

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

*Μελέτη της παραγωγής βιο-υδρογόνου (H_2) από το μικροφύκος
*Chlamydomonas reinhardtii**

Μιχογλου – Σεργίου Αριστείδης

Επιβλέπων καθηγητής: Δ.Φ. Γανωτάκης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων του πλανήτη σε συνδυασμό με την περιβαλλοντική μόλυνση και την κλιματική αλλαγή καθιστούν επιτακτική ανάγκη την εύρεση εναλλακτικών πηγών ενέργειας, φιλικών προς το περιβάλλον. Το υδρογόνο αποτελεί ιδανική λύση. Συγκριτικά με τους υδρογονάνθρακες που χρησιμοποιούνται σήμερα έχει υψηλότερο ενεργειακό περιεχόμενο, αφού με την καύση του παράγεται σχεδόν τριπλάσια ενέργεια. Επιπλέον, χαρακτηρίζεται ως το φιλικότερο καύσιμο προς το περιβάλλον επειδή το μοναδικό προϊόν της καύσης του είναι το νερό. Η φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου παρουσιάζει μία υποσχόμενη μέθοδο για την ανάπτυξη οικονομικά συμφέρουσας βιομηχανικής παραγωγής. Κύριος στόχος της εργασίας είναι η μελέτη του μηχανισμού παραγωγής υδρογόνου από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* υπό συνθήκες στέρησης θείου.

Υπό την παρουσία θείου το μικροφύκος επιτελεί κανονικά τη φωτοσυνθετική διαδικασία. Αντίθετα, κατά την έλλειψη θείου η διαδικασία αυτή παρεμποδίζεται, με αποτέλεσμα την παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων H_2 με χρήση νερού και φωτός. Μέχρι σήμερα η στέρηση θείου αποτελεί την αποτελεσματικότερη μέθοδο. Η επίδραση της στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό και ειδικότερα στο φωτοσύστημα II (PSII) είναι πολύ σημαντική και δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε ο ρόλος του PSII με τη χρήση μεταλλαγμάτων όπου διαφοροποιούνται σε καίρια σημεία της φωτοσυνθετικής διαδικασίας, οδηγώντας σε διαφορετική συμπεριφορά του PSII. Επιπλέον, μελετήθηκε απομονωμένος ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός (χλωροπλάστες, θυλακοειδείς μεμβράνες, PSII) προσδιορίζοντας την ενεργότητα και την πρωτεϊνική σύσταση του. Τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία αποδοτικού PSII ενισχύει την παραγωγή H_2 . Επίσης, παρατηρήθηκε η ύπαρξη ενός μηχανισμού παραγωγής υδρογόνου ανεξάρτητου από τη στέρηση θείου.

Δεύτερο μέρος της εργασίας αποτελεί η κατασκευή ενός βιοσυστήματος φωτοπαραγωγής H_2 . Θυλακοειδής μεμβράνες συνδυάστηκαν με τη NiFe-Υδρογενάση από το βάκιλλο *Ralstonia raucula*, και μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής υδρογόνου. Κύριο χαρακτηριστικό του υβριδικού συστήματος είναι η χρήση του νερού ως δότη ηλεκτρονίων καθώς και η χρήση του φωτός, οδηγώντας σε μία μέθοδο παραγωγής βιο-υδρογόνου με μειωμένο κόστος.

ABSTRACT

Concerns about energy supply, combined with global warming and environmental pollution, makes it imperative to develop alternative energy sources that are clean, renewable and environmentally friendly. Hydrogen is thought to be ideal as an alternative fuel. It has a high energy content since, compared to traditional hydrocarbon fuels, can generate roughly three times more energy through its combustion. Moreover, hydrogen is characterized as the cleanest energy source, since the sole product of its combustion is water. Photosynthetic hydrogen production presents a promising method for the development of a new economically advantageous industrial production. The main objective of this master thesis was the study of the hydrogen production mechanism by sulfur deprived *Chlamydomonas reinhardtii*.

Although in the presence of sulfur green algae perform normal photosynthesis, in the absence of sulfur photosynthetic activity is inhibited and the algae slip into the H₂-production mode, resulting in the generation of significant amounts of H₂ gas, essentially by using sunlight and water. So far, sulfur deprivation has been proven the most efficient method; the impact on the photosynthetic apparatus, especially on Photosystem II, is very important for the entire process. The role of Photosystem II in hydrogen production has been explored by using various mutants that have differences in critical phases of the photosynthetic process, resulting to a different behavior of PSII. In addition to whole cells, various photosynthetic preparations such as chloroplasts, thylakoids and Photosystem II enriched membranes were also investigated. Specifically, their activity and their protein composition were thoroughly examined. The main conclusion of these studies is that for effective hydrogen production an active Photosystem II is necessary. In addition, the presence of a hydrogen production mechanism, which does not require sulfur deprivation is also present in *Chlamydomonas*.

The second part of this thesis is related to the assembly of a hydrogen photoproducing biosystem. Thylakoid membranes combined with a NiFe-Hydrogenase from bacillus *Ralstonia paucula* are able to catalyze the crucial steps in a biological energy conversion, generating hydrogen by using water and light. The use of light and water as an electron donor are the key-points, which could be used for the low cost production of biohydrogen.

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Γανωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Τσιώτης

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελίδα

Εισαγωγή	1
Θεωρητικό μέρος	3
Το μικροφύκος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3
Φωτοσύνθεση.....	7
Μηχανισμός οξυγονικής φωτοσύνθεσης	10
Το φωτοσύστημα II.....	15
Φωτοσυνθετική παραγωγή H ₂	18
Στέρωση θείου (S).....	19
Μηχανισμός.....	21
Υδρογενάση.....	23
Σκοπός.....	27
Υλικά – Μέθοδοι	28
Συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	28
Μεταφορά των κυττάρων σε στέρωση θείου (-S).....	29
Προσδιορισμός συγκέντρωσης της χλωροφύλλης.....	30
Προσδιορισμός συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.....	30
Μέτρηση αριθμού κυττάρων	30
Μέτρηση υδρογόνου (H ₂) με αέρια χρωματογραφία GC.....	30
Μέτρηση έκλυσης οξυγόνου (O ₂)	30
Φασματοσκοπία EPR.....	31
Φασματοσκοπία Φθορισμού (OJIP test).....	31
Ηλεκτροφόρηση.....	32
Ταυτοποίηση πεπτιδίων Φασματομετρία MALDI TOF/TOF	33
Μέτρηση ενεργότητας Υδρογενάσης	36
Μέτρηση υδρογόνου (H ₂) πρωτεϊνικού συστήματος	37
Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από σπανάκι	38

Απομόνωση χλωροπλαστών από τα κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	39
Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	40
Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανών PSII από κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	41
Απομόνωση NiFe-Hydrogenase από το βακτήριο <i>Ralstonia paucula</i>	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
Μελέτη παραγωγής υδρογόνου σε καλλιέργειες <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	44
Βέλτιστη συγκέντρωση κυττάρων	44
Επίδραση DCMU	45
Επίδραση πηγής άνθρακα.....	46
Δοκιμή μεταλλαγμάτων.....	47
Μελέτη φωτοσυνθετικού μηχανισμού.....	51
Επίδραση της DCMU στον επαγόμενο φθορισμό απομονωμένων θυλακοειδών μεμβρανών.....	51
Μετρήσεις ενεργότητας απομονωμένου PSII	52
Μελέτη απομονωμένου PSII με φασματοσκοπία EPR.....	53
Διαφορές πρωτεϊνικής σύστασης χλωροπλαστών & θυλακοειδών μεμβρανών	58
Βιοσύστημα φωτοπαραγωγής H ₂	61
ΣΥΣΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

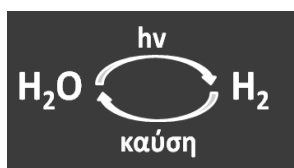
Η ενασχόληση με τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας έχει κερδίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τις τελευταίες δεκαετίες. Η ραγδαία κατανάλωση των ενεργειακών αποθεμάτων του πλανήτη και τα προβλήματα τα οποία έχουν δημιουργηθεί στο περιβάλλον καθιστούν επιτακτική ανάγκη την εύρεση νέων πηγών ενέργειας, φιλικά προς το περιβάλλον. Η χρήση του υδρογόνου προσφέρει μία ιδανική λύση στο ενεργειακό πρόβλημα. Περιέχει σχεδόν τρεις φορές περισσότερη ενέργεια από τη βενζίνη και το μοναδικό προϊόν της καύσης του είναι το νερό. Έτσι, αποτελεί αποδοτικό καύσιμο και ταυτόχρονα συνεισφέρει στην προστασία του περιβάλλοντος, αποφεύγοντας τη συσσώρευση ρύπων που οδηγούν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου και στην κλιματική αλλαγή.

Η καθημερινή χρήση του υδρογόνου παρουσιάζει πολλά πρακτικά προβλήματα. Το κυριότερο πρόβλημα είναι αυτό της αποθήκευσης του. Αν και παράγει μεγαλύτερη ενέργεια από τους υδρογονάνθρακες, η αέρια φύση του σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης δυσκολεύει την αποδοτική χρήση του (Πίνακας 1). Επιπλέον, η βιομηχανική παραγωγή υδρογόνου δεν είναι οικονομικά συμφέρουσα, γεγονός που οδηγεί στην αναζήτηση νέων μεθόδων παραγωγής.

Πίνακας_1		
	Υδρογόνο (H ₂)	Βενζίνη
MJ/kg	142	46.4
MJ/L	0.01	34.2
*Canadian Centre for Energy		

Ένα σημαντικό πεδίο έρευνας το οποίο αναπτύσσετε με ταχείς ρυθμούς και απασχολεί μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας είναι η παραγωγή βιο-υδρογόνου χρησιμοποιώντας φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς (μικροφύκη, κυανοβακτήρια, κα). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να παράγουν σημαντικές ποσότητες υδρογόνου υπό ειδικές συνθήκες καλλιέργειας. Αυτή η προσέγγιση έχει αρκετά θετικά χαρακτηριστικά. Το κυριότερο είναι η χρήση της ηλιακής ενέργειας, η οποία παραμένει ανεκμετάλλευτη στο μεγαλύτερο ποσοστό. Επίσης, παρατηρώντας τη γενική διαδικασία βλέπουμε τη δημιουργία ενός κύκλου, στον οποίο το νερό διασπάται μέσω της φωτοσύνθεσης προς το σχηματισμό του υδρογόνου, το οποίο με την

καύση του γίνεται ξανά νερό (Εικόνα 1). Το αποτέλεσμα είναι μία ενεργειακά συμφέρουσα διεργασία χωρίς καμία οικολογική επιβάρυνση.



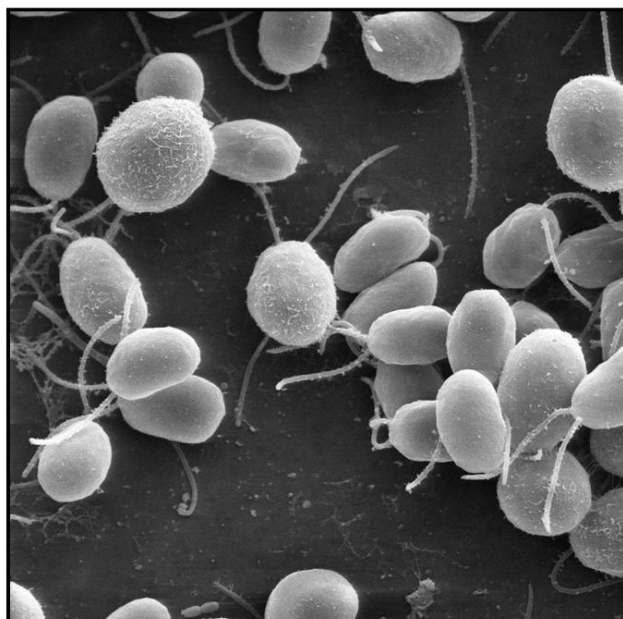
Εικόνα 1

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων με στόχο την κατανόηση του μηχανισμού παραγωγής υδρογόνου από τα μικροφύκη *Chlamydomonas reinhardtii*. Οι πληροφορίες για αυτή τη διεργασία και η εξακρίβωση του τρόπου με τον οποίο επιτελείται προσφέρουν στους επιστήμονες την απαραίτητη γνώση ώστε να μεγιστοποιήσουν την παραγωγή του υδρογόνου και να δημιουργήσουν μία νέα, οικονομικά συμφέρουσα βιομηχανική παραγωγή. Δεύτερο τμήμα της εργασίας είναι η προσπάθεια κατασκευής ενός συστήματος βασισμένο σε πρωτεΐνες που θα έχει την ικανότητα να παράγει υδρογόνο φωτοσυνθετικά. Η προσέγγιση αυτή έχει το πλεονέκτημα της απουσίας του οργανισμού, ο οποίος χρειάζεται πολύ συγκεκριμένες συνθήκες για τη σωστή ανάπτυξη, προσεκτικό χειρισμό για την αποφυγή μολύνσεων και συχνή ανανέωση λόγω της κυτταρικής απόπτωσης.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii*

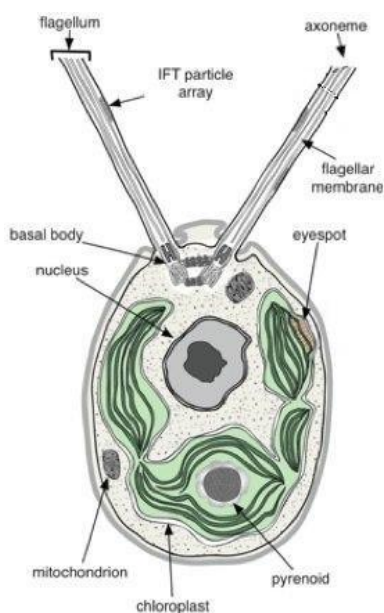
Τα *Chlamydomonas reinhardtii* είναι ευκαρυωτικά μονοκύτταρα πράσινα άλγη που μπορούν να βρεθούν είτε στο χώμα είτε σε βιότοπους γλυκού νερού [1] (Εικόνα 2). Τα κύρια χαρακτηριστικά αυτού του γένους αποτελούνται από κυτταρικό τοίχωμα, έναν χλωροπλάστη [2] και δύο μαστίγια με τα οποία μπορούν να κινούνται (Εικόνα 3). Έχουν αναγνωριστεί πάνω από 500 διαφορετικά είδη της οικογένειας *Chlamydomonas*, αλλά είναι λίγα εκείνα που χρησιμοποιούνται από τους επιστήμονες.



Εικόνα 2. Το μονοκύτταρο πράσινο άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*.

