πρωτεΐνες οι οποίες, σύμφωνα με την ένταση της χρώσης, χαρακτηρίστηκαν ως πρωτεΐνες σε μεγάλη αφθονία ήταν: C-phycocyanin subunit beta, Allophycocyanin subunit alpha 1(spot 27), η Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (spots 7, 44), η Alr2887 hypothetical protein (spot 6), η ATP synthase subunit beta (spot 8), ο μεταγραφικός παράγοντας Elongation factor Tu (spot 10), το Photosystem II manganese-stabilizing polypeptide με το Photosystem I reaction center subunit II (spots 18, 106), η C-phycocyanin alpha chain (spot 60), η Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit και η Nitrogen regulatory protein PII (spot 66), η Photosystem I reaction center subunit III (spot 109). Όσο αφορά τα ποιοτικά

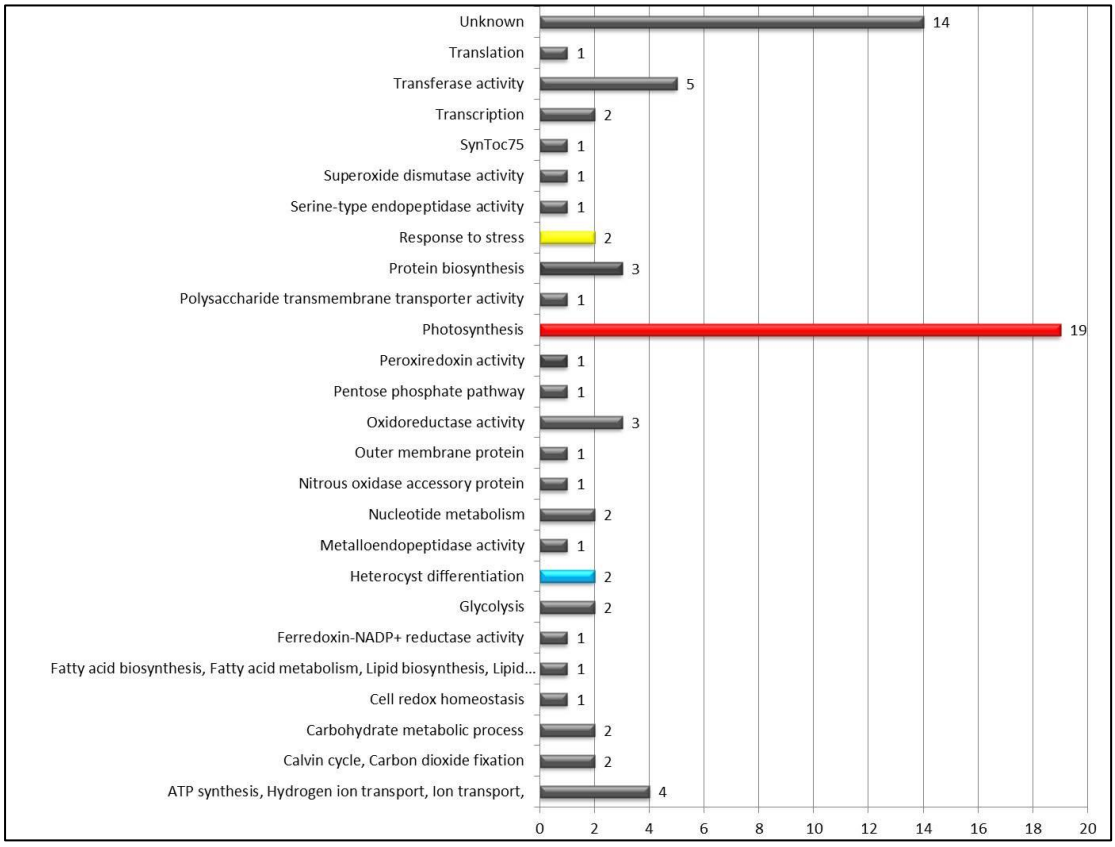
χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με την 2-DE , η υψηλότερη θεωρητική τιμή pI που παρατηρήθηκε ήταν 10,71 και η χαμηλότερη 4,22, πράγμα που υποδηλώνει ότι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στην πρώτη διάσταση ήταν επαρκής. Στο σύνολο τους, 72,15% των θεωρητικών pI's ήταν όξινα (pI<7), ενώ το 27,84% ήταν βασικά (pI>7). Η θέση των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών καθορίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος PSORTb, καθώς και η προβλεπόμενη από το γονιδίωμα λειτουργία τους παρουσιάζονται στις **Εικόνες 40,41.**



Εικόνα 40: Προβλεπόμενη υποκυτταρική τοπολογία του συνόλου των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης για το *Anabaena sp*.PCC7120 στελέχους hupL$^-$.

Στην **Εικόνα 40** παρατηρούμε ότι το 38,6% των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών χαρακτηρίστηκαν ως κυτταροπλασματικές, 32% κυτταροπλασματικής μεμβράνης, 6,66% πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης, 1,33% περιπλασματικές, 1,33% ριβοσωμικές, ενώ 20% παρέμειναν αγνώστου τοπολογίας. Οι συνολικά 78 διαφορετικές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την προβλεπόμενη λειτουργία τους **Εικόνα 41**. Έτσι προέκυψαν 25 λειτουργικές κατηγορίες πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα αυτές οι κατηγορίες συμπεριλαμβάνουν: 2 πρωτεΐνες σχετιζόμενες με την προσαρμογή σε ασυνήθιστες συνθήκες και την ανταπόκριση σε κατάσταση stress, 1 πρωτεΐνη που ανήκει στις Omp85 πρωτεΐνες, και είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου, καθώς συμβάλει στη δημιουργία της εξωτερικής μεμβράνης, 1 πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης η

οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά διαφόρων ουσιών στο εσωτερικό, 3 πρωτεΐνες υπεύθυνες για την παραγωγή ATP, 2 πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον κύκλο του Calvin, 2 πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε ετεροκύστες καθώς και τη καθήλωση αζώτου, 19 πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος στη φωτοσύνθεση, 14 άγνωστης λειτουργίας, 2 μεταφορικής λειτουργίας, 2 που συμμετέχουν στη γλυκόλυση, 3 με οξειδοαναγωγική δραστηριότητα, 3 που συμμετέχουν σε μεταβολικά μονοπάτια της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών, 2 που συμμετέχουν στη διαδικασία της μεταγραφής, 1 με καταλυτική δραστηριότητα, 2 που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων, και από 1 στη διαδικασία της μετάφρασης, στη δραστηριότητα της διαμεμβρανικής μεταφοράς πολυσακχαριτών, και στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.



Εικόνα 41: Κατανομή των λειτουργικών κατηγοριών στο σύνολο των 75 διαφορετικών ταυτοποιημένων πρωτεϊνών του *Anabaena sp.*PCC7120 στελέχους hupL$^-$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Παραγωγή αερίου Υδρογόνου από τα Anabaena sp.PCC 7120

Από την **Εικόνα 22** παρατηρείται ότι και τα δύο στελέχη (WTPCC7120, hupL$^-$), παρουσιάζουν έντονη παραγωγή υδρογόνου κατά την 7^η ημέρα, η οποία μειώνεται την 10^η ημέρα. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι έχει μειωθεί ο πληθυσμός των κυττάρων λόγω κατανάλωσης του θρεπτικού μέσου. Σημαντικά υψηλότερη ποσότητα υδρογόνου παρατηρείται για το στέλεχος hupL$^-$ σε σχέση με το στέλεχος WTPCC7120. Αυτό δείχνει ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου της uptake υδρογενάσης στο στέλεχος hupL$^-$,αυξάνει την παραγωγή του υδρογόνου και συμφωνεί με μελέτες που έχουν γίνει. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η διαγραφή του γονιδίου hupL, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πηγή για περαιτέρω βελτίωση της παραγωγής H_2 σε ένα σύστημα παραγωγής φωτοβιολογικά υδρογόνου ,βασιζόμενο στη νιτρογενάση [63]. Έχει αναφερθεί ότι το στέλεχος hupL$^-$ παράγει περισσότερο υδρογόνο, σε σχέση με αυτό που παρατηρήθηκε στο στέλεχος WTPCC7120, χωρίς να αναστέλλει τη δράση της νιτρογενάσης. Έχει αποδειχθεί ότι τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από την αντίδραση της uptake υδρογενάσης τροφοδοτούνται μέσω του κυτοχρώματος b_c στο PSI και συμβάλουν στη δημιουργία βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων και στη μεταγενέστερη σύνθεση χρήσιμου ATP. Το ATP χρησιμοποείται για βιοσυνθετικές αντιδράσεις του μεταβολισμού των ετεροκυστών και πιο συγκεκριμένα για τη δράση της νιτρογενάσης [63]. Τα δύο πρωτόνια που προκύπτουν από τη διάσπαση του υδρογόνου αντιδρούν με το O_2 παράγοντας νερό και συμβάλλοντας στη δημιουργία ανοξικού περιβάλλοντος. Έτσι το παραγόμενο H_2 προστατεύει τη νιτρογενάση και μειώνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα O_2 [64]. Συμπερασματικά τονίζεται ότι η δράση της νιτρογενάσης ακόμα και στην περίπτωση απουσίας της uptake υδρογενάσης παραμένει το ίδιο δραστική. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι και στα δύο στελέχη που παρατηρήθηκε παραγωγή υδρογόνου, η Hox υδρογενάση είναι ενεργή. Η σημασία αυτού έγκειται στο ότι η τελευταία λειτουργεί σαν δέκτης ηλεκτρονίων από το NADP και το υδρογόνο και συμβάλει στο να εξελιχθεί εξ ολοκλήρου το τελευταίο μέσα στο κύτταρο. Έτσι ρυθμίζεται σε κατάλληλο επίπεδο το οξειδοαναγωγικό δυναμικό και πραγματοποιείται η φωτοσύνθεση όταν η καθήλωση αζώτου υστερεί. Συμπερασματικά, η παραγωγικότητα του υδρογόνου στα κυανοβακτήρια είναι χαμηλή. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε τέσσερις λόγους: (1) τα ηλεκτρόνια που

παράγονται ίσως χρησιμοποιούνται και σε άλλα μονοπάτια του μεταβολισμού, που δεν συμμετέχουν οι υδρογενάσες (2) παρατηρείται χαμηλή απορρόφησης φωτός από τις κεραίες φωτοσύνθεσης (3) η παρουσία της uptake υδρογενάσης εντός των ετεροκυστών και (4) η συχνότητα σχηματισμού ετεροκυστών είναι χαμηλή.

