

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ



**Σχολή Θετικών και τεχνολογικών επιστημών
Τομέας Βιοχημείας-Τμήμα Χημείας**

Μεταπτυχιακό δίπλωμα

**Μελέτη του Μεταβολισμού του Θείου στο
Φωτοσυνθετικό Θειοβακτήριο *Chlorobaculum
tepidum*.**

Ακτουδιανάκη Κατερίνα

Χημικός, MSc

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στον τομέα Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επιστημονική επιμέλεια του αναπληρωτή καθηγητή **Γεωργίου Τσιώτη**, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για τη συνεργασία των τεσσάρων χρόνων που είχαμε.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. **Δημήτριο Γανωτάκη** του Τμήματος Χημείας καθώς και τον καθηγητή κ. **Κυριάκο Κοτζαμπάση** του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή μου.

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

Τους διδάκτορες **Παύλο Ζάρμπα** και **Παναγιώτα Νικολάου** του εργαστηρίου του κ. Μιχαλόπουλου του τμήματος Χημείας για τα αποτελέσματα της ιοντικής χρωματογραφίας.

Τον **Misha Kudryashev** του Biozentrum της Βασιλείας για τα αποτελέσματα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Τα άτομα του εργαστηρίου του κ. Τσιώτη, για την άψογη συνεργασία και για το υπέροχο κλίμα που δημιουργήσαμε όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τις διδακτορικούς, **Αντιγόνη Νικολάκη** και **Κατερίνα Αρβανίτη** για την πολύτιμη βοήθειά τους, τις συμβουλές τους και τη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τα άτομα του εργαστηρίου του κ. **Γανωτάκη** για τη συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τους γονείς μου **Βασίλη** και **Σίσσυ** καθώς και την αδερφή μου **Ζέτα** για όσα έχουν κάνει για μένα όλα αυτά τα χρόνια.

Στους γονείς μου Βασίλη και Σίσσυ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
3.1 Καλλιέργεια και ανάπτυξη του θειοβακτηρίου <i>Chlorobulum tepidum</i>	41
3.2 Καμπύλες ανάπτυξης	42
3.3 Ανάπτυξη βακτηρίου σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειούχων ενώσεων..	45
3.4 Μελέτη του μεμβρανικού πρωτεόματος.....	46
3.4.1 Σύγκριση του μεμβρανικού και υδατοδιαλυτού πρωτεόματος με Tricine SDS-PAGE.....	46
3.4.2 Μελέτη του μεμβρανικού πρωτεόματος με Tricine SDS-PAGE.....	47
3.4.3 Ανάλυση του εμπλουτισμένου μεμβρανικού πρωτεόματος με Tricine SDS-PAGE.....	48
3.4.4 Συγκριτική μελέτη των ολικών μεμβρανικών πρωτεομάτων με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-SDS PAGE).....	49
3.4.5 Ανάλυση του ολικού και του εμπλουτισμένου μεμβρανικού πρωτεόματος με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-SDS PAGE).....	53
3.5 Δομική ανάλυση του βακτηρίου.....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	62
4.1 Ανάπτυξη βακτηρίου και ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας	62
4.2 Συγκριτική μελέτη των ολικών μεμβρανικών πρωτεομάτων με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-SDS PAGE).....	63
4.3 Ανάλυση του ολικού και του εμπλουτισμένου μεμβρανικού πρωτεόματος με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.....	63
4.4 Cryo-electron tomography.....	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	71

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ATP:** αδενοσινο-5-τριφωσφορικός εστέρας
- BChl:** βακτηριοχλωροφύλλη
- Chl:** χλωροφύλλη
- rRNA:** ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ
- tRNA:** μεταφορικό ριβονουκλεϊκό οξύ
- bp:** ζεύγη βάσεων
- CO₂:** διοξείδιο του άνθρακα
- FMO:** Fenna-Matthews-Olson πρωτεΐνη
- EDTA:** αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
- kDa:** kilodalton
- NADP:** νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο φωσφορικού εστέρα
- NADH:** νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
- PAGE:** ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου
- RC:** κέντρο αντίδρασης
- PSI:** φωτοσύστημα τύπου I
- SDS:** δωδεκυλοθειϊκό νάτριο
- MS:** φασματοσκοπία μάζας
- MALDI:** ιονισμός με laser απόπτωση, υποβοηθούμενη με υπόστρωμα
- TOF:** ανιχνευτής χρόνου πτήσης
- Tris:** τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο
- Tricine:** N-τρις(υδροξυμέθυλο-)μεθυλο-γλυκίνη
- DTT:** διθειοθρεϊτόλη
- TEMED:** N,N,N',N'-τετραμεθυλοδιαμίνη
- TCA:** τριχλωροοξικό οξύ
- Cryo-ET :** κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Chlorobaculum tepidum* είναι ένα Gram-αρνητικό, πράσινο θειοβακτήριο το οποίο χαρακτηρίζεται απ' την ικανότητά του να αναπτύσσεται μέσω αναερόβιας φωτοσύνθεσης, κατά την οποία οξειδώνονται ανόργανες ενώσεις θείου (θειούχα, θειοθειικά) για την παραγωγή ισχυρά ανηγμένων φερρεδοξινών χρησιμοποιώντας κέντρα αντίδρασης τύπου I (σιδήρου-θείου). Η καθήλωση του CO₂ γίνεται μέσω του αντίστροφου κύκλου του καρβοξυλικού οξέος. Στο θρεπτικό ανάπτυξης του *Cba. tepidum*, στο οποίο θειούχα και θειοθειικά συνυπάρχουν, οξειδώνονται κατά προτίμηση τα θειούχα με σχηματισμό εξωκυττάρων σφαιριδίων στοιχειακού θείου. Καθώς η ποσότητα θειούχων στο υδατικό διάλυμα ανάπτυξης εξαντλείται, το στοιχειακό θείο και τα θειοθειικά οξειδώνονται σε θειικά. Παρ' όλα αυτά ο μοριακός μηχανισμός του φαινομένου αυτού δεν έχει κατανοηθεί πλήρως.

Για να αποκτήσουμε μια εικόνα για το μεταβολισμό του θείου καθώς και τη μεταφορά του μέσω της μεμβράνης, το *Cba. tepidum* αναπτύχθηκε κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Τα κύτταρα του *Cba. tepidum* αναπτύχθηκαν κάτω από αναερόβιες συνθήκες στους 48 °C για 24-30 ώρες παρουσία 7,7mM θειούχων και 4mM θειοθειικών (πηγή Α), παρουσία μόνο 4mM θειοθειικών (πηγή Β) και παρουσία μόνο 7,7mM θειούχων (πηγή Γ). Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση που έχουν τα θειοθειικά στο σχηματισμό ατομικού θείου, χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρία ορατού και ιοντική χρωματογραφία. Η μέτρηση των συγκεντρώσεων Bchl c, S⁰ και SO₄²⁻ έδειξαν ότι η βέλτιστη ανάπτυξη του βακτηρίου πραγματοποιείται μεταξύ 26-28 ωρών και ευνοείται περισσότερο για την πηγή Α. Επιπλέον η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων θειούχων, που αποτελούν και τον κύριο δότη ηλεκτρονίων της φωτοσύνθεσης, βρέθηκε ανάλογη με τη συγκέντρωση της Bchl c, συνεπώς και με την αύξηση των κυττάρων του βακτηρίου.

Για την περαιτέρω κατανόηση του μηχανισμού του μεταβολισμού του θείου, αναλύθηκε το μεμβρανικό πρωτεόμα του βακτηρίου στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξής του. Για την ανάλυση και τον χαρακτηρισμό του, το ολικό πρωτεόμα χωρίστηκε σε δύο κλάσματα, το μεμβρανικό και το υδατοδιαλυτό. Η ανάλυση του μεμβρανικού πρωτεόματος πραγματοποιήθηκε με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Tricine-SDS, συνδυάζοντας δύο πηκτές διαφορετικών συγκεντρώσεων. Από τα 59

πρωτεϊνικά στίγματα που αποκόπηκαν απ' την πηκτή και υπέστησαν κατεργασία με θρυψίνη, τα 56 ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS/MS. Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν βρέθηκε να έχουν λειτουργικό ρόλο στη φωτοσύνθεση, τη μεταφορά ηλεκτρονίων και τη μετάφραση. Βάση της λειτουργίας τους, βρέθηκε ότι ένα ποσοστό 32% αυτών των πρωτεϊνών είναι ριβοσωμικές. Γι' αυτό το λόγο έγινε δοκιμή της απομάκρυνσης των πρωτεϊνών αυτών απ' τις μεμβράνες χρησιμοποιώντας EDTA. Το εμπλουτισμένο πλέον μεμβρανικό πρωτέομα συλλέχθηκε και αναλύθηκε με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Tricine-SDS. Τα αποτελέσματα ταυτοποίησης των πρωτεϊνικών στιγμάτων έδειξαν την παρουσία ενός μεγαλύτερου αριθμού ριβοσωμικών πρωτεϊνών, και συγκεκριμένα ένα ποσοστό 52%, σε σχέση με αυτόν που βρέθηκε στο μη εμπλουτισμένο μεμβρανικό πρωτέομα. Γι' αυτό το λόγο η μέθοδος εμπλουτισμού του μεμβρανικού πρωτεόματος απορρίφθηκε. Έτσι αναλύθηκαν και τα ολικά μεμβρανικά κλάσματα των πηγών Β και Γ με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση και τα πρωτεϊνικά στίγματα που προέκυψαν δεν υπερέβησαν σε αριθμό αυτά της πηκτής της πηγής Α. Οι ταυτοποιήσεις των στιγμάτων των πηκτών των πηγών Β και Γ, η εύρεση της θέσης τους μέσα στο κύτταρο καθώς και η προβλεπόμενη απ' το γονιδίωμα λειτουργία τους, δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές. Η μόνη διαφορά ίσως παρουσιάζεται στην ύπαρξη λιγότερων ριβοσωμικών πρωτεϊνών κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου στην πηγή Α.

Το *Cba. tepidum* είναι ένα βακτήριο που διακρίνεται για την παρουσία μεγάλων συμπλεγμάτων-κεραίες τα οποία είναι προσκολλημένα στην κυτταροπλασματική του μεμβράνη μέσω της πρωτεΐνης FMO και έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το φως. Τα περισσότερα συστατικά του μηχανισμού έχουν γίνει γνωστά σε βιοφυσικό επίπεδο, ωστόσο η δομική διαμόρφωση αυτών των οργάνων συγκομιδής φωτός μέσα στο κύτταρο δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Έτσι στη συγκεκριμένη εργασία παρουσιάζεται για πρώτη φορά η τρισδιάστατη απεικόνιση της αρχιτεκτονικής του κυττάρου του *Cba. tepidum*, χρησιμοποιώντας cryo-electron microscopy. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο επιτυγχάνεται η έρευνα ολόκληρων ενυδατωμένων κυττάρων, τα οποία έχουν αναπτυχθεί σε διαφορετικές πηγές θείου. Τα τομογραφήματα που προκύπτουν μας δίνουν τη δυνατότητα διάκρισης των χλωροσωμάτων, σε ελλειψοειδείς διαμορφώσεις με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα, καθώς και των συνδετικών στοιχείων μεταξύ χλωροσωμάτων και κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

ABSTRACT

Chlorobaculum tepidum is a Gram-negative bacterium which is characterized by its ability to perform anoxygenic photosynthesis in which oxidation of inorganic sulfur compounds (sulfide, polysulfide or thiosulfate) or H₂ is coupled to the production of strongly reducing, soluble ferredoxins by the way of a type I (iron–sulfur-type) reaction center. Carbon dioxide is assimilated by the reverse tricarboxylic acid cycle. In cultures of *Cba.tepidum* that contain both sulfide and thiosulfate, sulfide is oxidized preferentially while sulfur globules are formed. Following sulfide depletion, thiosulfate and sulfur globules are oxidized to sulfate. The molecular mechanism of this phenomenon is poorly understood.

To gain insight into the sulfur metabolism and the sulfur transport through the membrane, the membrane proteome of *Cba. tepidum* grown under different conditions was analysed. *Cba. tepidum* cells were grown under anaerobic conditions for 24–30 h at 48°C in the presence of both 7,7mM sulfide and 4mM of thiosulfate (source A), 4mM of thiosulfate (source B) and 7,7mM of sulfide (source C). In order to study the effect that thiosulfate had on the formation of elemental sulfur, the bacterium was grown in the two different sources A and C. The growth rate of the bacterial cells as indicated by the Bchl c concentration, the oxidation rate of sulfide as indicated by elemental sulfur's concentration and the transformation of the sulfur compounds to sulfate were measured and the results showed that *Cba. tepidum* reaches its optimal growth between 26 to 28 hours and it is favored when it is cultured in the A source. Furthermore, the bacterium was cultured in the addition of increasing concentration of sulfide, which is the major electron donor in photosynthesis. The results showed that this addition was proportional to the concentration of Bchl c and therefore to the cell yield of the bacterium.

For the further understanding of the mechanism of sulfur metabolism, the whole membrane proteome of the bacterium, in its different growth conditions, was analyzed. The whole proteome was subfractionated in the membrane and the water-soluble proteome. Analysis of the membrane proteome from *Cba tepidum* was achieved by using two-dimensional SDS-Tricine electrophoresis. Protein spots are separated after the coupling of two SDS-gels of different total acrylamide concentration. From the 59 protein spots that were excised from the gel and treated

with trypsin, only the 56 were identified by the mass spectrometer MALDI-TOF MS/MS. The results showed that most of these proteins are being critical in photosynthesis, electron transport and translation. The location of the proteins inside the cell, showed the presence of ribosomal proteins in a rate of 32%, in the proteome of *Cba tepidum*. Therefore, the removal of these proteins from the membranes using EDTA, was tested. The enriched membrane proteome was then collected and analyzed using two-dimensional SDS-PAGE. The results, as determined by MALDI-TOF MS/MS, showed a significant percentage, 52%, of proteins were ribosomal. For this reason the idea of the enrichment of the membrane proteome was rejected. Thus, the total membrane proteomes of the two other sources of the bacterium were analyzed by two-dimensional SDS-PAGE and the protein spots that obtained did not exceed in number those of the gel of source A. The identifications of the protein spots of the gels of sources B and C, their location within the cell and the predicted from the genome function, showed no significant differences. The only difference perhaps is the presence of less ribosomal proteins during growth of the bacterium in source A.

Cba tepidum is a bacterium that is distinguished because of the large light-harvesting complexes-antennas that contains. These complexes are called chlorosomes, are attached to the cytoplasmic membrane through the FMO protein and are able to capture the light. Most components of the sulfur metabolism have been known in biophysical level, however, the structural configuration of these light-harvesting organs within the cell is not fully understood. For the first time, in this study, a three dimensional imaging of the architecture of the cell of *Cba. tepidum*, using cryo-electron microscopy, is presented. The combination of cryo-preparation, keeping samples in their natural hydrated environment, and three-dimensional (3D) electron tomographic imaging of intact cells allowed insights into the *in situ* organization of cells at macromolecular resolution.

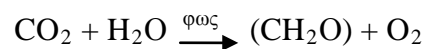
ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

- *Chlorobaculum tepidum*
- Φωτοσύνθεση
- Μεταβολισμός θείου
- Ανηγγμένες ενώσεις θείου
- Χλωρόσωμα
- Bchl c
- S^0
- S^{2-}
- $S_2O_3^{2-}$
- SO_4^{2-}
- Ιοντική χρωματογραφία
- Πρωτεομική
- MALDI
- Cryo-EM
- EDTA
- *SDS-Tricine ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου*
- Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-SDS PAGE)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση είναι η διαδικασία που χρησιμοποιείται από τα φυτά και άλλους οργανισμούς, όπως φύκη και φωτοσυνθετικά βακτήρια, για τη μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική. Κατά τη φωτοσύνθεση, νερό και άλλοι δότες ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται για την παραγωγή υδατανθράκων. Το προϊόν της αερόβιας φωτοσύνθεσης είναι το οξυγόνο.



Η ενέργεια του φωτός μετατρέπεται σε χημική και σχηματίζονται μόρια ATP. Οι οργανισμοί που έχουν την ικανότητα να συνθέτουν υδατάνθρακες από CO₂ ονομάζονται φωτοαυτότροφοι. Τέτοιοι οργανισμοί είναι και τα πράσινα θειοβακτήρια στην κατηγορία των οποίων ανήκει και το *Chlorobaculum tepidum*.

1.2 Πράσινα θειοβακτήρια

Τα πράσινα θειοβακτήρια αποτελούν μια οικογένεια από υποχρεωτικά αναερόβια, φωτοαυτότροφα βακτήρια, τα οποία ανήκουν στο φύλο *Chlorobi* και στην οικογένεια *Chlorobiaceae* και χαρακτηρίζονται από μη-κινητό, σφαιρικό, ωοειδές ή σε μορφή ινιδίων, σχήμα κυττάρων [2].

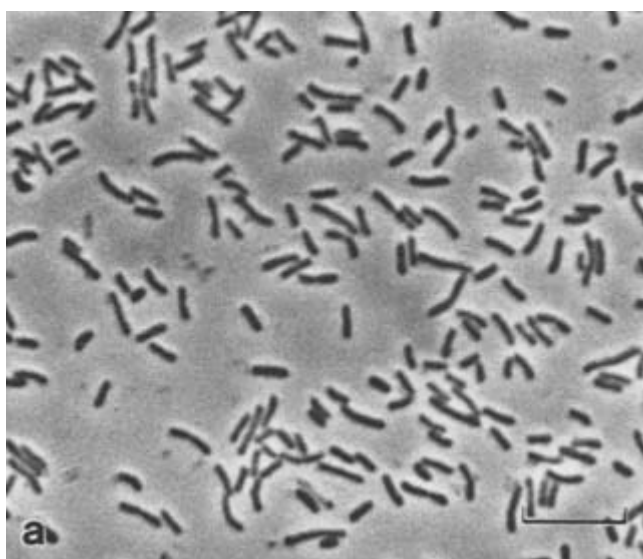
Η ανάπτυξή τους μέσω της φωτοσύνθεσης, πραγματοποιείται με την οξειδωση ανόργανων ενώσεων θείου μέσω ενός κέντρου αντίδρασης τύπου I. Κατά την οξειδωση των ενώσεων θείου σχηματίζεται στοιχειακό θείο, ως ενδιάμεσο, το οποίο εναποτίθεται εξωκυτταρικά.

Παρ' όλο που ο μεταβολισμός του θείου των πράσινων θειοβακτηρίων έχει μελετηθεί εκτενώς, δεν έχει επιτευχθεί ακόμα μια σφαιρική κατανόηση όσον αφορά τα μονοπάτια και τους μηχανισμούς της οξειδωσης των θειούχων, θειοθειϊκών και στοιχειακού θείου, τα οποία μπορούν να οξειδωθούν σε θειϊκά. [1]

1.3 *Chlorobaculum tepidum*

Στην κεντρική ηφαιστιογενή περιοχή της Νέας Ζηλανδίας, βρέθηκε ένα αναερόβιο μικροβιακό περιβάλλον επικαλυπτόμενο από ένα σκούρο πράσινο στρώμα από μονοκύτταρα βακτήρια. Το περιβάλλον αυτό χαρακτηρίστηκε από υψηλές συγκεντρώσεις θειούχων (0,2-2mM), όξινο pH (4,5-6) και θερμοκρασίες στην κλίμακα των 45-55 °C. Το αναερόβιο αυτό περιβάλλον παρουσίαζε αφθονία στοιχειακού θείου και η ανάπτυξη κυανοβακτηρίων και η παραγωγή οξυγόνου δεν ήταν ευνοϊκές. Το μικροβιακό αυτό στρώμα ονομάστηκε '*Travelodge Stream*' και τα στελέχη της καλλιέργειας των βακτηρίων που απομονώθηκαν απ' αυτό TLS. Οι οργανισμοί αυτοί οι οποίοι περιείχαν βακτηριοχλωροφύλλη c και χλωροσώματα, περιγράφηκαν ως ένα νέο είδος του γένους *Chlorobium*.

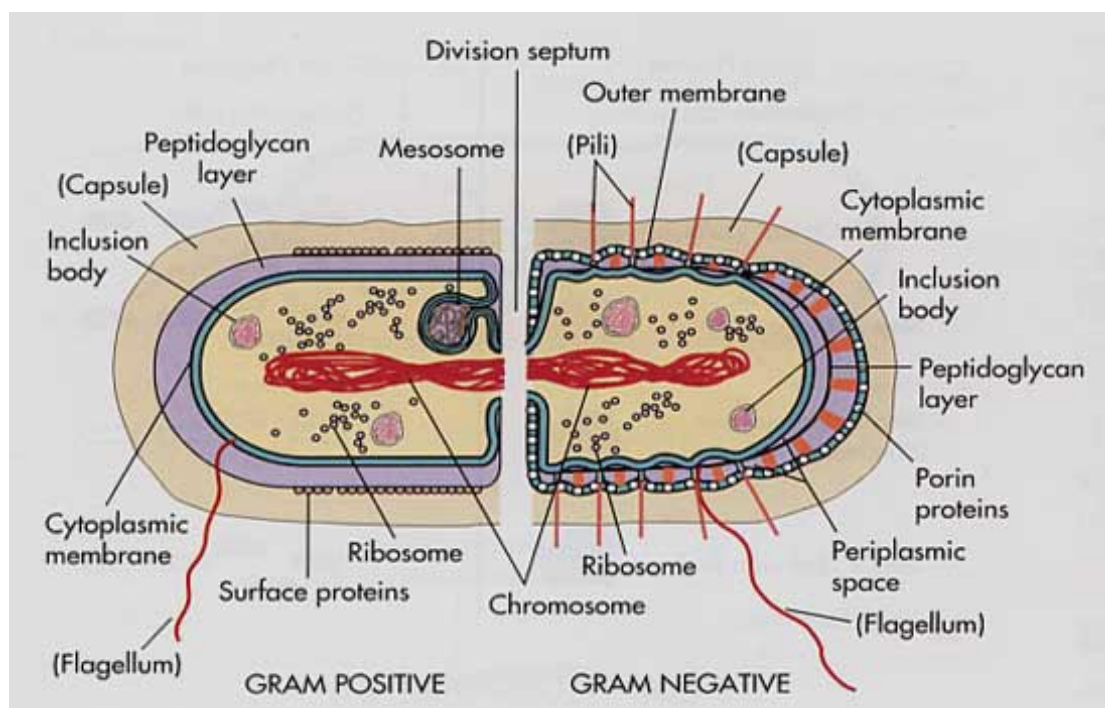
Τα μεμονωμένα κύτταρα του *Chlorobaculum tepidum*, όπως μετονομάστηκε, χαρακτηρίζονται ραμδόμορφα Gram αρνητικά, με διαστάσεις $0,6-0,8 \times 1,3-2,6 \mu\text{m}$ και αναπτύσσονται σε μικρές αλυσίδες (**Εικόνα 1**). Τα κύτταρα του βακτηρίου είναι τα μεγαλύτερα απ' αυτά των άλλων μεσόφιλων ειδών *Chlorobium*.



Εικόνα 1: φωτογραφίες αντίθετης φάσης των κυττάρων του στελέχους *Chlorobaculum tepidum* TLS.

Φωτογραφίες που ελήφθησαν από αναλύσεις με μικροσκόπιο διέλευσης σε λεπτές τομές των κυττάρων του βακτηρίου, αποκάλυψαν την κυτταρική δομή του βακτηρίου. Ως Gram-αρνητικό, το βακτήριο *Chlorobaculum tepidum* διαφέρει δομικά σε σχέση με ένα Gram-θετικό βακτήριο. Το κυτταρικό του τοίχωμα, εκτός απ' την κυτταροπλασματική διαθέτει μια επιπλέον κυτταρική μεμβράνη, την εξωτερική (Εικόνα 2). Η κυτταροπλασματική μεμβράνη περιβάλλεται από μια ανοιχτή περιοχή που ονομάζεται περιπλασματικός χώρος, στην οποία υπάρχει μια στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης και εξωτερικά της πεπτιδογλυκάνης βρίσκεται η εξωτερική αυτή μεμβράνη (OM). Η πεπτιδογλυκάνη προσδένεται ισχυρά στην εξωτερική μεμβράνη μέσω των υδρόφοβων περιοχών των λιποπρωτεϊνών που διαθέτει.

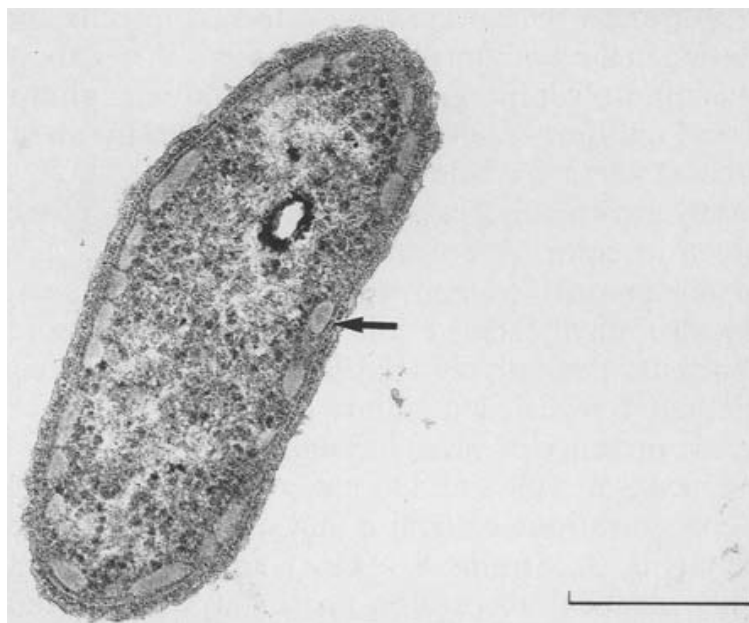
Η κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι ένα οργανωμένο συγκρότημα το οποίο αποτελείται από διπλοστιβάδα λιπιδίων, κυρίως φωσφολιπίδια, και πρωτεΐνες βυθισμένες στη λιπιδική στοιβάδα.