Το άλγος αυτό είναι ένας πρότυπος οργανισμός για έρευνα από τον προηγούμενο αιώνα και δίνει απαντήσεις σε πολλά βασικά ερωτήματα που αφορούν την κυτταρική ζωή. Ειδικότερα έχει μελετηθεί αρκετά για να απαντηθούν κύρια ερωτήματα για τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης αφού παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τους ανώτερους φωτοσυνθετικά οργανισμούς, τα φυτά. Επίσης, είναι ένας οργανισμός ο οποίος καλλιεργείται εύκολα είτε σε υγρό θρεπτικό μέσο είτε σε στερεό, σε θερμοκρασία δωματίου. Κύτταρα αυτού του είδους είναι απλοειδή και μπορούν να μεγαλώσουν σε ένα απλό θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων, χρησιμοποιώντας τη φωτοσύνθεση για να εξασφαλίσουν ενέργεια. Μπορούν επίσης να μεγαλώσουν σε απόλυτο σκοτάδι αν τους παρέχεται οξικό ως εναλλακτική πηγή άνθρακα. Σημαντικό χαρακτηριστικό του

μικροοργανισμού είναι η ολοκλήρωση του γενετικού χαρακτηρισμού του, διευκολύνοντας έτσι την έρευνα. Τέλος, είναι ένας ιδανικός οργανισμός για μελέτες μεταλλαξιγένεσης εντοπισμένες στη φωτοσυνθετική διαδικασία, δηλαδή στο γενετικό υλικό των χλωροπλαστών, διότι περιέχει έναν χλωροπλάστη ανά κύτταρο.

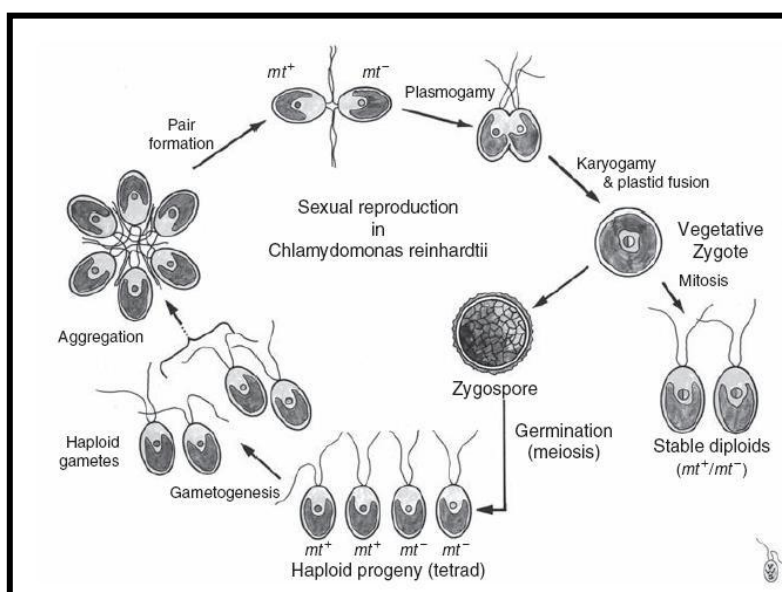


Εικόνα 3. Δομή κυττάρου *Chlamydomonas reinhardtii*.

Το γένος *Chlamydomonas* (στα ελληνικά: chlamys, μανδύας· monas, μοναχικός) ονομάστηκε από τον C.G.Ehrenberg (1833,1838), και πιθανόν αναφέρεται στα μαστιγοφόρα Monas που περιγράφηκαν το 1786. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται περίπου 459 είδη αυτού του γένους και περιστασιακά έχουν υπάρξει διαφωνίες ανάμεσα στους επιστήμονες σχετικά με την ταξινόμηση τους. Παρόλο που το σχήμα και το μέγεθος του σώματος του κυττάρου ποικίλει ανάμεσα στα είδη των *Chlamydomonas* (όπως ορίζεται από μορφολογικά κριτήρια), η γενική πολική δομή, με τα συνδυασμένα μαστίγια και τον χλωροπλάστη που περιβάλλει ένα ή περισσότερα πυρηνοειδή, είναι σταθερή. Τα κύτταρα συνήθως κινούνται ελεύθερα σε υγρό μέσο, αλλά μπορούν να αναπτυχθούν και σε στερεό υπόστρωμα όπου δεν χρησιμοποιούν τα μαστιγιά τους.

Το γένος *Chlamydomonas* εμφανίζει παγκόσμια κατανομή και μπορεί να βρεθεί σε μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών. Τοποθεσίες συλλογής περιλαμβάνουν εύκρατες, τροπικές και πολικές περιοχές. Είδη του έχουν απομονωθεί από λίμνες γλυκού νερού, από θαλασσινά και υφάλμυρα νερά, από χιόνια και από ερήμους.

Τα *C. reinhardtii* είναι ετεροθαλικά και ισόγαμα (Εικόνα 4). Δηλαδή, το φύλο (αναφερόμενο ως συν και πλην) είναι γενετικά προσδιορισμένο σε μία κυτταρική σειρά, και συμπεριφέρεται ως μία μεντελική περιοχή κατά τις διασταυρώσεις. Οι κατά αντιστοιχία με το φύλο συν και πλην γαμέτες είναι παραπλήσιοι στο μέγεθος και την εξωτερική εικόνα, αν και μπορεί να διαφέρουν στο επίπεδο της υπερδομής τους.



Εικόνα 4. Αναπαραγωγικός κύκλος στο άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*

Μερικά από τα μοντέλα ζευγαρώματος που εμφανίζονται στην οικογένεια *Chlamydomonas* είναι ανισογαμία (μορφολογικά παρόμοιοι γαμέτες που διαφέρουν αξιοσημείωτα στο μέγεθος), διάφοροι βαθμοί ετερογαμίας (μορφολογικά διαφορετικοί γαμέτες, με μεγάλη διαφορά στο μέγεθος σε γενικές γραμμές) και ωογαμία (μικρά κινητά κύτταρα ‘σπέρματος’ και μεγάλα μη κινητά ‘αυγά’ χωρίς τοίχωμα [3]).

Μέχρι τώρα έχουν αναφερθεί κυρίως τρεις συνθήκες ανάπτυξης για άλγη, κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται οργανικές πηγές άνθρακα. Φωτοτροφική ή φωτοαυτοτροφική ανάπτυξη συνεπάγεται μια καλλιέργεια με φωτοσυνθετικά αφομοιωμένο CO₂ ως μοναδική πηγή άνθρακα. Ετεροτροφική (οργανοτροφική) ανάπτυξη σημαίνει καλλιέργεια στο σκοτάδι με μια οργανική πηγή άνθρακα (συνήθως οξικό στην περίπτωση των ειδών του *Chlamydomonas*). Τέλος η φωτοετεροτροφική ανάπτυξη που είναι καλλιέργεια στο φως με προστιθέμενο οξικό. Διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης απαιτούν την προσαρμογή των κυττάρων και την περαιτέρω αλλαγή στον μεταβολισμό τους.

Στη φύση, τα *C.reinhardtii* είναι οργανισμός που ζει στο χώμα, παρόλα αυτά μπορεί εύκολα να αναπτυχθεί στο εργαστήριο είτε σε υγρή καλλιέργεια, είτε σε στερεή καλλιέργεια με απλά μεταλλικά άλατα. Πολλά από τα θρεπτικά που έχουν προταθεί για άλγη γενικά αρκούν για την ανάπτυξη και αυτού του είδους. Προετοιμασία μιας καλής καλλιέργειας απαιτεί μια καλή πηγή νερού. Εργαστηριακό νερό καθαρισμένο με συστήματα απόσταξης ή αντίθετης ώσμωσης ίσως είναι αναγκαίο να περαστεί από μια ανιοανταλλακτική κολώνα πριν τη προετοιμασία του θρεπτικού. Το νερό μπορεί να συμβάλλει είτε στην μη ανάπτυξη των κυττάρων, είτε σε αλλαγές στον κύκλο γονιμοποίησης τους [3].

ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ

Η φωτοσύνθεση είναι μία φυσικοχημική διαδικασία με την οποία τα φυτά, τα άλγη και ορισμένα βακτήρια εκμεταλλεύονται την ηλιακή ενέργεια για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις. Διαχωρίζεται σε δύο βασικές κατηγορίες, την οξυγονική φωτοσύνθεση και τη μη οξυγονική. Η διαφορά τους εντοπίζεται στην παραγωγή μοριακού οξυγόνου (O_2) που πραγματοποιείται στην πρώτη περίπτωση και δεν συμβαίνει στην δεύτερη. Η μη οξυγονική φωτοσύνθεση είναι το πρώτο είδος φωτοσύνθεσης που υπήρξε χρονικά, γίνεται αποκλειστικά από προκαρυωτικούς οργανισμούς και διαχωρίζεται σε δύο τύπους (Τύπος I και II). Η εξέλιξη οδήγησε στο συνδυασμό των δύο τύπων και στη δημιουργία ενός οργανισμού προσαρμοσμένου να επιτελεί τη διαδικασία οξυγονικά.

Η σημαντικότητα της φωτοσύνθεσης είναι αδιαμφισβήτητη. Δεν είναι υπερβολή να ειπωθεί ότι μέσω αυτής της διαδικασίας παρέχεται η ενέργεια για την επιβίωση όλης της ζωής στον πλανήτη. Αρχικά η φωτοσύνθεση χρησιμοποιεί την ενέργεια του ηλιακού φωτός για να επιτευχθεί. Έτσι δεν επιβαρύνει ενεργειακά τον πλανήτη. Επίσης χρησιμοποιεί το νερό ως δότη ηλεκτρονίων, που υπάρχει σε αφθονία. Έχει ως στόχο την παραγωγή υδρογονανθράκων από διοξείδιο του άνθρακα, ώστε να εφοδιάσει τον οργανισμό με οργανικό άνθρακα και παράλληλα να αποθηκεύσει ενέργεια στη μορφή του ATP. Ταυτόχρονα εκλύει μοριακό οξυγόνο και αυτό ωφελεί τους οργανισμούς που το χρειάζονται για να πάρουν ενέργεια μέσω της αναπνοής. Η ανάπτυξη των φυτών ήταν καθοριστικής σημασίας όχι μόνο για τον εμπλουτισμό της ατμόσφαιρας με οξυγόνο αλλά και γιατί αποτέλεσαν την πρώτη βασική τροφή για τους ζωικούς οργανισμούς. Ένας ακόμα κύκλος που επεμβαίνει η φωτοσύνθεση είναι εκείνος του CO_2 , όπου αρχικά τα φυτά το μετατρέπουν σε οργανικά μόρια, όπως σημειώθηκε παραπάνω, και στη συνέχεια άλλοι οργανισμοί τρέφονται και παράγουν ενέργεια μέσω της αναπνοής, όπου απελευθερώνεται ξανά στην ατμόσφαιρα. Παρατηρώντας τη γενική θέση της φωτοσυνθετικής διαδικασίας θα μπορούσαμε να πούμε ότι παίζει καθοριστικό ρόλο για την ισορροπία της ζωής στη Γη. Η απορύθμιση των συνθηκών λόγω της ανθρώπινης παρέμβασης ή άλλων γεγονότων ίσως επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην ατμόσφαιρα και στο κλίμα.

Οι Huzisige και Ke παρουσίασαν το 1993 ένα χρονοδιάγραμμα της φωτοσυνθετικής έρευνας των τελευταίων αιώνων [4]. Η πρώτη νεότερη ιστορική καταγραφή ξεκινάει το 1648, όπου ο van Helmont απορρίπτει το Αριστοτελικό δόγμα ότι τα φυτά λαμβάνουν την τροφή τους από το



χώρα[5]. Στη συνέχεια στηρίζουν την ίδια άποψη ο Edme Mariotte (1679)[6] και ο Stephen Hales (1727)[7] παρατηρώντας ότι τα φυτά λαμβάνουν θρεπτικά συστατικά από τον αέρα μέσω των φύλλων. Το 1772 ο Joseph Priestley, ένας άγγλος χημικός και κληρικός, πραγματοποιεί πειράματα που δείχνουν ότι τα φυτά επηρεάζουν τον αέρα επιτρέποντας στη φλόγα ενός κεριού να ανάψει σε σφραγισμένο δοχείο, ανακαλύπτοντας έτσι ένα μηχανισμό παραγωγής οξυγόνου [8]. Με βάση το έργο του Priestley, ο Jan Ingenhousz, ένας ολλανδός γιατρός, απέδειξε ότι το φως του ήλιου είναι απαραίτητο για να παραχθεί το οξυγόνο και πως η διεργασία αυτή γινόταν μόνο από τα πράσινα μέρη των φυτών [9, 10]. Παράλληλα, εκείνη την περίοδο ο Jean Senebier, ένας ελβετός βοτανολόγος, ανακάλυψε ότι το CO_2 ήταν απαραίτητο για τη φωτοσύνθεση ανάπτυξη [11]. Ο Nicolas-Théodore de Saussure, ένας ελβετός χημικός, απέδειξε ότι απαιτείται νερό για τη φωτοσύνθεση. Έτσι, μέχρι το 1880 περίπου αναγνωρίζονται τα βασικά στοιχεία που λαμβάνουν μέρος στη φωτοσύνθεση. Εκδίδονται σημαντικές διατριβές και το 1893 ο Barnes CR επίσημα προτείνει τη χρήση του όρου “φωτοσύνθεση” [12].

Ο αιώνας που ακολουθεί είναι γεμάτος από μία σειρά ανακαλύψεων όπου θα οδηγήσουν στην εξακρίβωση του μηχανισμού. Το 1905, ο F.F. Blackman, δημοσιεύει μία εργασία η οποία αποδεικνύει ότι η φωτοσύνθεση δεν είναι μία απλή φωτοχημική αντίδραση αλλά περιλαμβάνει αρκετά στάδια όπου το φως δεν απαιτείται σε όλα [13]. Αυτή η άποψη προβλημάτισε την κοινή γνώμη, ερευνήθηκε αρκετά και τελικά επικράτησε. Λίγο αργότερα, το 1913 οι Willstatter και Stoll, ανακαλύπτουν το σημαντικό ρόλο της χλωροφύλλης και τη δομή της και αυτό οδηγεί τον Richard Willstatter στο βραβείο Νόμπελ το 1915 για την έρευνά του πάνω στις χρωστικές των φυτών [14]. Μεταγενέστερα, ήταν σημαντική η παρουσία του Otto Warburg, ο οποίος δούλεψε με πράσινα άλγη (*Chlorella*) για να ξεπεράσει σημαντικές δυσκολίες που υπήρχαν στην έρευνα των φυτών. Έκανε ακριβείς μετρήσεις ανταλλαγών των αερίων και επιβεβαίωσε τον μηχανισμό φωτεινών και σκοτεινών αντιδράσεων. Το 1929 ο Cornelis Bernardus van Niel ερμηνεύει τη φωτοσυνθετική διαδικασία ως “Φωτοεπαγόμενη οξειδοαναγωγική διαδικασία” επηρεάζοντας τον τρόπο σκέψης των νεότερων επιστημόνων [15]. Ο ίδιος σύγκρινε τη μη οξυγονική φωτοσύνθεση των βακτηρίων με την οξυγονική φωτοσύνθεση των φυτών και συμπέρανε ότι το μοριακό οξυγόνο που απελευθερώνεται προέρχεται από το νερό και όχι από το διοξείδιο του



Cornelis Bernardus van Niel

άνθρακα, όπως πίστευαν εκείνη την εποχή. Έτσι σχημάτισε τη γενική εξίσωση της φωτοσύνθεσης, όπου για την οξυγονική φωτοσύνθεση είναι η εξής:



Στα χρόνια που ακολουθούν γίνονται πολλές καινοτομίες που θα βοηθήσουν στην ταχύτερη ανακάλυψη του μηχανισμού. Η χρήση ραδιοϊσοτόπων άνθρακα αποτέλεσε σημαντικό εργαλείο στα χέρια των ερευνητών η οποία βοήθησε στην κατανόηση των μηχανισμών αναγωγής του CO_2 . Δύο βασικές ερευνητικές ομάδες ανταγωνίζονταν σε αυτό το πεδίο, οι Calvin, Benson και Bassham με τους Gaffron και Fager. Αρχικά παρατήρησαν την ικανότητα καθήλωσης του CO_2 σε σκοτεινές συνθήκες και στη συνέχεια, το 1945-1954, ανακαλύπτουν ακριβώς το μηχανισμό [16, 17]. Ο κύκλος που ακολουθείται ονομάζεται πλέον “Κύκλος του Calvin”, και ο Melvin Calvin βραβεύεται με Νόμπελ το 1961 για την έρευνα του.