4.2 Ανάπτυξη του *Anabaena sp*.PCC 7120 και ανάλυση της ανάπτυξης με φασματοσκοπία ορατού

Στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν για τα τέσσερα στελέχη του *Anabaena sp*.PCC7120 μετρήθηκε η συγκέντρωση της Chl_a κατά την ανάπτυξη τους στο θρεπτικό μέσο BG11, σε εύρος 14 ημερών. Αυτή η μελέτη έγινε στα πλαίσια κατανόησης για το εάν και πόσο μεγαλώνουν τα διαφορετικά στελέχη στο θρεπτικό αυτό.Σημειώνεται ότι η αλλαγή του θρεπτικού σε $BG11^o$ έγινε την $5^η$ ημέρα καλλιέργειας. Απαντήσεις στα παραπάνω ερωτήματα μπορούν να δοθούν μέχρι ένα βαθμό από τη σύκγριση των καμπυλών ανάπτυξης. Η ανάπτυξη επιτυγχάνεται και για τα τέσσερα στελέχη σε αυτό το θρεπτικό μέσο, εφόσον παρατηρούμε αύξηση της συγκέντρωσης της Chl_a, οπότε τα αγενή κύτταρα αναπτύσσονται επαρκώς. Με βάση τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν (**Εικόνας 25)** παρατηρείται ότι η γενετική τροποποίηση δεν επηρεάζει την ταχύτητα ανάπτυξης τους στις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας. Η αύξηση στη συγκέντρωση της Chl_a, είναι μια ένδειξη για την αύξηση του αριθμού των κυανοβακτηρίων. Κατά την $5^η$ μέρα για όλα τα στελέχη φαίνεται μία μέγιστη τιμή στη συγκέντρωση της Chl_a, ημέρα στέρησης του αζώτου, έτσι μπορούμε εν συνεχεία να εκτιμήσουμε εάν μερικά από τα αγενή κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί εως τώρα θα μετατραπούν σε ετεροκύστες, ώστε να απομονωθούν. Στο διάστημα μεταξύ $5^{ης}$ και $7^{ης}$ ημέρας, η συγκέντρωση της Chl_a κυμαίνεται σε σταθερό επίπεδο,με μία μικρή αύξηση. Την $11^η$ μέρα η ανάπτυξη είναι στο βέλτιστο σημείο, για όλα τα στελέχη και μετά την ημέρα αυτή η συγκέντρωση της Chl_a μειώνεται με σταθερό ρυθμό, λόγω εισαγωγής των κυττάρων πλέον στη φάση θανάτου. Παρατηρείται ότι το στέλεχος WTPCC7120, στο θρεπτικό μέσο $BG11^0$, αναπτύσσεται πιο γρήγορα σε σχέση με τα άλλα στελέχη, πράγμα που πιθανόν να οφείλεται στη μη γενετική τροποποίηση του στελέχους αυτού. Στην **Εικόνα 26** παρατηρείται ότι μετά την αλλαγή του θρεπτικού την $5^η$ ημέρα μέχρι την $7^η$ ημέρα που γίνεται η συλλογή των κυττάρων, η τιμή της συγκέντρωση της Chl_a είναι σταθερή, πράγμα που πιθανώς να οφείλεται στην προσαρμογή των κυττα΄ρων στο

καινούργιο θρεπτικό μέσο. Για τα στελέχη WTPCC7120 και hoxH$^-$ σε κάποιες καλλιέργειες που τα κύτταρα δεν είχαν μεγαλώσει επαρκώς την 7^η ημέρα αλλά αφέθηκαν για ακόμα 1 ημέρα (εως την 8^η ημέρα) και η συλλογή τους έγινε τότε, η συγκέντρωση της Chl_a παρατηρείται ότι αυξήθηκε σημαντικά, ενώ στο στέλεχος hupL$^-$ αυξήθηκε ελάχιστα και τέλος στο στέλεχος hupL$^-$/hoxH$^-$ μειώνεται. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τις αυξανόμενες τιμές στη συγκέντρωση της Chl_a ακόμα και όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται στο θρεπτικό BG11 (**Εικόνα 25**), όπου πάλι παρατηρείται από την 8^η μέχρι την 11^η ημέρα αύξηση στις τιμές. Πιθανώς λοιπόν και στις δυο συνθήκες ανάπτυξης, το βακτήριο συνολικά υιοθετεί παρόμοια συμπεριφορά. Επίσης στο στέλεχος hupL$^-$, η αδρανοποίηση του γονιδίου, συντελεί στο να μην πραγματοποιείται πλήρως η απομάκρυνση του οξυγόνου από τη νιτρογενάση. Η υπομονάδα hupL έχει παρατηρηθεί ότι βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στις ανεπτυγμένες ετεροκύστες σε σχέση με τα αγενή κύτταρα. Άρα στο στέλεχος αυτό παρατηρούμε ένα χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Όσο αφορά το στέλεχος hoxH$^-$ στο οποίο έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο της αμφίδρομης υδρογενάσης, γονίδιο που καταλύει και την πρόσληψη και την εξέλιξη του μοριακού υδρογόνου, παρατηρούμε μία αύξηση στην καμπύλη ανάπτυξης, η οποία επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η δράση του συγκεκριμένου ενζύμου είναι ανεξάρτητη από τη διαδικασία της καθήλωσης του αζώτου, όταν το βακτήριο αναπτύσσεται στο θρεπτικό μέσο $BG11^0$.Επιπλέον εφόσον στο στέλεχος αυτό το γονίδιο της συγκεκριμένης υδρογενάσης έχει απενεργοποιηθεί, δεν μπορεί να λειτουργήσει πλέον σαν δέκτης για τα χαμηλού δυναμικού ηλεκτρόνια της φωτοσυνθετικής διαδικασίας, οπότε δεν εμποδίζεται η επιβράδυνση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων υπό συνθήκες καταπόνησης. Για το στέλεχος hupL$^-$/hoxH$^-$, το οποίο είναι το μοναδικό στέλεχος όπου μετά από 192h ανάπτυξης στο θρεπτικό μέσο $BG11^0$ παρατηρούμε μείωση στην καμπύλη ανάπτυξης και μπορούμε να κατανοήσουμε καλύτερα την αρνητική επίδραση της απενεργοποίησης και των δύο γονίδιων της υδρογενάσης, στην μικρότερη αντοχή του βακτηρίου σε συνθήκες καταπόνησης. Η μόνη παρατήρηση και στις δυο καμπύλες ανάπτυξης, σε σχέση με τα διαφορετικά στελέχη είναι ότι για το στέλεχος hupL$^-$, οι τιμές της Chl_a κυμαίνονται πάντα σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Η απενεργοποίηση του γονιδίου της uptake υδρογενάσης, δεν του επιτρέπει να χρησιμοποιήσει τα ηλέκτρόνια που παράγονται από την αντίδραση της, για περαιτέρω διεργασίες όπως συμβαίνει στα υπόλοιπα στελέχη.

4.3 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ετεροκυστών

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας ορατού, τόσο για τα κύτταρα πριν την απομόνωση, όσο και για τα τέσσερα υπερκείμενα και τις απομονωμένες ετεροκύστες, έγινε προσπάθεια να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου για την απομόνωση των ετεροκυστών. Με βάση την **Εικόνα 28** όπου παρουσιάζονται τα φάσματα για τις δύο καταστάσεις των κυττάρων, πριν και μετά την επεξεργασία τους, εξετάζοντας τις ξεχωριστές κορυφές για το κάθε διάλυμα, παρατηρείται ότι κατά τη διαδικασία απομόνωσης η ένταση των φυκοχολοσωμάτων μειώνεται στις απομονωμένες ετεροκύστες, σε ολόκληρη την περιοχή μεταξύ 570 και 650 nm, σε σύγκριση με εκείνη των αγενών κυττάρων, όπως και των υπερκειμένων, που προκύπτουν μετά τις πλύσεις. Η θυλακοειδής μεμβράνη των ετεροκυστών, περιέχει τα σύμπλοκα του κέντρου αντίδρασης του PSI, το απενεργοποιημένο PSII, μαζί με τα τροποποιημένα φυκοχολοσώματα. Τα αγενή κύτταρα περιέχουν και το PSI και το PSII σύστημα παραγωγής οξυγόνου. Αυτά τα κύτταρα έχουν μία τυπική κεραία φυκοχολοσωμάτων, ενώ τα φυκοχολοσώματα των ετεροκυστών, έχουν μικρότερες ράβδους και ένα αλλαγμένο πυρήνα αλλοφυκοκυανίνης. Παρά το μικρό ποσοστό των φυκοχολοπρωτεϊνών που βρέθηκαν στις απομονωμένες ετεροκύστες, η μεταφορά της ενέργειας διέγερσης από τα φυκοχολοσώματα στο PSI, λαμβάνει χώρα. Ένας μηχανισμός που ρυθμίζει το ποσό της ενέργειας διέγερσης που μεταφέρεται στο PSI, θα παρέχει τη δυνατότητα στις ετεροκύστες, να ανταποκρίνονται στην ποιότητα του φωτός, με σύζευξη ή με αποσύνδεση του φυκοχολοσώματος στο PSI, υποστηρίζοντας έτσι τη λειτουργία του σε αυτές. Τα φάσματα απορρόφησης, υποδεικνύουν ότι η μείωση των φυκοχολοσωμάτων κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ετεροκυστών, δεν επηρεάζει όλα τα συστατικά των φυκοχολοσωμάτων εξίσου. Τα φάσματα απορρόφησης στις απομονωμένες ετεροκύστες (ίζημα Ε), έδειξαν μειωμένη ένταση, σε ολόκληρη την περιοχή μεταξύ 550 και 650 nm, η οποία αντιστοιχεί στη απορρόφηση της φυκοκυανίνης όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 28.** Το PSI είναι κατά κύριο λόγο μονομερές και τα φυκοχολοσώματα είναι αποσυνδεδεμένα ή μόνο ελαφρώς ενωμένα με αυτό. Άρα εκτιμάται ότι έχει απομακρυνθεί ο μεγαλύτερος αριθμός αγενών κυττάρων, τα οποία είναι εμπλουτισμένα με τις χρωστικές αυτές λόγω του μη απενεργοποιημένου PSII. Αυτή η απανεργοποίηση βασίζεται στο γεγονός ότι η σύνδεση μεταξύ της αλοφυκονυανίνης και του PSII διασπάται κατά την έναρξη της κυτταρικής διαφοροποίησης. Κατά συνέπεια, η μεταφορά ενέργειας