Εικόνα 2: Κυτταρική δομή θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

Σε αντίθεση με άλλα είδη φωτότροφων βακτηρίων, το *Chlorobaculum tepidum* δε διαθέτει ενδοκυτταροπλασματικά συστήματα αλλά εξειδικευμένες δομές, οι οποίες αποτελούνται από πολλαπλούς τύπους Bchl και καρτενοειδή που βρίσκονται διατεταγμένα μέσα σε λιπίδια δημιουργώντας κυστίδια προσδεδεμένα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι δομές αυτές ονομάζονται χλωροσώματα και είναι

υπεύθυνες για τη συλλογή του φωτός (**Εικόνα 3**). Τα κύτταρα του *Chlorobaculum tepidum* περιέχουν περίπου 200 χλωροσώματα ανά κύτταρο και γι' αυτό το λόγο, κάθε μεμονωμένο κύτταρο του *Chlorobaculum tepidum* μπορεί να περιέχει πάνω από 50 εκατομμύρια μόρια Bchl c. Τα χλωροσώματα του *Cba. tepidum* είναι μεγάλα και έχουν ανομοιογενή σε μέγεθος, με μήκος στα 100-200nm και διάμετρο στα 30-60nm. [15] Οι πρωτεΐνες και τα γαλακτολιπίδια είναι εντοπισμένα στην επιφάνεια του χλωροσώματος, όπου σχηματίζουν ένα φάκελο. Ο χλωροσωμικός αυτός φάκελος αποτελείται μια στοιβάδα γλυκολιπιδίων και σ' αυτόν βρίσκονται 10 διαφορετικές πρωτεΐνες.[6] Εννέα απ' τις δέκα πρωτεΐνες αυτές μπορούν να απαλειφθούν χωρίς να επιφέρουν καμία αλλαγή στη δομή και τη λειτουργία του φακέλου. Η μία απ' τις δέκα αυτές πρωτεΐνες, η CsmA, είναι η μεγαλύτερη σε αφθονία χλωροσωμική πρωτεΐνη, βρίσκεται στην παρακρυσταλλική επιφάνεια που συνδέει τα χλωροσώματα με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και δεν μπορεί να απενεργοποιηθεί απ' το γονιδίωμα και σχηματίζει το λεγόμενο 'baseplate'. Η CsmA περιέχει μόρια Bchl a και το baseplate δομείται από διμερή της πρωτεΐνης αυτής. [16,17]



Εικόνα 3: φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από λεπτή τομή ενός κυττάρου του *Chlorobium tepidum* TLS. Το βέλος μαρτυρεί την ύπαρξη χλωροσωμάτων. Marker bar = 0,5 μm [8]

Η συλλεγόμενη ηλιακή ενέργεια από τα χλωροσώματα μεταφέρεται μέσω πρωτεϊνών (FMO) στα κέντρα αντίδρασης (RCs) για τη σύνθεση ATP. Το κέντρο αντίδρασης του *Chlorobaculum tepidum* χρησιμοποιεί φωτοσύστημα τύπου I (Fe-S) για την οξείδωση του νερού παράγοντας οξυγόνο και πρωτόνια και αποτελεί ένα ομοδιμερές,

εφόσον αποτελείται από δύο όμοιες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Επιπλέον η αυτότροφη καθήλωση του CO₂ πραγματοποιείται μέσω του ανηγμένου κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος, χρησιμοποιώντας ηλεκτρόνια που προέρχονται από ανηγμένες ενώσεις θείου. Συγκεκριμένα για την ανάπτυξή του, το *Chlorobaculum tepidum* οξειδώνειθειούχα (S²⁻) καιθειοθειϊκά (S₂O₃²⁻) σεθειϊκά (SO₄²⁻), χρησιμοποιώντας το ενδιάμεσο στάδιο του στοιχειακού θείου ως μέσο αποθήκευσής του. Ταθειούχα από μόνα τους δεν αποτελούν καλούς δότες ηλεκτρονίων της φωτοσύνθεσης, ακόμα και αν βρίσκονται στη μέγιστη συγκέντρωσή τους, η οποία ανέρχεται στα 4mM. Έτσι λοιπόν η προσθήκηθειοθειϊκών είναι απαραίτητη για το μεγαλύτερο βαθμό ανάπτυξης του βακτηρίου. [8] Αυτό υποδηλώνει ότι το βακτήριο διαθέτει ένα ιδιαίτερα εξελιγμένο σύστημα οξείδωσης όχι μόνοθειούχων αλλά καιθειοθειϊκών.

Η ομοδιμερής φύση του κέντρου αντίδρασης του *Cba. tepidum* και η ύπαρξη των σπανίων χαρακτηριστικών που προαναφέρθηκαν, ‘ανέδειξαν’ το βακτήριο ως πρόγονο των φωτοαυτότροφων οργανισμών [36] και ως πρότυπο για τη μελέτη της και την κατανόηση της εξέλιξης του μηχανισμού της φωτοσύνθεσης και του ενεργειακού μεταβολισμού.

Το πλήρες γονιδίωμα του *Cba. tepidum* αποκωδικοποιήθηκε πρόσφατα απ’ τον Eisen (2002) [18] και βρέθηκε ότι είναι ένα απλό κυκλικό χρωμόσωμα 2,154,946 ζευγών βάσεων. Πρόκειται για το πρώτο γονιδίωμα που αναλύθηκε απ’ την οικογένεια των *Chlorobiaceae*. Βρέθηκε ότι 2,288 πρωτεΐνες εκφράζονται στο γονιδίωμα του *Cba. tepidum* και σε σύγκριση με άλλα γονιδιώματα, βρέθηκαν γονίδια τα οποία είναι συντηρητικά μεταξύ των φωτοσυνθετικών οργανισμών. Η λειτουργία πολλών απ’ αυτά δεν είναι γνωστή και πιθανόν να παίζουν πρωτότυπους ρόλους στη φωτοσύνθεση ή στη φωτοβιολογία. Τα γενικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος του *Cba. tepidum* φαίνονται στον πίνακα 1.

Πλήρες μέγεθος του γονιδιώματος (bp)	2,154,946
Συνολικός αριθμός αλληλουχιών	36,670
Συνολικός αριθμός CDS	2,288
Μέσο μέγεθος CDS (bp)	837
Ποσοστό % που κωδικοποιείται	88,9
Πρωτεΐνες όμοιες με πρωτεΐνες γνωστής λειτουργίας και λειτουργικής κατηγορίας	1,217
Πρωτεΐνες όμοιες με πρωτεΐνες γνωστής λειτουργίας αλλά άγνωστης λειτουργικής κατηγορίας	98
Συντηρητικές υποθετικές πρωτεΐνες	293
Υποθετικές πρωτεΐνες	680

Πίνακας 1: Γενικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος του *Cba. tepidum*

1.4 Φωτοσύνθεση στο *Cba.tepidum*

Το πρώτο βήμα στην αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας είναι η απορρόφηση φωτονίων από ένα σύστημα συγκομιδής φωτός (κεραία).

Εξαιτίας της ύπαρξης αυτών των πολύ αποτελεσματικών κεραιών, το *Chlorobaculum tepidum* αποτελεί τον πιο ενεργητικά αποτελεσματικό οργανισμό σε σχέση με τους υπόλοιπους φωτότροφους οργανισμούς. Το γεγονός αυτό, επιτρέπει στο βακτήριο να επιβιώνει στις χαμηλότερες συνθήκες φωτός (μικρότερη του 0,01% του φωτός ημέρας) σε σχέση με τους υπόλοιπους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. [3]

Το μοναδικό αυτό σύστημα κεραιών ονομάζεται χλωρόσωμα και είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά της ενέργειας του φωτός στο κέντρο αντίδρασης (RC) του μηχανισμού φωτοσύνθεσης των πράσινων θειοβακτηρίων. Τα χλωροσώματα, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το φως πολύ αποτελεσματικά με περίπου 200.000 μόρια Bchl c, d ή e ανά χλωρόσωμα και αποτελούν τη μεγαλύτερη, γνωστή, φωτοσυνθετική κεραία με μια φωτοσυνθετική μονάδα μερικών χιλιάδων μορίων χλωροφύλλης ανά RC. Με 5000 μόρια χλωροφύλλης ανά RC θα πρέπει να υπάρχουν 40RCs ανά χλωρόσωμα. Οι Bchls c, d ή e στο χλωρόσωμα, διατάσσονται σε μη πρωτεϊνικούς σωληνοειδείς σωρούς με μέγιστη απορρόφηση στα 720-750nm. [4] Τα χλωροσώματα χρησιμοποιούν αυτές τις ράβδους για τη συλλογή του φωτός και η ενέργεια μεταφέρεται στο φωτοσυνθετικό κέντρο αντίδρασης στην κυτταροπλασματική

μεμβράνη. Η μεταφορά της ενέργειας προχωρά μέσω μιας μικρότερης δεξαμενής Bchl a-795, στη βάση του χλωροσώματος, την πρωτεΐνη FMO (Fenna-Matthews-Olson), η οποία εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 808nm. Η FMO μεταφέρει την ενέργεια στον ομοδιμερές πυρήνα του RC, μ' ένα διμερές Bchl a-840, ως τον κύριο δότη ηλεκτρονίων P840 και Chla-670 ως τον κύριο δέκτη ηλεκτρονίων A₀ (Εικόνα 4).

Ο πυρήνας του φωτοσυνθετικού κέντρου αντίδρασης του *Chlorobaculum tepidum*, είναι ένα ομοδιμερές το οποίο αποτελείται από 4 υπομονάδες επονομαζόμενες ως: PscA, PscB, PscC, PscD και την πρωτεΐνη FMO. Ο λόγος για τον οποίο ο πυρήνας έχει χαρακτηριστεί ως ομοδιμερές είναι ότι το PscA είναι το μοναδικό γονίδιο που έχει βρεθεί στο γονιδίωμα του *Chlorobaculum tepidum* και μοιάζει με το ετεροδιμερές PscA/ PscB του πυρήνα του φωτοσυστήματος I (PS I). Ο πυρήνας του RC αποτελείται από δύο αντίγραφα της μεγάλης μεμβρανικής πρωτεΐνης PscA και από ένα αντίγραφο της περιφερειακής πρωτεΐνης PscB.

Η PscA προσδένει τον πρωταρχικό δότη ηλεκτρονίων P840, ένα ειδικό ζευγάρι μορίων Bchl a, τον πρωταρχικό δέκτη ηλεκτρονίων A₀, παράγωγο της Chl-a, και το σύμπλεγμα 4Fe-4S που συμβολίζεται με Fx. Τα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης που συνδέονται με την υπομονάδα PscA, προσδένουν το σύμπλεγμα Fx. [14]

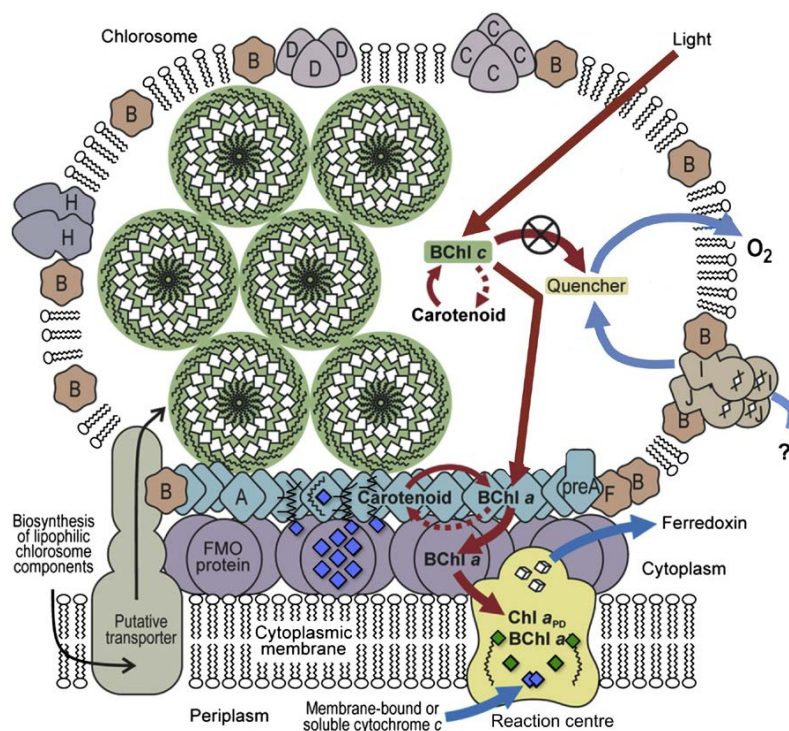
Η PscB προσδένει τα δύο τελικά 4Fe-4S συμπλέγματα F_A και F_B, τα επονομαζόμενα κέντρα 1 και 2 και συνδέεται με τη βακτηριακή φερρεδοξίνη.

Μόνο 16 μόρια Bchl a, 4 μόρια Chl-a και 2 καρροτενοειδή είναι συνδεδεμένα στον πυρήνα του κέντρου αντίδρασης. Το ποσοστό αυτό είναι σημαντικά μικρότερο απ' το αντίστοιχο του PS I, το οποίο περιέχει 85 μόρια Chl-a και 22 καρροτενοειδή.

Το φωτοσυνθετικό κέντρο αντίδρασης του *Chlorobaculum tepidum* συμπληρώνεται με δύο υπομονάδες του κυτοχρώματος c₅₅₁, επονομαζόμενες ως PscC, το οποίο μεταφέρει άμεσα τα ηλεκτρόνια στο ειδικό ζεύγος P840. Επίσης συμπληρώνεται με την πρωτεΐνη FMO, η οποία λειτουργεί σαν γέφυρα στη μεταφορά της ενέργειας του φωτός απ' τα χλωροσώματα στο RC. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εμφανίζεται στο RC ως τριμερές, με κάθε μονομερές να περιέχει 7 μόρια Bchl a. Τέλος το RC συμπληρώνεται με την υπομονάδα PscD, της οποίας ο ρόλος είναι ακόμα αβέβαιος αλλά υποστηρίζεται ότι συνδέεται με τη φερρεδοξίνη, πράγμα απαραίτητο για την αποτελεσματική μεταφορά της ενέργειας του φωτός απ' την κεραία στα χλωροσώματα, μέσω της πρωτεΐνης FMO. [5]

Η μεταφορά ηλεκτρονίων στα πράσινα θειοβακτήρια διαφέρει σημαντικά με αυτή των μωβ βακτηρίων στο ότι το μεμβρανικά-συνδεδεμένο φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης των πράσινων θειοβακτηρίων έχει τη δυνατότητα να μεταφέρει ηλεκτρόνια, μέσω της μεμβράνης, από ένα περιπλασματικό κυτόχρωμα c σ' ένα κυτταροπλασματικό μόριο φερρεδοξίνης. Η φερρεδοξίνη, που αποτελεί μια χαμηλού δυναμικού υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη σιδήρου-θείου, ανάγει τα νουκλεοτίδια της πυριδίνης (NAD⁺) σε μια αντίδραση που καταλύεται απ' το ένζυμο αναγωγή φερρεδοξίνης-NAD⁺, η οποία είναι φλαβοπρωτεΐνη [7]. Στην περίπτωση των πράσινων θειοβακτηρίων, στην καθήλωση του CO₂, ως ηλεκτρονιοδότες χρησιμοποιούνται ανηγμένη φερρεδοξίνη, NADH και NADPH και η αντίδραση γίνεται μέσω του ανηγμένου κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος.

Στο *Chlorobaculum tepidum*, όταν οι ανόργανες ενώσεις θείου οξειδώνονται, τα ηλεκτρόνια μπορούν να εισαχθούν στην φωτοσυνθετική μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω των κυτοχρωμάτων που βρίσκονται στον περιπλασματικό χώρο.



Εικόνα 4: δομική οργάνωση των χλωροσωμάτων, της πρωτεΐνης FMO και του κέντρου αντίδρασης τύπου I του *Chlorobaculum tepidum*. Τα μονοπάτια μεταφοράς της ενέργειας παριστάνονται με κόκκινα βέλη, ενώ η μεταφορά ηλεκτρονίων με μπλε βέλη. Δέκα πρωτεΐνες βρίσκονται στο χλωροσωμικό φάκελο και η παρακρυσταλλική επιφάνεια CsmA, που ενώνει τα χλωροσώματα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μέσω του FMO, βρίσκεται στη βάση του. Οι μπλε ρόμβοι αναπαριστούν τη Bchl a και τα πράσινα διαμάντια εσωτερικά του RC τα 4 μόρια Chl a. [6]

1.5 Μεταβολισμός θείου

Τα φωτότροφα θειοβακτήρια οξειδώνουν ανόργανες ενώσεις θείου, και συγκεκριμένα τα θειούχα, θειοθειικά και το στοιχειακό θείο, για την φωτοσυνθετική τους ανάπτυξη. Ευδοκιμούν σε μη οξικά θαλάσσια περιβάλλοντα και περιβάλλοντα γλυκού νερού, όπου θειούχα και νερό συνυπάρχουν. Αυτά τα βακτήρια χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα πράσινα θειοβακτήρια (GSB) και τα μωβ θειοβακτήρια (PSB).

Στα πλαίσια της προσπάθειας κατανόησης της βακτηριακής ποικιλότητας και του μεγάλου ενδιαφέροντος για τα πράσινα θειοβακτήρια, το ινστιτούτο γονιδιακής έρευνας (TIGR, Rockville, Maryland) αποκωδικοποίησε πλήρως και καταχώρησε σε βάσεις δεδομένων το γονιδίωμα του *Chlorobaculum tepidum*, το οποίο αναδείχθηκε ως πρότυπος οργανισμός για την ομάδα των πράσινων θειοβακτηρίων.

Η αλληλουχία του γονιδιώματος αύξησε σημαντικά την κατανόηση του μεταβολισμού του θείου στα πράσινα θειοβακτήρια και ειδικά στο *Chlorobaculum tepidum*, το πρώτο πράσινο θειοβακτήριο του οποίου η αλληλουχία του γονιδιώματος έγινε γνωστή. [18]

Το συγκεκριμένο στέλεχος αυξάνεται ραγδαίως παρουσία θειούχων (S^{2-}) και θειοθειικών ($S_2O_3^-$), τα οποία τα οξειδώνει για τη φωτοσυνθετική του ανάπτυξη δημιουργώντας στοιχειακό θείο (S^0) ως ενδιάμεσο. Το S^0 σχηματίζεται λόγω της ατελούς οξειδωσης του S^{2-} . Το στοιχειακό θείο εμφανίζεται ως μηδενικού-σθένους πολυσουλφάνια μακριάς αλυσίδας, που πιθανόν τερματίζονται από οργανικά κατάλοιπα. [19] Το στοιχειακό θείο εναποτίθεται εξωκυτταρικά, αλλά δεν είναι ακόμα γνωστό αν είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες. Η μείωση των απαιτούμενων αναλογιών (π.χ S^{2-}) έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη οξειδωση του S^0 σε θειικά (SO_4^{2-}).

Ο μηχανισμός που λαμβάνει μέρος στο σχηματισμό και την κατανάλωση του S^0 είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Έχει προταθεί ότι στον περιπλασματικό χώρο συσσωρεύονται ολιγοσουλφίδια (putative oligosulfide pool), που χρησιμεύουν ως ενδιάμεσο μεταξύ του S^0 και των ενζύμων που οξειδώνουν τις ενώσεις του θείου μέσα στο κύτταρο (**Εικόνα 5**).

Τα μόνα γνωστά γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξειδωση του S^0 , είναι τα γονίδια *dsr*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν το σύστημα της αναγωγής του θειώδους (dissimilatory sulfite reductase system), το οποίο είναι ομόλογο με αυτό των βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να ανάγουν τα θειικά, με τη μόνη διαφορά ότι το

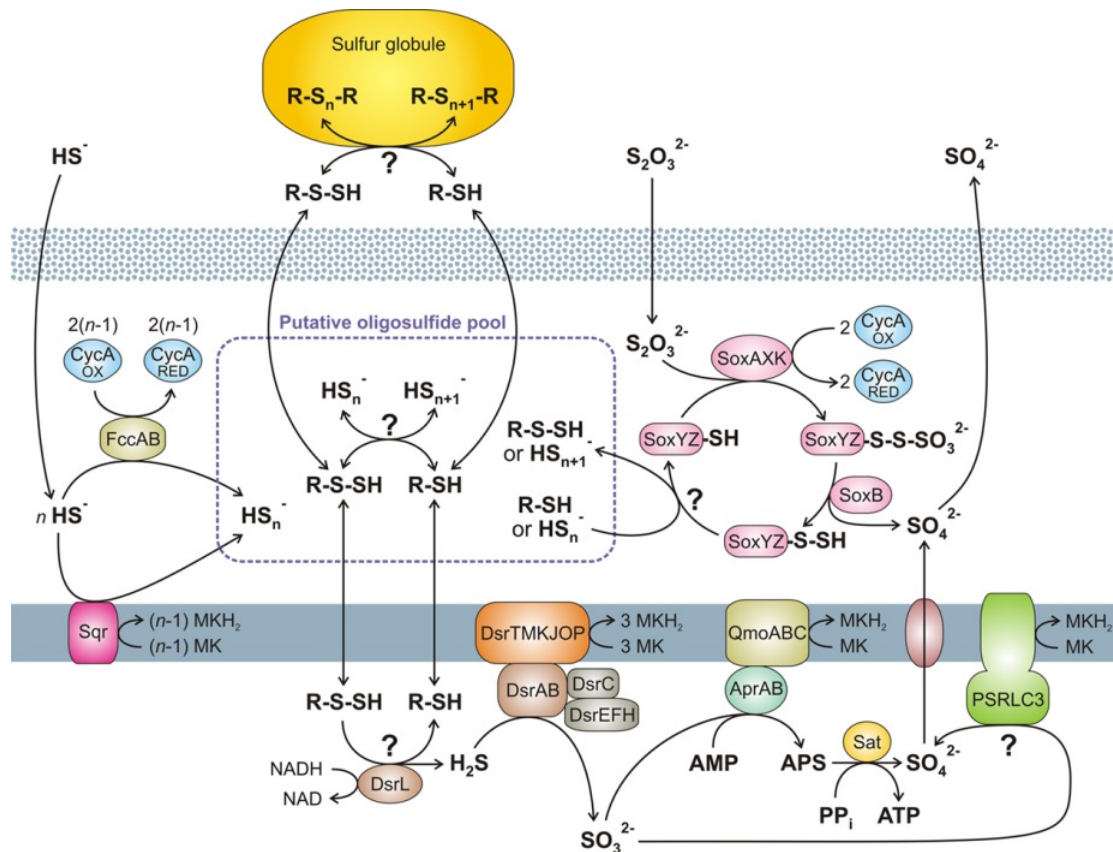
πρώτο λειτουργεί στην αντίθετη οξειδωτική κατεύθυνση. Στο *Cba. tepidum*, τα γονίδια αυτά χωρίζονται σε δύο συστάδες, *dsrNCABL6TMKJOP89* (CT2251-2238) και *dsrCABLEFH* (CT0851-0857), με τέτοιο τρόπο ώστε το *dsrCABL* να επαναλαμβάνεται. Είναι αποδεδειγμένο ότι και οι δύο συστάδες *dsrCABL* είναι απαραίτητες για την αποδοτική οξείδωση σε θειικά.[1]

Οι πρωτεΐνες *Dsr* που παίρνουν μέρος στην οξείδωση των σφαιριδίων S^0 του *Chl. tepidum*, είναι η siroheme-containing sulfite reductase *DsrAB*, το διαμεμβρανικό σύμπλοκο μεταφοράς ηλεκτρονίων *DsrMKJOP* και οι *dsrW/CT2238*, *dsrV/CT2239*, *dsrT/CT2245*, *dsrU/CT2246*. [20]

Διάφορα ένζυμα έχουν επίσης προταθεί για την οξείδωση θειούχων (S^{2-}) συμπεριλαμβανομένων της οξειδοαναγωγάσης της κινόνης (quinone oxidoreductase SQR) και του φλαβοκυτοχρώματος c (*SoxF*). Το φλαβοκυτόχρωμα c-553 καταλύει τη μεταφορά 2 e⁻ απ' το υδρόθειο στο cyt c, σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις, με το στοιχειακό θείο ως προϊόν οξείδωσης. [21]

Τα μεμβρανικά συνδεδεμένα ομόλογα SQR: *sqrD/CT0117* και *sqrF/CT1087* κωδικοποιούν διαφορετικά *sqr* ένζυμα στο *Cba. tepidum*, καταλύουν την οξείδωση του S^{2-} στα κύτταρα και πιθανόν να είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των ολιγοσουλφιδίων. [22] Έχει αποδειχθεί ότι η απουσία των 2 SQR ομόλογων, *sqrD* και *sqrF*, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού οξείδωσης των θειούχων κατά 50%. [1]

Η οξείδωση των θειοθειϊκών πραγματοποιείται απ' το σύστημα οξείδωσης θείου (sulfur-oxidation system) Sox. Στο προτεινόμενο μονοπάτι, τα θειοθειϊκά οξειδώνονται απ' το ένζυμο SoxYZ και προκύπτει η χαρακτηριστική ομάδα S-S-SO₃²⁻. Έπειτα το SoxB οξειδώνει την ομάδα S-SO₃²⁻ προς θειϊκά, τα οποία απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ η ομάδα σουλφανίων R-S-S-H που σχηματίζεται απελευθερώνεται στην περιοχή ολιγοσουλφιδίων του περιπλασματικού χώρου όπου είτε τοποθετείται με τη μορφή στοιχειακού θείου, είτε οξειδώνεται σε θειώδες άλας (SO₃²⁻) απ' το σύστημα *dsr* (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Προτεινόμενο μοντέλο για την οξειδωση θειούχων ενώσεων στο *Cba. tepidum*. [1]

1.6 Πρωτεομική

Η λέξη πρωτέομα επινοήθηκε απ' τον Mark Wilkins το 1994 και προέρχεται απ' τις ΠΡΩΤΕΪνες που εκφράζονται από ένα γονιδίωμα. Με τον όρο πρωτεομική αναφερόμαστε σε μια μεγάλης κλίμακας μελέτη ενός συγκεκριμένου γονιδιώματος, συμπεριλαμβανομένων των πληροφοριών σχετικά με την αφθονία ενός συνόλου πρωτεϊνών και των τροποποιήσεων που δέχονται από έναν οργανισμό ή ένα ολόκληρο κυτταρικό σύστημα. Όταν επινοήθηκε ο όρος πρωτεομική, έγινε προσπάθεια να συσχετιστεί με τον όρο γονιδιωματική, τη μελέτη δηλαδή των γονιδίων. Το γονιδίωμα, όμως, ενός οργανισμού είναι λίγο πολύ σταθερό σε σχέση με το πρωτέομά του που διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο. Αυτός ο λόγος καθιστά την πρωτεομική περισσότερο πολύπλοκη αλλά και πιο αποτελεσματική απ' τη γονιδιωματική σε πολλά επίπεδα:

- Ξεχωριστά γονίδια εκφράζονται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Η παλαιότερη χρήση ανάλυσης mRNA για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που παράγονται σ' ένα κύτταρο ήταν ελλιπής. Σήμερα η χρήση της πρωτεομικής

επιβεβαιώνει την παρουσία κάθε πρωτεΐνης και παρέχει άμεση μέτρηση της παρούσας ποσότητας αυτής.