Melvin Calvin

Η ταυτόχρονη ανάπτυξη της βιοφυσικής προσφέρει στους ερευνητές μία πολύ χρήσιμη μέθοδο, τη φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού με την οποία δίνεται η ικανότητα να παρατηρηθεί η διαδρομή μονήρων ηλεκτρονίων τη στιγμή που απορροφάται φως και ξεκινάει η διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Αποτέλεσμα είναι το ξετύλιγμα βήμα-βήμα του μηχανισμού. Βασικές ανακαλύψεις είναι η πρόταση του σχήματος Z της φωτοσύνθεσης το 1960 από τους Hill και Bendal [18], η αναγωγή του NADP^+ το 1951 από τον Arnon [19], καθώς και η ύπαρξη των δύο φωτοσυστημάτων από τους Kok, Hoch, Duysens και Witt το 1961 [20-22]. Το 1961 επίσης, ο Peter Mitchell δημοσιεύει την χημειοσμοτική θεωρία περιγράφοντας τον τρόπο μετατροπής ενέργειας που οδηγεί στο σχηματισμό του ATP και αυτό τον οδηγεί στην απονομή του βραβείου Νόμπελ το 1978 [23]. Ο μηχανισμός έκλυσης οξυγόνου αποτελεί κέντρο ενδιαφέροντος. Το 1968 ο Joliot και οι συνεργάτες του προτείνουν το μηχανισμό τεσσάρων σταδίων για την έκλυση ενός μοριακού οξυγόνου [24].



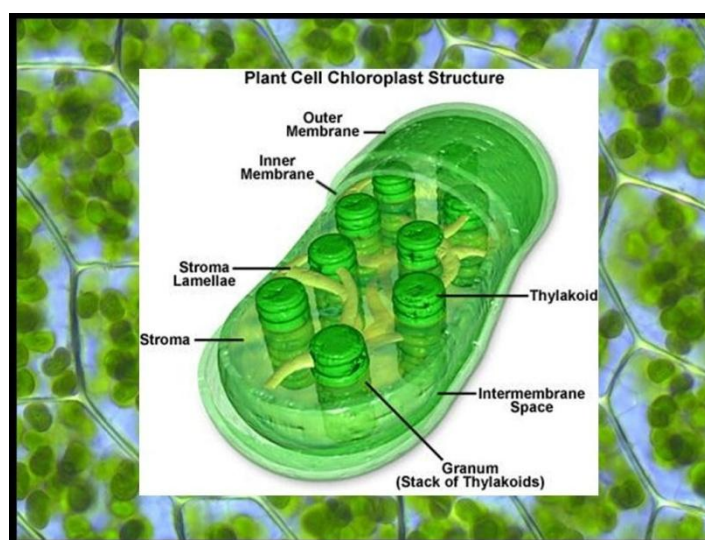
Peter D. Mitchell

Ήδη την περίοδο αυτή έχει ξεκινήσει η προσπάθεια κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών ώστε να καθοριστεί η δομή τους και να μπορέσει να διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός. Οι πρωτεΐνες της φωτοσύνθεσης όμως είναι μεγάλα μεμβρανικά συστήματα και παρουσίασαν μεγάλη δυσκολία στην κρυστάλλωση. Το 1984 οι Johann Deisenhofer, Robert Huber,

Hartmut Michel και οι συνεργάτες τους δημοσίευσαν τη δομή του κέντρου αντίδρασης του μωβ βακτηρίου *Rhodospseudomonas viridis* και βραβεύτηκαν με Νόμπελ το 1988 για την εργασία αυτή [25]. Το 1985 οι Marcus και Sutin δημοσίευσαν τη θεωρία τους για τις αντιδράσεις ηλεκτρονιακής μεταφοράς [26] και αυτό οδήγησε τον Rudolph Marcus στο βραβείο Νόμπελ το 1992. Πλέον υπάρχουν λίγα αδιευκρίνιστα σημεία και η περισσότερη έρευνα γίνεται με στόχο την πρακτική εφαρμογή της φωτοσύνθεσης ώστε να μπορέσουμε να τη χρησιμοποιήσουμε για την παραγωγή ενέργειας δεσμεύοντας αποτελεσματικά το ηλιακό φως.

Μηχανισμός οξυγονικής φωτοσύνθεσης

Η φωτοσύνθεση είναι ένας μηχανισμός παραγωγής ενέργειας για τα κύτταρα. Αποτέλεσμα του είναι η παραγωγή ATP, NADPH και σακχάρων. Η διαδικασία αυτή, λαμβάνει χώρα σε ειδικά κυτταρικά οργανίδια, τους χλωροπλάστες.

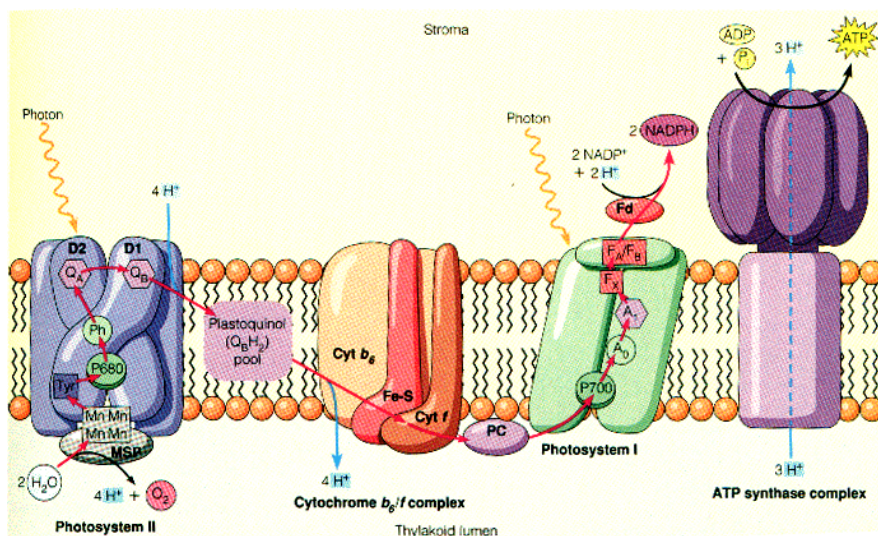


Εικόνα 5. Δομή φυτικού χλωροπλάστη

Η γενική δομή του χλωροπλάστη συνοψίζεται στην παραπάνω (Εικόνα 5). Περιβάλλεται από μία εξωτερική και μία εσωτερική μεμβράνη, όπου μεταξύ τους υπάρχει ένας διαμεμβρανικός χώρος. Η εσωτερική μεμβράνη περιβάλλει το stroma, το οποίο είναι ο χώρος διεξαγωγής όλων των αντιδράσεων κατήλωσης διοξειδίου του άνθρακα. Στο stroma βρίσκεται επίσης ένα σύστημα μεμβρανικών δομών που ονομάζονται θυλακοειδή και έχουν σχήμα πεπλατυσμένων σάκων. Μία στοίβα από αυτούς τους σάκους ονομάζεται granum ενώ ο εσωτερικός τους χώρος ονομάζεται lumen. Τα

διάφορα grana ενώνονται μεταξύ τους με μεμβράνες που ονομάζονται stroma lamellae. Οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τις φωτεινές αντιδράσεις βρίσκονται μέσα στη μεμβράνη των θυλακοειδών. Η γενική εικόνα του χλωροπλάστη παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το μιτοχόνδριο, το οργανίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ενέργειας μέσω της αναπνοής.

Οι φωτεινές αντιδράσεις επιτελούνται από τέσσερα βασικά σύμπλοκα, τα Φωτοσυστήματα I (PSI) και II (PSII), το κυτόχρωμα b_6f και την ATP-συνθάση, από τα οποία μόνο τα φωτοσυστήματα χρησιμοποιούν τη φωτεινή ενέργεια. Τα δύο φωτοσυστήματα συνδέονται με μικρούς μεταφορείς ηλεκτρονίων, την πλαστοκινόνη (PQ) και την πλαστοκυανίνη (PC), μέσω του cyt b_6f το οποίο δρα σαν αντλία πρωτονίων κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Το PSII βρίσκεται κυρίως στα grana, ενώ το PSI και η ATP-συνθάση εντοπίζεται στα lamellae και τις εκτεθειμένες στο stroma περιοχές των grana. Το cyt b_6f είναι ομοιόμορφα κατανεμημένο και στις δύο περιοχές. Όλα αυτά τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προσανατολίζονται στη μεμβράνη με τέτοιο τρόπο ώστε η επαγόμενη από το φως ηλεκτρονιακή μεταφορά να προκαλεί πρωτονιακή μεταφορά από το stroma στην περιοχή lumen. Η διαβαθμισμένη συγκέντρωση πρωτονίων κατά μήκος της θυλακοειδούς μεμβράνης είναι ο τρόπος αποθήκευσης της ενέργειας που λαμβάνει το κύτταρο από το φως. Έτσι η ενέργεια των κβάντων μετατρέπεται σε αυτό το είδος χημικής ενέργειας και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ATP από το ένζυμο ATP-συνθάση.



Εικόνα 6. Βασική ροή ηλεκτρονίων της φωτοσυνθετικής διαδικασίας. Τελικό αποτέλεσμα είναι η παραγωγή NADPH και ATP

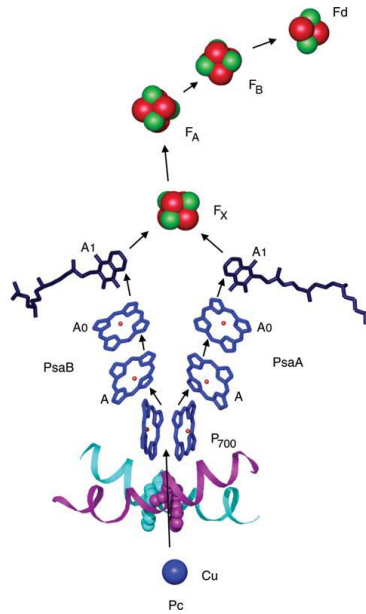
Η διαδικασία της φωτοσύνθεσης ξεκινά στο PSII (Εικόνα 6). Στην εσωτερική πλευρά του (lumen) υπάρχει ένα σύμπλοκο τεσσάρων

μαγγανίων (OEC) στο οποίο προσδένεται ένα μόριο του νερού. Επίσης στο κέντρο αντίδρασης υπάρχουν δύο χλωροφύλλες σε κατάλληλη γεωμετρική διαμόρφωση (P680). Με την απορρόφηση ενός φωτονίου διεγείρεται ένα ηλεκτρόνιο από το διμερές χλωροφυλλών (P680*) και μεταφέρεται στη φαιοφυτίνη a (Pheo a). Η απώλεια του ηλεκτρονίου καλύπτεται από το σύμπλοκο μαγγανίων, το οποίο διασπά το μόριο νερού σε ηλεκτρόνια και πρωτόνια. Το ηλεκτρόνιο που βρίσκεται στη φαιοφυτίνη a μεταφέρεται σε μία σταθερά προσδεδεμένη πλαστοκινόννη A (PQ_A) και στη συνέχεια στη θέση μιας ανταλλάξιμης πλαστοκινόννης B (PQ_B), η οποία ανάγεται σε ημιπλαστοκινόλη λαμβάνοντας ένα πρωτόνιο από το stroma. Με την απορρόφηση δεύτερου φωτονίου επαναλαμβάνεται η ίδια ηλεκτρονιακή ροή και έχουμε την πλήρη αναγωγή της PQ σε πλαστοκινόλη (PQH₂). Η απορρόφηση συνολικά τεσσάρων φωτονίων, οδηγεί στη διάσπαση δύο μορίων νερού προς τέσσερα ηλεκτρόνια, τέσσερα πρωτόνια και ένα μόριο οξυγόνου. Μέχρι στιγμής, αν παρατηρήσουμε τον αριθμό πρωτονίων εντός και εκτός της μεμβράνης βλέπουμε την αύξηση κατά 4H⁺ στο lumen και τη μείωση κατά 4H⁺ στο stroma. Δηλαδή, μία πρώτη διαβάθμιση της συγκέντρωσης των πρωτονίων.

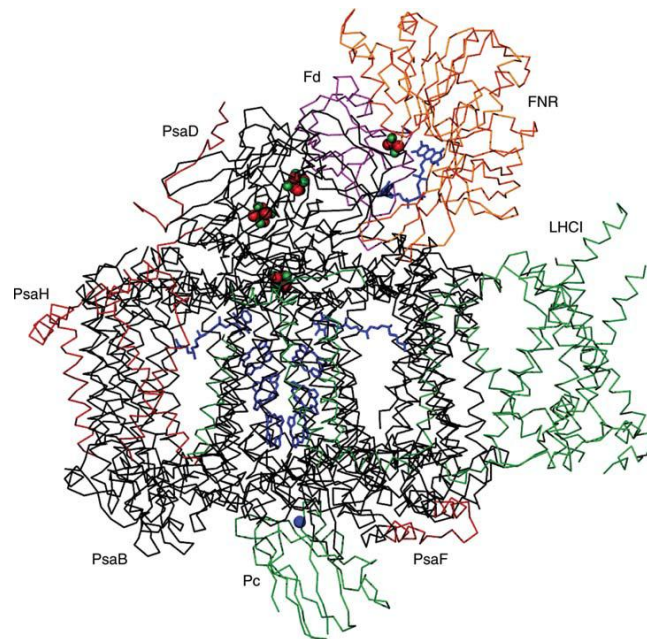
Η δομή της PQH₂ φέρει μία μεγάλη άπολη ανθρακική αλυσίδα που τις επιτρέπει την μετακίνηση της μέσα στη μεμβρανική διπλοστοιβάδα. Έτσι, είναι εύκολο να μεταφερθεί σε μία ειδική θέση πρόσδεσης στο κυτόχρωμα b₆f. Εκεί οξειδώνεται, δίνοντας τα ηλεκτρόνια τα οποία μέσω συμπλόκων σιδήρου-θείου (FeS) και μορίων αίμης στην πλαστοκυανίνη. Η πλαστοκυανίνη είναι μία μικρή υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη η οποία περιέχει ένα σύμπλοκο χαλκού σε κατάλληλη διαμόρφωση ώστε να αναχθεί από Cu²⁺ σε Cu⁺. Το αξιοσημείωτο αυτής της διαδικασίας είναι η ενίσχυση της πρωτονιακής διαβάθμισης μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης κατά την οξείδωση της PQH₂, αφού το κυτόχρωμα είναι προσανατολισμένο έτσι ώστε τα πρωτόνια να απελευθερώνονται μόνο στο lumen.