εμποδίζεται μεταξύ αλοφυκονυανίνης και PSII. Άλλος ένας παράγοντας που υποδεικνύει την μείωση στη συγκέντρωση του PSII στις απομονωμένες ετεροκύστες, είναι η όλο και μειωμένη συγκέντρωση της Chl_a, σταδιακά από το Υπερκείμενο 1 (A) μέχρι το τελικό ίζημα (E), πράγμα που συμφωνεί και με τις μειωμένες τιμές στη συγκέντρωση της Chl_a στην καμπύλη ανάπτυξης των στελεχών, όταν εκείνα μεγαλώνουν και συνθήκες ανάπτυξης ετεροκυστών.

Όσο αφορά την ανάλυση των απομονωμένων ετεροκυστών με ηλεκτροφόρηση, ότι τα κλάσματα που προκύπτουν κατά τις πλύσεις των υπερκειμένων (Y1-Y4) στην **Εικόνα 29** διαφέρουν στην ένταση των πρωτεϊνικών μπαντών σε σχέση με το ίζημα. Ιδιαίτερα στο Y1(Υπερκείμενο 1) όπου παρατηρούμε ότι αρκετές πρωτεΐνες και σε μεγάλη συγκέντρωση, απομακρύνονται κατά τη διάρκεια των πλύσεων και ίσως να αντιπροσωπεύουν πρωτεΐνες των αγενών κυττάρων (όπως πρωτεΐνες φυκοχολοσωμάτων και του φωτοσυστήματος ΙΙ) μετά τη κατεργασία με τους υπερήχους. Όσο επαναλαμβάνονται οι πλύσεις και πιο συγκεκριμένα στα Y2,Y3,Y4 πάλι παρατηρείται ότι αποβάλλονται και άλλες πρωτεΐνες ,ιδιαίτερα στα 21,55 KDa και 45 KDa.Με τελικό αποτέλεσμα το ίζημα των ετεροκυστών απαλλαγμένο από τις περισσότερες πρωτεΐνες των αγενών κυττάρων. Εκτιμάται ότι η διαδικασία της απόμόνωσης επιτυγχάνεται ως ένα βαθμό εφόσον υπάρχουν διαφοροποιήσεις στα δύο κλάσματα που προκύπτουν.

4.4 Συγκριτική μελέτη των δυο υποπρωτεομάτων, μετά τη κλασματοποίηση των ετεροκυστών

Για να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των μεμβρανών, χρησιμοποιήθηκε η επιλεκτική διαλυτοποίηση της εσωτερικής μεμβράνης των ετεροκυστών του βακτηρίου με το επιφανειοδραστικό Sodium N-layryl Sarcosinate (LS). Ο κυτταρικός φάκελος των Gram-αρνητικών βακτηρίων είναι μία σύνθετη δομή η οποία αποτελείται από μία εξωτερική μεμβράνη, μια ενδιάμεση στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης και μια εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το LS δεν έχει επίδραση στην εξωτερική μεμβράνη, διαλυτοποιεί μόνο την εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω επιλεκτικής διαλυτοποίησης [65, 66]. Μετά τη διαλυτοποίηση πραγματοποιήθηκε μονοδιάστατη και δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. Η μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση των υποπρωτεομάτων για τις διαλυτοποιημένες

ετεροκύστες, και η εμφανής διαφοροποίηση μεταξύ των δύο κλασμάτων, όσο αφορά την ένταση στις πρωτεϊνικές μπάντες, για όλα τα στελέχη, ήταν ένδειξη ώστε να συνεχίσουμε με τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση SDS-Tricine αυτών, για περαιτέρω ανάλυση των πρωτεϊνών που τα αποτελούν. Η ανάλυση για το υποπρωτέομα του υπερκειμένου μετά τη διαλυτοποίηση με απορρυπαντικό για όλα τα στελέχη, έδειξε τα εξής αποτελέσματα: Στην πηκτή του υποπρωτεόματος του υπερκειμένου για το στέλεχος WTPCC7120 (A) **Εικόνα 32A** διακρίθηκαν τα περισσότερα πρωτεϊνικά στίγματα ενώ στην **Εικόνα 32Δ** για το στέλεχος hupL$^-$/hoxH$^-$ τα λιγότερα. Επίσης οι περισσότερες πρωτεΐνες (41) ταυτοποιήθηκαν στο hupL$^-$ ενώ στο στέλεχος hupL$^-$ /hoxH$^-$ ταυτοποιήθηκαν μόνο 9 διαφορετικές πρωτεΐνες. Συνολικά από όλα τα στελέχη για το υποπρωτέομα του υπερκειμένου ταυτοποιήθηκαν 60 διαφορετικές πρωτεΐνες. Η πρόβλεψη της θέσης των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο μας δείχνει ότι το ποσοστό των πρωτεϊνών για τις κυτταροπλασματικές (45%) και για τις μεμβρανικές πρωτείνες (45%) είναι το ίδιο, ενώ παρατηρούμε και ένα μικρό ποσοστό να ανήκει στις ριβοσωμικές. Η ανάλυση για το υποπρωτέομα του ιζήματος έδειξε τα εξής αποτελέσματα: για το στέλεχος hupL$^-$ (B) **Εικόνα 35B** διακρίθηκαν τα περισσότερα πρωτεϊνικά στίγματα ενώ στην **Εικόνα 35Δ** για το στέλεχος hupL$^-$ /hoxH$^-$ (Δ) τα λιγότερα. Επίσης οι περισσότερες πρωτεΐνες (27) ταυτοποιήθηκαν στο hupL$^-$ ενώ στο στέλεχος hoxH$^-$ οι λιγότερες (18). Συνολικά από όλα τα στελέχη για το υποπρωτέομα του ιζήματος ταυτοποιήθηκαν 50 διαφορετικές πρωτεΐνες. Η πρόβλεψη της θέσης των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο μας δείχνει ότι το ποσοστό των πρωτεϊνών για τις μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι μεγαλύτερο (48%), ενώ για τις κυτταροπλασματικές (40%). Παρατηρούμε λοιπόν ότι στο υποπρωτέομα του ιζήματος ταυτοποιούμε μεγαλύτερο ποσοστό μεβρανικών πρωτεϊνών, σε σχέση με το υποπρωτέομα του υπερκειμένου, πράγμα που μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η διαδικασία της διαλυτοποίησης με επιφανειοδραστικό, για τις ερικύστες έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς. Και για τα δύο υποπρωτεόματα ταυτοποίηθηκαν 89 διαφορετικές πρωτεΐνες, 26 μοναδικές ταυτοποιήθηκαν για το υποπρωτέομα του ιζήματος και 36 μοναδικές για το υποπρωτέομα του υπερκειμένου. Όσο αναφορά τις 24 κοινές πρωτεΐνες και από τα δυο υποπρωτεόματα, παρατηρούμε ότι σε αυτές ανήκουν και πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη διαφοροποίηση των ετεροκυστών όπως η **All2269** (Q8YUR6) και η **Alr4550** (Q8YNL5) πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης, οι οποίες είναι σε μεγαλύτερη αφθονία στην εξωτερική μεμβράνη των αγενών κυττάρων. Η διαφοροποίηση στον αριθμό των μοναδικών ταυτοποιημένων

πρωτεϊνών για τα δυο υποπρωτεόματα ξεχωριστά, μας δείχνει ότι με τη διαλυτοποίηση έχει επιτευχθεί ένας πρώτος διαχωρισμός. Η λειτουργία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών για το υποπρωτέομα του υπερκειμένου δείχνει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών λαμβάνει μέρος στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης (διαμεμβρανικές υπομονάδες του φωτοσυστήματος I και του II, φυκοχολοπρωτείνες), την παραγωγή ενέργειας (διαφορετικές υδατοδιαλυτές υπομονάδες της ATP συνθάσης), πρωτεΐνες που εκφράζονται μόνο όταν το βακτήριο αναγκάζεται να αναπτυχθεί χωρίς πηγή αζώτου, ώστε να πραγματοποιηθεί η καθήλωση του αζώτου (σαπερόνες) , πρωτεΐνες που συμβάλουν στη διαδικασία της γλυκόλυσης, διαμεμβρανικές πορίνες της μεμβράνης για μεταφορά ουσιών και τέλος σημαντικό ποσοστό αφορά πρωτεΐνες αγνώστου λειτουργίας. Η προβλεπόμενη λειτουργία των πρωτεϊνών του ιζήματος δείχνει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ανήκει σε πρωτεΐνες που συμβάλουν στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, πρωτεΐνες για παραγωγή ATP, εκείνες που εκφράζονται σε συνθήκες καταπόνησης και τέλος πρωτεΐνες αγνώστου λειτουργίας. Παρατηρείται ότι μετά την πρωτεομική ανάλυση για το υποπρωτέομα του ιζήματος, ταυτοποιήθηκε μόνο σε αυτό, η διαμεμβρανική πρωτεΐνη **Alr2887** (Q8YT39) μία TolC-εξαρτώμενη πρωτεΐνη, εφαπτώμενη με τα εσωτερικά συστατικά της εσωτερικής μεμβράνης και είναι αγκυροβολημένη κατά κύριο λόγο στην εξωτερική μεμβράνη των αγενών κυττάρων και των ετεροκυστών [36, 37]. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η έκφραση της πρωτεΐνης **Alr2887** αυξάνεται σημαντικά όταν το βακτήριο αναγκαστεί να μεγαλώσει σε συνθήκες στέρησης αζώτου και συνδέεται με την ωρίμανση των ετεροκυστών σε αυτό. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε γιατί συμβάλει στη βιοσύνθεση της ειδικής γλυκολιπιδικής στοιβάδας των ετεροκυστών (HGLs), είτε στη μεταφορά πρωτεϊνών και ενζύμων υπεύθυνων για τη τροποποίηση της γλυκολιπιδικής αυτής στοιβάδας [67]. Έχει προταθεί ότι η μεταφορά των μεταβολιτών και των σηματοδοτικών μορίων μεταξύ των κυττάρων για το *Anabaena sp.*PCC 7120 πραγματοποιείται μέσω του συνεχούς περιπλάσματος που συνδέει τα δυο είδη των κυττάρων και μια εξωτερική μεμβράνη που πιθανώς να είναι κοινή σε αυτά [10]. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη δημιουργία των ετεροκυστών και πρωτεΐνες που εκφράζονται όταν το βακτήριο αναγκάζεται να αναπτυχθεί χωρίς πηγή αζώτου και στα δύο υποπρωτεόματα μετά τη διαλυτοποίηση. Η **All2269** πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε και στα δύο υποπρωτεόματα ανήκει στην οικογένεια των Omp85 πρωτεϊνών, με δομή β-πτυχωτής, συντηρημένη σε όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια

[68]. Είναι υπεύθυνη για την επιβίωση των κυττάρων, καθώς και για τη βιοσύνθεση της εξωτερικής μεμβράνης, πιθανότατα με τη συναρμολόγηση της πρωτεΐνης εντός της μεμβράνης αυτής. Η πρωτεΐνη **Alr4550** με χαμηλό ρυθμό έκφρασης στις ετεροκύστες, μία πορίνη της εξωτερικής μεμβράνης, ανήκει στις κοινές πρωτεΐνες των δυο υποπρωτεομάτων και είναι χαρακτηριστική και για τα δύο είδη κυττάρων. Η πρωτεΐνη **All4499** (Q8YNR3) ταυτοποιημένη μόνο στο υποπρωτέομα του ιζήματος, ανήκει και αυτή στις πρωτεΐνες με χαμηλό ρυθμό έκφρασης στις ετεροκύστες, και υποδηλώνει εν μέρει ότι στο απομονωμένο ίζημα μετά τη διαλυτοποίηση, βρίσκονται μεμβρανικές πρωτεΐνες, που συμβάλουν στη διαφοροποίηση των ετεροκυστών. Όσο αφορά τις διάφορες υπομονάδες των φωτοσυστημάτων I και II που ταυτοποιήθηκαν το ποσοστό των υπομονάδων για το PSI είναι μεγαλύτερο σε σχέση με τις υπομονάδες του PSII, πράγμα που υποδηλώνει ότι απομονώθηκαν επιτυχώς τα δυο είδη κυττάρων, εφόσον το PSII είναι απενεργοποιημένο στις διαφοροποιημένες ετεροκύστες και δεν εκφράζεται στον ίδιο βαθμό όπως το PSI. Μια πιθανή εξήγηση γιατί υπάρχουν PSII συγκροτήματα στις ετεροκύστες, είναι στο να χρησιμεύουν ως εφεδρική πηγή του βακτηρίου, για τη δωρεά ηλεκτρονίων μετά από περιόδους σκότους, όταν η προμήθεια των υδατανθράκων από τα αγενή κύτταρα μπορεί να είναι χαμηλή. Η πρωτεΐνη **Alr0397** (Q8YZR0) ταυτοποιείται μόνο στο στέλεχος $hupL^-$, στο υποπρωτέομα του ιζήματος. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι επειδή η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι μια πρωτεΐνη μεταφορέας σιδηροφόρων μορίων και μεταφορέας υδατανθράκων [69] και η έκφραση της αυξάνει σε συνθήκες μειωμένου σιδήρου, στο στέλεχος που στερείται τη μεγάλη υπομονάδα της υδρογενάσης και δεν έχει το πλεονέκτημα να παράγει επιπλέον πρωτόνια, λειτουργεί βοηθητικά. Το άτομο του σιδήρου είναι σημαντικό για τη μεταφορά ηλεκτρονίων στη φωτοσύνθεση, ως κύριο μέταλλο του PSI, του συμπλέγματος του κυτοχρώματος b_6f και του PSII. Έτσι η πρωτεΐνη αυτή διευκολύνει τη διεργασία του PSI στις απομονωμένες ετεροκύστες. Επίσης η πρωτεΐνη **All1861** (Q8YVW2) ταυτοποιείται μόνο στο στέλεχος $hupL^-$,τόσο στο υποπρωτέομα του ιζήματος, όσο και σε αυτό του υπερκειμένου. Αυτή η πρωτεΐνη ανήκει σε αυτές της εξωτερικής μεμβράνης, με δυνατότητα σύνδεσης με τη πεπτιδογλυκάνη συμβάλλοντας και στον μεταβολισμό της. Η πρωτείνη **Alr0834** (Q8YYL4) ταυτοποιείται για όλα τα στελέχη στο υποπρωτέομα του ιζήματος και η έκφραση της ενισχύεται στη πρώιμη φάση ανάπτυξης των ετεροκυστών, ως μια πρωτεΐνη που θεωρείται ως ένα από τα κύρια συστατικά της εξωτερικής μεμβράνης [36]. Σχετικά με τις ταυτοποιημένες υπομονάδες των φωτοσυστημάτων,

παρατηρούμε ότι οι δύο κύριες διαμεμβρανικές υπομονάδες του PSI (**PsaA, PsaB, PsaB$_1$**) ταυτοποιούνται μόνο στο στέλεχος hupL$^-$. Για το στέλεχος hupL$^-$/hoxH$^-$ παρατηρούμε ότι και για το υποπρωτεόμα του ιζήματος και γι αυτό του υπερκειμένου, ο αριθμός των πρωτεϊνών που ταυτοποιούνται είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι το βακτήριο όταν έχει τροποποιηθεί γενετικά και στις δυο υπομονάδες της υδρογενάσης, έχει αναπτύξει διαφορετικούς μηχανισμούς για να προσαρμόζεται σε συνθήκες στέρησης αζώτου, οπότε κάποιες πρωτεΐνες δεν εκφράζονται σε μεγάλη συγκέντρωση, ώστε να μπορούν να ταυτοποιηθούν. Γενικά οι διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών στα διάφορα στελέχη είναι εμφανής (Πίνακας 2,3), πράγμα απολύτως λογικό εφόσον το κάθε στέλεχος ανάλογα με τις ανάγκες του θα προσαρμοστεί στο εκάστοτε περιβάλλον. Βασικές πρωτεΐνες των μεταβολικών μονοπατιών για την επιβίωση της ετεροκύστης, εκφράζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό για το στέλεχος που δεν είναι γενετικά τροποποιημένο, ενώ ο αριθμός μειώνεται για τα υπόλοιπα στελέχη και παρατηρούμε και την έκφραση μοναδικών πρωτεϊνών σε αυτά. Αυτές οι μοναδικές πρωτεΐνες ίσως μπορέσουν να αποτελέσουν και ένα κριτήριο διάκρισης των στελεχών σε μελλοντικές εργασίες. Εδώ μπαίνει το ερώτημα για το αν οι γενετικές τροποποιήσεις, εκτός από το σκοπό να βελτιώσουν τη ποσότητα του παραγόμενου υδρογόνου, έχουν αντίθετη επίδραση στην περαιτέρω ομαλή λειτουργία του μεταβολισμού των ετεροκυστών.

4.5 Πρωτεομική ανάλυση ολόκληρων ετεροκυστών

Η δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση με την πρώτη διάσταση σε ευρεία κλίμακα pI ανάμεσα από 3 και 10 και σε συνδυασμό με MALDI TOF/TOF MS/MS, εφαρμόστηκε για την ταυτοποίηση όσο το δυνατό περισσότερων πρωτεϊνών στις απομονωμένες ετεροκύστες. Πράγματι ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνικών κηλίδων ταυτοποιήθηκε ο οποίος αντιστοιχεί σε 75 διαφορετικές πρωτεΐνες. Επιπλέον, τόσο τα μοριακά βάρη, όσο και τα ισοηλεκτρικά σημεία που παρατηρήθηκαν για τις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες υποδεικνύουν ένα πολύ ικανοποιητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Παρατηρούμε ότι στο σύνολο τους οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν

ταυτοποιηθεί είναι στο ίδιο ποσοστό (38,66%) σε σχέση με τις κυτταροπλασματικές (38,6%), γεγονός που μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε ότι ο διαχωρισμός των μεμβρανικών πρωτεϊνών επιτυγχάνεται επιτυχώς, αν και η συγκεκριμένη τεχνική δεν συνιστάται για μεμβρανικές πρωτεΐνες. Αυτό συμβαίνει γιατί οι μεμβρανικές πρωτεΐνες έχουν τη τάση να δημιουργούν συσσωματώματα κατά την ισοηλεκτρική εστίαση τα οποία αποτυγχάνουν να περάσουν στη δεύτερη διάσταση. Ταυτοποιήσαμε μεμβρανικές πρωτεΐνες, που η έκφραση τους είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των κυττάρων από αγενή σε ετεροκύστες, ή λαμβάνουν μέρος στο μεταβολισμό των ετεροκυστών, συμμετέχοντας ενεργά στις βιολογικές αντιδράσεις. Για την καθήλωση αζώτου η συνθάση του γλουταμινικού πρωτεΐνη για την αφομοίωση της αμμωνίας που παράγεται από τη νιτρογενάση. Ταυτοποιήθηκαν 4 διαφορετικές υπομονάδες της ATP συνθάσης στις απομονωμένες ετεροκύστες, πράγμα που συμφωνεί με το ότι η αφθονία αυτών στο κυτταρικό συγκρότημα των ετεροκυστών, θα μπορούσε να είναι αυξημένη και σχετίζεται με προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει και υποστηρίζουν ότι στα αγενή κύτταρα το ποσοστό είναι μικρότερο [70]. Ιδιαίτερη αναφορά, στην χαρακτηριστική πρωτεΐνη **All4388** , μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης των ετεροκυστών, η οποία παίρνει μέρος στη βιοσύνθεση της επιπλέον στοιβάδας των πολυσακχαριτών [71]. Μεταβολικές βιολογικές διεργασίες όπως η γλυκόλυση, ο κύκλος του κιτρικού οξέος, το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών και η φωτοσυνθετική διαδικασία πραγματοποιούνται με τη συμβολή πρωτεϊνών, που αρκετές έχουν ταυτοποιηθεί, σε όλα τα ξεχωριστά στάδια που μεσολαβούν, ώστε να λειτουργεί ομαλά αυτό το διαφοροποιημένο κύτταρο, προσαρμοσμένο στις καινούργιες συνθήκες. Αναμφίβολα, η κυκλική φωσφορυλίωση, που οδηγείται από το PSI είναι απαραίτητη για το μεταβολισμό των ετεροκυστών. Η ποσοτικοποίηση του πρωτεόματος μας έδωσε τη δυνατότητα να παρατηρήσουμε ότι το σύνολο των διαδικασιών της παραγωγής ενέργειας συμβαίνει εντός των ετεροκυστών σε συνεργασία με το αγενές κύτταρο. Με αυτό τον τρόπο συνδέεται ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, για παραγωγή άφθονης αναγωγικής ισχύος, με τη διαδικασία παραγωγής ATP, ωθούμενη από το PSI. Και στις δυο προσεγγίσεις που ακολουθήθηκαν δεν ταυτοποιήσαμε καμία υπομονάδα ούτε της νιτρογενάσης ούτε των υδρογενασών, αυτό όμως δεν μας αναιρεί το αποτέλεσμα ότι η απομόνωση των ετεροκυστών ήταν επιτυχής. Η μη ταυτοποίηση ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι τα δυο αυτά ένζυμα πιθανώς να είναι σε χαμηλή συγκέντρωση στο κύτταρο των ετεροκυστών, η οποία δεν επιτρέπει την ανίχνευση και την ταυτοποίηση.

Συμπερασματικά στο συγκεκριμένο κομμάτι της εργασίας, έγινε προσπάθεια πρωτεομικής μελέτης των απομονωμένων ετεροκυστών, χωρίς να έχει προηγηθεί διάρρηξη και διαχωρισμός των εξωτερικών μεμβρανών με τις μεμβράνες των θυλακοειδών και την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τον επιτυχή διαχωρισμό των μεμβρανικών πρωτεϊνών, για την περαιτέρω κατανόηση πώς η πολυκυτταρικότητα και η διαφοροποίηση του *Anabaena sp*.PCC 7120 αντανακλά στη πρωτεομική σύνθεση και λειτουργία της ενιαίας εξωτερικής μεμβράνης.

Βιβλιογραφία

1. Bekker A, Holland HD, Wang PL, Rumble D, Stein HJ, Hannah JL, Coetzee LL, Beukes NJ: **Dating the rise of atmospheric oxygen**. *Nature* 2004, **427**(6970):117-120.
2. Kasting JF: **Earth sciences: Ups and downs of ancient oxygen**. *Nature* 2006, **443**(7112):643-645.
3. Schopf JW: **The Fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Lineage**. In: *The Ecology of Cyanobacteria.* Edited by Whitton B, Potts M: Springer Netherlands; 2002: 13-35.
4. Fay P: **The blue-greens (Cyanophyta - Cyanobacteria)**. London {etc.]: Arnold; 1983.

5. Wilmotte A: **Molecular Evolution and Taxonomy of the Cyanobacteria**. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria.* Edited by Bryant D, vol. 1: Springer Netherlands; 2004: 1-25.
6. Schwartz W: **G. E. Fogg, W. D. P. Stewart, P. Fay And A. E. Walsby, The Blue-Green Algae. VII, 459 S., 170 Abb. und 8 farbige Abb., 33 Tab., 1 Farbtafel. London-New York 1973: Academic Press, £ 8.50**. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 1975, **15**(1):68-68.
7. Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS: **Cyanobacterial toxins: risk management for health protection**. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005, **203**(3):264-272.
8. Tamagnini P, Leitão E, Oliveira P, Ferreira D, Pinto F, Harris DJ, Heidorn T, Lindblad P: **Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications**. *FEMS Microbiology Reviews* 2007, **31**(6):692-720.
9. Srirangan K, Pyne ME, Perry Chou C: **Biochemical and genetic engineering strategies to enhance hydrogen production in photosynthetic algae and cyanobacteria**. *Bioresource Technology* 2011, **102**(18):8589-8604.
10. Flores E, Herrero A, Wolk CP, Maldener I: **Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria?** *Trends in Microbiology* 2006, **14**(10):439-443.
11. Peter Wolk C: **HETEROCYST FORMATION**. *Annual Review of Genetics* 1996, **30**(1):59-78.
12. Golden JW, Yoon H-S: **Heterocyst development in Anabaena**. *Current Opinion in Microbiology* 2003, **6**(6):557-563.
13. Ikeda TP, Shauger AE, Kustu S: **Salmonella typhimuriumApparently Perceives External Nitrogen Limitation as Internal Glutamine Limitation**. *Journal of Molecular Biology* 1996, **259**(4):589-607.
14. Laurent S, Chen H, Bédu S, Ziarelli F, Peng L, Zhang C-C: **Nonmetabolizable analogue of 2-oxoglutarate elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in Anabaena sp. PCC 7120**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(28):9907-9912.
15. Gallon JR: **Tansley Review No. 44. Reconciling the Incompatible: N2 Fixation and O2**. *New Phytologist* 1992, **122**(4):571-609.
16. Fay P, Stewart WDP, Walsby AE, Fogg GE: **Is the Heterocyst the Site of Nitrogen Fixation in Blue-green Algae?** *Nature* 1968, **220**(5169):810-812.
17. Wolk CP, Ernst A, Elhai J: **Heterocyst Metabolism and Development**. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria.* Edited by Bryant D, vol. 1: Springer Netherlands; 2004: 769-823.
18. Schmetterer G: **Cyanobacterial Respiration**. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria.* Edited by Bryant D, vol. 1: Springer Netherlands; 1994: 409-435.
19. Vermaas WFJ: **Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria**. In: *eLS.* John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
20. Shen G, Boussiba S, Vermaas WF: **Synechocystis sp PCC 6803 strains lacking photosystem I and phycobilisome function**. *The Plant Cell Online* 1993, **5**(12):1853-1863.
21. Bald D, Kruip J, Rögner M: **Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystems?** *Photosynth Res* 1996, **49**(2):103-118.
22. Cardona T, Magnuson A: **Excitation energy transfer to Photosystem I in filaments and heterocysts of Nostoc punctiforme**. *Biochimica et biophysica acta* 2010, **1797**(3):425-433.
23. Cardona T, Battchikova N, Zhang P, Stensjö K, Aro E-M, Lindblad P, Magnuson A: **Electron transfer protein complexes in the thylakoid membranes of heterocysts**

from the cyanobacterium Nostoc punctiforme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2009, **1787**(4):252-263.

24. Adams DG: **Heterocyst formation in cyanobacteria**. *Current Opinion in Microbiology* 2000, **3**(6):618-624.
25. Fay P: **Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria**. *Microbiological reviews* 1992, **56**(2):340-373.
26. Kumazaki S, Akari M, Hasegawa M: **Transformation of thylakoid membranes during differentiation from vegetative cell into heterocyst visualized by microscopic spectral imaging**. *Plant physiology* 2013, **161**(3):1321-1333.
27. Hoiczyk E, Hansel A: **Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope**. *Journal of Bacteriology* 2000, **182**(5):1191-1199.
28. Murry M, Wolk CP: **Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope**. *Arch Microbiol* 1989, **151**(6):469-474.
29. Gambacorta A, Pagnotta E, Romano I, Sodano G, Trincone A: **Heterocyst glycolipids from nitrogen-fixing cyanobacteria other than nostocaceae**. *Phytochemistry* 1998, **48**(5):801-805.
30. Cumino AC, Marcozzi C, Barreiro R, Salerno GL: **Carbon cycling in Anabaena sp. PCC 7120. Sucrose synthesis in the heterocysts and possible role in nitrogen fixation**. *Plant physiology* 2007, **143**(3):1385-1397.
31. Martín-Figueroa E, Navarro F, Florencio FJ: **The GS-GOGAT pathway is not operative in the heterocysts. Cloning and expression of glsF gene from the cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120**. *FEBS Letters*, **476**(3):282-286.
32. Flores E, Herrero A: **Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria**. *Nat Rev Micro* 2010, **8**(1):39-50.
33. Sato N, Ohmori M, Ikeuchi M, Tashiro K, Wolk CP, Kaneko T, Okada K, Tsuzuki M, Ehira S, Katoh H *et al*: **Use of segment-based microarray in the analysis of global gene expression in response to various environmental stresses in the cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120**. *The Journal of General and Applied Microbiology* 2004, **50**(1):1-8.
34. Vázquez-Bermúdez MF, Herrero A, Flores E: **Uptake of 2-Oxoglutarate inSynechococcus Strains Transformed with the Escherichia coli kgtP Gene**. *Journal of Bacteriology* 2000, **182**(1):211-215.
35. Li J-H, Laurent S, Konde V, Bédu S, Zhang C-C: **An increase in the level of 2-oxoglutarate promotes heterocyst development in the cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120**. *Microbiology* 2003, **149**(11):3257-3263.
36. Nicolaisen K, Hahn A, Schleiff E: **The cell wall in heterocyst formation by Anabaena sp. PCC 7120**. *Journal of Basic Microbiology* 2009, **49**(1):5-24.
37. Moslavac S, Bredemeier R, Mirus O, Granvogl B, Eichacker LA, Schleiff E: **Proteomic Analysis of the Outer Membrane of Anabaena sp. Strain PCC 7120**. *Journal of Proteome Research* 2005, **4**(4):1330-1338.
38. Houchins JP, Burris RH: **Occurrence and localization of two distinct hydrogenases in the heterocystous cyanobacterium Anabaena sp. strain 7120**. *Journal of Bacteriology* 1981, **146**(1):209-214.
39. Serebriakova L, Zorin N, Lindblad P: **Reversible hydrogenase in Anabaena variabilis ATCC 29413**. *Arch Microbiol* 1994, **161**(2):140-144.
40. Appel J, Phunpruch S, Steinmüller K, Schulz R: **The bidirectional hydrogenase of Synechocystis sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis**. *Arch Microbiol* 2000, **173**(5-6):333-338.
41. Lambert GR, Smith GD: **THE HYDROGEN METABOLISM OF CYANOBACTERIA (BLUE-GREEN ALGAE)**. *Biological Reviews* 1981, **56**(4):589-660.