- Ερευνά τη συμμετοχή των πρωτεϊνών σε μεταβολικά μονοπάτια και τον τρόπο που αυτές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.
- Επίσης διερευνά τα ποσοστά παραγωγής και αποδόμησης των πρωτεϊνών.
- Κάποιες πρωτεΐνες είναι ανενεργές όταν δεν είναι φωσφορυλιωμένες. Οι τεχνικές, Phosphoproteomics και glycoproteomics χρησιμοποιούνται για την έρευνα αυτών των μεταμεταφραστικών (post-translational) τροποποιήσεων.

Για τη διερεύνηση του πρωτεόματος σε βάθος, αναπτύχθηκαν τεχνολογίες υψηλής απόδοσης, όπως τεχνικές βασιζόμενες στη φασματομετρία μάζας MS και gel-based τεχνικές.

Αρχικά οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ή δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση, έπειτα ‘κόβονται’ ενζυματικά (in gel thrypsin digest) και στη συνέχεια υπόκεινται σε ανάλυση για τον χαρακτηρισμό τους, την εύρεση της ακολουθίας τους και τέλος την ταυτοποίησή τους. Να σημειωθεί εδώ ότι, περισσότερες από μία αλληλουχία πεπτιδίων απαιτείται για την εγκυρότητα μιας πρωτεϊνικής ταυτοποίησης. Μόλις ταυτοποιηθεί μια πρωτεΐνη, το MS είναι το εργαλείο που ταυτοποιεί το είδος της πρωτεΐνης αυτής. Αντίθετα με τη χρήση του MALDI TOF-TOF MS-MS δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης πρωτεϊνών μεγαλύτερου μοριακού βάρους (50-100kDa). Τα αποτελέσματα του MS/MS ενισχύουν έτσι την πληροφορία του πρωτεϊνικού προφίλ που προήλθαν απ’ το MS, εκτελώντας MS/MS στις πιο άφθονες και αναπαραγωγικές κορυφές που προέρχονται απ’ το MS. [23]

MALDI

Δύο είναι οι μέθοδοι ήπιου ιονισμού που χρησιμοποιούνται στην πρωτεομική ανάλυση, απόπτωση με λέιζερ υποβοηθούμενη από υπόστρωμα (matrix-assisted laser desorption) και ο ηλεκτροψεκασμός (ES). Το MALDI αναπτύχθηκε ταυτόχρονα από τους Karas & Hillenkamp 1988 και Tanaka et.al 1988 [24, 25]. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ανάλυση των βιομορίων (βιοπολυμερών όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες και σάκχαρα) καθώς και μεγάλων οργανικών μορίων (π.χ πολυμερή, δένδρομερή και άλλα μακρομόρια), τα οποία τείνουν να είναι εύθραυστα όταν ιονίζονται με άλλες συμβατικές μεθόδους ιονισμού. Στη μέθοδο αυτή, για να δημιουργηθεί η απαραίτητη

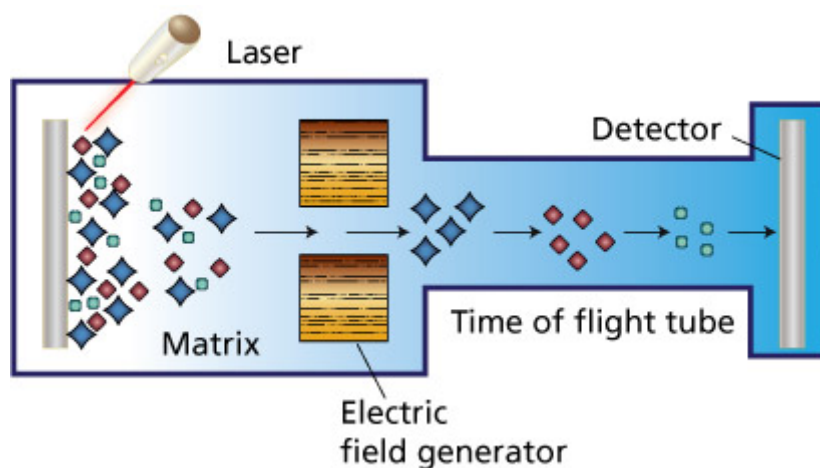
αέρια φάση, τα πρωτονιωμένα βιομόρια και συγκεκριμένη ποσότητα του υποστρώματος (μήτρα), συγκρυσταλλώνονται με μόρια του αναλύτη πάνω σε μια μεταλλική πλάκα. **(Εικόνα 6)**

Η μήτρα αποτελείται από κρυσταλλικά μόρια α-κυανο-4-υδροξυκινναμινικού οξέος τα οποία διαλύονται σε 50%ACN και 0,1%TFA.

Οι ενώσεις της μήτρας είναι χαμηλού μοριακού βάρους έτσι ώστε να είναι εύκολη η εξάτμιση, αλλά έχουν χαμηλή τάση ατμών έτσι ώστε η μήτρα να μην εξατμίζεται κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του δείγματος ή όταν έχει τοποθετηθεί στο φασματοόμετρο. Είναι όξινες και γι' αυτό αποτελούν πηγή πρωτονίων, ενθαρρύνοντας τον ιονισμό της ουσίας. Έχουν ισχυρή οπτική απορρόφηση σε φάσματα *UV* και *IR* και έτσι είναι εφικτή η γρήγορη και αποτελεσματική απορρόφηση της ακτινοβολίας του λέιζερ από τη μήτρα.

Ο πιο διαδεδομένος τύπος φασματομέτρου μάζας που χρησιμοποιείται με το MALDI είναι TOF(time of flight), κυρίως λόγω του μεγάλου εύρους μάζας του. Η διαδικασία μέτρησης TOF ταιριάζει ιδανικά με τη διαδικασία ιονισμού του MALDI εφόσον το παλμικό λέιζερ παίρνει ατομικά 'shots' αντί να λειτουργεί εν συνεχεία. Το όργανο MALDI-TOF είναι εξοπλισμένα με 'καθρέφτη ιόντων', εκτρέποντας τα ιόντα που διαθέτουν ηλεκτρικό πεδίο με αποτέλεσμα, το διπλασιασμό του μονοπατιού πτήσης των ιόντων και την αύξηση της ανάλυσης.

Για δομική ανάλυση, όπως προσδιορισμός αλληλουχίας αμινοξέων των πεπτιδίων, χρησιμοποιείται φασματοσκοπία μάζας σε σειρά MS/MS, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί εφαρμόζοντας δύο φορές την ίδια αρχή διαχωρισμού των ιόντων.



Εικόνα 6: Μέθοδος ιονισμού χρησιμοποιώντας απόπτωση με λέιζερ υποβοηθούμενη από υπόστρωμα. Στην εικόνα φαίνεται η συγκυστάλλωση των δειγμάτων με μόρια της μήτρας πάνω στη μεταλλική επιφάνεια. Τα δείγματα ακτινοβολούνται από παλμό λέιζερ, δημιουργώντας μια 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.

1.6 Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Την τελευταία δεκαετία, η φράση ‘μικροσκοπία κρυο-ηλεκτρονικής’, έχει εξελιχθεί ώστε να καλύπτει ένα ευρύ φάσμα πειραματικών μεθόδων. Στην ουσία, κάθε μία απ’ αυτές τις μεθόδους βασίζεται στην αρχή απεικόνισης δειγμάτων ευαίσθητων στην ακτινοβολία, μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου κάτω από κρυογενείς συνθήκες. Στη βιολογία, οι εφαρμογές της cryo-EM καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα, το οποίο κυμαίνεται από την απεικόνιση τμημάτων άθικτων ιστών και παγωμένων κυττάρων μέχρι την απεικόνιση μεμονωμένων βακτηρίων, ιών και πρωτεϊνικών μορίων. Οι μέθοδοι single-particle cryo-EM, cryo-tomography και η ηλεκτρονική κρυσταλλογραφία αποτελούν κλάδους της cryo-EM οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην ανάλυση βιολογικών δομών. Οι μέθοδοι αυτοί έχουν χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα καθώς και σε υβριδικές προσεγγίσεις, στις οποίες η πληροφορία που λαμβάνεται απ’ την ηλεκτρονική μικροσκοπία συνδυάζεται με τις συμπληρωματικές πληροφορίες που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και φασματοσκοπίας NMR.

Απεικόνιση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι ανάλογη με τη μικροσκοπική απεικόνιση δειγμάτων κυττάρων και ιστών, τα οποία είναι τοποθετημένα σε γυάλινα πλακίδια. Η διαφορά βρίσκεται στην πηγή της ακτινοβολίας, που στην περίπτωση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι τα ηλεκτρόνια τα οποία εκπέμπονται από μια πηγή που βρίσκεται κάτω από υψηλό κενό και στη συνέχεια επιταχύνονται προς το κάτω μέρος της στήλης του μικροσκοπίου σε τάσεις 80-300kV. Εφόσον διαπεράσουν τα δείγματα, τα διασκορπισμένα πλέον ηλεκτρόνια εστιάζονται απ' τους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς του μικροσκοπίου **(Εικόνα 7Α)**. Η ανάλυση που μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ορατή ακτινοβολία είναι σημαντικά μικρότερη απ' αυτή που επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τις πηγές ηλεκτρονίων ενός τυπικού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

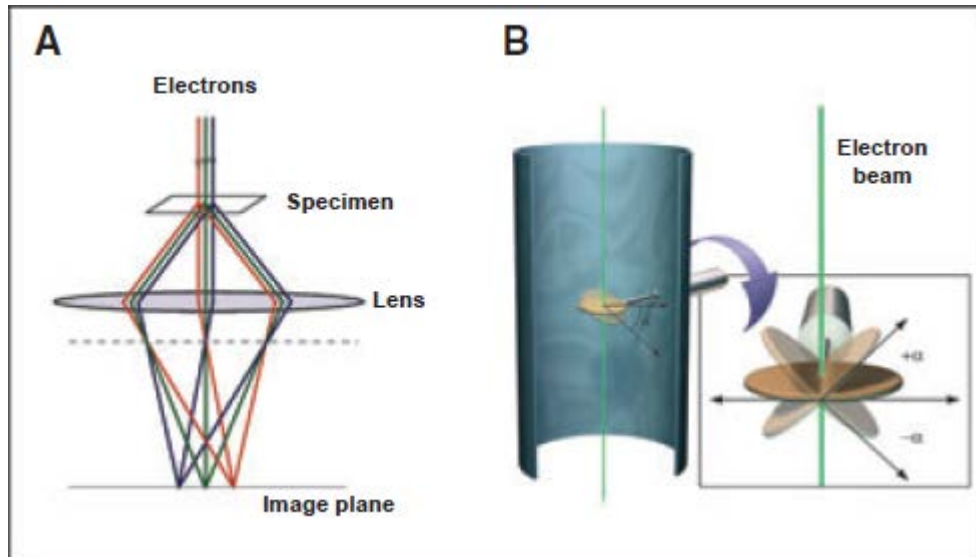
Η πιθανότητα απεικόνισης βιολογικών δομών χρησιμοποιώντας ηλεκτρόνια αποδείχθηκε το 1975 με τον προσδιορισμό της δομής της βακτηριοροδοψίνης σε ανάλυση περίπου 7Å. [28] Ακόμα υψηλότερες αναλύσεις έχουν επιτευχθεί για μη-οργανικά δείγματα, τα οποία αντέχουν σημαντικά υψηλότερες δόσεις ηλεκτρονίων σε σχέση με βιολογικά, χωρίς απώλεια της δομικής τους ακεραιότητας κατά τη διάρκεια της απεικόνισης. Για παράδειγμα, μεμονωμένα άτομα χρυσού μπορούν να απεικονιστούν άμεσα με υψηλής έντασης ηλεκτρονικά μικροσκόπια και οι τρισιδιάστατες δομές αυτών των νανοσωματιδίων να ληφθούν σε ατομική ανάλυση χρησιμοποιώντας ηλεκτρονική τομογραφία. [29] Η δυσκολία που παρουσιάζει η απεικόνιση υψηλής ανάλυσης είναι ότι παρ' όλο που οι δόσεις ηλεκτρονίων είναι αρκετά χαμηλές έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν ζημιές που προκαλεί η ακτινοβολία και να προστατεύεται το δείγμα, δημιουργούν θόρυβο. Μία απ' τις προσεγγίσεις που χρησιμοποιείται στη σύγχρονη ηλεκτρονική μικροσκοπία (EM) υψηλής ανάλυσης είναι η μικροσκοπία κρυο-ηλεκτρονικής (cryo-EM), στην οποία η απεικόνιση πραγματοποιείται σε δείγματα που έχουν ψυχθεί σε θερμοκρασίες υγρού αζώτου ή υγρού ηλίου. Πριν από 4 δεκαετίες μετρήσει που έγιναν στη φθορά των εντάσεων περίθλασης σε θερμοκρασία δωματίου έναντι θερμοκρασιών υγρού αζώτου, απέδειξαν ότι η cryo-EM μειώνει τις βλάβες που προκαλεί η ακτινοβολία. [31] Η ανάπτυξη μεθόδων για την άμεση ψύξη βιολογικών δειγμάτων πάνω σ' ένα στρώμα πάγου και η μετέπειτα απεικόνισή τους σε θερμοκρασίες υγρού αζώτου ή ηλίου, είχε ως αποτέλεσμα τη χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου ευρέως.

Cryo-electron tomography

Μία προσέγγιση για τη λήψη των τρισδιάστατων δομών μακρομοριακών συγκροτημάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία, είναι η τομογραφία, [32] στην οποία συλλέγεται μια σειρά από εικόνες, με κάθε εικόνα να λαμβάνεται σε διαφορετική κλίση σχετική με την κατεύθυνση της προσπίπτουσας ηλεκτρονικής δέσμης (**Εικόνα 7B**). Στην απεικόνιση παχύτερων δειγμάτων, όπως είναι οι ιοί, βακτηριακά ή ευκαρυωτικά κύτταρα, οι εικόνες συλλέγονται με τη βοήθεια ενός φίλτρου απεικόνισης το οποίο βελτιώνει την αντίθεση με εξάλειψη των άκαμπτων ηλεκτρονίων που διαχέονται. Αυτές οι εικόνες στη συνέχεια συνδυάζονται με τη βοήθεια υπολογιστή, δημιουργώντας ουσιαστικά τρισδιάστατες εικόνες του δείγματος, τα λεγόμενα ‘tomograms’.

Η καταβύθιση-ψύξη υδατικών διαλυμάτων σ’ ένα κρυογόνο, όπως η ψύξη του υγρού αιθανίου από υγρό άζωτο, είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία δειγμάτων στις εφαρμογές της cryo-EM στην τομογραφία. Η απεικόνιση δειγμάτων σε θερμοκρασίες υγρού αζώτου μειώνει τη ζημιά που προκαλεί η ακτινοβολία 6 φορές πιο κάτω απ’ τη ζημιά που προκαλείται στις θερμοκρασίες της ατμόσφαιρας.[30] Αυτό σημαίνει ότι για τις εικόνες που καταγράφονται σε θερμοκρασίες υγρού αζώτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν υψηλότερες δόσεις ηλεκτρονίων έτσι ώστε λόγω της μειωμένης ποσότητας ζημιάς απ’ την ακτινοβολία ανά μονάδα ηλεκτρονικής δόσης, να αυξηθεί ο λόγος σήματος-θορύβου.

Η απεικόνιση με ηλεκτρονική τομογραφία ‘απαιτεί’ τα δείγματα να είναι αρκετά λεπτά, έτσι ώστε να είναι εφικτή η μεταβίβαση της προσπίπτουσας ηλεκτρονικής δέσμης, ακόμα και για μικροσκοπία ικανά για λειτουργία σε 300kV. Τα δείγματα που είναι αρκετά λεπτά χρωματίζονται αρνητικά (negatively stained), για την τομογραφία σε θερμοκρασίες δωματίου, ενώ ψύχονται σε φυσικές συνθήκες για την κατεργασία τους με cryo-EM.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. (Α) Διευκρινιστική απεικόνιση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, τονίζοντας τις ομοιότητες μεταξύ ηλεκτρονικής και οπτικής μικροσκοπίας. (Β) Σχηματική απεικόνιση της αρχής συλλογής δεδομένων για ηλεκτρονική τομογραφία. Μια σειρά από εικόνες λαμβάνονται στο ίδιο οπτικό πεδίο, με αυτό που κλίνει το δείγμα σε σχέση με την ηλεκτρονική δέσμη. [33]

Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το *Cba.tepidum* ανήκει στην κατηγορία των πράσινων θειοβακτηρίων και αποτελεί τον πρότυπο οργανισμό για τη μελέτη τους καθώς και για τη μελέτη της φωτοσύνθεσης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι κατέχει έναν συνδυασμό σπάνιων χαρακτηριστικών που το καθιστούν ιδιαίτερα ενδιαφέρον.

Το *Cba.tepidum*, είναι ένας φωτοαυτότροφος οργανισμός, ικανός για φωτοσύνθεση, ο οποίος αναπτύσσεται ραγδαία σε ανόργανες ενώσεις θείου (θειούχα, θειοθειικά) τις οποίες και οξειδώνει σε θειικά. Ένας απ' τους στόχους της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου σε 3 διαφορετικές συνθήκες: **συνθήκες Α** (συνύπαρξη θειούχων και θειοθειικών στο θρεπτικό ανάπτυξης), **Β** (παρουσία μόνο θειοθειικών στο θρεπτικό ανάπτυξης) και **Γ** (παρουσία μόνο θειούχων στο θρεπτικό ανάπτυξης). Η μελέτη του μεμβρανικού πρωτεόματος σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης είχε ως στόχο την κατανόηση του ρόλου του στην αποικοδόμηση του θείου αλλά και του τρόπου μεταφοράς του στον εξωκυττάριο χώρο.

Τελευταίος στόχος αυτής της εργασίας ήταν η δομική ανάλυση του κυττάρου του *Cba. tepidum*. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω τρισδιάστατης απεικόνισης ολόκληρων ενυδατωμένων κυττάρων του *Cba. tepidum* μέσω τομογραφημάτων και ανάλυσή τους με cryo-EM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Αντιδραστήρια-Διαλύματα

Τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της συγκεκριμένης εργασίας, παρουσιάζονται παρακάτω και προμηθεύτηκαν απ' τις εταιρείες Sigma, Fluka, Serva, Boehringer/Roche κ.α. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν απιονισμένο, με στήλη ιοντοανταλλακτικών ρητινών και υπερκαθαρό (nanopure) από ειδικό σύστημα αντίστροφης ώσμωσης.

Ρυθμιστικό διάλυμα TT (ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης)

- 20 mM Tricine Base
- Tris Base έως pH=7,5
- 1 mM Benzamidine
- 1 mM 6-amino-caproic acid

Πρότυπες πρωτεΐνες για SDS-PAGE (Biorad)

- | | |
|----------------------|----------|
| • Phosphorylase b | 97,4kDa |
| • Serum albumin | 66,2 kDa |
| • Ovalbumin | 31 kDa |
| • Carbonic anhydrase | 31 kDa |
| • Trypsin inhibitor | 21,5 kDa |
| • Lysozyme | 14,4 kDa |

Διαλύματα παρασκευής πηκτών SDS-PAGE

➤ AB-mix buffer

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

➤ Gel buffer (3x)

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

➤ Anode buffer

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

➤ Cathode buffer

- Tris Base 1M
- Tricine Base 1M
- SDS 1,0% (w/v)
- pH=8,25 (χωρίς προσθήκη HCl)

➤ Sample buffer

- SDS 12% (w/v)
- Glycerol 10% (w/v)
- Mercaptoethanol 6% (w/v)
- Serva blue G 0,05% (w/v)
- Tris-HCl, pH=7.0 150mM

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

- **Πηκτή διαχωρισμού (300ml)** (10%)

Urea	109,5 gr
AB-mix	60 ml
Gel-buffer	99 ml
APS	1,5 ml
TEMED	150 μl

- **Πηκτή στοιβαξης (100ml)** (4%)

AB-mix	8 ml
Gel-buffer	25 ml
Nanopure έως τα	100ml
APS	750μl
TEMED	75μl

- **Πηκτή διαχωρισμού (300ml)** (16%)

Glycerol	30 gr
AB-mix	100 ml
Gel-buffer	100 ml
APS	1 ml
TEMED	100μl

➤ **Διάλυμα επώασης για τη δεύτερη διάσταση**

- Tris Base 100mM
- 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% (v/v)
- Methanol 20% (w/v)

➤ **Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτών**

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

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Οργανισμός

Το βακτήριο που μελετήθηκε είναι ευγενική προσφορά του Prof. H. Sakurai, University of Kanagawa, Tokyo.

2.2.2 Ανάπτυξη οργανισμού και συλλογή κυττάρων

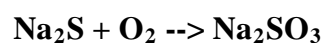
Για την παρασκευή καλλιέργειας 1lt του βακτηρίου χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο	Ποσότητες
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$	1gr
KH_2PO_4	0,5gr
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	0,5gr
NH_4Cl	0,4gr
NaCl	0,4gr
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,2gr
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,05gr
EDTA	0,0125gr
NaHCO_3	2gr
Μείγμα Ιχνοστοιχείων	1ml
Βιταμίνη B12 (20mg/lt)	2ml

Ιχνοστοιχεία:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
EDTA	0.67gr
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0.2gr
CoCl ₂ x 6H ₂ O	19mg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	19mg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	15mg
MnCl ₂ x 4H ₂ O	10mg
VSO ₄ x 2H ₂ O	3mg
NiCl ₂ x 6H ₂ O	2.5mg
CuCl ₂ x 2H ₂ O	1.7mg
H ₃ BO ₃	0.6mg
NaWO ₄ x 2H ₂ O	0.2mg
Na ₂ HSeO ₃	0.2mg
NaOH	έως pH = 8

Μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων, η καλλιέργεια υπέστη απαέρωση για 40 λεπτά, με διαβίβαση αερίου CO₂ (2,2 ADR, 23 BAR) κλείστηκε αεροστεγώς και στο αναερόβιο πλέον περιβάλλον προστέθηκε Na₂S σε συγκέντρωση 7,7mM. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στα 6.9, χρησιμοποιώντας H₂SO₄ 10% (v/v). Έπειτα προστέθηκαν 20ml αρχικής καλλιέργειας και η νέα καλλιέργεια τοποθετήθηκε στο σκοτάδι για μια νύχτα [8], έτσι ώστε το υπάρχον οξυγόνο να καταναλωθεί απ' το H₂S σύμφωνα με την αντίδραση:



Τα κύτταρα του *Cba. tepidum* TLS καλλιεργήθηκαν για 24-36 ώρες, υπό αναερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 48 °C, σε γυάλινα μπουκάλια (Duran) 1000ml σύμφωνα με τον Wahlund et al. (1991) [8]. Ο κατάλληλος φωτισμός επετεύχθη από οκτώ λάμπες φθορισμού 15W. Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μετέπειτα συλλογή κυττάρων του βακτηρίου είχαν φτάσει στην τελευταία φάση της εκθετικής τους ανάπτυξης και είχαν αποκτήσει σκούρο πράσινο χρώμα.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 6000g στους 4°C για 20min και ομογενοποιήθηκαν με παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα TT σε αναλογία 1gr κυττάρων : 20ml ρυθμιστικού διαλύματος. Να σημειωθεί ότι μετά το πέρας της φυγοκέντρησης και το σχηματισμό σκούρου πράσινου ιζήματος (κύτταρα), σχηματίζεται επίσης και ένα υποκίτρινο ίζημα το οποίο υποδεικνύει την παρουσία στοιχειακού θείου. Το κίτρινο αυτό ίζημα δεν συλλέγεται.

2.2.3 Διάρρηξη κυττάρων

Το διάλυμα των κυττάρων αρχικά ομογενοποιείται, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία συσσωματωμάτων, και έπειτα τα κύτταρα διασπώνται με υπερήχους Broxon ultrasonic processor (20 φορές, 15 sec με παύση 45 sec στα 90-100 Watt). Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε πάγο έτσι ώστε να διατηρηθεί η θερμοκρασία του διαλύματος κάτω των 10°C. Η παρουσία υπερήχων έχει ως στόχο τη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος και τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού διαλύματος. Το διάστημα των 45 sec όπου πραγματοποιείται διακοπή της λειτουργίας των υπερήχων είναι απαραίτητο ώστε να επέλθει θερμική ισορροπία στο διάλυμα και για αυτό τον λόγο άλλωστε πρέπει καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας να υπάρχει πάγος.