Το τελικό στάδιο των φωτεινών αντιδράσεων καταλύεται από το PSI (Εικόνα 7,8). Ο πυρήνας αυτού του συστήματος είναι ένα ζεύγος παρόμοιων υπομονάδων psaA(83kDa) και psaB(82kDa). Ένα ειδικό ζεύγος μορίων χλωροφύλλης a βρίσκεται στο κέντρο της δομής και απορροφά φως σε μέγιστο μήκος κύματος των 700nm. Αυτό το κέντρο (P700) ξεκινά το φωτοεπαγόμενο διαχωρισμό ηλεκτρικών φορτίων. Το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται διαμέσου μιας πορείας που περνά από τη χλωροφύλλη στη θέση A₀ και την κινόννη στη θέση A₁ φθάνοντας σε μια σειρά συμπλόκων 4Fe-4S. Τελικός αποδέκτης είναι μία μικρή υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, η φερρεδοξίνη (Fd), που περιέχει ένα σύμπλοκο 2Fe-2S σε συναρμογή με τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης. Το θετικό φορτίο του P700⁺ εξουδετερώνεται με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από την πλαστοκυανίνη. Η ανηγμένη Fd ενώνεται με το ένζυμο αναγωγάση του

ζεύγους φερρεδοξίνης-NADP⁺ και το τελικό προϊόν που παράγεται είναι το NADPH. Παράλληλα, η διαβάθμιση συγκέντρωσης πρωτονίων που έχει δημιουργηθεί μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης επιτρέπει την παθητική μεταφορά των H⁺ λόγω όσμωσης διαμέσου της ATP-συνθάσης, εκκινώντας έτσι τη φωσφορυλίωση του ADP και το σχηματισμό του ATP.

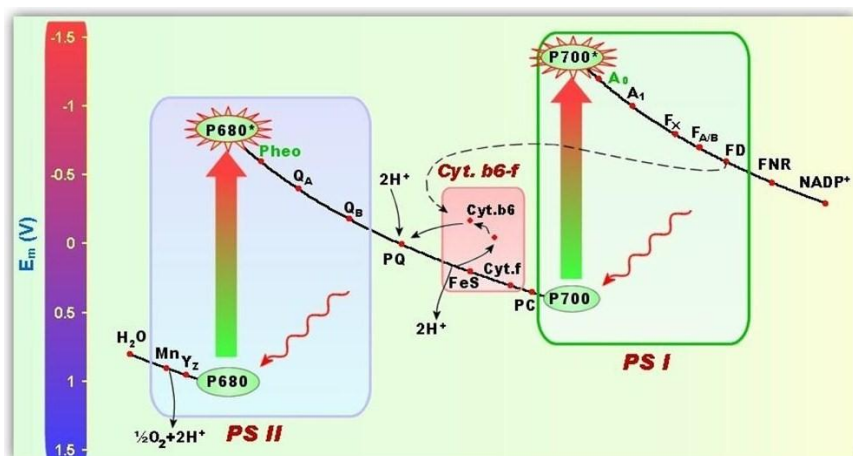


Εικόνα 7. Δομικό μοντέλο του μονοπατιού της φωτοεπαγόμενης ηλεκτρονικής μεταφοράς από την Pc έως τη Fd διαμέσου του PSI. Παρουσιάζονται οι χλωροφύλλες (μπλε), οι κινόνες (μαύρο), το άτομο Cu (μπλε μπάλες), του Fe (κόκκινες μπάλες), του S (πράσινες μπάλες) και δύο κατάλοιπα τρυπτοφάνης τα οποία θεωρείται ότι συμμετέχουν στην ηλεκτρονική ροή.



Εικόνα 8. Πλάγια όψη του PSI, της Pc, της Fd και της FNR. Παρουσιάζεται το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHC) (πράσινο), τα άτομα Fe (κόκκινες μπάλες), του S (πράσινες μπάλες), του Cu (μπλε μπάλα) και το μόριο FAD (μπλε) που λειτουργεί ως συμπαραγοντας της FNR.

Η συνεργασία των PSII, PSI δημιουργεί μια ροή ηλεκτρονίων από το H₂O στο NADP⁺. Η πορεία αυτή των ηλεκτρονίων ονομάζεται “σχήμα Z της φωτοσύνθεσης” λόγω του σχήματος του συνολικού διαγράμματος (Εικόνα 9).

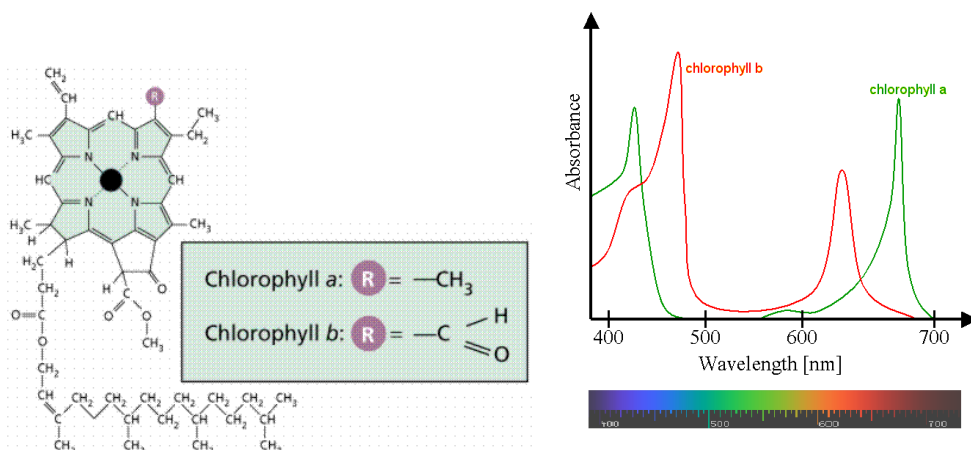


Εικόνα 9. Σχήμα Z της φωτοσύνθεσης

Συνολικό αποτέλεσμα των φωτεινών αντιδράσεων είναι η παραγωγή μορίων με υψηλή αναγωγική ισχύ, τα οποία θα συνεισφέρουν ενεργειακά στην επίτευξη των σκοτεινών αντιδράσεων, ώστε να πραγματοποιηθεί η μετατροπή του ατμοσφαιρικού CO₂ σε σάκχαρα και να δημιουργήσει το κύτταρο την τροφή του.

Στις θυλακοειδής μεμβράνες είναι έντονη η παρουσία ενός συμπλόκου που δεν συμμετέχει στην ηλεκτρονιακή ροή. Ο ρόλος του εντοπίζεται στη συλλογή του ηλιακού φωτός και τη μεταφορά της φωτεινής ενέργειας προς τα ενεργά κέντρα P700 και P680. Για το λόγο αυτό ονομάζεται σύμπλοκο συλλογής φωτός (Light Harvesting Complex) ή αλλιώς φωτοσυνθετική κεραία. Περιέχει μικρά οργανικά μόρια-χρωστικές που χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες, τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Οι χλωροφύλλες είναι οι χρωστικές που επικρατούν και προσδίδουν το πράσινο χρώμα των φυτών. Η δομή της χλωροφύλλης αποτελείται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο, που περιέχει π σύστημα ηλεκτρονίων το οποίο επιτρέπει την απορρόφηση ορατού φωτός. Στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου υπάρχει ένα Mg²⁺ που εξισορροπεί τα 2 αρνητικά φορτία των τεσσάρων πυρρολικών αζώτων. Συναντούνται δύο βασικές δομές στους ανώτερους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, η χλωροφύλλη a (Chl a) και η χλωροφύλλη b (Chl b). Μοναδική διαφορά τους είναι η ύπαρξη μιας αλδεϋδομάδας στον πορφυρινικό δακτύλιο της Chl b, ενώ στην ίδια θέση στη Chl a υπάρχει μια μεθυλομάδα (Εικόνα 10). Η χλωροφύλλη a έχει μέγιστα απορρόφησης

στα 430nm και 662nm περίπου, ενώ η χλωροφύλλη b έχει μέγιστα απορρόφησης στα 453nm και 642nm (Εικόνα 10)



Εικόνα 10. Δομή χλωροφύλλης α & β καθώς και το φάσμα απορρόφησης τους

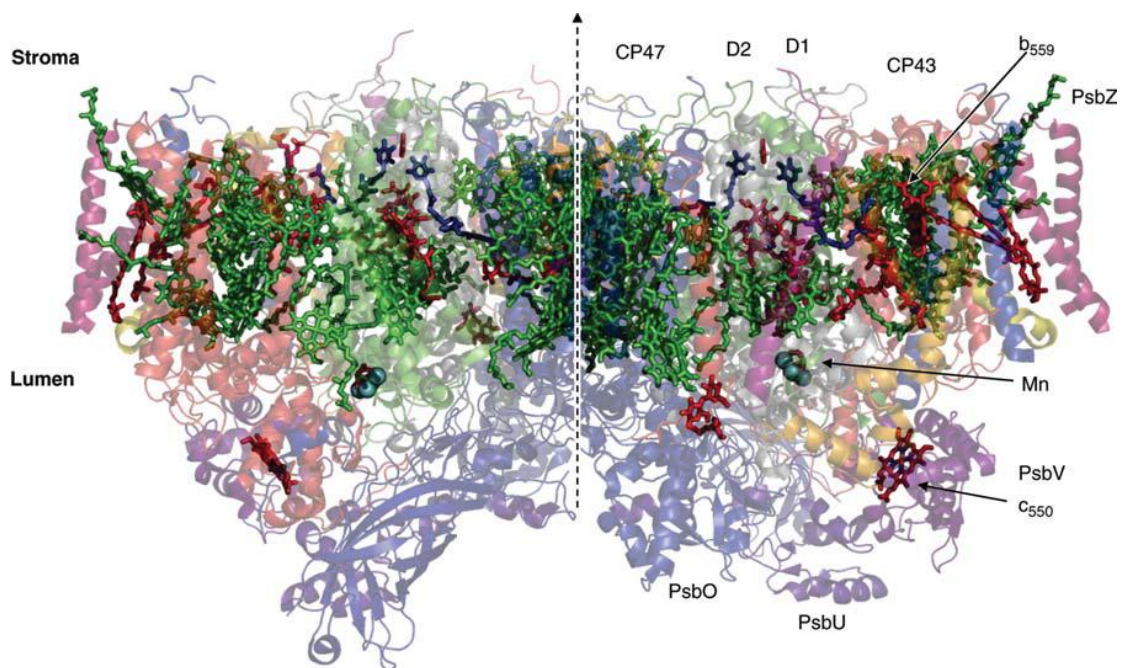
Όλες οι χλωροφύλλες έχουν την ικανότητα να απορροφούν το φως αλλά μόνο οι χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου συμμετέχουν στη μετατροπή της φωτοχημικής σε ηλεκτροχημική ενέργεια.

Οι χρωστικές της κεραίας είναι διευθετημένες στο χώρο έτσι ώστε να απορροφούν και να μεταφέρουν το μεγαλύτερο μέρος του ορατού φάσματος στο ενεργό κέντρο. Η ύπαρξη του LHC είναι καθοριστικής σημασίας. Χωρίς αυτό το σύμπλοκο, τα ενεργά κέντρα των δύο φωτοσυστημάτων θα είχαν την ικανότητα να εκμεταλλευτούν μόνο δύο μήκη κύματος από όλο το φάσμα. Η απορρόφηση μικρότερων μηκών κύματος σημαίνει απορρόφηση φωτονίων με μεγαλύτερη ενέργεια τα οποία μπορούν να μεταφερθούν στο κέντρο αντίδρασης χάνοντας μέρος της ενέργειάς τους, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα ειδικά ζεύγη χλωροφυλλών. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η κεραία κάθε οργανισμού μπορεί να προσαρμοστεί εύκολα στις συνθήκες του περιβάλλοντος όπου αναπτύσσεται.

Το φωτοσύστημα II

Το φωτοσύστημα II έχει κεντρίσει αρκετά το ενδιαφέρον των ερευνητών. Η αντίδραση της οξειδωσης του νερού που καταλύει είναι από τις πιο σημαντικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στα βιολογικά συστήματα και απαιτεί μεγάλη ενέργεια. Η φασματοσκοπία EPR έχει βοηθήσει πολύ στην ανίχνευση του μηχανισμού. Πολλές προσπάθειες έγιναν επίσης μέσω κρυσταλλογραφικής μελέτης ώστε να προσδιοριστεί η τρισδιάστατη δομή, προσφέροντας επιπλέον στοιχεία στο γρίφο του μηχανισμού. Η παραγωγή καλής ποιότητας κρυστάλλων του φυτικού φωτοσυστήματος ήταν πολύ

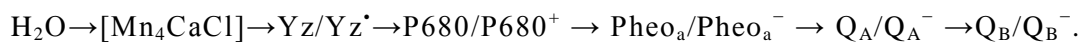
δύσκολη λόγω πρωτεόλυσης των δειγμάτων [27]. Λύση στο πρόβλημα ήταν η δοκιμή PSII από θερμοφιλά κυανοβακτήρια (i.e., *T. elongatus*, *T. vulcanus*) από τα οποία προέκυψε δομή με ανάλυση 3.8 Angstrom (Εικόνα 11).

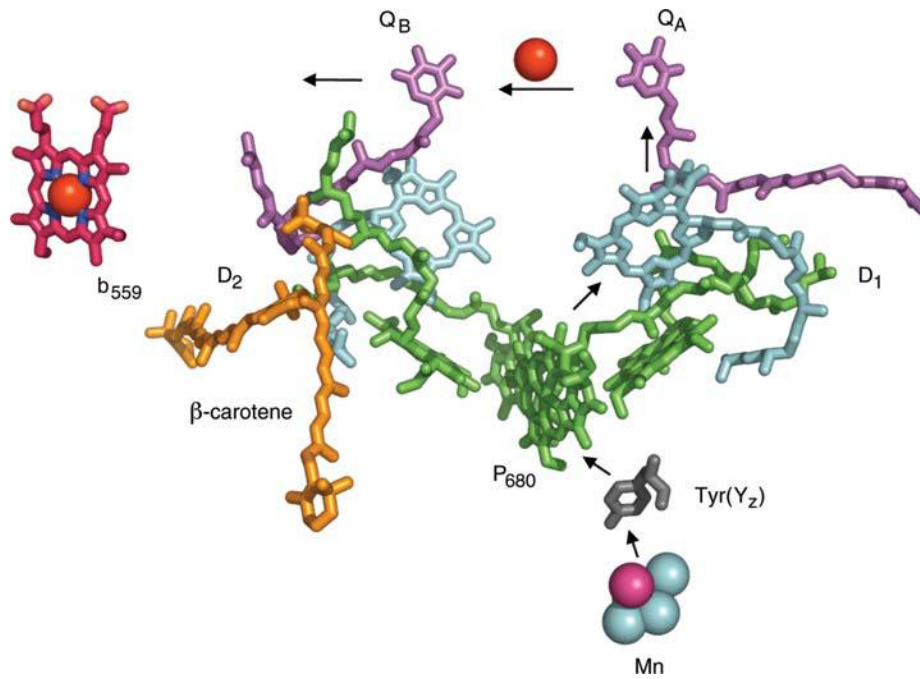


Εικόνα 11. Πλάγια όψη του PSII των κυανοβακτηρίων. Υποδεικνύεται ο άξονας C2 ψευδοσυμμετρίας ανάμεσα στις μονομερές υπομονάδες του ομοδιμερούς.