42. Herrero A, Muro-Pastor AM, Valladares A, Flores E: **Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria**. *FEMS Microbiology Reviews* 2004, **28**(4):469-487.
43. Curatti L, Giarrocco L, Salerno G: **Sucrose synthase and RuBisCo expression is similarly regulated by the nitrogen source in the nitrogen-fixing cyanobacterium Anabaena sp**. *Planta* 2006, **223**(5):891-900.
44. Cumino AC, Marcozzi C, Barreiro R, Salerno GL: **Carbon Cycling in Anabaena sp. PCC 7120. Sucrose Synthesis in the Heterocysts and Possible Role in Nitrogen Fixation**. *Plant physiology* 2007, **143**(3):1385-1397.
45. Ernst A, Reich S, Böger P: **Modification of dinitrogenase reductase in the cyanobacterium Anabaena variabilis due to C starvation and ammonia**. *Journal of Bacteriology* 1990, **172**(2):748-755.
46. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez J-C, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I *et al*: **From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Arnino Acid Analysis**. *Nat Biotech* 1996, **14**(1):61-65.
47. Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M: **Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology**. *PROTEOMICS* 2001, **1**(3):377-396.
48. Weston AD, Hood L: **Systems Biology, Proteomics, and the Future of Health Care: Toward Predictive, Preventative, and Personalized Medicine**. *Journal of Proteome Research* 2004, **3**(2):179-196.
49. Intelicato-Young J, Fox A: **Mass spectrometry and tandem mass spectrometry characterization of protein patterns, protein markers and whole proteomes for pathogenic bacteria**. *Journal of Microbiological Methods* 2013, **92**(3):381-386.
50. Karas M, Hillenkamp F: **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons**. *Analytical Chemistry* 1988, **60**(20):2299-2301.
51. Tanaka K: **Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of flight mass spectrometry**. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1988, **2**:151-153.
52. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY: **Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria**. *Journal of General Microbiology* 1979, **111**(1):1-61.
53. Moslavac S, Reisinger V, Berg M, Mirus O, Vosyka O, Plöscher M, Flores E, Eichacker Lutz A, Schleiff E: **The proteome of the heterocyst cell wall in Anabaena sp. PCC 7120**. In: *Biological Chemistry.* vol. 388; 2007: 823.
54. Liu D, Golden JW: **hetL Overexpression Stimulates Heterocyst Formation in Anabaena sp. Strain PCC 7120**. *Journal of Bacteriology* 2002, **184**(24):6873-6881.
55. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analytical Biochemistry* 1976, **72**(1–2):248-254.
56. Schagger H: **Tricine-SDS-PAGE**. *Nature protocols* 2006, **1**(1):16-22.
57. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG: **Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis**. *Electrophoresis* 2004, **25**(9):1327-1333.
58. Rais I, Karas M, Schagger H: **Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification**. *Proteomics* 2004, **4**(9):2567-2571.
59. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M: **In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes**. *Nat Protocols* 2007, **1**(6):2856-2860.

60. Masukawa H, Inoue K, Sakurai H, Wolk CP, Hausinger RP: **Site-Directed Mutagenesis of the Anabaena sp. Strain PCC 7120 Nitrogenase Active Site To Increase Photobiological Hydrogen Production**. *Applied and Environmental Microbiology* 2010, **76**(20):6741-6750.
61. Yoon H-S, Golden JW: **Heterocyst Pattern Formation Controlled by a Diffusible Peptide**. *Science* 1998, **282**(5390):935-938.
62. Ke S, Haselkorn R: **Fluorescence spectroscopy study of heterocyst differentiation in Anabaena PCC 7120 filaments**. *Microbiology* 2013, **159**(Pt 2):253-258.
63. Masukawa H, Mochimaru M, Sakurai H: **Disruption of the uptake hydrogenase gene, but not of the bidirectional hydrogenase gene, leads to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, **58**(5):618-624.
64. Happe T, Schütz K, Böhme H: **Transcriptional and Mutational Analysis of the Uptake Hydrogenase of the Filamentous CyanobacteriumAnabaena variabilis ATCC 29413**. *Journal of Bacteriology* 2000, **182**(6):1624-1631.
65. Filip C, Fletcher G, Wulff JL, Earhart CF: **Solubilization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate**. *J Bacteriol* 1973, **115**(3):717-722.
66. Ravaoarinoro M, Ciurli C, Toma E, Morisset R: **Rapid method for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from Pseudomonas aeruginosa**. *Electrophoresis* 1994, **15**(1):594-596.
67. Sharff A, Fanutti C, Shi J, Calladine C, Luisi B: **The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux.** . *European Journal of Biochemistry* 2001, **268**(19):5011-5026.
68. Voulhoux R, Tommassen J: **Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly**. *Research in Microbiology* 2004, **155**(3):129-135.
69. Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, Buchanan SK: **TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function**. *Annual review of microbiology* 2010, **64**:43-60.
70. Schwassmann HJ, Rexroth S, Seelert H, Dencher NA: **Metabolism controls dimerization of the chloroplast FoF1 ATP synthase in Chlamydomonas reinhardtii**. *FEBS Lett* 2007, **581**(7):1391-1396.
71. Maldener I, Hannus S, Kammerer M: **Description of five mutants of the cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120 affected in heterocyst differentiation and identification of the transposon-tagged genes**. *FEMS Microbiology Letters* 2003, **224**(2):205-213.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

<u>Πίνακας 1:</u> Συγκριτικός πίνακας ταυτοποιημένων πρωτεϊνών από τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση των υπερκειμένων μετά τη διαλυτοποίηση με N-layryl Sarcosinate, για όλα τα στελέχη
[C:cytoplasm, CM: cytoplasmic membrane, OM: outer membrane P: periplasm]

No.	Accession Number	Identified Proteins	Protein MW	PI Value	Localization	Biological Process	WTPCC7 120 (A)	hupL- (B)	hoxH- (Γ)	hupL$^-$ /hoxH$^-$ (Δ)
1	P12405	ATP synthase subunit alpha	54422	5.11	CM	ATP synthesis, Hydrogen ion transport, Ion transport,	15	11,12	14	–
2	P06540	ATP synthase subunit beta	52016	5.02	CM	ATP synthesis, Hydrogen ion transport, Ion transport,	16,17	13,14,23, 26	14	–
3	P12408	ATP synthase gamma chain	35277	8.88	CM	ATP synthesis, Hydrogen ion transport, Ion transport,	26	–	–	–
4	P00879	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	53045	6.25	C	Calvin cycle, Carbon dioxide fixation, Photorespiration, Ph otosynthesis	16	13	14,15	26
5	Q8YVW9	Alr1850 protein	79128	5.62	Unknown	Carbohydrate metabolism	–	7	–	–
6	Q8YXE1	Phosphorylase	97198	5.61	C	Carbohydrate metabolism	6	5	4	–
7	Q8YLM3	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	52178	5.90	C	Gluconate utilization	19	15	–	–
8	Q8YPR1	Phosphoglycerate kinase	42441	5.15	C	Glycolysis	22	18	–	–
9	Q8YNK2	Fructose-bisphosphate aldolase	38617	5.49	C	Glycolysis	23	19	18	–
10	Q8YRBO	Enolase	45965	5.03	C	Glycolysis	–	17	–	–
11	Q8YTK9	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	59465	6,77	C	Glycolysis	–	–	20	–
12	Q8YP62	Elongation factor G	76145	5.08	C	GTPase activity	–	7	–	–
13	P00964	Glutamine synthetase	53136	5.28	C	Heterocyst differentiation,Nitrogen fixation	16	–	–	–

14	Q8YM38	LL-diaminopimelate aminotransferase 1	44986	5.13	C	Lysine biosynthetic process via diaminopimelate	–	17	–	–
15	Q8YVN4	Protease	59607	8.77	C	Metalloendopeptidase activity	–	11	–	–
16	Q8YP11	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	77790	5.05	C	mRNA catabolic process	8	–	–	–
17	Q8YRV8	Nitrate transport ATP-binding protein of ABC transporter	29612	8.83	CM	Nitrate transmembrane transporter activity	–	–	9	–
18	Q8YR42	Alr3608 protein	58272	9.41	OM	Nitrous oxidase accessory protein	15	9,12	–	–
19	Q8YV76	FMN-dependent NADH-azoreductase	22784	5.31	C	Oxidoreductase activity	–	28	–	–
20	Q8YRU9	Transketolase	72071	5.88	C	Pentose phosphate pathway	10	8	–	–
21	P58561	Transaldolase	36178	5.27	C	Pentose phosphate pathway	26	–	–	–
22	Q8YVW2	All1861 protein	28440	10.22	OM	Peptidoglycan -binding protein	–	29	–	–
23	Q8YP05	AhpC/TSA family protein	23698	5.09	C	Peroxiredoxin activity	32	27	–	–
24	P80559	Phycobiliprotein ApcE	126888	9.41	CM	Photosynthesis	3	3	2	–
25	P07123	Phycobilisome 32.1 kDa linker polypeptide, phycocyanin-associated, rod	32209	9.33	CM	Photosynthesis	27	22	21,22	15
26	P31329	Phycobilisome 34.5 kDa linker polypeptide, phycoerythrocyanin-associated, rod	31295	9.50	CM	Photosynthesis	28	–	22	–
27	P29989	Phycobilisome rod-core linker polypeptide CpcG4	29323	9.31	CM	Photosynthesis	30,32	25	23	–
28	P29988	Phycobilisome rod-core linker polypeptide CpcG3	2726	7.82	CM	Photosynthesis	32	–	–	–
29	P07120	C-phycocyanin subunit beta	18387	5.00	CM	Photosynthesis	34	–	–	21
30	P07121	C-phycocyanin alpha chain	17457	6.83	CM	Photosynthesis	35	–	20	20,21,22
31	P58576	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	83200	7.34	CM	Photosynthesis	–	10,11	–	–
32	P13907	Photosystem II manganese-stabilizing polypeptide	29638	4.91	CM	Photosynthesis	–	23	22	–