2.2.4 Απομόνωση μεμβρανικού και υδατοδιαλυτού πρωτεόματος

Τα άσπαστα κύτταρα και κυτταρικά θραύσματα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στα 9000g για 20min στους 4°C. Το υπερκείμενο που προκύπτει φυγοκεντρείται στα 35000g για 1,5h στους 4°C για την καταβύθιση των μεμβρανών. Το υπερκείμενο που προκύπτει μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρησης περιέχει το κυτταρόπλασμα και το περίπλασμα του κυττάρου (υδατοδιαλυτό τμήμα), ενώ οι μεμβράνες βρίσκονται υπό τη μορφή ιζήματος. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε 1ml ρυθμιστικού TT και το μίγμα

ομογενοποιείται με τη βοήθεια γυάλινου ομογενοποιητή. Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα υπό την παρουσία πάγου.

2.2.5 Κατεργασία μεμβρανών με EDTA

Για την απομάκρυνση υδατοδιαλυτών και περιφερειακών πρωτεϊνών, οι οποίες συνδέονται στις μεμβράνες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, έγινε κατεργασία των μεμβρανών με υδατικό διάλυμα 5mM EDTA. Ένα κλάσμα μεμβρανών συγκέντρωσης 1mg, που απομονώθηκαν όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.4, αραιώθηκε σε τελικό όγκο 5ml με διάλυμα TT το οποίο περιείχε 5mM EDTA. Το κλάσμα των μεμβρανών τοποθετήθηκε σε υπέρηχους τρεις φορές από 15sec κάθε φορά και 45sec παύση. Οι μεμβράνες συλλέχθηκαν ύστερα από υπερφυγοκέντρωση στα 35.000g για 1h στους 4°C.

Έτσι επετεύχθη διαχωρισμός των κατεργασμένων πρωτεϊνών (ίζημα) απ' τις περιφερειακές και υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες (υπερκείμενο). Το προκύπτον ίζημα μεμβρανών αποθηκεύτηκε στους -40°C μέχρι τη χρήση του.

2.3 Αναλυτικές μέθοδοι

2.3.1 Φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού

Η ύπαρξη Bchl καθιστά δυνατή τη μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού. Οι απορροφήσεις ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis (UV-1700/SHIMADZU) μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης Bradford (βλ. §2.3.1.1)

Για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων των *Bchl* φυγοκεντρήθηκε 1ml καλλιέργειας στα 13.000g για 5min για την καταβύθιση των κυττάρων σε μορφή ιζήματος. Το ίζημα εκχυλίστηκε με μεθανόλη, και η συγκέντρωση του υπερκειμένου μετρήθηκε στα 669nm χρησιμοποιώντας το συντελεστή απορρόφησης $86 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [27]. Επίσης κατά το μεταβολισμό των ανόργανων ενώσεων θείου, τις οποίες οξειδώνει ο οργανισμός για την ανάπτυξή του μέσω φωτοσύνθεσης, σχηματίζεται στοιχειακό θείο (S^0) ως ενδιάμεσο [1]. Η ποσοτικοποίηση του S^0 έγινε με τη διαδικασία που προαναφέρθηκε

όπου η μέτρηση της συγκέντρωσης του υπερκειμένου μετρήθηκε αυτή τη φορά στα 265nm χρησιμοποιώντας το συντελεστή απορρόφησης $23,9 \text{ g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [26].

Οι μετρήσεις των απορροφήσεων διεξάγονταν κάθε 2 ώρες και χρησιμοποιήθηκαν έπειτα για την κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης για τα επιμέρους συστατικά.

2.3.1.1 Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνικής συγκέντρωσης (Μέθοδος Bradford)

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ενός δείγματος. Για να γίνει αυτό κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με τις συγκεντρώσεις που προκύπτουν από τη μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm σε δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων της BSA (αλβουμίνη από ορό βοδιού). [42]

Αρχικά λαμβάνονται εις διπλούν 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 και 20μl απ' το πρότυπο διάλυμα της πρωτεΐνης BSA(2mg/ml) και αραιώνονται μέχρι τα 100μl ρυθμιστικού TT. Κατασκευάζεται ακόμα ένα δείγμα το οποίο περιέχει μόνο 100μl ρυθμιστικού TT και χρησιμοποιείται ως τυφλό. Σ' αυτά προστίθεται 900μl αντιδραστηρίου Bradford και ύστερα από ισχυρή ανάδευση (vortex) τα διαλύματα αφήνονται σε ηρεμία για 8min. Έπειτα μετράται η απορρόφηση των συγκεκριμένων δειγμάτων στα 595 nm, στο μήκος κύματος δηλαδή που απορροφά το σύμπλοκο χρωστική-πρωτεΐνη. Η τιμή της απορρόφησης του τυφλού δείγματος αφαιρείται απ' τις τιμές των υπόλοιπων δειγμάτων και κατασκευάζεται έτσι η καμπύλη αναφοράς συναρτήσει της μάζας του BSA σε μg. Η πρωτεϊνική λοιπόν πυκνότητα των άγνωστων δειγμάτων υπολογίζεται μέσω της ανώτερης καμπύλης.

Για τα συγκεκριμένα πειράματα η πρότυπη καμπύλη ήταν της μορφής

$$y = ax + \beta$$

με $a = 0,0352$ και $\beta = 0,0008$

όπου x η συγκέντρωση και y η απορρόφηση.

Κατά τη διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή ώστε το διάλυμα Bradford 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.

Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογιζόταν μέσω του νόμου Beer-Lambert.

Έτσι ισχύει:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Όπου: A = απορρόφηση

ϵ = μοριακός συντελεστής απορρόφησης, (για το κυτόχρωμα c είναι 17)

C = η συγκέντρωση σε mM

b = η οπτική διαδρομή της κυψελίδας (1cm)

2.3.1.2 Κατακρύμνιση πρωτεϊνών

Η φόρτωση ενός πρωτεϊνικού δείγματος στην πηκτή ακρυλαμίδιου απαιτεί συγκεκριμένη πρωτεϊνική συγκέντρωση. Λόγω του ότι κάποια δείγματα έχουν χαμηλότερη συγκέντρωση απ' την απαιτούμενη, υπόκεινται συμπύκνωση με τη χρήση τριχλωροοξικού οξέος (TCA).

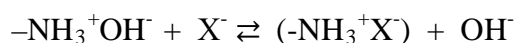
Στο κάθε πρωτεϊνικό δείγμα προστίθεται υποδεκαπλάσιος όγκος TCA και το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για 16 ώρες. Την επόμενη μέρα ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.000g για 10min και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Έπειτα προστίθεται κρύα ακετόνη, σε ίσο όγκο με αυτόν του πρωτεϊνικού δείγματος, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 13.000g και απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο. Η διαδικασία της πύσης με ακετόνη πραγματοποιείται ακόμα 2 φορές. Το ίζημα που προκύπτει αφήνεται να στεγνώσει μέσα σε απαγωγό για περίπου 30min. Έπειτα επαναδιαλυτοποιείται στην απαιτούμενη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης SDS-Tricine (sample buffer), επώάζεται σε λουτρό υπερήχων για 30min περίπου, με ενδιάμεσα διαλύματα των 5min, και το δείγμα φορτώνεται στην πηκτή ακρυλαμίδιου.

2.3.2 Ιοντική χρωματογραφία

Ανάλογα με τα ιόντα που θέλουμε να διαχωρίσουμε, η ιοντική χρωματογραφία διακρίνεται σε: ανιοντική και κατιοντική. Αυτό έχει να κάνει με τη στατική φάση δηλαδή το υλικό πλήρωσής της, ανάλογα με τα ιόντα που ανιχνεύονται.

Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται ανίχνευση και μέτρηση της συγκέντρωσης των θειϊκών ιόντων (SO_4^-) στην υγρή καλλιέργεια του θειοβακτηρίου *Chlorobaculum tepidum* και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ανιοντική χρωματογραφία.

Στην ανιοντική χρωματογραφία, η επιφάνεια της στατικής φάσης είναι θετικά φορτισμένη και αναπτύσσει ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα του αναλύτη. Τα $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$ και $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$ χρησιμοποιούνται σαν ισχυρός και σαν ασθενής ανιοανταλλάκτης αντίστοιχα.



Τα βασικά μέρη του ιοντικού χρωματογράφου είναι:

- Κινητή φάση: χρησιμοποιούνται άλατα Na ασθενών οξέων αφού ο καταστολέας τα μετατρέπει σε ουδέτερα ελεύθερα οξέα. Η πιο συνηθισμένη κινητή φάση για το διαχωρισμό ανιόντων είναι το ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων.
- Στατική φάση: η στατική φάση που βρίσκεται μέσα στη στήλη διαχωρισμού, αποτελείται απ' το υλικό πλήρωσής της, και συνήθως είναι ρητίνες ιονανταλλαγής. Οι ρητίνες ιονανταλλαγής αποτελούνται από ένα μη διαλυτό οργανικό ή ανόργανο υπόστρωμα, τις δραστικές ιονανταλλακτικές ομάδες (functional groups) και τα αντισταθμιστικά ιόντα αντιθέτου φορτίου προς τις ιονανταλλακτικές ομάδες (counter ions) που κινούνται ελεύθερα μέσα στον ιονανταλλάκτη.

Σαν υπόστρωμα χρησιμοποιούνται πολυμερή τα οποία σχηματίζονται με τον συμπολυμερισμό στυρενίου και διβινυλοβενζολίου το συμπολυμερές αυτό είναι σταθερό σε pH= 0-14, επιτρέποντας τη μετατροπή μη ιοντικών ενώσεων σε ιοντικές έτσι ώστε να μπορούν να αναλυθούν με ιοντική χρωματογραφία.

Σαν δραστική ομάδα στην ανιοντική χρωματογραφία χρησιμοποιείται το τεταρτοταγές αμμώνιο $-\text{N}(\text{R})_3$.

- Αντλία: οι αντλίες μπορεί να είναι μονού ή διπλού εμβόλου, ισοκρατικές ή βαθμιδωτές. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η αντλία Dionex GP50 gradient pump.
- Ανιχνευτής: χρησιμοποιείται αγωγιμομετρικός ανιχνευτής της εταιρείας Dionex CD20, ο οποίος αποκρίνεται στη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου ιόντος, ενώ η περιοχή γραμμικότητάς του καλύπτει 5 τάξεις μεγέθους συγκεντρώσεων γι' αυτό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποσοτική ανάλυση.
- Στήλη: η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι Dionex AS4A-SC 4mm.
- Προστήλη: η προστήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι Dionex AG4A-SC 4mm.
- Καταστολέας: ο καταστολέας που χρησιμοποιήθηκε είναι Dionex ASRS ULTRA II 4mm
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος: Marathon Autosampler
- Διάλυμα έκλουσης: χρησιμοποιήθηκε μίγμα όξινου ανθρακικού νατρίου/ανθρακικού νατρίου ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$) 20M, μαζί με νερό σε αναλογία 50% απ' το καθένα.
- Ροή: 1,5 ml/min

Διαδικασία ανάλυσης:

Πριν ξεκινήσει η ανάλυση των δειγμάτων, πραγματοποιείται διαβίβαση He στο διάλυμα έκλουσης και γίνεται απαέρωση του συστήματος, ενώ έπειτα αφού σταματήσουμε τη διαβίβαση He, απομονώνουμε το σύστημα και αφήνουμε να τρέχει ο εκλουτής, χωρίς να περνάει από τη στήλη ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, δεν πρέπει να υπάρχουν καθόλου φυσαλίδες γιατί θα προκαλέσουν φραγή ή άλλη ζημιά στο όλο σύστημα. [10]

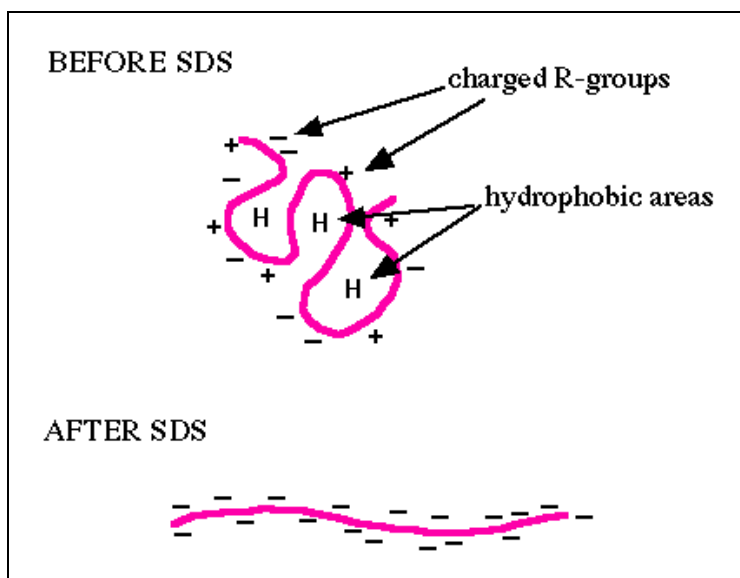
2.4 Μέθοδοι ανάλυσης και χαρακτηρισμού πρωτεϊνών

2.4.1 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια ευρέως γνωστή μέθοδο η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μακρομορίων, όπως DNA, RNA ή πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος, το σχήμα ή το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Ο διαχωρισμός των μακρομορίων με ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάση του μοριακού τους βάρους. Αυτό επιτυγχάνεται με την μετουσίωση των πρωτεϊνών με

SDS και εφόσον έχουν το ίδιο γραμμικό σχήμα (**Εικόνα 8**) μπορούν να κινούνται διαμέσου της πηκτής με την ίδια ταχύτητα και να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος.

Η μέθοδος αποτελεί κύριο εργαλείο της βιοχημείας, μοριακής βιολογίας, αναλυτικής χημείας και πρωτεομικής.



Εικόνα 8: μετουσίωση πρωτεϊνών με τη βοήθεια του απορρυπαντικού SDS(sodium dodecyl sulfate). Το άνω τμήμα παρουσιάζει μια φορτισμένη πρωτεΐνη λόγω παρουσίας των R-ομάδων. Τα H εκπροσωπούν τις υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης. Στο κάτω σχήμα φαίνεται πως το SDS μπορεί να διαταράξει τις υδρόφοβες περιοχές και να φορτίσει τις πρωτεΐνες αρνητικά πετυχαίνοντας έτσι ένα γραμμικό αποτέλεσμα.

2.4.1.1 SDS-Tricine ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου

Η πρωτεϊνική σύσταση των δειγμάτων εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου (PAGE). Η Tricine-SDS-PAGE χρησιμοποιείται συνήθως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με εύρος μάζας 1-100 kDa. Η συγκεκριμένη μέθοδος προτιμάται για την ανάλυση πρωτεϊνών με μάζα < 30kDa μέσω 2^{ης} διάστασης ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου (dSDS-PAGE), πρωτεομικό εργαλείο που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό εξαιρετικά υδρόφοβων πρωτεϊνών.[11]

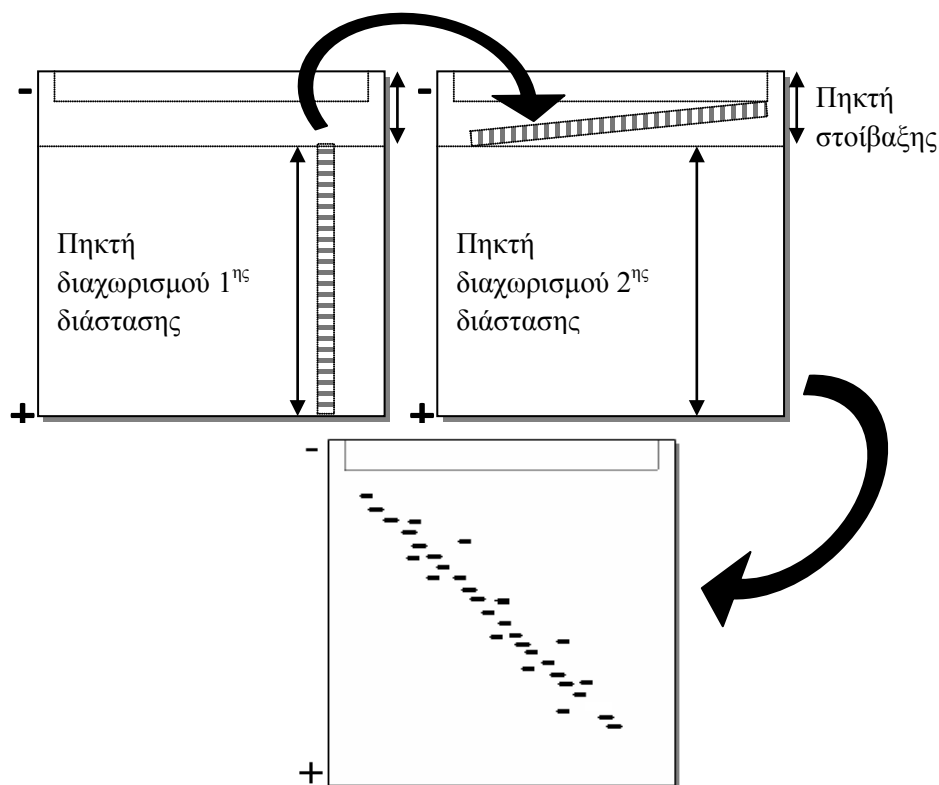
Αρχικά οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται στην πηκτή συμπύκνωσης (βλ. §2.1), η οποία έχει συγκέντρωση 4% ακρυλαμιδίου/δισ ακρυλαμιδίου και στη συνέχεια διαχωρίστηκαν στην πηκτή διαχωρισμού με συγκέντρωση 10% ακρυλαμιδίου/δισ ακρυλαμιδίου συμπεριλαμβανομένων 6M ουρίας. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 70V/πηκτή για 14-16 ώρες. Η χρώση των πηκτών έγινε

χρησιμοποιώντας κολλοειδή Coomassie Blue Silver. [43] Για την εύρεση των φαινομενικών μοριακών βαρών των πρωτεϊνών έγινε σύγκριση με δείκτη πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. (βλ. πίνακα §2.1)

2.4.1.2 Δισδιάστατη SDS-Tricine ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου

Στη συγκεκριμένη μέθοδο συνδυάστηκαν δύο Tricine-SDS πηκτές σ' ένα δισδιάστατο σύστημα ηλεκτροφόρησης. Απ' τις Tricine-SDS πηκτές της πρώτης διάστασης κόπηκαν οι επιθυμητές λωρίδες (3-10mm) και επώαστηκαν για 30min σε όξινο διάλυμα 100mM Tris-HCl με pH=2. [12] Με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού απορροφήθηκε η υγρασία και οι λωρίδες τοποθετήθηκαν σκόπιμα με μια μικρή κλίση ώστε να αφαιρεθούν τυχόν φυσαλίδες που θα σχηματιστούν κατά τον πολυμερισμό της πηκτής της δεύτερης διάστασης (εικόνα 9).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100V/πηκτική για 16-24 ώρες.



Εικόνα 9: Διάταξη πηκτών ακρυλαμιδίου μονοδιάστατης και δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης SDS-Tricine PAGE. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ανάλυση των πρωτεϊνών σε μια διαγώνιο, με τις πιο υδρόφοβες πρωτεΐνες να αποκλίνουν εκατέρωθεν αυτής.

2.4.2 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών

Η θρυψίνη είναι μια σερινοπρωτεάση, η οποία παράγεται στο πάγκρεας σπονδυλωτών και έχει την ικανότητα να υδρολύει πρωτεΐνες και ειδικότερα να διασπάει τον C-τερματικό των πεπτιδικών δεσμών των αμινοξέων αργινίνης και λυσίνης. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται θρυψινοποίηση και πραγματοποιείται απευθείας στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου (*in situ*) έπειτα από αποδιατακτική Tricine-SDS ηλεκτροφόρηση και χρώση με κολλοειδή Coomassie (Blue Silver). [43]

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Τα στίγματα των πρωτεϊνών αποκόπτονται από τις πηκτές σε μικρά κομμάτια (1x1cm)
- Ακολουθεί αποχρωματισμός με ACN (50% v/v) και διττανθρακικό αμμώνιο (50mM), με τρεις πλύσεις εναλλάξ διάρκειας 15min η καθεμία.
- Η αναγωγή των ξηραμένων πηκτών πραγματοποιείται με 10 mM DTT σε 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο και ακολουθεί επώαση για 45min στους 56°C.
- Η αλκυλίωση γίνεται με 55 mM ιωδοακεταμίδιο σε 50mM διττανθρακικό αμμώνιο για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Στη συνέχεια τα κομμάτια της πηκτής πλένονται με 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο και με 50% ACN, επαναλαμβάνοντας ουσιαστικά τη διαδικασία που ακολουθείται και στο αποχρωματισμό.
- Πριν την προσθήκη της θρυψίνης πραγματοποιείται αφυδάτωση των κομματιών της πηκτής με 100% ACN για 15min.
- Στα αφυδατωμένα κομμάτια της πηκτής προστίθενται 25-30 μl του ρυθμιστικού διαλύματος της πρωτεόλυσης το οποίο περιέχει 20 μg θρυψίνης από πάγκρεας χοίρου και αφήνονται για 30-90min σε πάγο.
- Κατόπιν επωάζονται για 14-16 ώρες στους 37°C.
- Την επόμενη μέρα τα πεπτίδια από τα κομμάτια της πηκτής ανακτώνται με διαδοχικά βήματα ένωσης των υπερκειμένων που προκύπτουν από δύο διαδοχικές επώσεις διάρκειας 30min, αρχικά σε διάλυμα 50% ACN/0,1% TFA και έπειτα σε διάλυμα 100% ACN.
- Το συνολικό διάλυμα που προκύπτει ξηραίνεται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα και τα πεπτίδια που σχηματίζονται τοποθετούνται στους -4°C μέχρι την εφαρμογή τους στο στόχο. [13]

2.4.3 Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας

Κάθε επιμέρους δείγμα, μετά απ' τη διαδικασία της πρωτεόλυσης διαλυτοποιήθηκε σε 5μl διαλύματος 50% ACN, 0,1% TFA. 1μl δείγματος συγκρυσταλλώθηκε με 1μl διαλύματος α-κυανο-4-υδροξυκινναμικού οξέος (8,3 mg/ml), ACN (50%), TFA (0,1%) και τοποθετήθηκαν πάνω στη μεταλλική πλάκα, η οποία εισήχθη σε φασματογράφο μάζας Ultraflex extreme (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 χαμηλού 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 .

2.4.4 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων με μεθόδους βιοπληροφορικής

Οι κορυφές των ιόντων των φασμάτων που προέρχονται από MS/MS, συγκρίνονται με εικονικά φάσματα της μηχανής αναζήτησης Mascot. Έπειτα η μηχανή αναζήτησης, δημιουργεί μια λίστα με τα πιο πιθανά πεπτίδια και την πηγή τους, η οποία στηρίζεται στην ομολογία της ακολουθία μεταξύ πραγματικών και εικονικών φασμάτων που βρίσκονται μέσα στη βάση δεδομένων

2.5 Cryo-electron tomography

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία ήταν η εξής:

Τα βακτήρια που αναπτύχθηκαν στις 2 μόνο συνθήκες θείου, υπέστησαν φυγοκέντρηση για 3min στα 300g. Το ίζημα αναμείχθηκε με κolloειδή σωματίδια χρυσού 10nm και μεταφέρθηκε άμεσα σε αποφορτισμένα Quantifoil EM πλακίδια άνθρακα. Τα πλακίδια αυτά καταβυθίστηκαν-ψύχθηκαν (plunge-frozen) σε υγρό αιθάνιο, το οποίο είχε ψυχθεί σε θερμοκρασίες υγρού αζώτου, χρησιμοποιώντας μία Vitrobot (FEI Corp, Hillsboro, USA). Τα πλακίδια παρατηρήθηκαν σε μία Titan Krios (FEI), η οποία λειτουργεί στα 300 kV και είναι εξοπλισμένη με μία Gatan ενεργειακή κολώνα φιλτραρίσματος και μία 2k Ultrascan 1000 CCD κάμερα (Gatan, Pleasanton, USA). Οι κλίσεις αποκτήθηκαν με αύξηση 2° καλύπτοντας το εύρος από -

60° μέχρι +60°. Η αθροιστική δόση ήταν λιγότερο από 10.000 ηλεκτρόνια/nm² και η αποεστίαση από -5 μέχρι -10μm.

Για το *Cba.tepidum* καταγράφηκε ένα σύνολο από 19 τομογραφήματα όταν το βακτήριο αναπτύχθηκε στις συνθήκες Α, και ένα σύνολο από 6 τομογραφήματα για τις συνθήκες Γ. Τα τομογραφήματα ανακατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας την Etomo (Boulder Laboratory for 3D Electron Microscopy) [34]. Η απεικόνιση, η απόδοση του όγκου και η τμηματοποίηση διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας το 3dmod πρόγραμμα του πακέτου Amira (FEI Corp, Hillsboro, USA). Η τελική δομή της σύνδεσης της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με το χλωρόσωμα (**Εικόνα 23**), δημιουργήθηκε με χειροκίνητη ευθυγράμμιση και τοπική βελτίωση χρησιμοποιώντας την Dynamo (www.dynamo-em.org) [35].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Καλλιέργεια και ανάπτυξη του θειοβακτηρίου *Chl. Tepidum*

Το *Cba.tepidum* καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό όπου S²⁻ και S₂O₃²⁻ συνυπήρχαν (συνθήκες Α), σε θρεπτικό που περιείχε μόνο S₂O₃²⁻ (συνθήκες Β) και σε θρεπτικό που περιείχε μόνο S²⁻ (συνθήκες Γ). Στην εικόνα 8 φαίνονται οι καλλιέργειες του βακτηρίου στις 3 διαφορετικές συνθήκες καθώς και οι διαφορές που παρουσιάζουν. Η ανάπτυξη του βακτηρίου διήρκησε 24-30 ώρες όταν αυτό καλλιεργήθηκε στις συνθήκες Α και Β, ενώ περισσότερες από 30 ώρες χρειάστηκαν για την ανάπτυξη του βακτηρίου στις συνθήκες Γ. Η διαφορά χρώματος μαρτυρά την ύπαρξη μεγαλύτερης συγκεντρώσεως βακτηριοχλωροφύλλης κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου στις συνθήκες Α και Β.