Το PSII έχει μία σύνθετη αρχιτεκτονική δομή αποτελούμενη από τουλάχιστον 20 πρωτεϊνικές υπομονάδες, οι περισσότερες από τις οποίες βρίσκονται στη θυλακοειδή μεμβράνη. Το κέντρο αντίδρασης του αποτελείται από δυο βασικές υπομονάδες, τις πρωτεΐνες D1 και D2. Το ετεροδιμερές D1/D2 δεσμεύεται με μια σειρά παραγόντων που συμμετέχουν στην ηλεκτρονιακή ροή, όπως το διμερές χλωροφυλλών (P680) που λειτουργεί ως πρωτοταγής δότης ηλεκτρονίων, δύο μόρια φαιοφυτίνης (Pheo_a), τις πλαστοκινόνες PQ_A και PQ_B , τον μη αιμικό σίδηρο Fe^{2+} , τα οξειδοαναγωγικά ενεργά κατάλοιπα τυροσίνης Y_Z και Y_D , τέσσερις χλωροφύλλες και δύο καροτένια. Τέλος οι πρωτεΐνες αυτές παρέχουν υποκαταστάτες στους ανόργανους συμπαραγόντες του συμπλόκου έκλυσης O_2 , καθώς, επίσης, παρέχουν θέσεις δέσμευσης για τις εξωτερικές πρωτεΐνες του PSII.

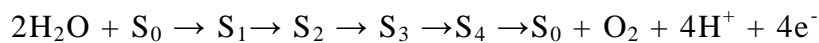
Είναι κοινά αποδεκτό πλέον ότι το μονοπάτι που ακολουθούν τα ηλεκτρόνια είναι συνοπτικά το εξής (Εικόνα 12):





Εικόνα 12. Ηλεκτρονιακή ροή στο PSII. Παρουσιάζεται η Chla (πράσινο), Pheoa (γαλάζιο), PQ (μωβ), αίμη b559, το άτομο Fe (κόκκινο), τα καροτενοειδή (πορτοκαλί), το σύμπλοκο CaMn₄ και η Yz.

Ο μηχανισμός έκλυσης οξυγόνου από το OEC περιλαμβάνει μια σειρά S οξειδωτικών καταστάσεων του συμπλόκου του μαγγανίου. Συνολικά έχει προταθεί η συνολική αντίδραση :



όπου, το πρώτο στάδιο δεν απαιτεί φωτεινή ενέργεια. Γίνονται ακόμα έρευνες για τη διευκρίνιση του μηχανισμού εφόσον παραμένουν ορισμένα βασικά ερωτήματα. Αρχικά, χρειάζεται σαφής προσδιορισμός των σταδίων οξείδωσης του νερού καθώς και του ρόλου των ιόντων Ca²⁺ και Cl⁻. Επίσης, υπάρχει διαφωνία στην προέλευση των πρωτονίων που απελευθερώνονται, όπου το φαινολικό H⁺ της Yz ίσως είναι μέρος του δικτύου μεταφοράς πρωτονίων. Σημαντικό θέμα έρευνας είναι επίσης το μονοπάτι μέσω του οποίου το H⁺ φεύγει από το σημείο οξείδωσης του νερού, για το οποίο υπάρχουν ορισμένες αποδείξεις ότι εμπλέκεται η His190 της υπομονάδας PsbA και ίσως γίνεται μέσω της Yz. Η απόσταση όμως Yz-Mn είναι περίπου 7Angstrom από τις κρυσταλλογραφικές δομές, δηλαδή αρκετά μεγάλη απόσταση για μεταφορά H⁺. Ωστόσο, οι αποστάσεις στον κρύσταλλο δεν σημαίνει ότι παραμένουν αναλλοίωτες και στο φυσιολογικό περιβάλλον της πρωτεΐνης όπου λειτουργεί. Τα σύγχρονα μέσα που έχουν οι ερευνητές βοηθούν στην απάντηση των ερωτημάτων, συμπληρώνοντας έτσι τη συνολική εικόνα για αυτή τη ενδιαφέρουσα αντίδραση.

Φωτοσυνθετική παραγωγή H₂

Η παραγωγή υδρογόνου από μικροφύκη είναι ένα φλέγον θέμα έρευνας τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια παρόλο που η ικανότητα τους αυτή είναι γνωστή πάνω από 70 χρόνια. Το 1942 συγκεκριμένα, οι Gaffron και Rubin δημοσιεύουν μία εργασία παρουσιάζοντας δύο τρόπους παραγωγής υδρογόνου από το μικροφύκος *Scenedesmus*, είτε στο σκοτάδι είτε στο φως σε αναερόβιες συνθήκες αφού έχουν επωαστεί στο σκοτάδι [28]. Τις επόμενες δεκαετίες οι επιστήμονες είχαν στραφεί στην διαδικασία της φωτοσύνθεσης όπου υπήρχαν ακόμα πολλές ασάφειες, ενώ λίγοι ήταν εκείνοι που ασχολήθηκαν με το μονοπάτι του υδρογόνου. Οι πρώτες παρατηρήσεις έδειχναν την παρουσία ενός ενζύμου που καταλύει το σχηματισμό του μοριακού υδρογόνου, την υδρογενάση (Hd). Επίσης, συσχετίστηκε η μεταφορά ηλεκτρονίων με το φωτοσυνθετικό μηχανισμό, αφού παρατηρήθηκε η ταυτόχρονη παραγωγή ATP [29]. Αργότερα, προτάθηκε ότι το μονοπάτι που ακολουθείται για την παραγωγή H₂ ανταγωνίζεται το μονοπάτι καθήλωσης CO₂ [30, 31]. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι απουσία του λειτουργικού PSII απαιτείται η λειτουργία του κυτοχρώματος b₆f και του PSI [32, 33]. Το 1985 γίνεται γνωστή η παρατεταμένη φωτο-παραγωγή H₂ από καλλιέργεια για έξι ημέρες συνεχόμενα, η οποία είχε συνεχή ροή ευγενούς αερίου [34]. Επιβεβαιώνοντας ότι υπάρχει σαφής σύνδεση με τη φωτοσύνθεση, κύριος στόχος γίνεται η επίτευξη της άμεσης βιοφωτόλυσης [35-41], κατά την οποία με τη διάσπαση του νερού από το PSII, τα ηλεκτρόνια καταλήγουν στη φερρεδοξίνη μέσω του PSI και από εκεί στην υδρογενάση, σχηματίζοντας έτσι H₂. Αυτή η εκδοχή δεν είναι απαγορευτική γνωρίζοντας ότι το οξειδοαναγωγικό δυναμικό της Fd είναι -450mV και αυτό που απαιτείται για την αναγωγή του H₂ είναι -420mV. Ο λόγος που δεν μπορεί να συμβεί η διαδικασία αυτή είναι η εξαιρετική ευαισθησία της υδρογενάσης στο μοριακό οξυγόνο [42]. Έτσι εξηγείται και ο τρόπος με τον οποίο ήταν ικανή η παρατήρηση υδρογόνου από τα κύτταρα, χρησιμοποιώντας επώαση στο σκοτάδι και απαέρωση [43, 44], μέθοδοι που έχουν ως αποτέλεσμα την εξασφάλιση αναερόβιων συνθηκών στην καλλιέργεια. Εναλλακτική προσέγγιση των ερευνητών είναι ο διαχωρισμός των δύο διαδικασιών, της παραγωγής O₂ και H₂, ώστε να πραγματοποιούνται διαδοχικά και όχι ταυτόχρονα [45]. Το 2000 δημοσιεύτηκε μία εργασία από τον A. Melis και τους συνεργάτες του, όπου παρουσιάζεται ιδιαίτερος αύξημένη ποσότητα υδρογόνου παρουσία φωτός [46]. Στην μελέτη αυτή το ανόργανο θείο στερείται από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, πετυχαίνοντας τη διαδικασία δύο σταδίων. Μέχρι και σήμερα, η στέρηση θείου παραμένει ο πιο αποδοτικός τρόπος παραγωγής υδρογόνου.

Στέρηση θείου (S)

Η ανακάλυψη του A. Melis αποτέλεσε σταθμό στην προσπάθεια φωτοσυνθετικής παραγωγής υδρογόνου. Η μέθοδος αυτή έχει σημαντικές συνέπειες στην επιβίωση του οργανισμού, επηρεάζοντας διάφορες διαδικασίες του κυττάρου. Έγινε αμέσως αντικείμενο συζήτησης και αμφισβήτησης από μερικούς επιστήμονες.

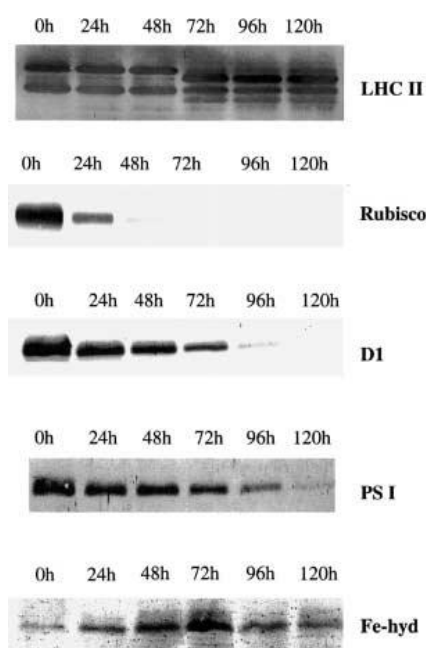
Δεν ήταν όμως η πρώτη φορά που μελετήθηκαν οι επιδράσεις της στέρησης θείου. Είχαν ήδη δημοσιευτεί αρκετά χρόνια πριν, εργασίες με αντικείμενο έρευνας τον τρόπο που ο οργανισμός αντιμετωπίζει την έλλειψη ενός βασικού θρεπτικού συστατικού [47, 48], όπου παρατηρούσαν μείωση της έκλυσης O_2 και της καθήλωσης του CO_2 , χωρίς όμως να αλλάζει η πρωτεϊνική σύσταση του χλωροπλάστη. Επιπλέον αναλύσεις έδειξαν μειωμένη ικανότητα ηλεκτρονιακής μεταφοράς από το P680 του PSII προς την PQ_B [49]. Μετά από 14 χρόνια έρευνας, γνωρίζουμε αρκετά πράγματα για τις επιδράσεις στο μεταβολισμό του κυττάρου και για το μηχανισμό παραγωγής υδρογόνου. Πολλά όμως είναι τα σημεία που δεν έχουν απαντηθεί λόγω της πολυπλοκότητας του συστήματος.

Παρατηρώντας τις συνέπειες της στέρησης, μπορούμε να διαχωρίσουμε σε τρεις χρονικές περιόδους την κατάσταση του κυττάρου [50, 51]:

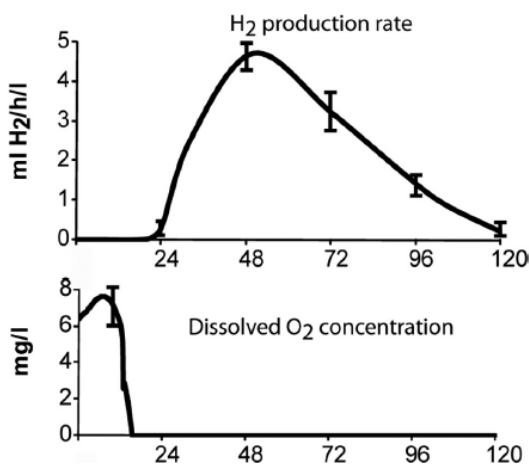
1. Τις πρώτες 24 ώρες το κύτταρο αντιλαμβάνεται την έλλειψη θείου στο περιβάλλον του και ξεκινάει την αερόβια μετατροπή ενέργειας. Φωτοσυνθέτει και αποθηκεύει σχεδόν την δεκαπλάσια ποσότητα αμύλου [52]. Αυτό οδηγεί σε αύξηση του όγκου του κυττάρου και σε αλλαγή του σχήματός του, από ελλειψοειδή σε σφαιρικό [52].
2. Τις επόμενες δύο ημέρες (24-72 ώρες) τα κύτταρα ζουν σε αναερόβιο περιβάλλον. Το επίπεδο της μιτοχονδριακής αναπνοής παραμένει στο φυσιολογικό, καταναλώνοντας O_2 ώστε να παραχθεί ενέργεια. Αντίθετα, δεν υπάρχει η ικανότητα φωτοσύνθεσης λόγω αδυναμίας αντικατάστασης της D1 υπομονάδας του PSII, εξαιτίας της έλλειψης των βασικών αμινοξέων κυστεΐνη και μεθειονίνη τα οποία χρειάζονται το θείο. Έτσι, το οξυγόνο έχει ελαττωθεί δραματικά στην καλλιέργεια και αυτό εκκινεί την έκφραση της υδρογενάσης [44, 53, 54]. Παρατηρείται λοιπόν, σταδιακή αύξηση του παραγόμενου H_2 (Εικόνα 14) και ταυτόχρονα έναρξη του καταβολισμού. Πιο συγκεκριμένα, τα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν μείωση του αμύλου και απότομη μείωση της Rubisco [52].
3. Τις επόμενες δύο ημέρες (72-120 ώρες) παρατηρείται σταδιακή πτώση της παραγωγής H_2 λόγω της πτώσης των ζωτικών επιπέδων

της καλλιέργειας. Τα κύτταρα χρησιμοποιούν τα τελευταία ενεργειακά τους αποθέματα.

Η διαδικασία δύο σταδίων που αναφέραμε παραπάνω πραγματοποιείται με τη στέρηση θείου, όπου ήδη από την πρώτη ημέρα απενεργοποιείται σταδιακά η έκλυση O_2 , επιτρέποντας από τη δεύτερη ημέρα να ξεκινήσει η παραγωγή H_2 . Σημαντική πληροφορία είναι ότι οι επιδράσεις της στέρησης είναι αναστρέψιμες [55]. Αυτό σημαίνει ότι με προσθήκη θείου το κύτταρο διορθώνει τις βλάβες που έχει υποστεί και επανέρχεται στη φυσιολογική του λειτουργία, όπου είναι πλέον ικανό να φωτοσυνθέσει και να παράγει O_2 . Έτσι, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν κύκλοι στέρησης σε μία καλλιέργεια ώστε να είναι παραγωγική για περισσότερο από τέσσερις ημέρες.



Εικόνα 13. Western Blot για την ανίχνευση ποσοτικών διαφοροποιήσεων συγκεκριμένων πρωτεϊνών τη διάρκεια στέρησης θείου



Εικόνα 14. Μεταβολή συγκέντρωσης H_2 & O_2 κατά τη διάρκεια στέρησης θείου

Μηχανισμός

Ο ρόλος της στέρησης και τα μηχανιστικά μονοπάτια δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Τα σημεία που παραμένουν αναπάντητα είναι σημαντικά για να συνδέσουν τα γνωστά κομμάτια και να γίνει ξεκάθαρη η συνολική εικόνα.

Η φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου ακολουθεί δύο μονοπάτια, το εξαρτώμενο από το PSII και το ανεξάρτητο.