33	P58573	Photosystem I reaction center subunit II	15156	9.3	Photosystem I reaction center	Photosynthesis	–	–	19	1
34	P80557	Photosystem I reaction center subunit XI	18119	9.15	CM	Photosynthesis	–	–	–	19
35	P29987	Phycobilisome rod-core linker polypeptide CpcG2	28651	9.06	CM	Photosynthesis	–	–	23	–
36	Q8YPA8	Photosystem II CP43 protein	49865	6.00	CM	Photosynthetic electron transport in photosystem II	25	–	–	–
37	P31694	Photosystem Q(B) protein 2	39715	5.39	CM	Photosynthetic electron transport in photosystem II	31	–	–	–
38	Q8YYL4	Porin major outer membrane protein (alr0834)	54439	4.61	OM	Porin	–	–	–	11
39	Q8YP63	Elongation factor Tu	44811	5.25	C	Protein biosynthesis	20	16	17	–
40	Q8YM80	Alr5059 protein	4049	5,16	P	protein folding	25	20	–	–
41	Q8YST5	Endopeptidase Clp ATP-binding chain	93140	5.56	C	Protein metabolic process, nucleoside-triphosphatase activity	7	6	–	–
42	Q8YV58	Two-component sensor histidine kinase	52715	5.63	CM	Regulation of transcription	13	–	–	–
43	Q8YYA5	Alr0946 protein	16059	5.43	C	Regulator of gene expression	34	–	25	5,10,11
44	Q8YW74	Chaperone protein dnaK2 (heat shock protein)	67907	4.84	C	Response to stress	10	–	9	–
45	Q8YYG8	Alr0882 protein	30609	6.83	unknown	Response to stress	29	–	–	–
46	Q8YQZ8	60 kDa chaperonin 1	5797	4.90	C	Response to stress	13	10	–	–
47	Q8YQ52	All3983 protein	42351	5.41	OM	Secreted and surface protein	23	–	–	–
48	Q8YSZ1	Superoxide dismutase [Fe]	22384	5.32	C	Superoxide dismutase activity	–	29	–	–
49	Q8YUR6	Alr2269 hypothetical protein	89633	5.00	OM	SynToc75	–	–	–	6
50	P22705	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	147583	4.81	C	Transcription	2	–	–	–
51	Q8YQK1	Two-component response regulator	27094	4.99	C	Transcription	31	–	–	–
52	Q8Z0G0	30S ribosomal protein S1	38363	4.67	ribosome	Translation	22	18	18	–
53	Q8YQW9	Alr3692 protein	30706	6.08	CM	Transmembrane transport	31	–	–	–

54	Q8YNL5	Uncharacterized protein alr4550	60581	4.76	OM	Transporter activity	18	14	6,7	5,11,12
55	Q8YXE6	Aconitate hydratase 2	94650	5.23	C	Tricarboxylic acid cycle	5	–	–	–
56	Q8YM58	All5082 protein	23576	4.69	unknown	Unknown	4	–	–	–
57	Q8YYI3	Carbon dioxide concentrating mechanism protein	59465	6.77	C	Unknown	13	–	2,11	–
58	Q8YT49	Bicarbonate transport bicarbonate-binding protein	50292	6.63	CM	Unknown	19	15	–	–
59	Q8YP15	All4387 protein	31907	4.93	C	Unknown	29	–	–	–
60	Q8YYN5	Alr0811 protein	11533	6.43	unknown	Unknown	–	14	–	–

<u>Πίνακας 2</u>: Συγκριτικός πίνακας ταυτοποιημένων πρωτεϊνών από τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση των ιζημάτων μετά τη διαλυτοποίηση με N-layryl Sarcosinate, για όλα τα στελέχη [C:cytoplasm, CM: cytoplasmic membrane, OM: outer membrane, P: periplasm]

No.	Accession Number	Identified Proteins	Protein MW	PI Value	Localization	Biological Process	WTPCC7120 (A)	hupL- (B)	hoxH- (Γ)	hupL$^-$ /hoxH$^-$ (Δ)
1	Q8YR44	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase	44832	5.75	C	Acyltransferase	–	15	–	–
2	Q8YVM4	Substrate-binding protein of ABC transporter	47683	8.56	P	Amino acid transport	–	–	9	–
3	P12408	ATP synthase gamma chain	35277	8.88	CM	ATP synthesis, Hydrogen ion transport, Ion transport,	–	15	–	–
4	P12405	ATP synthase subunit alpha	54422	5.11	CM	ATP synthesis, Hydrogen ion transport, Ion transport,	–	–	–	8
5	P06540	ATP synthase subunit beta	52016	5.02	CM	ATP synthesis, Hydrogen ion transport, Ion transport,	–	–	–	9
6	P00879	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	53045	6.25	C	Calvin cycle, Carbon dioxide fixation, Photorespiration, Photo synthesis	–	4	–	–
7	P48991	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1	38518	5.10	C	Carbohydrate biosynthesis	–	–	13	–
8	Q8YQL3	Nutrient stress-induced DNA-binding protein	20687	5.07	C	Cellular iron ion homeostasis, response to stress	–	22,23	20	–
9	Q8YU40	Cysteine synthase	33784	5.61	C	Citric acid pathway	–	–	15	–
10	P58558	Ferredoxin--NADP reductase	48838	7.66	C	Ferredoxin-NADP+ reductase activity	–	–	14,15	–
11	Q8YY05	Glucose-6-phosphate isomerase	5781	5.36	C	Gluconeogenesis, Glycolysis	6	–	–	–
12	P00964	Glutamine synthetase	53136	5.28	C	Heterocyst differentiation,Nitrogen fixation	7	5	6	8
13	Q8YP11	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	77790	5.05	C	mRNA catabolic process	–	3	2	–
14	Q8YR42	Alr3608 protein	58272	9.41	OM	Nitrous oxidase accessory protein	–	–	–	8

15	Q8YT39	Alr2887 hypothetical protein	80838	6.34	OM	Outer membrane protein	6	4,5	6	–
16	P51778	Transaldolase	36165	5.19	C	Pentose phosphate pathwaay	16	–	–	–
17	Q8YRU9	Transketolase	72071	5.88	C	Pentose phosphate pathway	4	2	4	6
18	Q8YVW2	All1861 protein	28440	10.22	OM	Peptidoglycan -binding protein	–	20	–	–
19	Q8YNC5	Peroxiredoxin	22361	4.87	C	Peroxiredoxin activity	16,17	17	–	–
20	P07123	Phycobilisome 32.1 kDa linker polypeptide, phycocyanin-associated, rod	32209	9.33	CM	Photosynthesis	10	13,16	–	13
21	P29989	Phycobilisome rod-core linker polypeptide CpcG4	29323	9.31	CM	Photosynthesis	14,17	14,18,19	–	15,16
22	P29986	Phycobilisome rod-core linker polypeptide CpcG1	31933	9.25	CM	Photosynthesis	17	–	–	–
23	P58573	Photosystem I reaction center subunit II	15156	9.3	Photosystem I reaction center	Photosynthesis	19	24	21	17
24	P07121	C-phycocyanin alpha chain	17457	6.83	CM	Photosynthesis	20	25,26,29	22	18
25	P07120	C-phycocyanin subunit beta	18387	5.00	CM	Photosynthesis	20	26,27,28	23	–
26	P58565	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 1	83375	6.74	CM	Photosynthesis	–	1	–	–
27	P0A407	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	83044	6.43	CM	Photosynthesis	–	2	–	–
28	P80559	Phycobiliprotein ApcE	126888	9.41	CM	Photosynthesis	–	18	–	2
29	P58577	Photosystem I reaction center subunit XI	18119	9.15	CM	Photosynthesis	–	–	24,26	–
30	P13907	Photosystem II manganese-stabilizing polypeptide	29638	4.91	CM	Photosynthesis	–	–	–	14
31	P80555	Allophycocyanin subunit alpha 1	17346	4.92	CM	Photosynthesis	–	–	–	18
32	Q8YNR3	All4499 protein	58564	5.02	OM	Porin	8,15	7	–	–

33	Q8YYL4	Porin major outer membrane protein (alr0834)	54439	4.61	OM	Porin	9	8	9	6
34	Q8YQ51	All3984 hypothetical protein	24713	10.24	Unknown	Predicted ATP-dependent ptotease	2,3,18	–	–	–
35	Q8YP63	Elongation factor Tu	44811	5.25	C	Protein biosynthesis	–	–	18	10
36	Q8YYA5	Alr0946 protein	16059	5.43	C	Regulator of gene expression	19	–	21	17
37	Q8YW74	Chaperone protein dnaK2 (heat shock protein)	67907	4.84	C	Response to stress	–	4	–	6
38	Q8YXN9	DNA-binding protein, starvation-inducible	20874	5.01	C	Response to stress	–	22	–	–
39	Q8YQZ8	60 kDa chaperonin 1	5797	4.90	C	Response to stress	–	–	–	7
40	Q8YZR0	Alr0397 protein	94333	4.79	OM	Siderophore transmembrane transporter activity	–	2	–	–
41	Q8YRW8	All3324 protein	16439	5.56	Unknown	Structural molecule activity	18	–	–	–
42	Q8YUR6	Alr2269 hypothetical protein	89633	5.00	OM	SynToc75	4	1,3	3	–
43	Q8YQM2	Glutathione S-transferase	28948	5.00	C	Transferase activity	15	–	–	–
44	Q8YNL5	Uncharacterized protein alr4550	60581	4.76	OM	Transporter activity	2,3,8,11,15,16	6,7	7,8	9
45	Q8Z0M2	Ribonuclease PH	27152	5.38	C	tRNA processing	–	–	–	20
46	Q8YW53	All1763 protein	31060	9.89	Unknown	Unknown	–	14	–	–
47	Q8YWA6	Alr1709 protein	33298	5.08	Unknown	Unknown	–	17	–	–
48	Q8YM49	All5091 protein	34767	5.43	Unknown	Unknown	–	–	–	11
49	Q8YQ52	All3983 protein	42351	5.41	OM	Unknown	–	–	–	11
50	Q8YXC0	Alr1295 protein	29559	6.06	C	Unknown	–	–	–	14