Εικόνα 10: Καλλιέργεια *Chlorobaculum tepidum* σε διαφορετικές πηγές θείου

A: πηγή $S_2O_3^{2-}$ και S^{2-} (κέντρο)

B: πηγή $S_2O_3^{2-}$ (αριστερά)

C: πηγή S^{2-} (δεξιά)

3.2 Καμπύλες ανάπτυξης

Στις καλλιέργειες του *Cba. tepidum* που περιέχουν S^{2-} and $S_2O_3^{2-}$, κατά προτίμηση οξειδώνεται το S^{2-} , σχηματίζοντας σφαιρίδια στοιχειακού θείου. Καθώς το S^{2-} εξαντλείται, τα $S_2O_3^{2-}$ και S^0 οξειδώνονται σε θειικά (SO_4^{2-}). Για να μελετήσουμε την επίδραση που έχει το $S_2O_3^{2-}$ στο σχηματισμό σφαιριδίων στοιχειακού θείου, καλλιεργήσαμε το βακτήριο υπό την παρουσία S^{2-} and $S_2O_3^{2-}$ (πηγή A) και υπό την παρουσία μόνο S^{2-} (πηγή Γ).

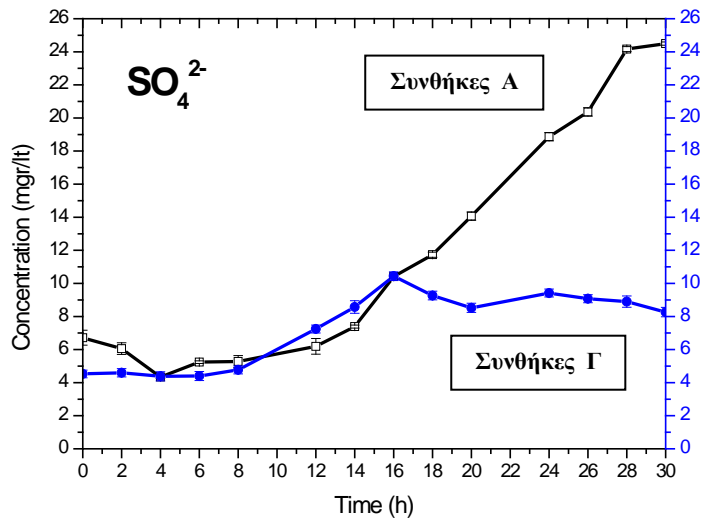
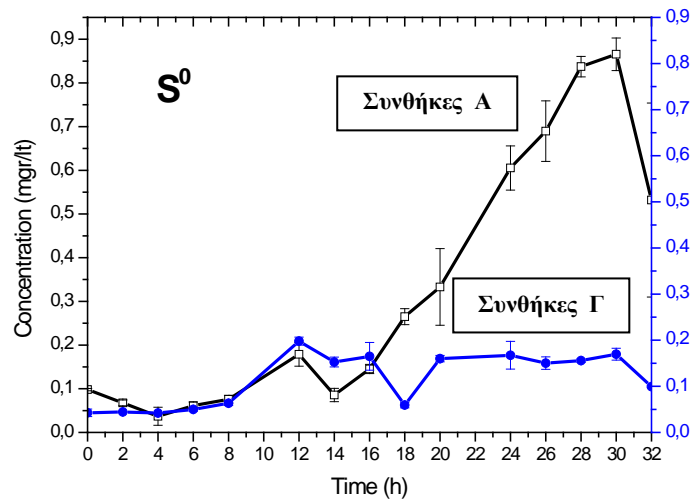
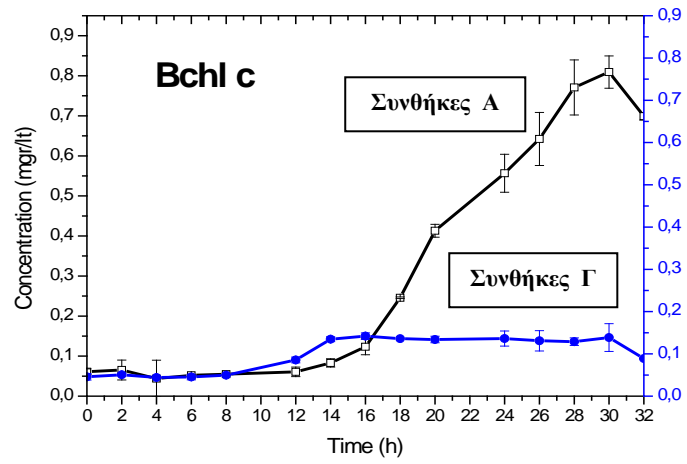
Η μέτρηση του στοιχειακού θείου και της Bchl c έγινε χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρία ορατού, ενώ ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των θειικών πραγματοποιήθηκε με ιοντική χρωματογραφία. Στην **εικόνα 11** φαίνονται οι

συγκεντρώσεις Bchl c, S^0 και SO_4^{2-} , δειγμάτων που λαμβάνονταν κάθε 2 ώρες απ' το θρεπτικό ανάπτυξης του βακτηρίου.

Στην **εικόνα 11Α** φαίνεται η ανάπτυξη των κυττάρων του βακτηρίου, βάση της συγκέντρωσης της Bchl c. Παρατηρούμε ότι η βέλτιστη ανάπτυξη του βακτηρίου πραγματοποιείται στις 26-28 ώρες στις συνθήκες Α, ενώ στις συνθήκες Γ παρατηρούμε μια σταθερή και χαμηλότερη ταχύτητα ανάπτυξης των κυττάρων. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η ταχύτητα ανάπτυξης του κυττάρου αυξάνεται όταν το βακτήριο έχει ως δότη ηλεκτρονίων S^{2-} και $S_2O_3^{2-}$. Όταν το S^{2-} είναι ο μοναδικός δότης ηλεκτρονίων, το βακτήριο χρειάζεται περισσότερες από 30 ώρες για να φτάσει στη στατική φάση ανάπτυξης.

Η καμπύλη συγκέντρωσης του S^0 (**Εικόνα 11Β**) συμβαδίζει με την καμπύλη συγκέντρωσης της Bchl c. Οι συγκεντρώσεις S^0 εμφανίζονται σε υψηλότερο επίπεδο όταν S^{2-} και $S_2O_3^{2-}$ συνυπάρχουν στο θρεπτικό ανάπτυξης με την υψηλότερη συγκέντρωση S^0 να ανιχνεύεται στις 30 ώρες. Αυτό συμβαίνει γιατί κατά το μεταβολισμό του *Cba. tepidum*, η οξειδωση τωνθειούχων καιθειοθειικών συμβάλλει στη δημιουργία στοιχειακού θείου (**Εικόνα 5**). Το κοινό στοιχείο του διαγράμματος παρουσιάζεται στις 32 ώρες όπου και για τις 2 πηγές η συγκέντρωση του στοιχειακού θείου αρχίζει και μειώνεται.

Παράλληλα μετρήσαμε τη συγκέντρωση τωνθειικών, τα οποία αποτελούν την υψηλότερη οξειδωτική μορφή του θείου. Υπάρχει μια σαφής συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των βακτηριακών κυττάρων και της παραγωγήςθειικών, άσχετα με το αν το $S_2O_3^{2-}$ είναι παρόν στο θρεπτικό ή όχι. Η **εικόνα 11Γ** φαίνεται τη συγκέντρωση τωνθειικών ιόντων όταν το βακτήριο αναπτύσσεται στις συνθήκες Α και Γ. Αυτό που παρατηρείται ότι η μέγιστη συγκέντρωση τωνθειικών στις 16 ώρες είναι κοινή και για τις καμπύλες. Κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου στις συνθήκες Α, η συγκέντρωση των SO_4^{2-} ιόντων φαίνεται να φτάνει τη μέγιστη τιμή της στις 30 ώρες, τη στιγμή δηλαδή που το βακτήριο εμφανίζει τη μέγιστη τιμή ανάπτυξής του. Οι συγκεντρώσειςθειικών όταν το βακτήριο αναπτύσσεται στις συνθήκες Γ εμφανίζονται ξανά χαμηλότερες και φτάνουν τη μέγιστη τιμή τους στις 16 ώρες, γεγονός που ίσως οφείλεται στην ασθενέστερη ανάπτυξη του βακτηρίου στην συγκεκριμένη πηγή.

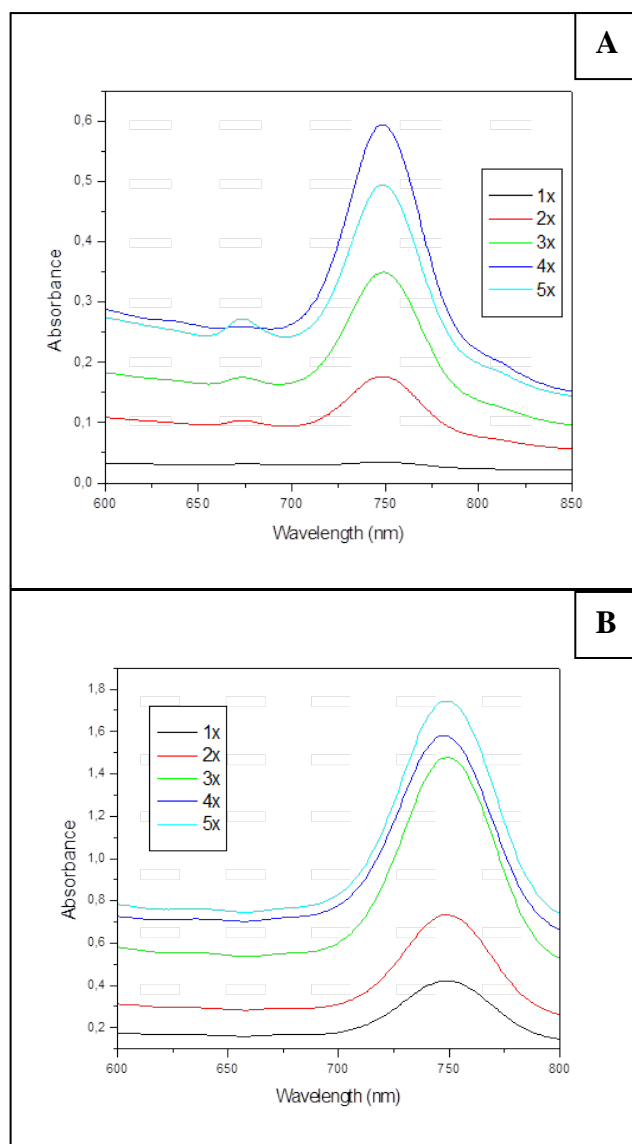


Εικόνα 11: Α. Κατανομή συγκέντρωσης Bchl c κατά την ανάπτυξη του *Cba. tepidum* σε θειούχα και θειοθειικά-συνθήκες Α (διακεκομμένη γραμμή) και μόνο σε θειούχα-συνθήκες Γ (συνεχόμενη γραμμή)
Β. Σχηματισμός στοιχειακού θείου κατά την οξείδωση ανόργανων ενώσεων θείου, κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του *Cba. tepidum* σε θειούχα και θειοθειικά-συνθήκες Α (διακεκομμένη γραμμή) και μόνο σε θειούχα-συνθήκες Γ (συνεχόμενη γραμμή)
Γ. Μετασχηματισμό των ενώσεων του θείου σε θειικά σε καλλιέργεια 1-L του *Cba. tepidum*, όταν αναπτύσσεται σε θειούχα και θειοθειικά-συνθήκες Α (διακεκομμένη γραμμή) και μόνο σε θειούχα-συνθήκες Γ (συνεχόμενη γραμμή)

3.3 Ανάπτυξη βακτηρίου σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειούχων ενώσεων

Όπως αναφέρθηκε, το *Cba.tepidum* αυξάνεται ραγδαίως σε θρεπτικό που περιέχει θειούχα και θειοθειικά (συνθήκες Α) και συγκεκριμένα σε συγκεντρώσεις 7,7mM και 4mM αντίστοιχα. Όταν το βακτήριο αναπτύχθηκε κάτω απ' αυτές τις συνθήκες, 1L καλλιέργειας απέδωσε 2,7gr κυττάρων. Όταν η ανάπτυξη και η απομόνωση των κυττάρων του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε στις συνθήκες Β και Γ, παρατηρήθηκε απόδοση κυττάρων 2,5 και 2gr αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η βέλτιστη ανάπτυξη του βακτηρίου πραγματοποιείται όταν στο θρεπτικό ανάπτυξής του συνυπάρχουν θειούχα και θειοθειικά. Επίσης, αν συγκριθούν οι τιμές απόδοσης κυττάρων των πηγών Β και Γ, συμπεραίνουμε ότι παρ' όλο που τα θειούχα είναι απαραίτητα για την βέλτιστη ανάπτυξη του βακτηρίου, εφόσον αποτελούν τον πρωταρχικό δότη ηλεκτρονίων, η απόδοση των κυττάρων εξαρτάται περισσότερο απ' την αρχική συγκέντρωση $S_2O_3^{2-}$ παρά απ' την αυτή των S^{2-} . [8]

Στην **εικόνα 12** παρατηρούμε τη συμπεριφορά του βακτηρίου με προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων $S_2O_3^{2-}$ (σχήμα Α) και S^{2-} (σχήμα Β), και συγκεκριμένα διπλάσιας ($2x=8mM$ και $15,4mM$), τριπλάσιας ($3x=12mM$ και $23,1mM$), τετραπλάσιας ($4x=16mM$ και $30,8mM$) και πενταπλάσιας ($5x=20mM$ και $38,5mM$) αντίστοιχα. Τα φάσματα πάρθηκαν στο εύρος 600-850nm με την χαρακτηριστική κορυφή της Bchl c να ανιχνεύεται στα 750nm. Παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της Bchl c αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης $S_2O_3^{2-}$ καθώς και S^{2-} , επομένως αυξάνεται και η απόδοση των κυττάρων του βακτηρίου. Η μόνη διαφορά που παρουσιάζουν τα 2 συγκεντρωτικά φάσματα είναι ότι η απόδοση κυττάρων είναι μεγαλύτερη με την προσθήκη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων S^{2-} , το οποίο αποτελεί και τον κύριο ηλεκτρονιοδότη της φωτοσυνθετικής ανάπτυξης του βακτηρίου.



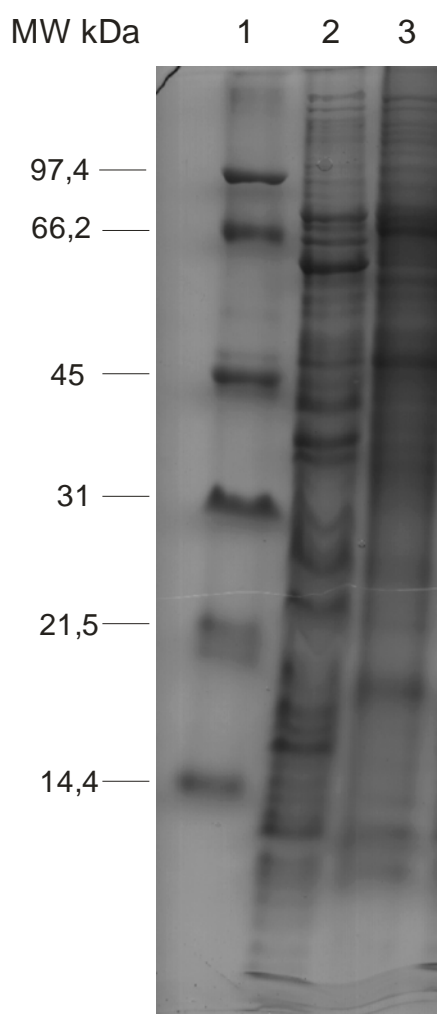
Εικόνα 12: Φάσματα του βακτηρίου σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις $S_2O_3^{2-}$ (σχήμα A) και S^{2-} (σχήμα B). Εύρος παραλαβής φασμάτων 600-850nm. Η χαρακτηριστική κορυφή στα 750nm οφείλεται στη Bchl c.

3.4 Μελέτη του μεμβρανικού πρωτεόματος

3.4.1 Συγκριτική μελέτη του μεμβρανικού και του υδατοδιαλυτού πρωτεόματος με Tricine SDS-PAGE.

Το πρώτο βήμα για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών του μεμβρανικού πρωτεόματος του *Cba.tepidum* είναι ο διαχωρισμός τους με Tricine-SDS-PAGE. Στην **εικόνα 13** φαίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του

μεμβρανικού (λωρίδα 2) και του υδατοδιαλυτού (λωρίδα 3) πρωτεόματος του βακτηρίου. Παρατηρείται ότι ελάχιστος αριθμός πρωτεϊνών έχει απομακρυνθεί απ' το μεμβρανικό στο υδατοδιαλυτό πρωτέομα.

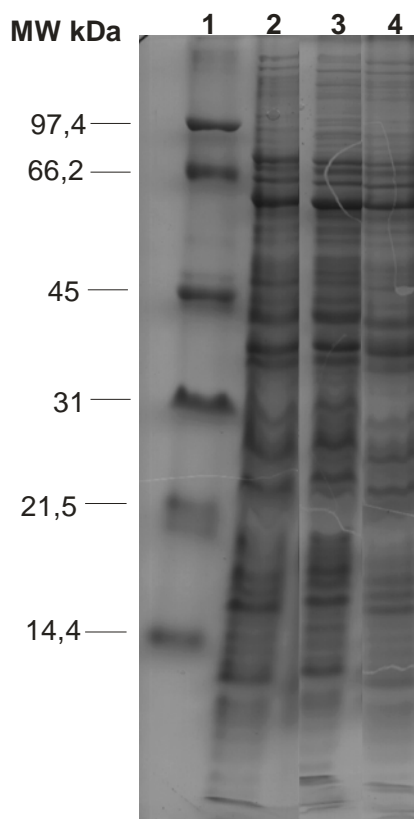


Εικόνα 13: Tricine-SDS-PAGE ολικών μεμβρανών (λωρίδα 2) και κυτταροπλάσματος (λωρίδα 3).

3.4.2 Μελέτη του μεμβρανικού πρωτεόματος με Tricine SDS-PAGE

Για την παρατήρηση διαφορών που παρουσιάζονται μεταξύ των πρωτεομάτων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-Tricine στα ολικά μεμβρανικά κλάσματα του βακτηρίου που απομονώθηκαν μετά την ανάπτυξή του κάτω απ' τις τρεις διαφορετικές συνθήκες. Στην **εικόνα 14** φαίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του ολικού μεμβρανικού πρωτεόματος για τις συνθήκες A (λωρίδα 2), B (λωρίδα 3) και Γ (λωρίδα 4). Οι διαφορές που παρατηρούνται είναι ελάχιστες, με τη μόνη διαφορά να

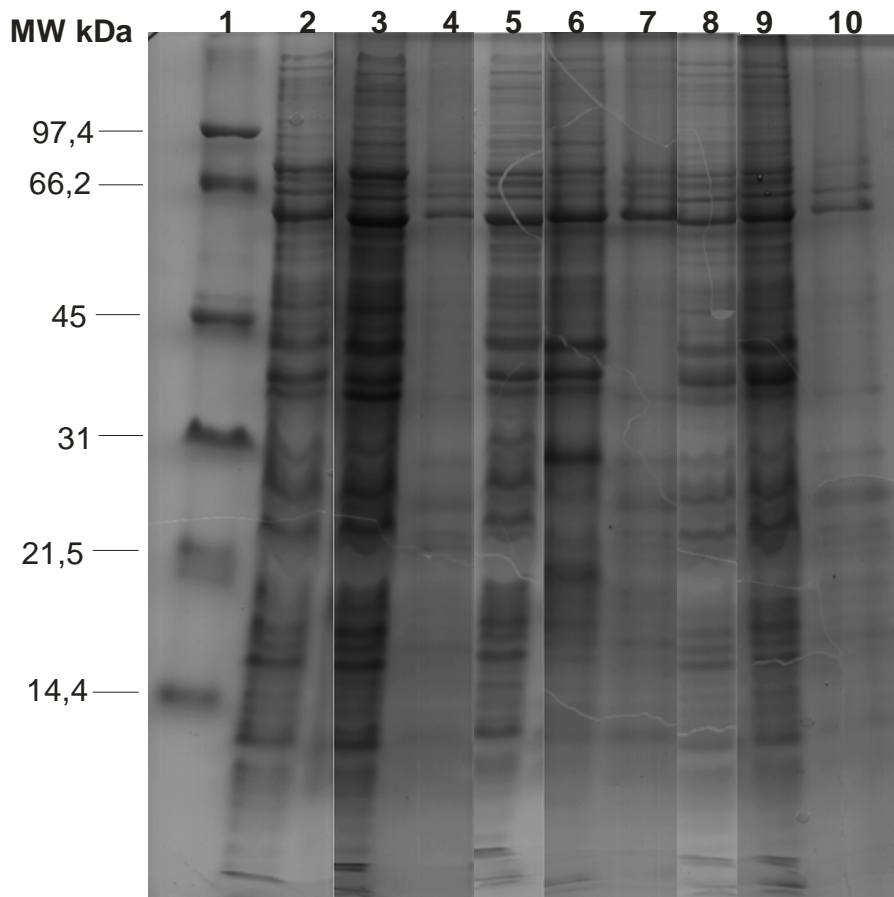
παρουσιάζεται στο γεγονός ότι οι μπάντες της λωρίδας 2 είναι εντονότερες, λόγω μεγαλύτερης πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.



Εικόνα 14: Tricine-SDS-PAGE μεμβρανικού πρωτεόματος για τις συνθήκες A (λωρίδα 2), B (λωρίδα 3) και Γ (λωρίδα 4).

3.4.3 Ανάλυση του εμπλουτισμένου μεμβρανικού πρωτεόματος

Με στόχο την απομάκρυνση περιφερειακών και υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών οι ολικές μεμβράνες του βακτηρίου υπέστησαν κατεργασία με EDTA και στην **εικόνα 15** φαίνεται ο διαχωρισμός των τριών διαφορετικών μεμβρανικών πρωτεομάτων (για τις συνθήκες A, B και Γ αντιστοιχούν οι λωρίδες 3, 6 και 9 αντίστοιχα) καθώς και των υπερκειμένων που προέκυψαν από την υπερφυγοκέντρωση (για τις συνθήκες A, B και Γ αντιστοιχούν οι λωρίδες 4, 7 και 10 αντίστοιχα). Παρατηρούμε ότι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των ολικών μεμβρανών δε φαίνεται να διαφοροποιείται μετά την κατεργασία τους με EDTA, όπως και ότι οι περιφερειακές πρωτεΐνες που απομακρύνονται, είναι ελάχιστες.