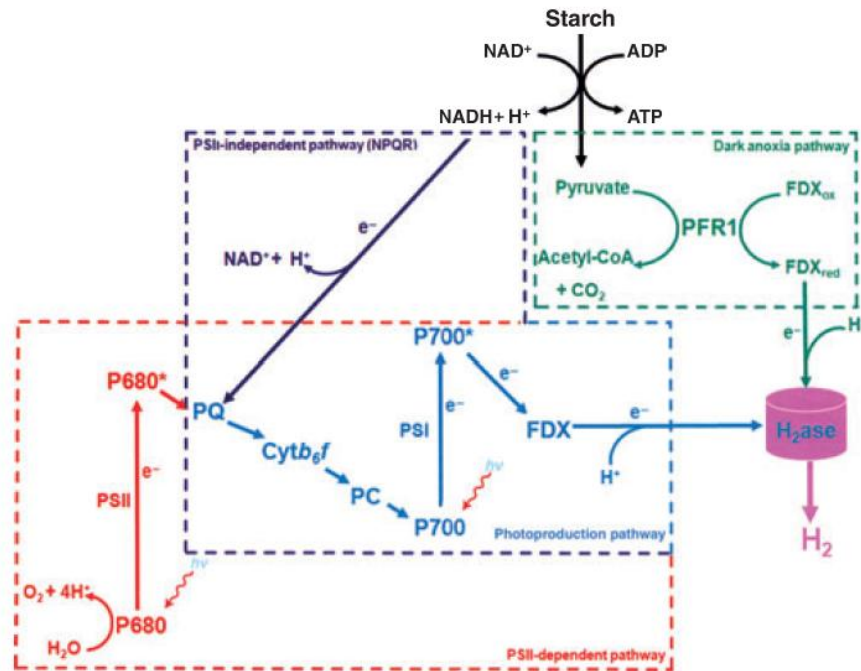
- ❖ Το εξαρτώμενο από το PSII μονοπάτι είναι εκείνο στο οποίο δεν έχει γίνει κάποια αλλαγή στη φωτοσύνθεση. Ο αρχικός δότης ηλεκτρονίων είναι το νερό, το οποίο οξειδώνεται μέσω του PSII. Το φως είναι απαραίτητο ώστε να πραγματοποιηθεί η ηλεκτρονιακή ροή μεταφέροντας τα ηλεκτρόνια στη Fd και στη συνέχεια στην υδρογενάση. Η λειτουργία αυτή δεν μπορεί να γίνεται για μεγάλο χρονικό διάστημα λόγω της ταυτόχρονης παραγωγής O_2 , το οποίο παρεμποδίζει μη αντιστρεπτά την υδρογενάση. Ωστόσο υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι ο ρόλος του PSII είναι πολύ σημαντικός για την παραγωγή υδρογόνου.
- ❖ Το ανεξάρτητο από το PSII μονοπάτι συμβαίνει όταν το PSII είναι απενεργοποιημένο, δηλαδή το περισσότερο διάστημα της στέρησης θείου. Ο δότης ηλεκτρονίων σε αυτή την περίπτωση είναι αναγωγικά μόρια τα οποία έχουν προκύψει από τον καταβολισμό του κυττάρου και δεν μπορούν να οξειδωθούν μέσω της αναπνοής λόγω της απουσίας του οξυγόνου, που είναι ο τελικός αποδέκτης. Ο καλύτερος δότης είναι το NADPH όπως και το NADH. Τα ηλεκτρόνια διοχετεύονται στο σημείο της δεξαμενής της πλαστοκινόνης (PQ pool), όπου ανάγουν την PQ σε PQH_2 . Για να γίνει αυτή η μεταφορά συμμετέχει μία NAD(P)H αναγωγάση [56, 57]. Στη συνέχεια ακολουθεί η ηλεκτρονιακή ροή προς τη Fd και την Hd μέσω του PSI, κάνοντας απαραίτητη τη χρήση φωτός.

Παρατηρώντας τους δύο μηχανισμούς (*Εικόνα 15*) καταλαβαίνουμε ότι οι επιδράσεις της στέρησης θείου που οδηγούν στην παραγωγή H_2 , δεν επηρεάζουν ένα μόνο σημείο. Η συνολική διαδικασία είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των παρακάτω τεσσάρων βασικών διεργασιών:

1. Οξυγονική φωτοσύνθεση
2. Μιτοχονδριακή αναπνοή
3. Καταβολισμός ενδογενών υποστρωμάτων (αμύλου, πρωτεϊνών και λιπιδίων)

4. Ηλεκτρονιακή ροή προς την Hd

Η κατάλληλη ισορροπία μεταξύ των παραπάνω διαδικασιών μπορεί να επιτευχθεί ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη παραγωγή H_2 . Η δυσκολία για την απόλυτη κατανόηση της συνολικής διαδικασίας έγκειται στη πολυπλοκότητα του συστήματος.



Εικόνα 15. Ηλεκτρονικά μονοπάτια κατά τη διάρκεια της στέρησης S που οδηγούν στην παραγωγή H_2

Τα βασικά ερωτήματα που παραμένουν αφορούν το ρόλο του PSII και επίσης το λόγο που το κύτταρο καταφεύγει στην παραγωγή H_2 τη στιγμή που αντιμετωπίζει σοβαρό πρόβλημα επιβίωσης.

Ο ρόλος του PSII γνωρίζουμε ότι είναι σημαντικός αλλά δεν ξέρουμε πως ακριβώς ρυθμίζεται. Η αρχική απενεργοποίησή του συμβαίνει λόγω ανικανότητας σύνθεσης της D1 υπομονάδας [49], η οποία βρίσκεται στο ενεργό κέντρο και χρειάζεται αντικατάσταση πολύ συχνά (κάθε 6-12ώρες) [58]. Όμως, δεν υπάρχει πλήρης απενεργότητα. Ένα μικρό ποσοστό παραμένει ενεργό χωρίς να παρατηρείται αύξηση του οξυγόνου. Επειδή όμως η μιτοχονδριακή αναπνοή δεν είναι απενεργοποιημένη είναι πολύ πιθανό να μην μπορούμε να ανιχνεύσουμε το οξυγόνο επειδή καταναλώνεται αμέσως. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι η PQ pool είναι υπερ-ανηγμένη λόγω του καταβολισμού, το οποίο συνεπάγεται την ανικανότητα να δεχθεί ηλεκτρόνια από το PSII [59].

Το άμυλο είναι εξίσου σημαντικό για το ανεξάρτητο από το PSII μονοπάτι, λόγω του NADH που παράγεται κατά τον καταβολισμό του. Συγκεκριμένα, οξειδώνεται μέσω την αναπνευστικής αλυσίδας βοηθώντας έτσι στην κατανάλωση O_2 ώστε να παραμείνει σε χαμηλά επίπεδα και να μην

παρεμποδίζει την ενεργότητα της υδρογενάσης, και επιπλέον τροφοδοτεί με ηλεκτρόνια τη φωτοσυνθετική αλυσίδα (PSII-ανεξάρτητο μονοπάτι) [60]. Πρόσφατα πειράματα με μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία ήταν ανίκανα να σχηματίσουν άμυλο, έδειξαν ίδια επίπεδα παραγόμενου H_2 με τον άγριο τύπο, αποτέλεσμα το οποίο αποδεικνύει ότι το άμυλο δεν είναι απαραίτητο [61]. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι το κύτταρο κατανάλωνε οξικό κατά την φάση παραγωγής H_2 , έτσι ώστε να διατηρήσει τα επίπεδα αναπνοής. Αντίστοιχα, και το οξικό δεν είναι απαραίτητο για την παραγωγή H_2 όταν το κύτταρο έχει τρόπο να συσσωρεύσει άμυλο [62-64].

Η επιλογή του κυττάρου να στραφεί στην παραγωγή υδρογόνου δεν είναι τυχαία. Οι οργανισμοί έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να προσαρμόζονται στο περιβάλλον τους χωρίς να σπαταλούν την ενέργειά τους. Αυτό σημαίνει ότι η έκλυση μεγάλης ποσότητας υδρογόνου βοηθάει το κύτταρο να επεκτείνει τη βιωσιμότητά του υπό τις νέες συνθήκες. Υπάρχουν αρκετές υποθέσεις. Η επικρατέστερη αναφέρει ότι το κύτταρο λόγω του καταβολισμού έχει πολλά αναγωγικά ισοδύναμα τα οποία δεν μπορεί να τα χρησιμοποιήσει για την οξειδωτική φωσφορυλίωση λόγω έλλειψης O_2 , και τα χρησιμοποιεί για να ανάγει την PQ pool. Όμως η ροή μέσω της κυκλικής φωτοφωσφορυλίωσης ($Fd \rightarrow cyt\ b_6f \rightarrow PSI$) δεν μπορεί να απορροφήσει τα ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα να δυσκολεύεται η ροή προς το PSI. Η υδρογενάση παρεμβαίνει σε εκείνο το σημείο δίνοντας εναλλακτική πορεία στα ηλεκτρόνια, βοηθώντας την ηλεκτρονιακή ροή. Το H_2 που σχηματίζεται δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το κύτταρο και έτσι αποβάλλεται.

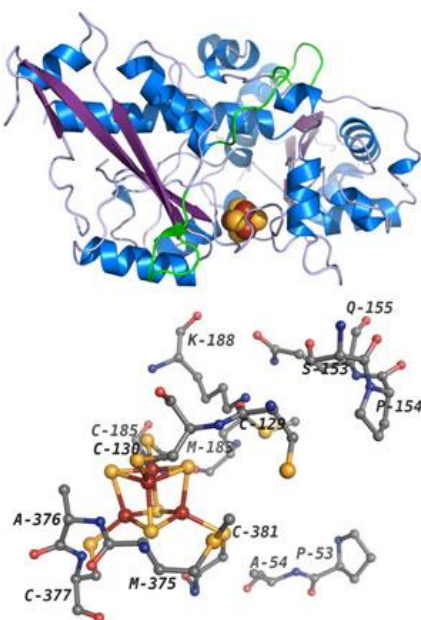
Αντικείμενο έρευνας πλέον είναι η διευκρίνιση των “θολών σημείων” ώστε γνωρίζοντας ακριβώς τη διαδικασία να καταφέρουμε να επηρεάσουμε με το σωστό τρόπο το κύτταρο και να πετύχουμε την αποδοτική και οικονομικά συμφέρουσα παραγωγή H_2 .

Υδρογενάση

Σε αρκετούς μικροοργανισμούς έχουν βρεθεί ένζυμα τα οποία καταλύουν το σχηματισμό υδρογόνου, οι υδρογενάσες. Η οικογένεια των υδρογενασών χωρίζεται σε τρεις κύριες ομάδες με βάση τη δομή των συμπλόκων μετάλλου-θείου που σχηματίζονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [65, 66]. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι [Fe]-hydrogenases, οι οποίες δεν περιέχουν σύμπλοκα σιδήρου-θείου και συναντώνται μόνο στα αρχαία. Η

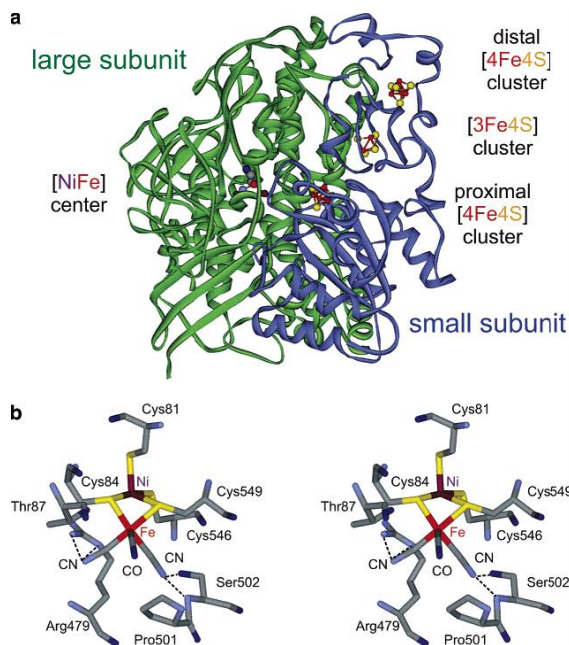
δεύτερη ομάδα περιέχει τις [NiFe]-hydrogenases, οι οποίες συναντώνται σε πολλούς προκαρυωτικούς οργανισμούς, με χαρακτηριστικό το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου όπου περιέχει ένα άτομο νικελίου και ένα άτομο σιδήρου. Στην τρίτη ομάδα ανήκουν οι [FeFe]-hydrogenases, οι οποίες διαθέτουν ένα κυβικό σύμπλοκο σιδήρου-θείου στο ενεργό τους κέντρο. Εντοπίζονται κυρίως σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στο οξυγόνο. Παρουσιάζουν όμως μεγαλύτερη απόδοση υδρογόνου συγκριτικά με εκείνες των άλλων κατηγοριών. Το μέγεθος τους κυμαίνεται μεταξύ 30 και 50kDa και συνήθως είναι μονομερή.

Στο *C.reinhardtii* και γενικότερα στα μικροφύκη, συναντάται η τρίτη κατηγορία των FeFe-υδρογενασών [67] (Εικόνα 16). Έρευνες έχουν δείξει ότι αν και η λειτουργία τους σχετίζεται με τη φωτοσυνθετική διαδικασία, κωδικοποιούνται στον πυρήνα του κυττάρου. Στη συνέχεια συνθέτονται στο κυτοσόλιο και τελικά μεταφέρονται στο stroma των χλωροπλαστών ώστε να επιτελέσουν τη λειτουργία τους. Πειραματικές και θεωρητικές μελέτες έχουν αποδείξει την μεταφορά ηλεκτρονίων από τη φερρεδοξίνη στην υδρογενάση.



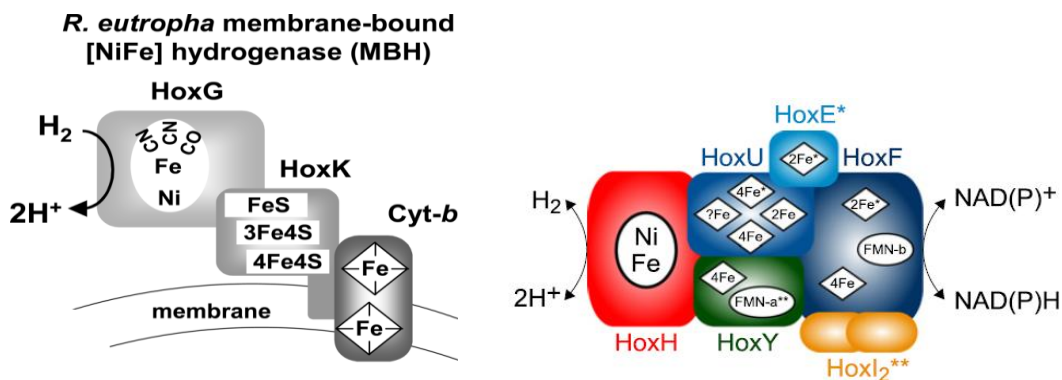
Εικόνα 16. [FeFe]-hydrogenase από το *Chlamydomonas reinhardtii*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το O₂ δρα ως ισχυρός αναστολέας τόσο της μεταγραφής του γονιδίου όσο και της λειτουργίας της [44, 55]. Αυτή είναι μία σημαντική διαφορά μεταξύ των κατηγοριών των ενζύμων. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι οι NiFe-Hd αναστέλλονται από το οξυγόνο αντιστρεπτά, δηλαδή με απομάκρυνση του O₂ επανακτούν πλήρως την ενεργότητά τους. Αυτό δεν συμβαίνει στις FeFe-Hd, όπου το σύμπλοκο του ενεργού τους κέντρου καταστρέφεται χωρίς να υπάρχει δυνατότητα να επανέλθει στη φυσιολογική κατάσταση.