<u>Πίνακας 3</u>: Συγκεντρωτικός πίνακας όλων των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν, με ισοηλεκτρική εστίαση από τις απομωνομένες ετεροκύστες για το στέλεχος hupL⁻

[C:cytoplasm, CM: cytoplasmic membrane, OM: outer membrane, P: periplasm]

No.	No.of spot	Accession Number	Identified Proteins	Protein MW	PI Value	Localization	Biological Process
1	**6,9,16,81,85**	P12405	ATP synthase subunit alpha	54422	5,11	CM	ATP synthesis, Hydrogen ion transport, Ion transport,
2	**8**	P06540	ATP synthase subunit beta	52016	5.02	CM	ATP synthesis, Hydrogen ion transport, Ion transport,
3	**31**	P06542	ATP synthase epsilon chain	14656	5.13	CM	ATP synthesis, Hydrogen ion transport, Ion transport,
4	**88,89**	P12408	ATP synthase gamma chain	35277	8.88	CM	ATP synthesis, Hydrogen ion transport, Ion transport,
5	**7,9,11,17,43,44, 45,102,73,85,88 ,89**	P00879	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	53045	6.25	C	Calvin cycle, Carbon dioxide fixation, Photorespiration, Photosynthesis
6	**64,65,112**	P06514	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	1282	7.76	C	Calvin cycle, Carbon dioxide fixation, Photosynthesis
7	**42**	Q8YXA5	Alr1310 protein	85772	5.39	Unknown	Carbohydrate metabolic process
8	**50**	Q8YPR9	Phosphoribulokinase	38455	5.53	C	Carbohydrate metabolic process
9	**97**	Q8YLW1	Mercuric reductase	54896	8.64	Unknown	Cell redox homeostasis
10	**101**	Q8Z0G8	Geranylgeranyl hydrogenase	44759	8.56	C	Chlorophyll biosynthetic process, Photosynthesis
11	**87,89**	Q8YUI2	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	35456	7.67	C	Fatty acid biosynthesis, Fatty acid metabolism, Lipid biosynthesis, Lipid metabolism

12	**79**	P58558	Ferredoxin-NADP reductase	48839	7.66	C	Ferredoxin-NADP+ reductase activity
13	**14,15**	Q8YPR1	Phosphoglycerate kinase	42441	5.15	C	Glycolysis
14	**50**	Q8YNK2	Fructose-bisphosphate aldolase	38617	5.49	C	Glycolysis
15	**114**	P05514	DNA-binding protein HU	10072	9.57	C	Heterocyst differentiation
16	**9**	P00964	Glutamine synthetase	53136	5.28	C	Heterocyst differentiation,Nitrogen fixation
17	**97**	Q8YVN4	Protease	59607	8.77	C	Metalloendopeptidase activity
18	**98,102,105**	Q8YR42	Alr3608 protein	58272	9.41	OM	Nitrous oxidase accessory protein
19	**63**	Q44555	RNA-binding protein	12030	6.33	C	Nucleotide binding
20	**62**	Q8YRP2	Nucleoside diphosphate kinase	16604	5.94	C	Nucleotide metabolism
21	**4,6**	Q8YT39	Alr2887 hypothetical protein	80904	6.34	OM	Outer membrane protein
22	**9**	Q8YW28	Alr1788 protein	55800	5.24	CM	Oxidoreductase activity
23	**13**	Q8YPU6	NADH dehydrogenase	45675	4.95	C	Oxidoreductase activity
24	**91**	Q8YXI8	All1225 protein	34707	6.78	Unknown	Oxidoreductase activity
25	**43**	Q8YRU9	Transketolase	72071	5.88	C	Pentose phosphate pathway
26	**23**	Q8YNC5	Peroxiredoxin	22361	4.87	C	Peroxiredoxin activity
27	**18, 110**	P13907	Photosystem II manganese-stabilizing polypeptide	29638	4.91	CM	Photosynthesis

28	**18,70,106, 111,112**	P58573	Photosystem I reaction center subunit II	15156	9.3	Photosystem I reaction center	Photosynthesis
29	**25,26**	Q93SX0	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit 1	19198	5.32	CM	Photosynthesis
30	**27,28**	P07120	C-phycocyanin subunit beta	18389	5.00	CM	Photosynthesis
31	**27,28**	P80555	Allophycocyanin subunit alpha 1	17346	4.92	CM	Photosynthesis
32	**29**	P80556	Allophycocyanin subunit alpha-B	17811	5.06	CM	Photosynthesis
33	**30,29**	P80557	Allophycocyanin subunit beta	17305	5.45	CM	Photosynthesis
34	**33,31,34,109**	P58564	Photosystem I reaction center subunit III	17833	6,58	Photosystem I reaction center	Photosynthesis
35	**39,4,69**	P0A410	Photosystem I iron-sulfur center	8816	5.65	CM	Photosynthesis
36	**49**	Q8YRT8	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H	45216	6.06	CM	Photosynthesis
37	**55,56**	Q9WM6	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit	22283	6.22	CM	Photosynthesis
38	**58,60,61,19,95, 106**	P07121	C-phycocyanin alpha chain	17457	6.83	CM	Photosynthesis
39	**70,71,72**	P58575	Photosystem I reaction center subunit IV	7886	9.40	CM	Photosynthesis
40	**72**	P07124	Phycobilisome 8.9 kDa linker polypeptide, phycocyanin-	8895	9.77	CM	Photosynthesis

			associated, rod				
41	**72**	P80558	Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated, core	7840	10.71	CM	Photosynthesis
42	**93**	Q44240	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K	27493	7.64	CM	Photosynthesis
43	**94**	P29986	Phycobilisome rod-core linker polypeptide CpcG1	31933	9.25	CM	Photosynthesis
44	**103,104**	P07123	Phycobilisome 32.1 kDa linker polypeptide, phycocyanin-associated, rod	32209	9.33	CM	Photosynthesis
45	**79,99**	Q8YP14	All4388 protein	51580	9.09	OM	Polysaccharide transmembrane transporter activity
46	**10**	Q8YP63	Elongation factor Tu	44811	5.25	C	Protein biosynthesis
47	**16**	Q8YM80	Alr5059 protein	40493	5,16	P	Protein folding
48	**41**	Q8YST5	Endopeptidase Clp ATP-binding chain	93140	5.56	C	Protein metabolic process, nucleoside-triphosphatase activity
49	**3**	Q8YW74	Chaperone protein dnaK2 (heat shock protein)	68037	4.84	C	Response to stress
50	**5**	Q8YQZ8	60 kDa chaperonin 1	57973	5.09	C	Response to stress-protein refolding

51	**23**	Q8YQX8	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2	25341	4.97	C	Serine-type endopeptidase activity
52	**26**	Q8YSZ1	Superoxide dismutase [Fe]	22384	5,32	C	Superoxide dismutase activity
53	**2,3**	Q8YUR6	Alr2269 hypothetical protein	89633	5.00	OM	SynToc75
54	**46,113**	P22705	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	147583	4.81	C	Transcription
55	**66**	Q9L422	Nitrogen regulatory protein PII	12492	7.95	C	Transcription
56	**21**	Q8YQM2	Glutathione S-transferase	28948	5.00	C	Transferase activity
57	**94**	Q8YR44	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase	44832	5.75	C	Transferase activity
58	**63**	Q8YMX2	30S ribosomal protein S6	12557	6.34	Ribosome	Translation
59	**35**	Q8YW84	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit M	13473	4.66	CM	Transport
60	**82**	Q8YUH4	ABC transporter ATP-binding protein	36699	6.37	Unknown	Transport
61	**115**	Q8YNL5	Uncharacterized protein alr4550	60581	4.76	OM	Transporter activity
62	**19**	Q8YUK4	All2342 protein	28796	5.12	Unknown	Unknown
63	**20**	Q8YRZ5	Alr3297 protein	22871	5.25	Unknown	Unknown
64	**34**	Q8YX60	All1355 protein	18581	7.76	Unknown	Unknown

65	**36**	Q8YNQ0	Alr4514 protein	12018	4.64	Unknown	Unknown
66	**51,52,90,92**	Q8YK66	Alr8051 protein	34455	6.11	Unknown	Unknown
67	**66**	D4P2J4	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	5450	4.22	Unknown	Unknown
68	**68**	Q8YYI1	Carbon dioxide concentrating mechanism protein	12318	6.74	C	Unknown
69	**69**	Q8YYI0	Carbon dioxide concentrating mechanism protein	10905	6.09	C	Unknown
70	**70**	Q8ZOI8	UPF0296 protein asr0105	9739	8.29	Unknown	Unknown
71	**74,75,76,83,84, 85,86,114**	Q8YYI3	Carbon dioxide concentrating mechanism protein	59465	6.77	C	Unknown
72	**96**	Q8YTI1	All2736 protein	19243	7.48	Unknown	Unknown
73	**106**	Q8ZSB3	All7598 protein	18763	9.49	Unknown	Unknown
74	**107**	Q8ZSA4	All7607 protein	17490	9.64	Unknown	Unknown
75	**116**	Q8YN82	All4688 protein	31892	4.63	Unknown	Unknown