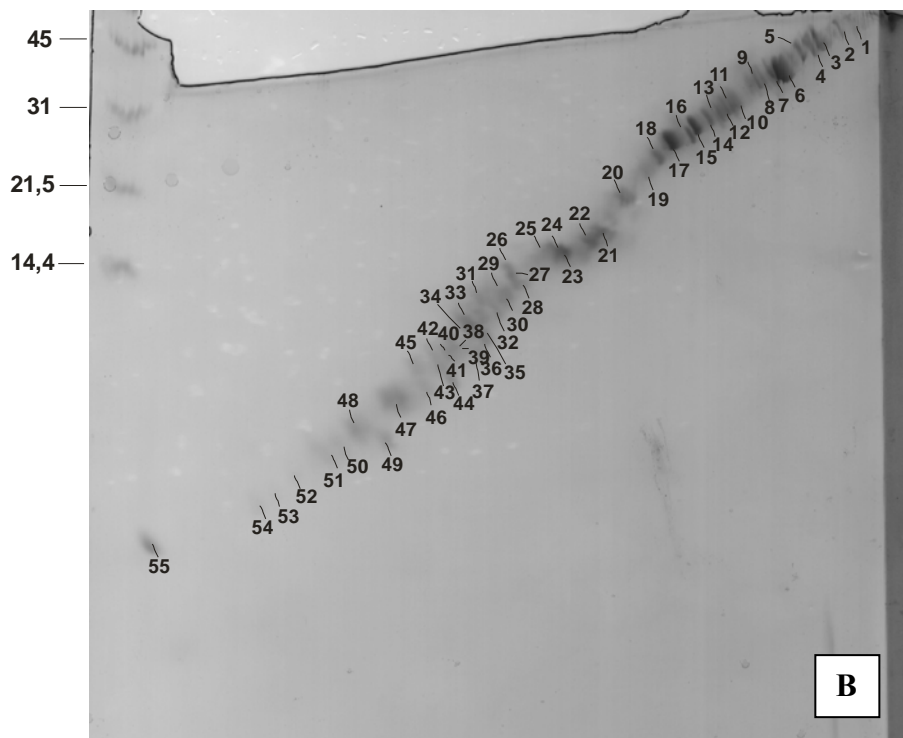
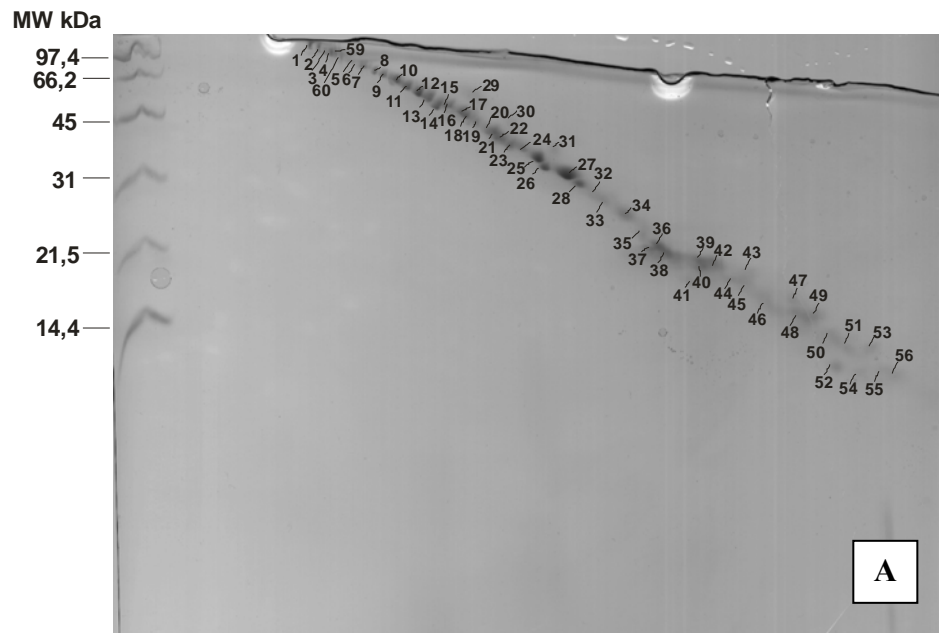


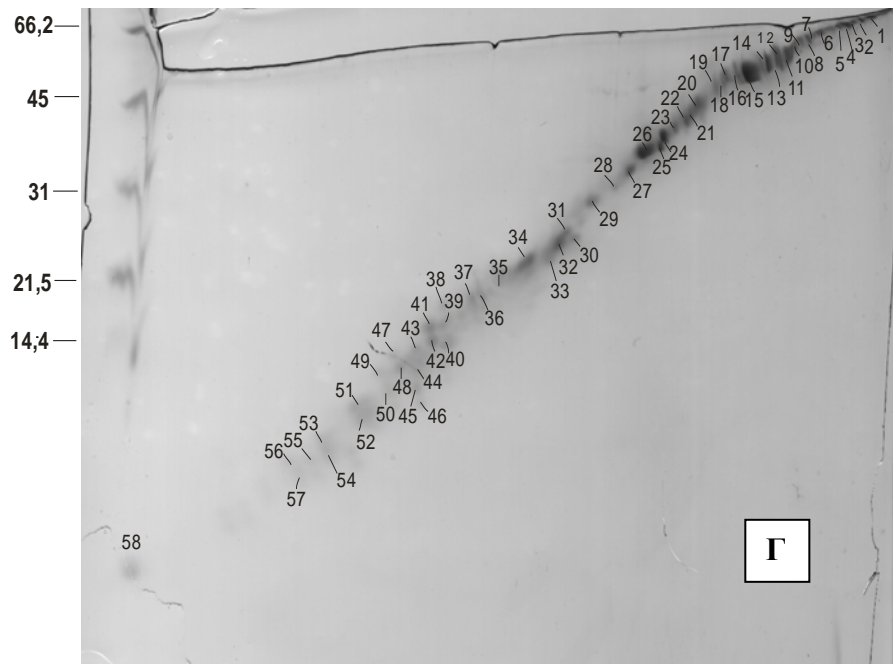
Εικόνα 15: Tricine-SDS-PAGE μεμβρανικού κλάσματος συνθηκών A (λωρίδα 2), B (λωρίδα 5) και Γ (λωρίδα 8), εμπλουτισμένου μεμβρανικού πρωτεόματος συνθηκών A (λωρίδα 3), B (λωρίδα 6) και Γ (λωρίδα 9), και υπερκειμένου εμπλουτισμένου μεμβρανικού πρωτεόματος συνθηκών A (λωρίδα 4), B (λωρίδα 7) και Γ (λωρίδα 10).

3.4.4 Συγκριτική μελέτη των ολικών μεμβρανικών πρωτεομάτων με διδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-SDS PAGE)

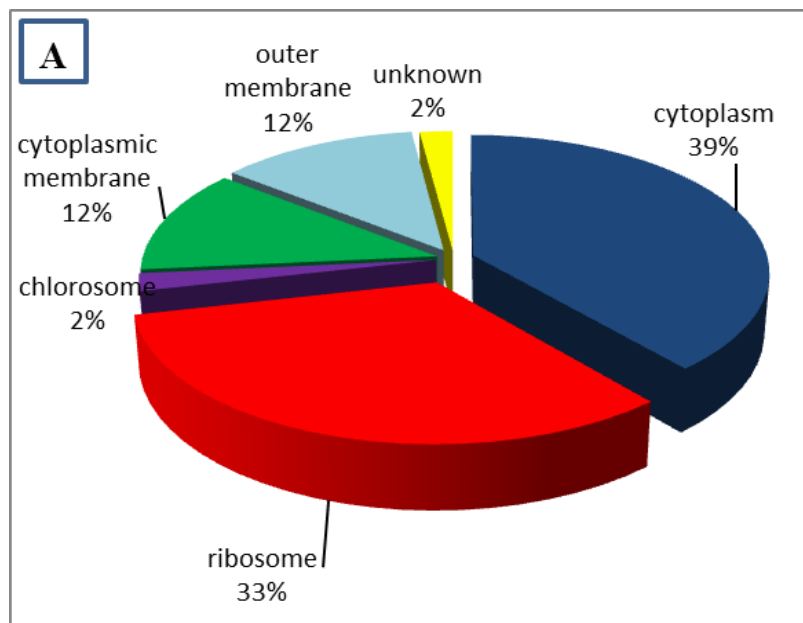
Στην **εικόνα 16** φαίνονται οι δύο διαστάσεων ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα ολικά μεμβρανικά πρωτεόματα του βακτηρίου μετά την ανάπτυξή του στις συνθήκες A, B και Γ. Οι επισημασμένοι, πάνω στην κάθε εικόνα, αριθμοί υποδηλώνουν τα πρωτεϊνικά στίγματα που αποκόπηκαν και μετά από πρωτεόλυσή τους με θρυψίνη, αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας MALDI TOF MS/MS, με σκοπό την ανάλυση και τη σύγκριση των 3 διαφορετικών μεμβρανικών πρωτεομάτων. Στην πηκτή του ολικού μεμβρανικού πρωτεόματος των συνθηκών A (**εικόνα 16A**) διακρίθηκαν 59 πρωτεϊνικά στίγματα τα οποία αναλύθηκαν με MALDI TOF MS/MS με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 49 διαφορετικών πρωτεϊνών (Πίνακας 2, Παράρτημα). Στην πηκτή του ολικού μεμβρανικού πρωτεόματος των συνθηκών B (**εικόνα 16A**) διακρίθηκαν 55 πρωτεϊνικά στίγματα τα οποία αναλύθηκαν με MALDI

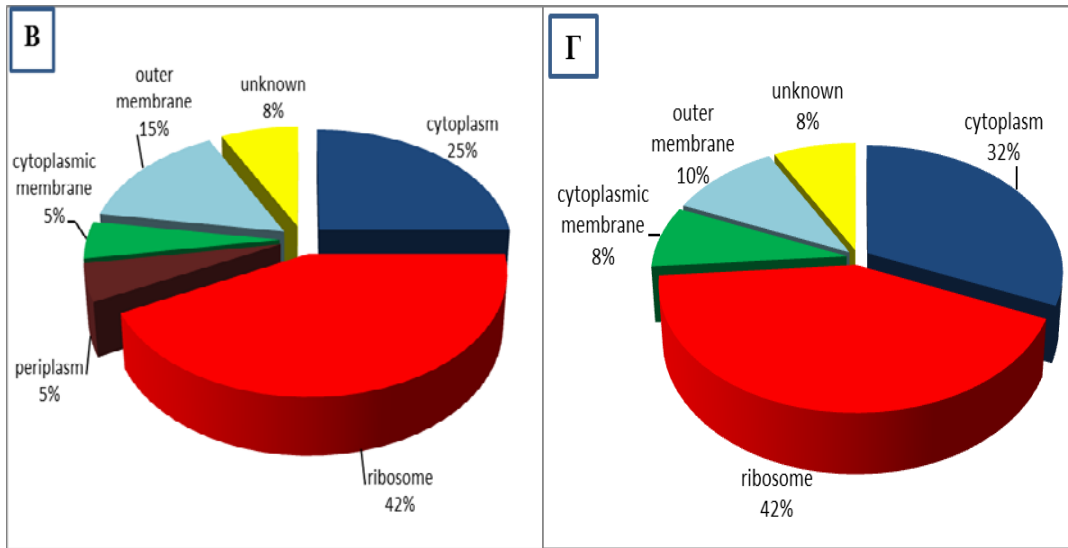
TOF MS/MS με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 40 διαφορετικών πρωτεϊνών (Πίνακας 2, Παράρτημα). Στην πηκτή του ολικού μεμβρανικού πρωτεόματος των συνθηκών Γ (εικόνα 16B) διακρίθηκαν 58 πρωτεϊνικά στίγματα τα οποία αναλύθηκαν με MALDI TOF MS/MS με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 38 διαφορετικών πρωτεϊνών (Πίνακας 2, Παράρτημα). Η θέση των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών καθώς και η προβλεπόμενη απ' το γονιδίωμα λειτουργία τους παρουσιάζονται στις εικόνες 17 και 18 αντίστοιχα.



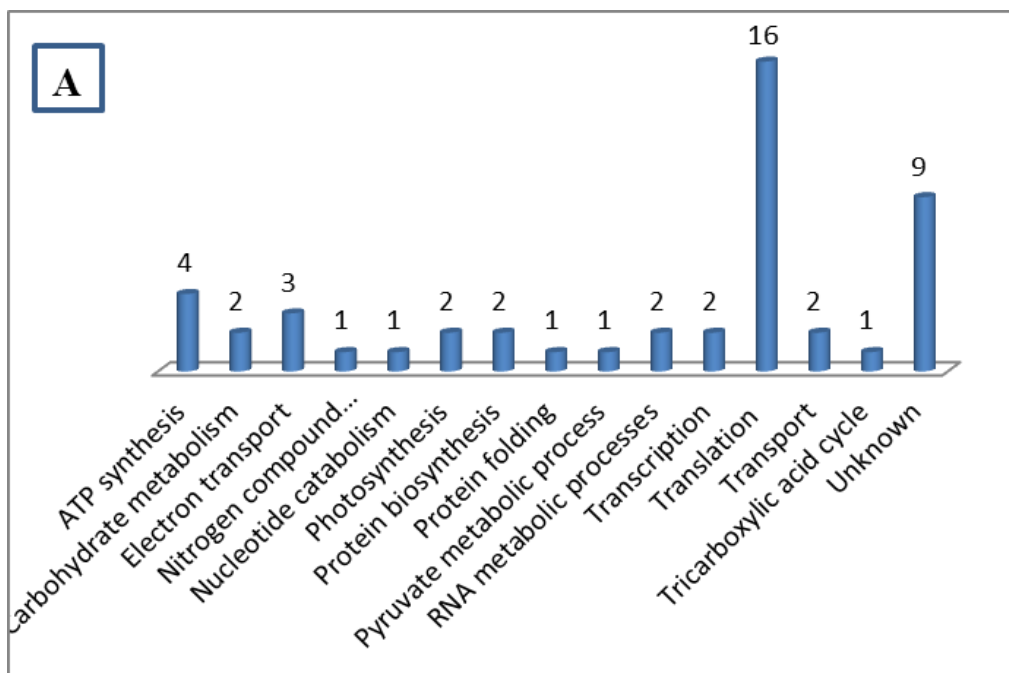


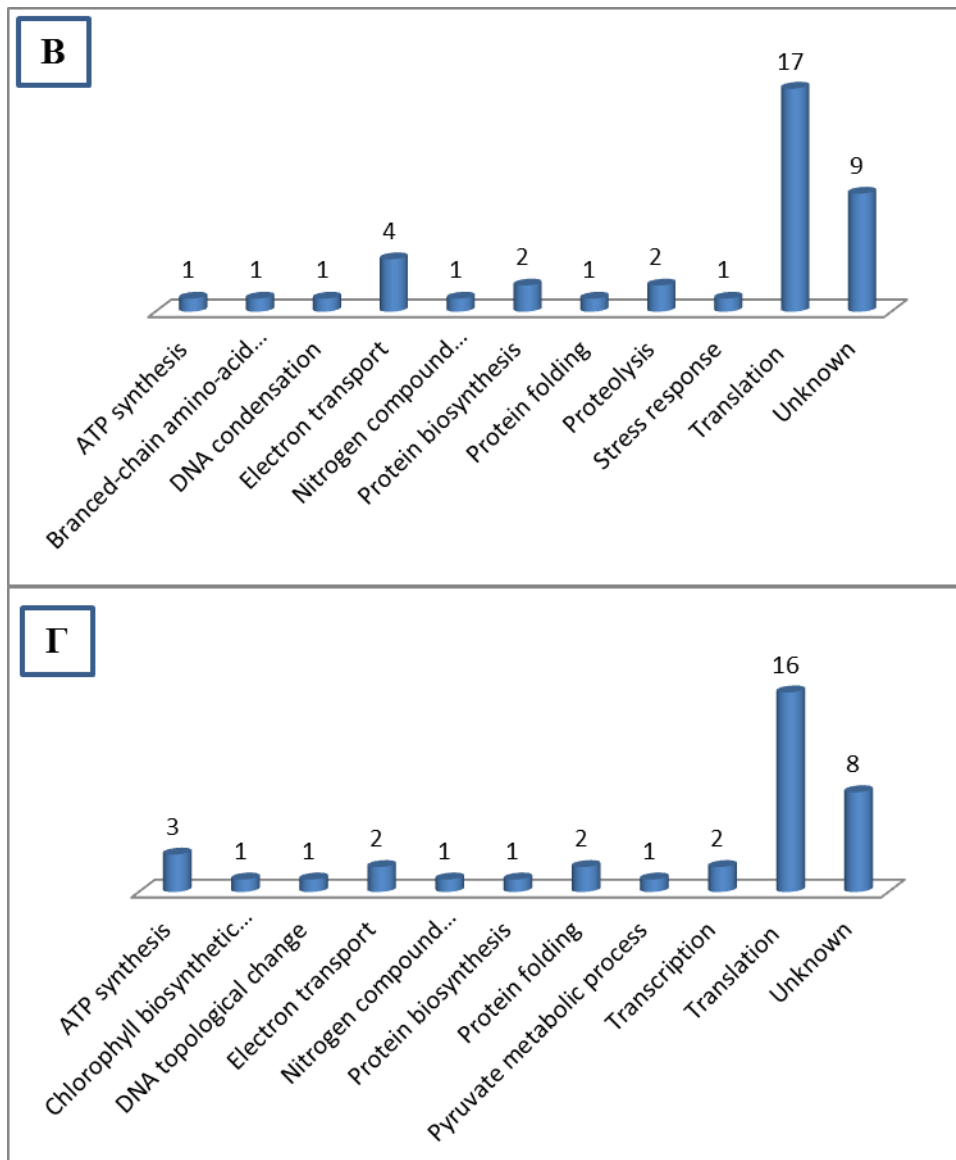
Εικόνα 16: Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Tricine-SDS του ολικού μεμβρανικού πρωτεώματος του βακτηρίου μετά απ' την ανάπτυξη του στις συνθήκες Α, Β και Γ.





Εικόνα 17: Προβλεπόμενη θέση μέσα στο κύτταρο των ταυτοποιημένων από 2D-Tricine-SDS-PAGE πρωτεϊνών του ολικού μεμβρανικού πρωτεόματος του βακτηρίου μετά απ' την ανάπτυξή του στις συνθήκες Α, Β και Γ .



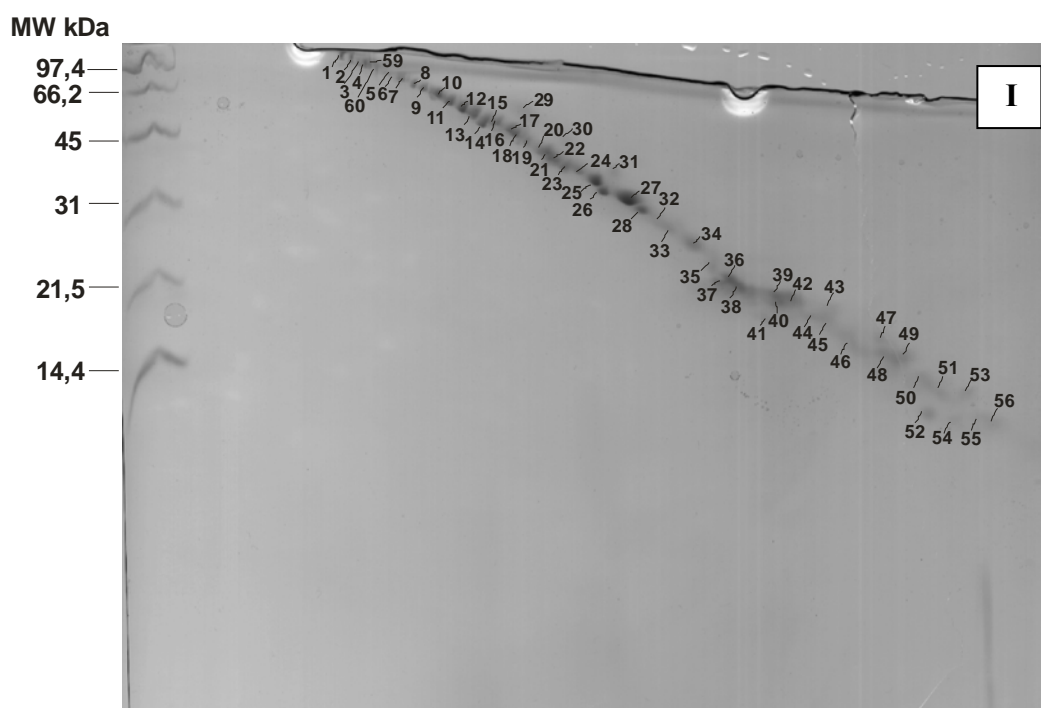


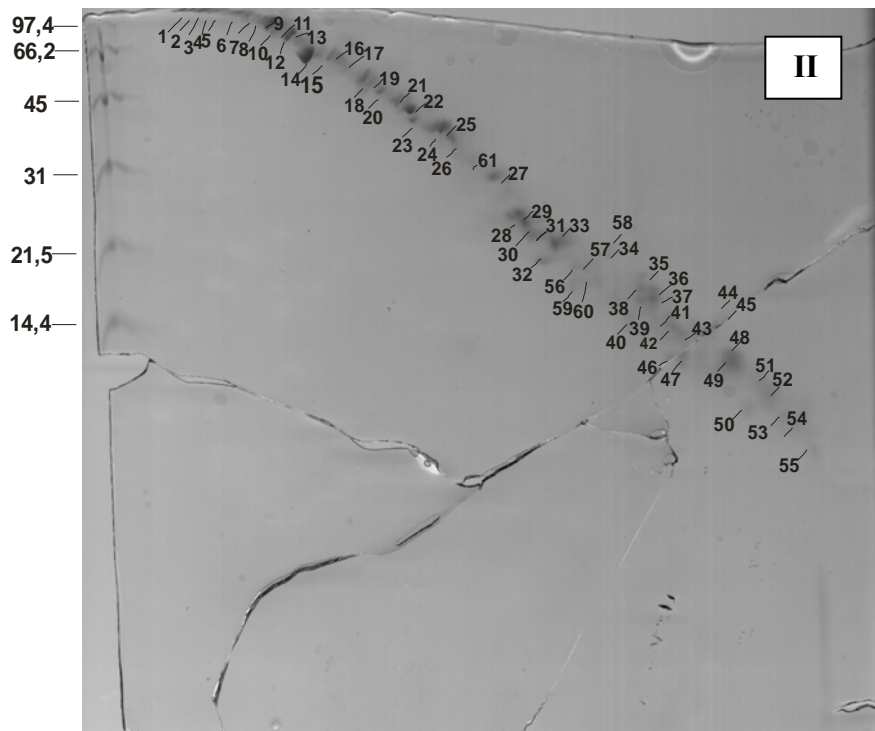
Εικόνα 18: Προβλεπόμενη απ' το γονιδίωμα λειτουργία των ταυτοποιημένων από 2D-Tricine-SDS-PAGE πρωτεϊνών του ολικού μεμβρανικού του ολικού μεμβρανικού πρωτεόματος του βακτηρίου μετά απ' την ανάπτυξή του στις συνθήκες A, B και Γ.

3.4.5 Ανάλυση του ολικού και του επλουτισμένου μεμβρανικού πρωτεόματος με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-SDS PAGE)

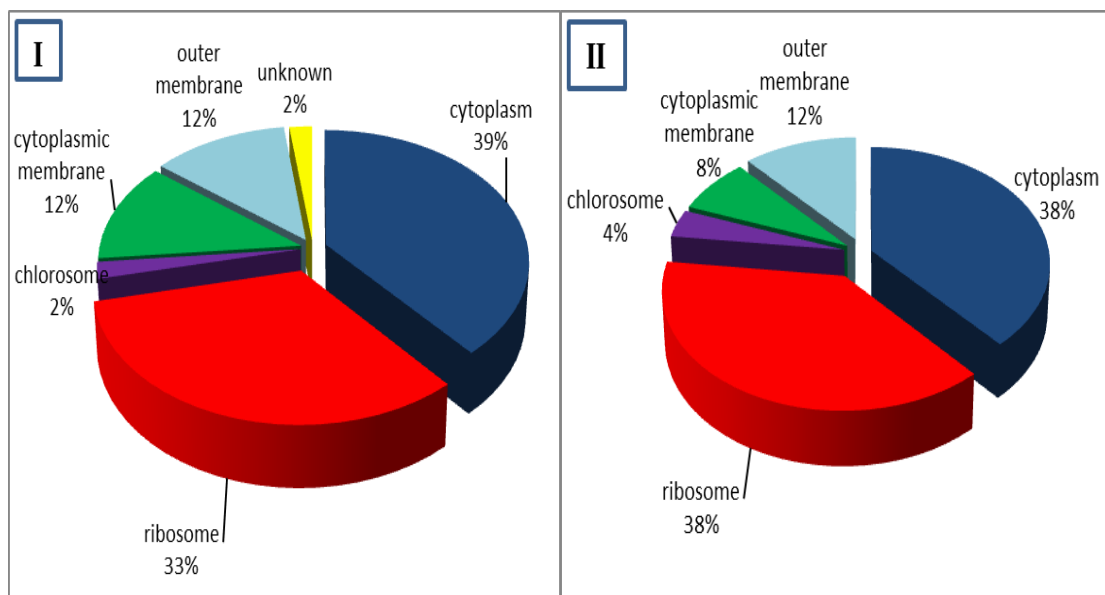
Λόγω του ότι στη μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση κάθε πρωτεϊνική μπάνα περιέχει περισσότερες από μία πρωτεΐνες, για τον καλύτερο διαχωρισμό του πρωτεόματος πραγματοποιείται δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου. Στην **εικόνα 19** φαίνονται οι δύο διαστάσεων ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο ολικό (**A**) και εμπλουτισμένο (**B**) μεμβρανικό πρωτέομα του βακτηρίου μετά απ' την ανάπτυξή του στις συνθήκες A. Παρατηρείται η ανάλυση των πρωτεϊνών σε μια

διαγώνιο με τις υδρόφοβες πρωτεΐνες να αποκλίνουν εκατέρωθεν αυτής. Οι επισημασμένοι, πάνω στην κάθε εικόνα, αριθμοί υποδηλώνουν τα πρωτεϊνικά στίγματα που αποκόπηκαν και μετά από πρωτεόλυσή τους με θρυψίνη, αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας MALDI TOF MS/MS, με σκοπό την ανάλυση και τη σύγκριση των διαφορετικών μεμβρανικών πρωτεομάτων. Στην πηκτή του ολικού μεμβρανικού κλάσματος (**εικόνα 19 I**) διακρίθηκαν 59 πρωτεϊνικά στίγματα, τα οποία αναλύθηκαν με MALDI TOF MS/MS με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 49 διαφορετικών πρωτεϊνών (Πίνακας 1, Παράρτημα). Στην πηκτή του εμπλουτισμένου μεμβρανικού πρωτεόματος (**εικόνα 19 II**) διακρίθηκαν 61 πρωτεϊνικά στίγματα, τα οποία αναλύθηκαν με MALDI TOF MS/MS με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 26 διαφορετικών πρωτεϊνών (Πίνακας 1, Παράρτημα). Απ' τα δεδομένα του πίνακα 1 παρατηρούμε ότι ένα ποσοστό 46,9% πρωτεϊνών απομακρύνονται μετά την πλύση του μεμβρανικού πρωτεόματος με EDTA, με το 32,6% να είναι υδατοδιαλυτές και το 14,3% μεμβρανικές. Η θέση των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών καθώς και η προβλεπόμενη απ' το γονιδίωμα λειτουργία τους παρουσιάζονται στις **εικόνες 20** και **21** αντίστοιχα.