Εικόνα 17. [NiFe]hydrogenase από *Desulfovibrio gigas*

Οι NiFe-Hd δεν αποτελούν μονομερή. Ποικίλουν τα ένζυμα ανάλογα με το μικροοργανισμό και αυτό επηρεάζει και τον τρόπο λειτουργίας τους. Το βακτήριο *Ralstonia eutropha* έχει μελετηθεί αρκετά και χαρακτηριστεί [68]. Περιέχει συνολικά τρία διαφορετικά είδη υδρογενασών, δύο κυτταροπλασματικές (SH και RH) και μία προσδεμένη στη μεμβράνη (MBH). Η RH είναι μία πρωτεΐνη η οποία έχει ρυθμιστικό ρόλο και εκκινεί ορισμένες διαδικασίες σύμφωνα με τη συγκέντρωση του H_2 . Η SH αποτελείται από τέσσερις κύριες υπομονάδες και έχει την ικανότητα να λαμβάνει ηλεκτρόνια από το NAD(P)H. Η MBH αποτελείται από δύο υπομονάδες και συνδέεται μέσω κυτοχρώματος με την αναπνευστική αλυσίδα. Οι δύο τελευταίες λειτουργούν περισσότερο προς την κατεύθυνση οξείδωσης του H_2 , ώστε να τροφοδοτήσουν με ηλεκτρόνια το κύτταρο. Έχουν όμως την ικανότητα να λειτουργούν προς την αντίθετη κατεύθυνση σχηματίζοντας H_2 , όταν υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες.



Εικόνα 18. SH & MBH υδρογενάση από το βακτήριο *Ralstonia eutropha*

Λόγω της αντιστρεπτής επίδρασης του O_2 , αυτά τα ένζυμα προτιμώνται για το σχηματισμό τεχνητών συστημάτων με στόχο τη φωτοβιολογική παραγωγή υδρογόνου. Η βιβλιογραφία παρουσιάζει πολλά παραδείγματα στα οποία γίνεται χρήση του PSI ή συνθετικών μορίων στο ρόλο “κεραίας” συνδεδεμένα με μία NiFe-Hd [69].

ΣΚΟΠΟΣ

Ο βασικός στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η διαλεύκανση των επιδράσεων της στέρησης θείου στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό, ώστε να προκύψουν συμπεράσματα για το ρόλο του φωτοσυστήματος II αλλά και για το μηχανισμό παραγωγής υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με μεταλλαγμένα στελέχη όπου έχουν διαφορές στο PSII ώστε αναλογικά με την παραγωγή H_2 να συμπεράνουμε τη συνεισφορά στο μηχανισμό. Επίσης, απομονώθηκαν μεμβράνες εμπλουτισμένες σε PSII ώστε να μελετηθούν με φασματοσκοπία EPR για να διακρίνουμε τυχόν αλλαγές στην ηλεκτρονιακή ροή. Τέλος, απομονώθηκαν χλωροπλάστες και θυλακοειδής μεμβράνες ώστε να μελετηθεί η πρωτεϊνική τους σύσταση και να εντοπιστούν διαφορές.

Δευτερεύον κομμάτι της εργασίας αποτέλεσε η προσπάθεια κατασκευής ενός συστήματος βασισμένο σε πρωτεΐνες που θα έχει την ικανότητα να παράγει υδρογόνο φωτοσυνθετικά. Η δημιουργία ενός αποδοτικού και σταθερού συστήματος θα έλυνε τα προβλήματα χρήσης των κυττάρων. Το σύστημα που στοχεύουμε να αναπτύξουμε θέλουμε να χρησιμοποιεί το νερό ως δότη ηλεκτρονίων και για το λόγο αυτό θα χρησιμοποιηθεί ολόκληρο το σύστημα φωτοσύνθεσης, δηλαδή τις θυλακοειδής μεμβράνες. Το μέρος της παραγωγής H_2 είναι βασισμένο στις υδρογενάσες Ni-Fe του βακτηρίου *Ralstonia raucula*, οι οποίες έχουν την δυνατότητα της αναστρέψιμης παρεμπόδισης από το O_2 . Τα πειράματα που θα πραγματοποιηθούν περιλαμβάνουν την απομόνωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων, το συνδυασμό τους και την εξέταση των συνθηκών της παραγωγής H_2 .

ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα διάφορα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Merck, Serva, Sigma, ενώ τα απορρυπαντικά ήταν Sigma και Bio-Rad. Η ποιότητα των αντιδραστηρίων ήταν analytical grade. Το νερό για τα θρεπτικά και τα διαλύματα απομόνωσης ήταν απιονισμένο με στήλη ιονοανταλλακτικών ρητίνων. Για την ηλεκτροφόρηση και τη διαδικασία της θρυψινοποίησης χρησιμοποιήθηκε νερό καθαρότητας nanopure. Τα διαγράμματα και η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα Origin 6.0.

Συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii*

Κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό TAP (Tris-acetate-phosphate), υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 25°C, κάτω από λευκές λάμπες φθορισμού (ένταση φωτισμού 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Harris [3]. Όταν χρειαζόταν καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό γινόταν προσθήκη 1,5 % agar [70].

Θρεπτικό μέσο TAP	V_F=1L	Stock Solutions	
1M Tris base pH=7,0	20ml	Solution A	V_F=500ml
Hutner's Trace Metals	1ml	NH ₄ Cl	20,0g
Solution A	10ml	MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0g
Acetic acid	1ml	*MgCl ₂ .6H ₂ O	4,1g
		CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5g
		Phosphate Buffer	V_F=100ml
		K ₂ HPO ₄	10,44g
		KH ₂ PO ₄	5,4g
		Hutner's Trace Metals	V_F=100ml
		BO ₃ H ₃	1,14g
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,20g
		*ZnCl ₂	1,0g
		MnCl ₂ .4H ₂ O	0,506g
		FeSO ₄ .7H ₂ O	0,499g
		*FeCl ₂ .4H ₂ O	0,36g
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,161g
		Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ .H ₂ O	0,11g
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0,157g
		*CuCl ₂ .2H ₂ O	0,1g
		EDTA	5gr

*Αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιούνται στη θέση των αντίστοιχων θειικών αλάτων για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου έλλειψης θείου (TAP-S)

Τα στελέχη *Chlamydomonas reinhardtii* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- **CC-125:** άγριος τύπος
- **CC-S264K:** μετάλλαξη στη θέση 264 της πρωτεΐνης D1 όπου η σερίνη (S) έχει αλλάξει με μια λυσίνη (K) → παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην ατραζίνη (δημιουργήθηκε και μας δόθηκε από τον καθηγητή Johanningmeier, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Institute of Plant Physiology, Germany)
- **CC-4170:** μειωμένο LHC (μας τα παρείχε ο καθηγητής A. Melis, Department of Plant and Microbial Biology, Berkeley University of California)
- **CC-4476:** ατελείς LHC, λιγότερη Chl/cell, αυξημένη αναλογία Chla/Chlb (από τον καθηγητή A. Melis)

Μεταφορά των κυττάρων σε στέρηση θείου (-S)

Η μεταφορά των κυττάρων πραγματοποιείται όταν η καλλιέργεια βρίσκεται στο τέλος της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης ή στην αρχή της στατικής.

Βήματα

1. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 1.000G για 3λεπτά στους 20° C
2. Επαναιωρούνται σε θρεπτικό TAP-S με ήπια ανάδευση και φυγοκεντρώνονται στις ίδιες συνθήκες
3. Το βήμα 2 επαναλαμβάνεται ακόμα 2 φορές ώστε να ξεπλυθούν τα κύτταρα από το προηγούμενο θρεπτικό
4. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε φιάλες οι οποίες σφραγίζονται και απαερώνονται για 1λεπτό με άζωτο (N₂)
5. Στη συνέχεια τοποθετούνται στο φως χωρίς ανάδευση και μετά από 7ημέρες μετράται το παραγόμενο H₂ και συσχετίζεται με την ποσότητα των κυττάρων

**Σε όλη τη διάρκεια εργαζόμαστε σε αποστειρωμένες συνθήκες.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης της χλωροφύλλης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης των θυλακοειδών μεμβρανών έγινε φασματοσκοπικά λαμβάνοντας υπόψη τη μέθοδο του Arnon [71].

Προσδιορισμός συγκέντρωσης της πρωτεΐνης

Η σχετική συγκέντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford [72].

Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Ο αριθμός των κυττάρων της καλλιέργειας προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Neubauer (improved cell counting chamber).

Μέτρηση υδρογόνου (H₂) με αέρια χρωματογραφία GC

Οι μετρήσεις H₂ έγιναν στο εργαστήριο του καθηγητή Κ. Κοτζαμπάση, του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το όργανο είναι της Shimadzu GC 2010 Plus, όπου χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD) και τριχοειδής στήλη Vici Metronics MC (Poulsbo, USA) μήκους 30μέτρων, διαμέτρου 0,53 χιλιοστών, στατικής φάση πάχους 20μm. Για το διαχωρισμό του H₂ με το O₂ χρησιμοποιήθηκε αργό (Ar) ως φέρον αέριο, με πίεση 5bar. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν στους 120°C, του TCD στους 200°C και του injector 180°C. Για την ποσοτικοποίηση του H₂ κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με προσθήκη γνωστών ποσοτήτων.

Μέτρηση έκλυσης οξυγόνου (O₂)

Οι μετρήσεις της έκλυσης οξυγόνου έγιναν με επιλεκτικό ηλεκτρόδιο τύπου Clark. Η ρύθμιση του ηλεκτροδίου έγινε στους 25°C με διάλυμα SMN (25mM MES, 400mM Sucrose, 15mM NaCl, pH 6,0), το οποίο ήταν κορεσμένο σε οξυγόνο. Η κυψελίδα, που χρησιμοποιήθηκε ήταν γυάλινη με πρόσθετο γυάλινο περίβλημα, που επιτρέπει τη διέλευση H₂O, προκειμένου να διατηρείται η θερμοκρασία στους 25°C. Το φως παραγόταν από 2 λάμπες βολφραμίου ισχύος 250W και εστιαζόταν στο δείγμα, έτσι ώστε να δημιουργούνται συνθήκες φωτοκορεσμού. Το φως πριν φθάσει στην κυψελίδα, διέρχεται πρώτα από μια γυάλινη φιάλη μήκους 5cm, που

περιείχε διάλυμα 0,2%w/v θειϊκού χαλκού (CuSO₄). Το διάλυμα αυτό απορροφώντας τα μεγάλα μήκη κύματος, προστάτευε το δείγμα από γρήγορη θέρμανση. Στη συνέχεια, το φως διερχόταν από ένα κόκκινο πλαστικό φίλτρο, για την απορρόφηση των μικρών μήκων κύματος. Έτσι, το φως, που διερχόταν στην κυψελίδα με το δείγμα, κυμαινόταν σε ένα εύρος μηκών κύματος 600-700nm. Για τις μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου τοποθετούνταν στην κυψελίδα 5ml διαλύματος SMN, 20μg χλωροφύλλης του εξεταζόμενου δείγματος, 10mM CaCl₂ και 300μM DCBQ ως ηλεκτρονιοδέκτης. Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου προσδιορίστηκε με μέτρηση της κλίσης της καμπύλης παραγωγής οξυγόνου, που καταγράφηκε σε καταγραφικό χαρτί και εκφράζεται σε $\mu\text{moles O}_2 (\text{mg Chl})^{-1} \text{ hr}^{-1}$.

Φασματοσκοπία EPR

Οι μετρήσεις EPR πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φωτοσύνθεσης/EPR του Δρ. Βασίλειου Πετρουλέα, το οποίο στεγάζεται στο Τμήμα Επιστήμης Υλικών του ερευνητικού ιδρύματος Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ. Το όργανο είναι της Bruker, μοντέλο ER-200D-SRC συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Επιπλέον είναι εξοπλισμένο με κρυοστάτη Oxford ESR 910, με μετρητή μικροκυματικής συχνότητας Anritsu MF76A και με μαγνητόμετρο Bruker 035M NMR gaussmeter. Τα φάσματα προκύπτουν από το μέσο όρο δύο μερήσεων, χρησιμοποιώντας EPR tubes 4 mm. Οι εμπλουτισμένες σε PSII μεμβράνες ήταν συγκέντρωσης 3mg Chl ml⁻¹ ή 2,75 mg πρωτεΐνης ml⁻¹.

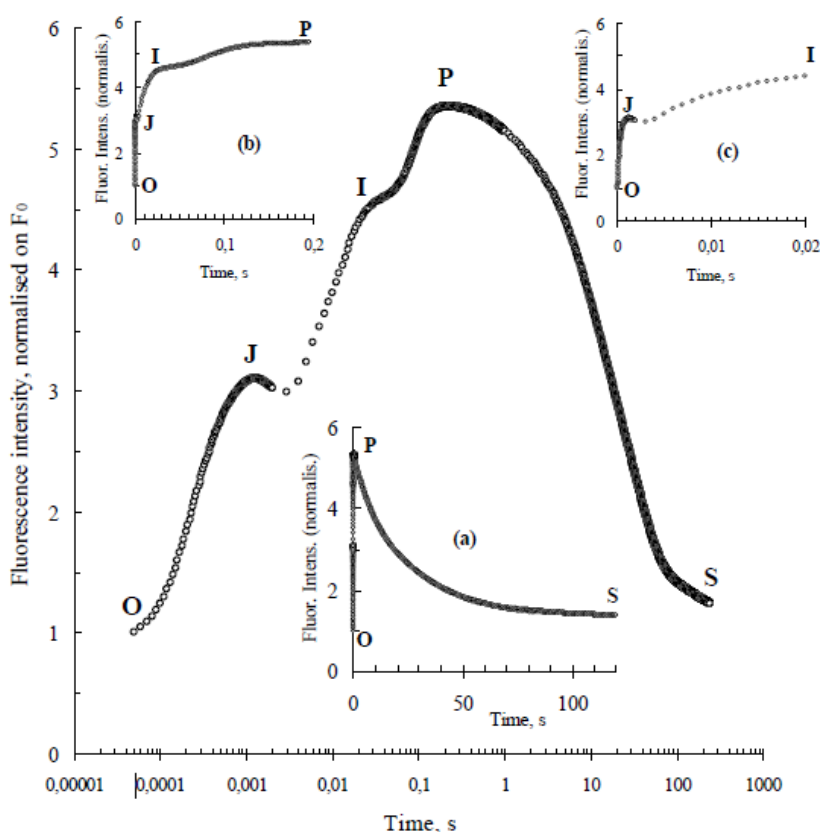
Φασματοσκοπία Φθορισμού (OJIP test)

Ο επαγόμενος φθορισμός της Chla είναι μία ευαίσθητη τεχνική η οποία βοηθάει στην εύρεση τυχόν αλλοιώσεων στη φωτοσυνθετική λειτουργία. Η υφή της καμπύλης είναι χαρακτηριστική και οποιαδήποτε επίδραση στην ηλεκτρονιακή ροή αλλοιώνει το φάσμα. Η παρατήρηση ολόκληρων κυττάρων είναι σημαντική, ειδικά όταν αντικείμενο έρευνας είναι φυτική οργανισμοί, επειδή δεν χρειάζεται να απομονωθεί ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός για να μελετηθεί και μπορεί να γίνει χωρίς να απομακρυνθεί ο οργανισμός από το περιβάλλον που αναπτύσσεται.