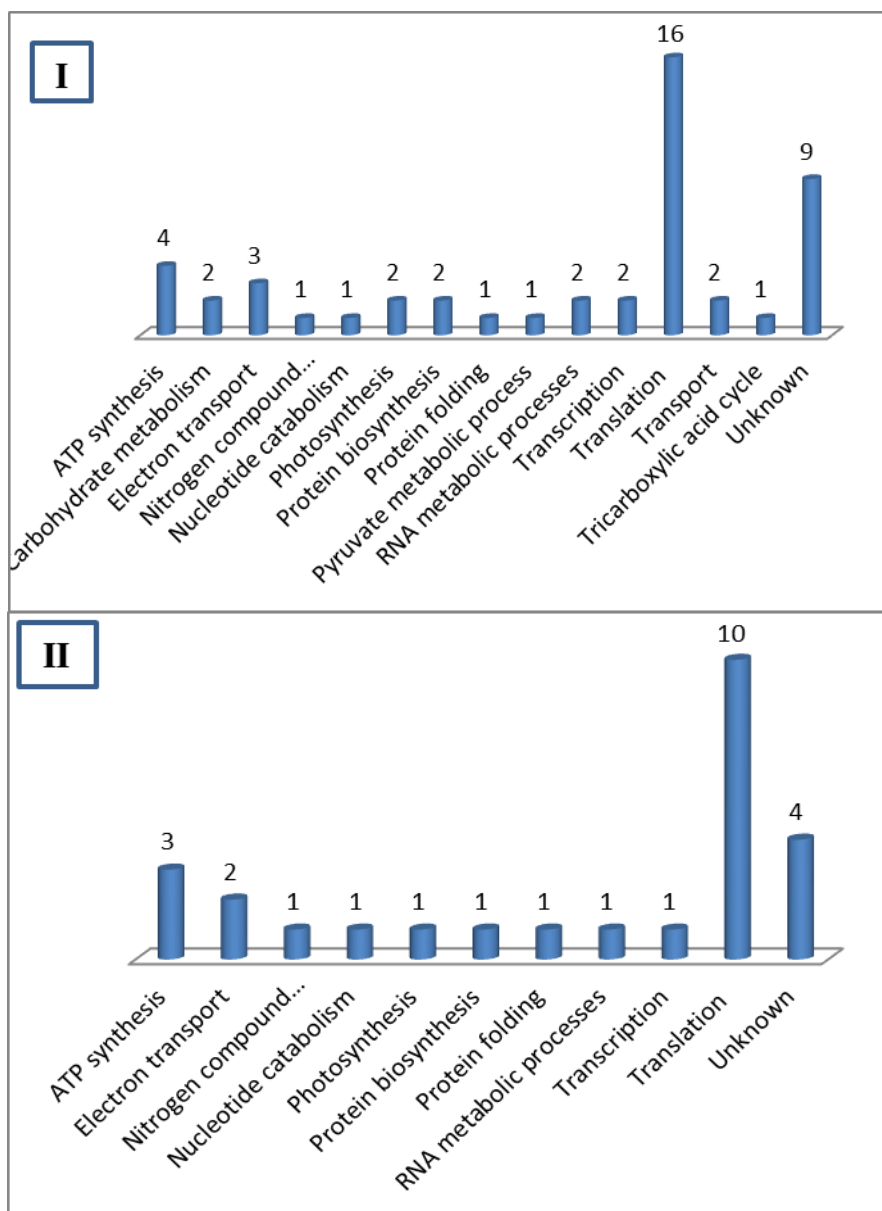




Εικόνα 19: Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση Tricine-SDS του ολικού (I) και του εμπλουτισμένου (II) μεμβρανικού πρωτεόματος του βακτηρίου μετά απ' την ανάπτυξη του στις συνθήκες A.



Εικόνα 20: Προβλεπόμενη θέση μέσα στο κύτταρο των ταυτοποιημένων από 2D-Tricine-SDS-PAGE πρωτεϊνών του ολικού (I) και του εμπλουτισμένου (II) μεμβρανικού πρωτεόματος.



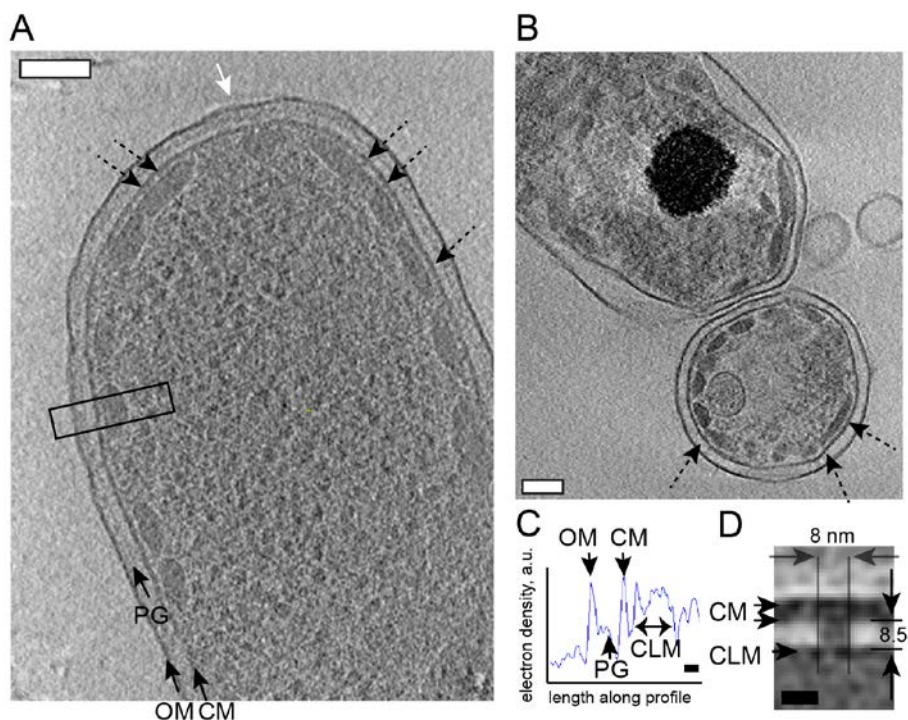
Εικόνα 21: Προβλεπόμενη απ' το γονιδίωμα λειτουργία των ταυτοποιημένων από 2D-Tricine-SDS-PAGE πρωτεϊνών του ολικού (I) και του εμπλουτισμένου (II) μεμβρανικού πρωτεώματος.

3.5 Δομική ανάλυση του βακτηρίου

Το *Cba. tepidum*, ως Gram-αρνητικό βακτήριο, εκτός απ' την κυτταροπλασματική διαθέτει και μια εξωτερική μεμβράνη. Η σημασία του ρόλου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι ύψιστης σημασίας εφόσον περιέχει τα σύμπλοκα αναπνοής και φωτοσύνθεσης του βακτηρίου, όπως είναι το κέντρο αντίδρασης RC και ιδιαίτερα τα χλωροσώματα. Η χρήση cryo-EM έγινε με στόχο τη μελέτη οργάνωσης του βακτηριακού κυττάρου.

Παρά τη σχετικά μεγάλη διάμετρο των βακτηρίων (500-600nm), το πάχος τους είναι μερικά εκατοντάδες nm, αριθμός που επιτρέπει την *in situ* απεικόνιση της αρχιτεκτονικής των εσωτερικών και εξωτερικών μεμβρανών, καθώς και της διάταξης των χλωροσωμάτων στην εσωτερική μεμβράνη (**Εικόνα 22**). Η απόσταση μεταξύ εξωτερικής και κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι περίπου 33nm, ενώ μπορεί να διακριθεί και το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης, μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης (**Εικόνα 22A**).

Τα χλωροσώματα μπορούν να διακριθούν στα τομογραφήματα σαν ελλειψοειδείς διαμορφώσεις με ομοιόμορφη ηλεκτρονική πυκνότητα. Διακριτές επίσης είναι οι συνδέσεις μεταξύ χλωροσωμάτων και κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με τη μέση δομή να αποκαλύπτει την απόσταση μεταξύ τους στα 7nm περίπου, υποδεικνύοντας την παρουσία των συνδετικών πρωτεϊνών. Τα βακτήρια που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό που περιείχε μόνο θειούχα (συνθήκες Γ) περιείχαν μάζες ηλεκτρονικής πυκνότητας μεγέθους $r=96\pm 22\text{nm}$ (**Εικόνα 22B**).

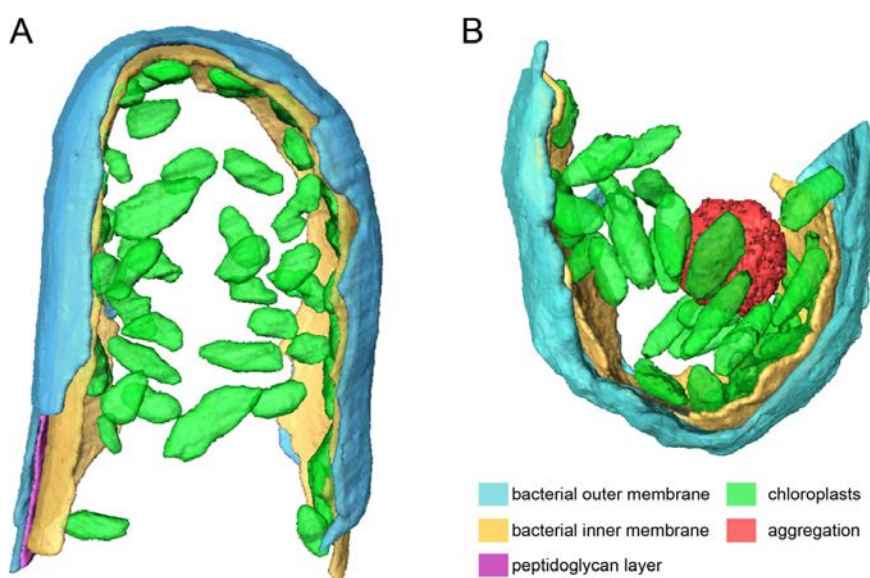


Εικόνα 22: Η παραπάνω εικόνα απεικονίζει ένα τυπικό τομόγραμμα άθικτων κυττάρων του *Cba. tepidum*. Στο σχήμα A φαίνεται ένα κομμάτι x-y πάχους 20nm από κύτταρα που προήλθαν από θρεπτικό που περιείχε θειούχα και θειοθειικά, ενώ στο σχήμα B κύτταρα που προήλθαν από θρεπτικό που περιείχε μόνο θειούχα. Τα μαύρα βέλη δείχνουν την πεπτιδογλυκάνη (PG), την εξωτερική μεμβράνη (OM) και την κυτταροπλασματική μεμβράνη (CT). Τα διακεκομμένα βέλη δείχνουν τη σύνδεση των χλωροσωμάτων στην εσωτερική μεμβράνη, ενώ το άσπρο βέλος δείχνει τις συνδέσεις μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης. Marker bars: άσπρη 100nm, μαύρη 10nm

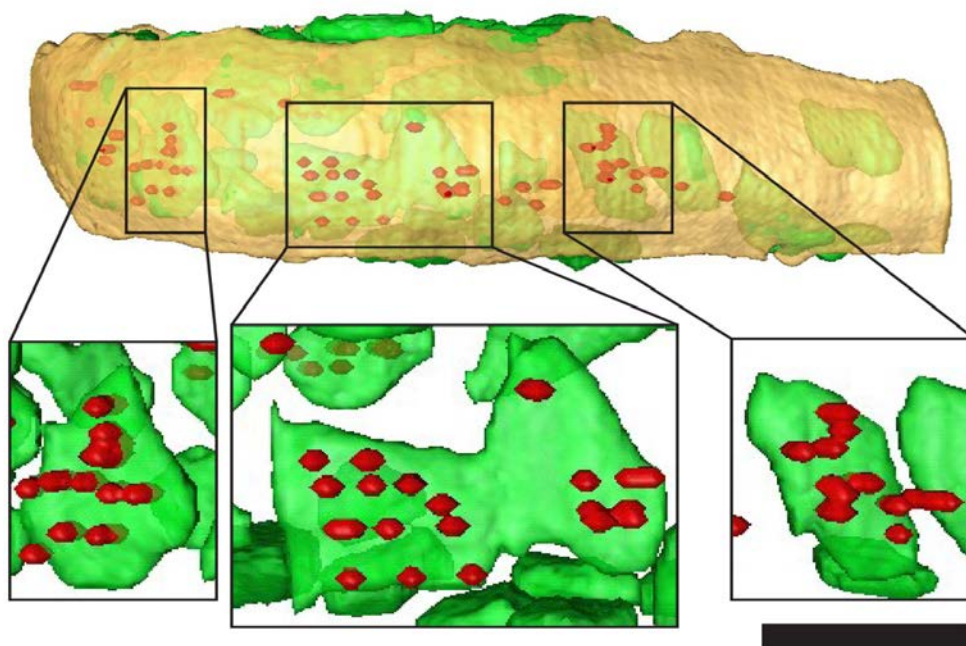
Η απόδοση του όγκου του βακτηρίου που φαίνεται στην **εικόνα 23** παρέχει μια γενική εικόνα της οργάνωσης στο βακτήριο. Η ανακατασκευασμένη **εικόνα 24** επιτρέπει τη λεπτομερή ανάλυση των συνδέσεων μεταξύ χλωροσωμάτων και κέντρου αντίδρασης που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Συγκεκριμένα τα χλωροσώματα συνδέονται στη μεμβράνη του κυττάρου μέσω πρωτεϊνών. Αυτές είναι οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες FMO συνδέονται άμεσα στα RCs. Οι αποστάσεις μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών ποικίλλει, ωστόσο φαίνεται να πλησιάζουν, δημιουργώντας συσσωματώματα, περισσότερο από 100nm (**Εικόνα 25**). Βάση της τρισδιάστατης δομής του κυττάρου φαίνεται ότι τα χλωροσώματα καταλαμβάνουν περίπου το 70% της επιφάνειας της εσωτερικής μεμβράνης των κυττάρων του *Cba.tepidum*. Εμφανίζονται ως ελλειψοειδή αντικείμενα με πτυχωτά άκρα, με μήκος 188 ± 85 nm,

πλάτος 98 ± 37 nm και πάχος 34 ± 13 nm όταν το βακτήριο αναπτύχθηκε στις συνθήκες Α, και μήκος 185 ± 58 nm, πλάτος 70 ± 18 nm και πάχος 34 ± 8 nm όταν το βακτήριο αναπτύχθηκε στις συνθήκες Γ.

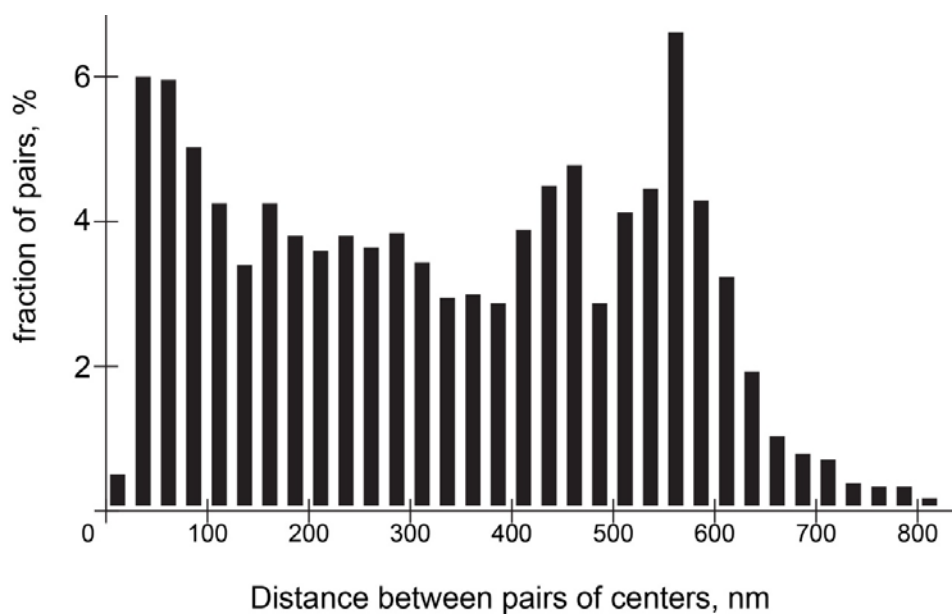
Τέλος η **εικόνα 26** δείχνει τις κατανομές του μήκους, πλάτους και πάχους των χλωροσωμάτων του ίδιου κυττάρου, το οποίο έχει αναπτυχθεί σε διαφορετικές συνθήκες θείου. Με βάση αυτές τις διαστάσεις, ο συνολικός μέσος όγκος των κυττάρων του *Cba. tepidum* που καταλαμβάνεται από χλωροσώματα είναι 328.000 nm^3 για τα κύτταρα των συνθηκών Α και 217.000 nm^3 για τα κύτταρα των συνθηκών Γ.



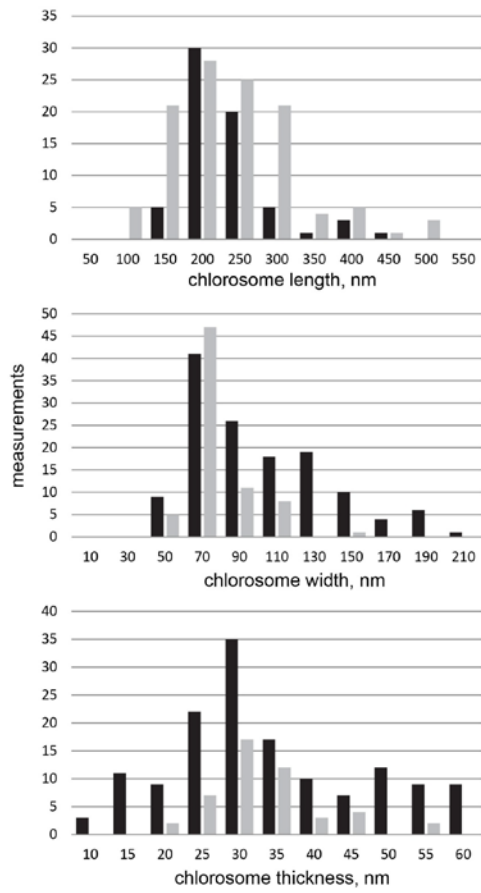
Εικόνα 23: Παρουσίαση της σχίζοντος επιφάνειας και οργάνωση του ενδοκυτταρικού χλωροσώματος του κυττάρου του *Cba. tepidum*, που έχει προέλθει από καλλιέργεια σε θρεπτικό παρουσία S^{2-} και $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (A) και παρουσία μόνο S^{2-} (B).



Εικόνα 24: Σύνδεση των χλωροσωμάτων στην εσωτερική μεμβράνη. Marker bar: 100nm



Εικόνα 25: Διαχωρισμός μεταξύ των ζευγών των RCs που υποδεικνύεται απ' τις ορατές συνδέσεις χλωροσωμάτων-κυτταροπλασματικής μεμβράνης



Εικόνα 26: Κατανομή των διαστάσεων των χλωροσωμάτων που καλλιεργήθηκαν υπό την παρουσία S²⁻ και S₂O₃²⁻ (μαύρες στήλες) και υπό την παρουσία μόνο S²⁻ (γκρι στήλες).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου και ανάλυση με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού και ιοντική χρωματογραφία

Απ' τις συγκεντρώσεις της Bchl c, της εικόνας 11Α, φαίνεται ότι η ανάπτυξη του βακτηρίου είναι μεγαλύτερη στις συνθήκες Α και συγκεκριμένα φτάνει τη μεγαλύτερη τιμή της μεταξύ 26-28 ωρών, ενώ η ανάπτυξη του βακτηρίου στις συνθήκες Γ είναι σταθερή αλλά χαμηλότερη σε απόλυτη τιμή. Αυτό δείχνει ότι η παρουσία $S_2O_3^{2-}$ επιταχύνει την ανάπτυξη των κυττάρων μέσω της παρουσίας περισσότερων δοτών ηλεκτρονίων.

Στην εικόνα 11Β φαίνεται ότι όταν το βακτήριο αναπτύσσεται στις συνθήκες Γ, η συγκέντρωση του στοιχειακού θείου έχει χαμηλότερη απόλυτη τιμή. Το κοινό στοιχείο του διαγράμματος παρουσιάζεται στις 32 ώρες όπου και για τις 2 πηγές η συγκέντρωση του στοιχειακού θείου αρχίζει και μειώνεται. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η συγκέντρωση του στοιχειακού θείου εξαρτάται απ' την παρουσία και των δύο δοτών ηλεκτρονίων στο θρεπτικό ανάπτυξης του *Cba. tepidum*.

Στην εικόνα 11Γ φαίνεται η συγκέντρωση των θειϊκών ιόντων όταν το βακτήριο αναπτύσσεται στις συνθήκες Α και Γ. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι η μέγιστη συγκέντρωση των θειϊκών στις 16 ώρες είναι κοινή και για τις καμπύλες. Κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου στις συνθήκες Α, η συγκέντρωση των SO_4^{2-} ιόντων φαίνεται να φτάνει τη μέγιστη τιμή της στις 30 ώρες, τη στιγμή δηλαδή που το βακτήριο εμφανίζει τη μέγιστη τιμή ανάπτυξής του. Παρατηρούμε ότι και στα δύο διαγράμματα η πορεία ανάπτυξης θειϊκών είναι ανοδική, με την πορεία της πηγής Γ να παρουσιάζει και πάλι χαμηλότερη απόλυτη τιμή. Το γεγονός αυτό είναι απολύτως λογικό εφόσον από μόνα τους τα θειούχα δεν είναι ικανά για οξείδωση σε θειϊκά. Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι μόνο όταν θειούχα και θειοθειϊκά συνυπάρχουν στο θρεπτικό ανάπτυξης του βακτηρίου, πραγματοποιείται η πλήρης οξείδωση αυτών σε θειϊκά και έτσι πετυχαίνεται και η βέλτιστη ανάπτυξη του *Cba. tepidum*.

4.2 Συγκριτική μελέτη των ολικών μεμβρανικών πρωτεομάτων με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-SDS PAGE)

Η ανάλυση των ολικών μεμβρανικών πρωτεομάτων έγινε με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση SDS-Tricine. Έτσι προέκυψαν 59, 55 και 58 πρωτεϊνικά στίγματα από τις πηκτές της πηγής Α, Β και Γ αντίστοιχα, τα οποία αποκόπηκαν και ύστερα από κατεργασία τους με θρυψίνη, αναλύθηκαν με MALDI-TOF MS/MS με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 49, 44 και 43 διαφορετικών πρωτεϊνών αντίστοιχα.

Η πρόβλεψη της θέσης των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο μας δείχνει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνών είναι υδατοδιαλυτές και για τις τρεις συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου. Απ' τη λειτουργία των πρωτεϊνών, όπως αυτή προβλέφθηκε απ' το γονιδίωμά τους, παρατηρούμε την ταυτοποίηση πρωτεϊνών με λειτουργία στο μεταβολισμό του θείου, όπως η πρωτεΐνη **sulfur oxidation SoxB**, στη φωτοσύνθεση, καθώς και σε σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως η μεταφορά ηλεκτρονίων και η σύνθεση του ATP. Επίσης παρατηρήθηκε η ταυτοποίηση της περισσότερο υδρόφοβης πρωτεΐνης **sodium solute symporter**, καθώς και της χλωροσωμικής πρωτεΐνης **csmC**.

4.3 Ανάλυση του ολικού και του εμπλουτισμένου μεμβρανικού πρωτεόματος της πηγής Α με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Όπως και σε προηγούμενες μελέτες [44], για την ανάλυση και τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο πρωτέομα του βακτηρίου, αναγκαία ήταν η δημιουργία υποπρωτεομάτων. Έτσι αρχικά διαχωρίστηκε το υδατοδιαλυτό απ' το μεμβρανικό πρωτέομα και στη συνέχεια αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-Tricine. Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών του πρωτεόματος, συνδυάστηκαν δύο πηκτές με διαφορετική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και πραγματοποιήθηκε δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση με την πρώτη διάσταση να περιέχει 6M ουρίας. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με τη μορφή στιγμάτων σε μια διαγώνιο με τις υδρόφοβες πρωτεΐνες να αποκλίνουν εκατέρωθεν αυτής. Συνολικά βρέθηκαν 59 διαφορετικά στίγματα, τα οποία αποκόπηκαν και ύστερα από κατεργασία τους με θρυψίνη αναλύθηκαν με χρήση του φασματογράφου μάζας MALDI-TOF MS/MS με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 49 διαφορετικών πρωτεϊνών. Η θέση τους μέσα στο κύτταρο προβλέφθηκε με προγράμματα βιοπληροφορικής και έδειξε έναν σημαντικό

αριθμό πρωτεϊνών να συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων, τη μετάφραση καθώς και τη φωτοσύνθεση (**Εικόνα 20A**). Επίσης ένα σημαντικά μεγάλο ποσοστό πρωτεϊνών, 70%, ήταν υδατοδιαλυτές. (**Εικόνα 21A**).

Έτσι έγινε η δοκιμή απομόνωσης καθαρών μεμβρανών χωρίς προσμίξεις από υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται μέσω ηλεκτροστατικών ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τη μεμβράνη. Αυτό επετεύχθη με την πλύση των ολικών μεμβρανών με EDTA [44]. Το εμπλουτισμένο πλέον πρωτόμα συλλέχθηκε και αναλύθηκε με δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση SDS-Tricine, όπως προηγουμένως. Αυτή τη φορά προέκυψαν 61 διαφορετικά πρωτεϊνικά στίγματα, η ανάλυση με MALDI- TOF MS/MS των οποίων είχε ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 26 διαφορετικών πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τον Πίνακα 1 του παραρτήματος, απομακρύνθηκε το 46,9% των πρωτεϊνών που είχαν βρεθεί στο ολικό μεμβρανικό πρωτόμα, με το 32,6% αυτών να είναι υδατοδιαλυτές. Παρατηρούμε ότι ένα σημαντικά μεγάλο ποσοστό ριβοσωμικών πρωτεϊνών παραμένει στις μεμβράνες μετά την πλύση με EDTA, λόγω της ισχυρής πρόσδεσης του ριβοσώματος στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

4.4 Cryo-electron tomography

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο μελετήσαμε την οργάνωση ολόκληρων κυττάρων του πράσινου φωτοσυνθετικού θειοβακτηρίου *Cba.tepidum*. Αυτή η προσέγγιση παρέχει ποιοτικές πληροφορίες υψηλής ανάλυσης σχετικά με το μέγεθος και το σχήμα των χλωροσωμάτων καθώς και για την οργάνωση των μεμβρανών του κυττάρου. Διάφορες μέθοδοι απεικόνισης των χλωροσωμάτων, όπως η ξήρανση και εκχύλιση των κυττάρων και προσρόφηση αυτών σε στρώμα άνθρακα ή η απεικόνιση ενός λεπτού τμήματος, τροποποιούσαν το μετρούμενο μέγεθος και έτσι τα αποτελέσματα που παρατηρούνταν ήταν διαφορετικά από έρευνα σε έρευνα. Η έρευνα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιώντας cryo-electron τομογραφία, η οποία στηρίζεται στην τρισδιάστατη απεικόνιση των χλωροσωμάτων στη φυσική τους κατάσταση, θέτει ένα νέο πρότυπο για τη μελέτη της δομής των φωτοσυνθετικών βακτηρίων.

Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών βακτηρίων αποτελείται από μια εσωτερική και μία εξωτερική μεμβράνη, οι οποίες διαχωρίζονται από ένα στρώμα πεπτιδογλυκάνης που περιέχει το περίπλασμα. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν τη λεπτομερή διαστρωμάτωση της εξωτερικής και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης

και του στρώματος πεπτιδογλυκάνης (**Εικόνα 23**), καθώς και το ότι το μεμβρανικό σύστημα του *Cba.tepidum* δεν υφίσταται μεταβολή με αλλαγή του δότη ηλεκτρονίων.

Τα χλωροσώματα, τα οποία αποτελούν τα μεγαλύτερα φωτοσυνθετικά σύμπλοκα-κεραίες συγκομιδής φωτός, επισυνάπτονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου και είναι επιμήκεις δομές που αποτελούνται από συσσωματώματα. Περισσότερα από 250,000 μόρια Bchl βρίσκονται πυκνά κατανεμημένα στα χλωροσώματα δίνοντας τους τη δυνατότητα σύλληψης της ηλιακής ενέργειας με υψηλή αποτελεσματικότητα. Έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες για τη δομική και λειτουργική ανάλυση των χλωροσωμάτων, [37, 38] και το μέγεθός τους έχει προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους, όπως Atomic Force Microscopy (AFM) και Transmission Electron Microscopy (TEM). [39] Οι μελέτες αυτές τονίζουν τη σημασία που έχει η απεικόνιση των χλωροσωμάτων στη φυσική και ενυδατωμένη τους κατάσταση. Μέσω της cryo-electron τομογραφίας καταφέραμε για πρώτη φορά να απεικονίσουμε την τρισδιάστατη δομή των χλωροσωμάτων στη φυσική τους κατάσταση. Οι απόλυτες τιμές που μετρήθηκαν για το μήκος και το πλάτος των χλωροσωμάτων ήρθαν σε συμφωνία με μετρήσεις προηγούμενων ερευνών. Επίσης αποδείξαμε ότι τα χλωροσώματα κυττάρων που είχαν αναπτυχθεί σε διαφορετικές συνθήκες, είχαν σημαντική διαφορά κατανομής πλάτους (**Εικόνα 26**). Δεδομένης της ακρίβειας της μεθόδου cryo-EM, οι παρατηρούμενες μεταβολές στις διαστάσεις του χλωροσώματος αντιπροσωπεύουν τις γνήσιες διαφορές του μεγέθους των χλωροσωμάτων ενός κυττάρου. Έχει αποδειχθεί ότι το μέγεθος του χλωροσώματος αυξάνεται κατά τη διάρκεια ανάπτυξής του.[40] Γι' αυτό το λόγο, περιμένουμε οι μετρήσεις μας να αντιπροσωπεύουν τα χλωροσώματα σε διαφορετικούς βαθμούς ωριμότητας μέσα στο ίδιο βακτηριακό κύτταρο.

Ακόμα ένα ζήτημα όσον αφορά τα χλωροσώματα, είναι τα μέσα με τα οποία αυτά συνδέονται με την εσωτερική μεμβράνη. Πρόσφατα εκτιμήθηκε η απόσταση που έχουν τα χλωροσώματα απ' την εσωτερική μεμβράνη χρησιμοποιώντας AFM και παρατηρήθηκε ότι οι μεμβράνες που προσδέουν τα χλωροσώματα διαθέτουν διακριτές σφαιρικές προεξοχές που φτάνουν τα 30nm σε μήκος και τα 6nm σε ύψος. [35] Η χρήση της cryo-ET επέτρεψε την απεικόνιση των χλωροσωμάτων που συνδέονται στις μεμβράνες και τα αποτελέσματα έδειξαν το ύψος των προεξοχών της εσωτερικής μεμβράνης να φτάνει στα 7nm (**Εικόνα 22-inset**), το οποίο συσχετίστηκε με το τριμερές της πρωτεΐνης FMO. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα

της τρισδιάστατης απεικόνισης του κέντρου αντίδρασης που είχε επιτευχθεί απ' τον Remigy.[41] Τα αποτελέσματα αυτά έδειχναν τη συσχέτιση του κέντρου αντίδρασης με τα τριμερή της FMO καθώς και την αλληλεπίδραση αυτού του τριμερούς με την περιφέρεια της ομοδιμερούς υπομονάδας PscA του κέντρου αντίδρασης. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, οι προεξοχές της εσωτερικής μεμβράνης μας επιτρέπουν για πρώτη φορά την απεικόνιση της κατανομής των κέντρων αντίδρασης στη μεμβράνη. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η χρήση της cryo-ET, καθιστά δυνατή την απεικόνιση των χλωροσωμάτων ενός κυττάρου στη φυσική, ενυδατωμένη τους κατάσταση, τις πιθανών συνδέσεις τους με τις μεμβράνες των κυττάρων, καθώς και την κατανομή των μεμβρανών αυτών μέσα στο κύτταρο. Μελλοντικές μελέτες των κυττάρων σε διαφορετικά στάδια ή συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου, ίσως αποκαλύψουν την ωρίμανση των χλωροσωμάτων και της μεμβράνης του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Frigaard, N-U., Holkenbrink C., Sulfur globule oxidation in green sulfur bacteria is dependent on the dissimilatory sulfite reductase system. *Microbiology*, 2011, 157: p.1229-1239
2. Imhoff, J., Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. Kluwer Academic Publishers Dordrecht the Netherlands, 1995, p.1-15
3. J.Prencik, T.P.Ikonen., Lamellar Organization of Pigments in Chlorosomes, the light harvesting complexes of Green Photosynthetic Bacteria. *Biophysical Journal*, 2004, 87: p.1165-1172
4. Hauska G., Schoedl T., Remigy H., Tsiotis, G., The reaction center of green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys Acta*, 2001, 1507: p.260-277
5. Jagannathan B., Golbeck J. H., Unifying principles in homodimeric type I photosynthetic reaction centers: Properties of PscB and the FA, FB and Fx iron clusters in green sulfur bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1777: p.1535-1544
6. Bryant D. A., Liu Z., Green Bacteria: Insights into Green Bacterial Evolution through Genomic Analyses, Chapter 4
7. Kusai A., Yamanaka T., An NAD(P) reductase derived from *Chlorobium thiosulfatophilum*: purification and some properties. *Biochim Biophys Acta*, 1973, 292: p.621-633
8. Wahlund T. M., Woese C. R., Castenholz R. W., Madigan M. T., A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum*. *Arch Microbiol*, 1991, 156: p.81-90
9. Frigaard N. U., Maresca J. A., Yunker C. E., Jones A. D., Bryant D. A., Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J.Bacteriol*, 2004, 186: p.5210-5220
10. Μεταπτυχιακή εργασία Παναγιώτας Νικολάου, Χημική σύσταση αιωρούμενων σωματιδίων στην Κύπρο, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, 2012, p:26-35
11. Schagger, H.v.J., G., *Anal Biochem*, 1987, 166: p.368-379

12. Schagger, H., Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics*, 2004, 4: p.2567-2571
13. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J. V., Mann M., In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 2006, 1: p.2856-2860
14. Blankenship R. E., Madigan M. T., Bauer C. E., Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, *Advances in Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Volume 2
15. Oostergetel, G. T., van Amerongen, H., & Boekema, E. J. The chlorosome: a prototype for efficient light harvesting in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 2010, 104: p.245–255.
16. Frigaard N. U., Ikonen T. P., Psencik J., Li H., Laurinmaki P. A., Serimaa R. E., Bryant D. E., Tuma R., X-Ray Scattering and Electron Cryomicroscopy Study on the Effect of Carotenoid Biosynthesis to the Structure of *Chlorobium tepidum* Chlorosomes. *Biophys Journal*, 2007, 93: p.620-628
17. Robert E. Blankenship, Donald A. Bryant, Comparison of the physical characteristics of chlorosomes from three different phyla of green phototrophic bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1827: p.1235-1244
18. Eisen, J. A., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Heidelberg, J.F., The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green sulfur bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: p.9509-9514
19. Prange, A., Chauvistre, R., Modrow, H., Hormes, J., Truper, H.G. & Dahl C., Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur. *Microbiology*, 2002, 148: p.267-276
20. Frigaard, N-U. & Dahl, C., Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. In *Advances in Microbial Physiology*, 2009, pp.103-200
21. Friedrich C. G., Genetics of sulfur-oxidizing bacteria
22. Chan, L. K., Morgan-Kiss R.M. & Hanson T.E., Functional analysis of three sulfide : quinone oxidoreductase homologes in *Chlorobaculum tepidum*. *J Bacteriol*, 2009, 191: p.1026-1034

23. 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: p. 381-386
24. Karas M, H.F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.*, 1988, 60(20): p.2299-2301
25. Tanaka K., H.W., Yutaka I., Satoshi A., Yoshida Y.,Yoshida T., Protein and polymer analyzes up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: Rcm*, 1988. 2(8): p.151-153
26. Stal L. J., Gernerden H., Krumbein W. E., The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. *J Microbiol Methods*, 1984, 2: p. 295–306.
27. Stanier R. Y., Smith J. H. C., The chlorophylls of green bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 41: p. 478-484.
28. Henderson R., Unwin P. N. T., Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, 1975, 406: p.653-657
29. Scott M.C., Chen C.C., Mecklenburg M., Regan B.C. & Miao J., Electron tomography at 2,4-angstrom resolution. *Nature*, 2012, 483: p.444-447
30. Dubochet J., Chang J.J., Mc Dowall A.W. & Schultz P., Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys*, 1988, 21: p.129-288
31. Glaeser R. M., Cosslett V.E. & Valdre U., Low temperature electron microscopy: radiation damage in crystalline biological materials. *J Microsc.*, 1971, 12: p.133–138.
32. Hoenger A. & Bouchet-Marquis C., Cellular tomography. *Adv Protein Chem. Struct. Biol.*, 2011, 82: p.67–90.
33. Milne J. L. S., Borgnia M. J., Bartesaghi A., Schauder D. M., Tran E. E. H., Earl L. A., Cryo-electron microscopy – a primer for the non-microscopist. *FEBS Journal*, 2013, 280: p.28–45
34. Kremer J. R., Mastronarde D. N., McIntosh J. R., Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol*, 1996, 116: p.71-76
35. Castaño-Díez D., Kudryashev M., Arbeit M., Stahlberg H., Dynamo: A flexible, user-friendly development to for subtomogram averaging of cryo-EM

- data in high-performance computing environments. *J Struct Biol*, 2012, **178**: p.139-151
36. Cavalier-Smith T., Obcells as Proto-Organisms: Membrane Heredity, Lithophosphorylation, and the Origins of the Genetic Code, the First Cells, and Photosynthesis. *J Mol Evol*, 2001, 53: p.555-595.
37. Hohmann-Marriott M. F., Blankenship R. E., Roberson R.W., The ultrastructure of *Chlorobium tepidum* chlorosomes revealed by electron microscopy. *Photosynth Res*, 2005, 86: p.145-154
38. Psencík J., Collins A. M., Liljeroos L., Torkkeli M., Laurinmäki P., Ansink H. M., Ikonen T. P., Serimaa R. E., Blankenship R. E., Tuma R., & Butcher S. J., Structure of chlorosomes from the green filamentous bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J Bacteriol*, 2009, **191**: 6701-6708.
39. Kouyianou, K., De Bock P. J., Müller S. A., Nikolaki A., Rizos A., Krzyžánek V., Aktoudianaki A., Vandekerckhove J., Engel A., Gevaert K. & Tsiotis G., The Chlorosome of *Chlorobaculum tepidum*: mass, size and protein composition revealed by electron microscopy, dynamic light scattering and mass spectrometry-driven proteomics. *Proteomics*, 2011, **11**: 2867–2880
40. Foidl, M., J. R. Golecki & J. Oelze, Chlorosome development in *Chloroflexus aurantiacus*. *Photosynth. Res*, 1998, **55**: 109-114
41. Remigy, H. W., H. Stahlberg, D. Fotiadis, S. A. Muller, B. Wolpensinger, A. Engel, G. Hauska & G. Tsiotis, The reaction center complex from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*: a structural analysis by scanning transmission electron microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 1999, **290**: 851-858.
42. Switzer R., Garrity L., Freeman W.H., *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: p.248-254
43. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G., Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for Proteome Analysis. *Electrophoresis*, 2004, 25: p.1327-1333
44. Διδακτορική διατριβή Μιχάλη Αϊβαλιώτη, Πρωτεομική ανάλυση του πράσινου θειοβακτηρίου *Chlorobium tepidum*, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, 2005

П А Р А Р Т Н М А

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποιημένων πρωτεϊνών από τη διασδιάστατη ηλεκτροφόρηση του ολικού και του εμπλουτισμένου μεμβρανικού κλάσματος των συνθηκών Α.

Ολικό μεμβρανικό πρωτέομα	Εμπλουτισμένο μεμβρανικό πρωτέομα	Identified proteins	Protein MW	Accession number	Localization	Biological process
13	-	Citrate lyase, subunit 2	65708	Q8KDG2	cytoplasm	Carbohydrate metabolism
24	-	ArsA ATPase family protein	44513	Q8KDR5	cytoplasm	ATP catabolic process
17	16	F0F1 ATP synthase subunit alpha	56869	Q8KAW8	cytoplasmic membrane	ATP synthesis
32, 33	61	ATP synthase gamma chain	32147	Q8KAW9	cytoplasm	ATP synthesis
20,21	18	ATP synthase subunit beta 2	50094	Q8KAC9	cytoplasmic membrane	ATP synthesis
58	-	Alpha-1,4-glucan:maltose-1-phosphate maltosyltransferase	76560	Q8KAR6	cytoplasm	Carbohydrate metabolism
3	4	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	131289	Q8KC02	cytoplasm	Electron transport
31	-	Cytochrome bc complex cytochrome b subunit	47464	Q9F721	cytoplasmic membrane	Electron transport
10	10, 11	Glutamine synthetase	78673	Q8KCK4	cytoplasm	nitrogen compound metabolic process

15,16	15	sulfur oxidation protein SoxB	68363	Q8KDM5	unknown	Nucleotide catabolic process
25	22	Bacteriochlorophyll a protein	40383	Q46393	cytoplasm	Electron transport
55	48	chlorosome protein C	14316	Q46367	chlorosome	Photosynthesis
29	-	Photosystem P840 reaction center, large subunit	81660	Q8KAY0	cytoplasm	Photosynthesis
40	33	Ribosome-recycling factor	21209	Q8KC49	cytoplasm	Protein biosynthesis
23	-	Elongation factor Tu	42929	Q8KAH0	cytoplasm	Protein biosynthesis
14	14	60 kDa chaperonin OS=Chlorobium tepidum	61535	Q8KF02	cytoplasm	protein refolding
5	-	pyruvate, orthophosphate dikinase	101342	Q8KBV0	cytoplasm	pyruvate metabolic process
6	7	Ribonuclease R	82332	Q8KF23	cytoplasm	RNA metabolic process
8,9	-	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	79887	Q8KBY3	cytoplasm	RNA processing
1	-	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	166806	Q8KG14	cytoplasm	transcription
2	2	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	155664	Q8KG15	cytoplasm	transcription
39	-	50S ribosomal L25	21518	Q8KCQ1	ribosome	Translation
41	-	50S ribosomal L17	17390	Q8KAJ9	ribosome	Translation

52	-	50S ribosomal L20	13118	Q8KAM7	ribosome	Translation
12	13	30S ribosomal protein S1	61535	Q8KFN4	ribosome	Translation
28	26	50S ribosomal protein L2	30412	Q8KAH5	ribosome	Translation
34	-	30S ribosomal protein S3	28492	Q8KAH8	ribosome	Translation
36	29	50S ribosomal protein L1	24839	Q8KG18	ribosome	Translation
37	28	30S ribosomal protein S4	23362	P59129	ribosome	Translation
38	30	50S ribosomal protein L4	22629	Q8KAH3	ribosome	Translation
47	-	50S ribosomal protein L10	19270	Q8KG17	ribosome	Translation
44	56, 57	50S ribosomal protein L6	19586	Q8KAI6	ribosome	Translation
49	36, 38, 39	50S ribosomal protein L16	15776	Q8KAH9	ribosome	Translation
54	-	50S ribosomal protein L23	11816	Q8KAH4	ribosome	Translation
56	49	50S ribosomal protein L21	10834	Q8KCB8	ribosome	Translation
45, 46	59	50S ribosomal protein L13	16892	Q8KBK4	ribosome	Translation
50,51	42, 43	30S ribosomal protein S8	14964	P59031	ribosome	Translation
30	-	Sodium:solute symporter family protein	63790	Q8KBI1	cytoplasmic membrane	Transport
35	-	Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphet-binding protein	28361	Q8KDZ9	cytoplasmic membrane	Transport
57	-	Isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent, monomeric type	80787	Q8KFH5	cytoplasm	Tricarboxylic acid cycle
11	12	Adenylylsulfate reductase, alpha subunit	73998	Q8KE27	cytoplasm	unknown

19	-	BchE/P-methylase family protein	52210	Q8KCU0	cytoplasm	unknown
4,59	-	AcrB/AcrD/AcrF family protein	118792	Q8KAVA	cytoplasmic membrane	unknown
7	8	Bacterial surface antigen family protein	93689	Q8KFQ6	outer membrane	unknown
26	23	Putative uncharacterized protein	42440	Q8KE01	outer membrane	unknown
27	24, 25	Putative uncharacterized protein	42898	Q8KBI3	outer membrane	unknown
42	-	Hemagglutinin-related protein	22132	Q8KGA0	outer membrane	unknown
43	-	OmpA family protein	24377	Q8KCR0	outer membrane	unknown
22	-	LipD protein, putative	50058	Q8KAV2	outer membrane	unknown

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποιημένων πρωτεϊνών από τη διασδιάστατη ηλεκτροφόρηση του ολικού μεμβρανικού κλάσματος των 3 διαφορετικών συνθηκών.

Συνθήκες A	Συνθήκες B	Συνθήκες Γ	Identified proteins	Protein MW	Accession number	Localization	Biological process
24	-	-	ArsA ATPase family protein	44513	Q8KDR5	cytoplasm	ATP synthesis
20,21	-	20	ATP synthase subunit beta 2	50094	Q8KAC9	cytoplasmic membrane	ATP synthesis
32, 33	-	28	ATP synthase gamma chain	32147	Q8KAW9	cytoplasm	ATP synthesis
17	7	17, 18	F0F1 ATP synthase subunit alpha	56869	Q8KAW8	cytoplasmic membrane	ATP synthesis
-	19	-	Branched-chain amino acid aminotransferase	34038	Q8KC21	cytoplasm	Branched-chain amino-acid metabolism
58	-	-	Alpha-1,4-glucan:maltose-1-phosphate maltosyltransferase	76560	Q8KAR6	cytoplasm	Carbohydrate metabolism
13	-	-	Citrate lyase, subunit 2	65708	Q8KDG2	cytoplasm	Carbohydrate metabolism
-	-	3	Magnesium-chelatase, bacteriochlorophyll c-specific subunit	145882	H2VFJ5	cytoplasm	Chlorophyll biosynthetic process

-	52	-	DNA-binding protein HU-beta	9589	Q8KG10	cytoplasm	DNA condensation
-	-	8	DNA gyrase subunit A	92806	Q8KG27	cytoplasm	DNA topological change
3	-	-	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	131289	Q8KC02	cytoplasm	Electron transport
25	15	24	Bacteriochlorophyll a protein	40383	Q46393	cytoplasm	Electron transport
-	1	-	Succinate/fumarate oxidoreductase, flavoprotein subunit	63019	Q8KAV9	cytoplasmic membrane	Electron transport
31	-	-	Cytochrome bc complex cytochrome b subunit	47464	Q9F721	cytoplasmic membrane	Electron transport
-	20	-	SoxAX cytochrome complex subunit A	32398	Q8KDM7	periplasm	Electron transport
-	55	58	Bacteriochlorophyll c-binding protein	8284	P0A314	unknown	Electron transport
10	3	11	Glutamine synthetase	78673	Q8KCK4	cytoplasm	Nitrogen compound metabolic process
15,16	-	-	sulfur oxidation protein SoxB	68363	Q8KDM5	unknown	Nucleotide catabolic process

55	-	-	chlorosome protein C	14316	Q46367	chlorosome	Photosynthesis
29	-	-	Photosystem P840 reaction center, large subunit	81660	Q8KAY0	cytoplasm	Photosynthesis
40	25	34	Ribosome-recycling factor	21209	Q8KC49	cytoplasm	Protein biosynthesis
23	13	-	Elongation factor Tu	42929	Q8KAH0	cytoplasm	Protein biosynthesis
-	-	13	Chaperone protein DnaK	68460	Q8KEP3	cytoplasm	Protein folding
14	6	15,16	60 kDa chaperonin	61535	Q8KF02	cytoplasm	Protein folding
-	8	-	Probable cytosol aminopeptidase	53247	Q8KD74	cytoplasm	Proteolysis
-	10	-	Serine protease	53495	Q8KCH4	periplasm	Proteolysis
5	-	7	pyruvate, orthophosphate dikinase	101342	Q8KBV0	cytoplasm	Pyruvate metabolic process
6	-	-	Ribonuclease R	82332	Q8KF23	cytoplasm	RNA metabolism
8,9	-	-	Polyribotide nucleotidyltransferase	79887	Q8KBY3	cytoplasm	RNA metabolism
-	36	-	Heat shock protein, Hsp20 family	15998	Q8KB28	unknown	Stress response

1	-	1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	166806	Q8KG14	cytoplasm	Transcription
2	-	2	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	155664	Q8KG15	cytoplasm	Transcription
39	-	-	50S ribosomal L25	21518	Q8KCQ1	ribosome	Translation
41	-	-	50S ribosomal L17	17390	Q8KAJ9	ribosome	Translation
52	-	-	50S ribosomal L20	13118	Q8KAM7	ribosome	Translation
12	5	14	30S ribosomal protein S1	61535	Q8KFN4	ribosome	Translation
28	18	27	50S ribosomal protein L2	30412	Q8KAH5	ribosome	Translation
34	-	29	30S ribosomal protein S3	28492	Q8KAH8	ribosome	Translation
36	-	30	50S ribosomal protein L1	24839	Q8KG18	ribosome	Translation
37	21	31	30S ribosomal protein S4	23362	P59129	ribosome	Translation
38	22	32	50S ribosomal protein L4	22629	Q8KAH3	ribosome	Translation
47	-	-	50S ribosomal protein L10	19270	Q8KG17	ribosome	Translation
-	-	33	50S ribosomal protein L5	21081	Q8KAI4	ribosome	Translation
44	28	36	50S ribosomal protein L6	19586	Q8KAI6	ribosome	Translation
49	38, 39	39, 41, 42	50S ribosomal protein L16	15776	Q8KAH9	ribosome	Translation
-	-	40	30S ribosomal protein S13	13883	Q8KAJ5	ribosome	Translation
-	40	43	50S ribosomal protein L19	13339	Q8KD91	ribosome	Translation
-	-	44	50S ribosomal protein L14	13574	Q8KAI2	ribosome	Translation
-	42	48	50S ribosomal protein L22	13400	Q8KAH7	ribosome	Translation
-	45	49	50S ribosomal protein L20	13118	Q8KAM7	ribosome	Translation
54	46	50	50S ribosomal protein L23	11816	Q8KAH4	ribosome	Translation
56	47	51, 52	50S ribosomal protein L21	10834	Q8KCB8	ribosome	Translation
45, 46	30	-	50S ribosomal protein L13	16892	Q8KBK4	ribosome	Translation

50,51	41	-	30S ribosomal protein S8	14964	P59031	ribosome	Translation
-	43	-	30S ribosomal protein S6	14789	Q8KAM1	ribosome	Translation
-	48	-	30S ribosomal protein S15	10320	Q8KFS7	ribosome	Translation
-	50	-	50S ribosomal protein L27	8801	Q8KCB7	ribosome	Translation
-	51	-	50S ribosomal protein L33	7092	Q8KCP0	ribosome	Translation
-	-	-	30S ribosomal protein S2	28254	Q8KKBK6	ribosome	Translation
-	-	-	30S ribosomal protein S7	17151	P59060	ribosome	Translation
-	-	-	30S ribosomal protein S5	18079	Q8KAI8	ribosome	Translation
30	-	-	Sodium:solute symporter family protein	63790	Q8KBI1	cytoplasmic membrane	Transport
35	-	-	Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphet-binding protein	28361	Q8KDZ9	cytoplasmic membrane	Transport
57	-	-	Isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent, monomeric type	80787	Q8KFH5	cytoplasm	Tricarboxylic acid cycle
-	14	23	Putative uncharacterized protein	42408	Q8KAK9	cytoplasm	unknown
11	4	-	Adenylylsulfate reductase, alpha subunit	73998	Q8KE27	cytoplasm	unknown
19	-	-	BchE/P-methylase family protein	52210	Q8KCU0	cytoplasm	unknown
4,59	-	4	AcrB/AcrD/AcrF family protein	118792	Q8KAV4	cytoplasmic membrane	unknown

42	24	-	Hemagglutinin-related protein	22132	Q8KGA0	outer membrane	unknown
43	26, 27	-	OmpA family protein	24377	Q8KCR0	outer membrane	unknown
7	-	9	Bacterial surface antigen family protein	93689	Q8KFQ6	outer membrane	unknown
26	16	25	Putative uncharacterized protein	42440	Q8KE01	outer membrane	unknown
27	17	26	Putative uncharacterized protein	42898	Q8KBI3	outer membrane	unknown
-	29, 31, 32	38	Outer surface protein, putative	20101	Q8KAL2	outer membrane	unknown
-	11	-	Putative uncharacterized protein	54850	Q8KCV5	outer membrane	unknown
22	-	-	LipD protein, putative	50058	Q8KAV2	outer membrane	unknown
-	9	19	Sulfide-quinone reductase, putative	54168	Q8KG51	unknown	unknown
-	-	21	Sulfide dehydrogenase, flavoprotein subunit, putative	45635	Q8KDM1	unknown	unknown