Ο φθορισμός μετρήθηκε με το όργανο της Hansatech Instruments, Handy-PEA. Η πηγή laser είναι στα 650nm διεγείροντας από 3 διόδους φωτισμού (LED) με συνολική ένταση 3.000μmol m⁻² s⁻¹ και μετρήθηκε συνολικά ο επαγόμενος φθορισμός της Chla για 1δευτερόλεπτο με ανάλυση 10μsec, ώστε να προκύψει το διάγραμμα που φαίνεται στην εικόνα. Οι μεταβολές στην κλίση του φθορισμού σχετίζονται με την αλλαγή κατάστασης του

ενεργού κέντρου του PSII (ανοικτή ή κλειστή) άρα και με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το νερό προς την PQ_B . Συγκεκριμένα, όταν το δείγμα είναι στο σκοτάδι, τότε τα περισσότερα ενεργά κέντρα του PSII είναι στην ανοικτή κατάσταση όπου η PQ_A είναι πλήρως οξειδωμένη. Όταν φωτιστεί το δείγμα, ξεκινά η ηλεκτρονιακή ροή και παρατηρείται αύξηση του φθορισμού η οποία προέρχεται από την περίσσεια ενέργειας του ενεργού κέντρου και είναι αναλογική της αναγωγής της PQ_A . Επομένως λειτουργεί ως ένδειξη της αναγωγής της PQ pool. Ο μέγιστος φθορισμός (κατάσταση P ή F_M) επιτυγχάνεται όταν η PQ pool αναχθεί πλήρως. Αυτό το στάδιο επηρεάζεται και από την ηλεκτρονιακή ροή προς το PSI.

Για να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι για 10λεπτά και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μέτρηση. Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν μέσω του προγράμματος Biolyzer HP 4.0.



Ηλεκτροφόρηση

Στην εργασία χρησιμοποιήθηκε η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε μία και δύο διαστάσεις (SDS-PAGE 1D, 2D). Για την παρασκευή των gels χρησιμοποιήθηκε gel ουρίας [73].

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρισης σε πρώτη διάσταση (hr CNE), για την οποία ακολουθείται το πρωτόκολλο των Wittig, Karas και Schagger [74].

Η χρώση με την οποία εμφανίστηκαν οι πρωτεΐνες είναι η Blue Silver, η οποία έχει μεγάλη ευαισθησία [75] και είναι συμβατή με την διαδικασία ταυτοποίησης πεπτιδίων με φασματομετρία MALDI.

Ταυτοποίηση πεπτιδίων

Προετοιμασία δειγμάτων

Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται στο πρωτόκολλο των Shevchenko et al. [76]. Στόχος της διαδικασίας είναι η αποτελεσματική θρυψινοποίηση πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται σε αποδιατακτικό gel, ώστε να ταυτοποιηθεί η αλληλουχία πεπτιδίων με φασματοσκοπία μάζας.

Βήματα

1. Οι μπάντες προς ταυτοποίηση κόβονται με νυστέρι, αφαιρούνται από το gel και κόβονται περαιτέρω σε μικρούς κύβους.
2. Τοποθετούνται σε αποστειρωμένα erpendorf
3. Καλύπτονται με διάλυμα αποχρωματισμού και αναδεύονται για 15λεπτά
4. Αφαιρείται το διάλυμα, τα κομμάτια καλύπτονται με διάλυμα ABS και αναδεύονται για 15λεπτά
5. Το διάλυμα αφαιρείται και το βήμα 3 και 4 επαναλαμβάνεται ακόμα 2 φορές (αν κάποιο δείγμα δεν έχει αποχρωματιστεί, τότε συνεχίζεται ξανά ο ίδιος κύκλος)
6. Προστίθεται 100% Acetonitrile και τα δείγματα αναδεύονται για 15λεπτά (παρατηρούνται λευκά κομμάτια, συρρικνωμένα)
7. Αφαιρείται το διάλυμα και αφήνεται σε ροή αέρα προς ξήρανση
8. Τα κομμάτια καλύπτονται με διάλυμα 10mM DTT και αναδεύονται για 45λεπτά στους 56°C, ώστε να αναθούν πλήρως οι πρωτεΐνες και να αποδιατακτούν
9. Αφαιρείται το διάλυμα και επαναλαμβάνονται τα βήματα 3, 4, 6 και 7

10. Προστίθεται διάλυμα 55mM IAA και αναδεύεται για 45λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να πραγματοποιηθεί αλκυλίωση των πρωτεϊνών
11. Αφαιρείται το διάλυμα και επαναλαμβάνονται τα βήματα 3,4,5,6 και 7
12. Στα κομμάτια προστίθεται διάλυμα θρυψίνης (125ng/δείγμα) και αφήνεται όλο το βράδυ στους 37°C (αν δεν έχουν καλυφθεί προστίθεται λίγο ακόμα διάλυμα θρυψίνης ή διάλυμα ABS)
13. Μεταφέρεται το διάλυμα σε νέο, αποστειρωμένο erpendorf
14. Τα κομμάτια καλύπτονται με διάλυμα 0,1%TFA σε διάλυμα αποχρωματισμού και αναδεύονται για 30λεπτά
15. Το διάλυμα μεταφέρεται στο νέο erpendorf του βήματος 13
16. Προστίθεται 100% στα κομμάτια και αναδεύονται για 30λεπτά
17. Το διάλυμα μεταφέρεται στο νέο erpendorf του βήματος 13
18. Τα δείγματα στα καινούργια erpendorf παγώνονται με υγρό άζωτο
19. Χρησιμοποιείται το Speed Vac για να εξατμιστεί ο παγωμένος διαλύτης και να παραμείνουν μόνο τα πεπτίδια στη μορφή σκόνης
20. Στα πεπτίδια προστίθεται διάλυμα μήτρας και τοποθετούνται στον ειδικό στόχο για να ταυτοποιηθούν μέσω φασματομετρίας μάζας MALDI

Διαλύματα

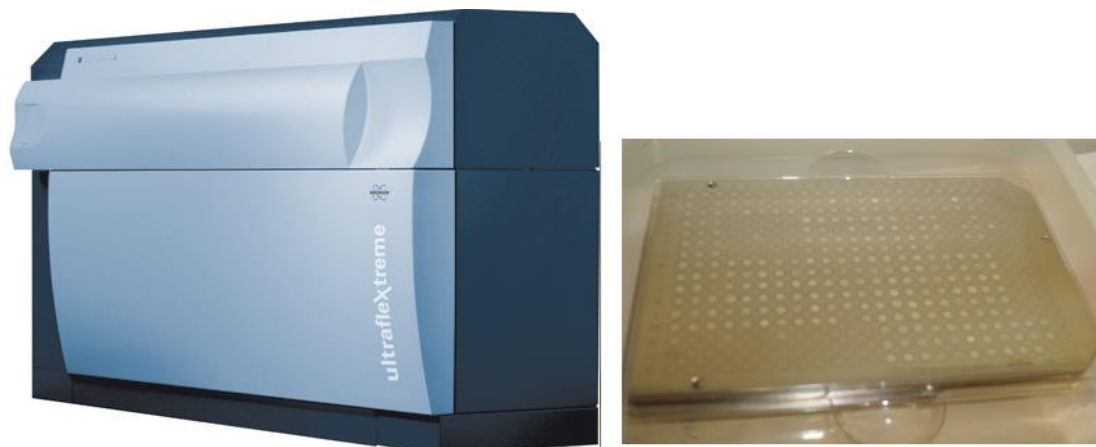
- Διάλυμα αποχρωματισμού: 50% Acetonitrile
- Διάλυμα ABS: 50mM Ammonium bicarbonate (φιλτραρισμένο)
- Διάλυμα DTT: 10mM Dithiothreitol σε διάλυμα ABS
- Διάλυμα IAA: 55mM Iodoacetamide σε διάλυμα ABS

**Όλα τα διαλύματα θα πρέπει να είναι φρέσκα και να έχει χρησιμοποιηθεί νερό καθαρότητας nanopure. Επίσης, η διαδικασία έγινε σε αποστειρωμένο περιβάλλον (laminar flow)

Φασματομετρία MALDI TOF/TOF

Ο φασματογράφος μάζας είναι της εταιρίας Bruker Daltonics (Εικόνα 19). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της αργής εξαγωγής

(delayed extraction) και με τη χρήση του ανακλαστήρα. Το laser smartbeam II είναι συχνότητας 200Hz. Για τα φάσματα MS χρησιμοποιήθηκε τάση επιτάχυνσης 20,15kV για την Πηγή Ιοντισμού_1 και 18,10kV για την Πηγή Ιοντισμού_2, 90ns καθυστέρηση και πύλη χαμηλού μοριακού βάρους 600kDa. Αντίστοιχα, για τα φάσματα MS/MS (LIFT) χρησιμοποιήθηκε τάση επιτάχυνσης 19,06kV για την Πηγή Ιοντισμού_1 και 3,80kV για την Πηγή Ιοντισμού_2. Ο ανακλαστήρας τέθηκε στην κατάσταση ανάλυσης θετικών ιόντων με κλάσμα τάσης 2,3 και ελήφθησαν φάσματα με εύρος μαζών από 700-3900 kDa.



Εικόνα 19. Ο φασματογράφος μάζας Ultraflextreme (Bruker Daltonics) και ο μεταλλικός στόχος πάνω στον οποίο τοποθετούνται τα δείγματα.

Τα φάσματα που ελήφθησαν βαθμονομήθηκαν εξωτερικά με το μίγμα εννέα πεπτιδίων Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik GmbH), όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.2, καθώς επίσης έγινε και εσωτερική βαθμονόμηση με δύο πεπτίδια (Bradykinin Fragment 1-7: 756,3997 Da και ACTH Fragment 18-39: 2454,1989 Da, Sigma) χρησιμοποιώντας το λογισμικό flexcontrol 3.3 (Bruker Daltonics). Για κάθε τελικό φάσμα μάζας αθροίστηκαν 1000 έως και 2000 επιμέρους φάσματα.. Όλα τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό flexanalysis 3.3 (Bruker Daltonics) για την εξομάλυνσή τους, το φιλτράρισμα του θορύβου και την επιλογή των μόνο-ισοτοπικών κορυφών, ενώ μέσω του λογισμικού BioTools version 3.2 (Sequence editor version) έγινε η αναζήτηση στο Mascot server για τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος Pseudomonas από τη βάση δεδομένων NCBI. Το περιθώριο λάθους ορίστηκε στα 30ppm, ο μέγιστος αριθμός αποτυχημένων πρωτεολύσεων σε 1 και οι πιθανές τροποποιήσεις αμινοξέων ορίστηκαν οι καρβαμιδομεθυλίωση των κυστεϊνών και η οξείδωση των μεθειονινών.

Το σύνολο της διαδικασίας (λήψη και επεξεργασία φασμάτων, αναζήτηση πεπτιδίων) πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο του Αναπληρωτή Καθηγητή Γ. Τσιώτη.

Μέτρηση ενεργότητας Υδρογενάσης

❖ Μέτρηση παραγόμενου υδρογόνου (H₂)

Βήματα

1. Χρησιμοποιούμε φιαλίδια των 2ml, τα οποία σφραγίζονται αεροστεγώς και έχουν septum
2. Σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl pH 6.8, τοποθετούμε το δείγμα πρωτεϊνών μαζί με 5mM Methyl viologen
3. Απαερώνουμε με N₂ για 1λεπτό και σφραγίζουμε το φιαλίδιο κάτω από τη ροή N₂
4. Προσθέτουμε με σύριγγα 25mM Sodium dithionite από προπαρασκευασμένο διάλυμα, το οποίο έχουμε απαερώσει
5. Αφήνουμε 1-2ώρες σε θερμοκρασία 30°C και μετράμε είτε με τον αισθητήρα είτε με GC το παραγόμενο υδρογόνο

Παρατηρήσεις

- Ο τελικός όγκος είναι 1ml
- Αν έχει πραγματοποιηθεί σωστά η απαέρωση, με την προσθήκη του Sodium dithionite το χρώμα του διαλύματος πρέπει να παραμείνει διαυγές
- Το Sodium dithionite λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων στην υδρογενάση, η οποία συνδυάζει τα ηλεκτρόνια με H⁺ από το περιβάλλον ώστε να σχηματίσει H₂

❖ Φασματοφωτομετρική μέτρηση

Βήματα

1. Χρησιμοποιούμε φιαλίδια των 2ml, τα οποία σφραγίζονται αεροστεγώς και έχουν septum
2. Σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl, 5mM Methyl viologen, pH 8.0, τοποθετούμε το δείγμα πρωτεϊνών
3. Απαερώνουμε με N₂ για 1λεπτό και σφραγίζουμε το φιαλίδιο κάτω από τη ροή N₂

4. Προσθέτουμε ποσότητα αέριου H₂ και αφήνουμε 1-2ώρες σε θερμοκρασία 30°C και παρατηρούμε το χρώμα του διαλύματος να γίνεται μπλε στα δείγματα όπου είναι ενεργή η υδρογενάση

Παρατηρήσεις

- Σε αυτή τη διαδικασία η υδρογενάση δρα αντίστροφα, δηλαδή οξειδώνοντας το υδρογόνο και ανάγοντας το Methyl viologen, το οποίο όταν αναχθεί προσφέρει το μπλε χρώμα (απορρόφηση στα 605nm)
- Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται για την εμφάνιση του συμπλόκου της υδρογενάσης σε ηλεκτροφόρηση Clear Native (CN-PAGE)

Μέτρηση υδρογόνου (H₂) πρωτεϊνικού συστήματος

Το πρωτεϊνικό σύστημα που δοκιμάσαμε έχει ως βάση τις θυλακοειδής μεμβράνες από σπανάκι, οι οποίες συνδυάζονται με πρωτεϊνικά σύμπλοκα απομονωμένα από το βακτήριο *Ralstonia raucula*. Επίσης προστίθεται το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης ώστε να υπάρχει η ικανότητα να καταναλωθεί το οξυγόνο που παράγεται. Η διαδικασία για τη μέτρηση παραγωγής H₂ είναι η εξής:

Βήματα

1. Σε φιαλίδια συνολικού όγκου 2ml με βιδωτό πώμα και septum προσθέτουμε θυλακοειδής μεμβράνες από σπανάκι (100μg Chl), 50μg ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης και την ποσότητα πρωτεϊνών βακτηρίου
2. Προσθέτουμε 100mM Glucose και απαερώνουμε για 1λεπτό
3. Σφραγίζουμε το φιαλίδιο κάτω από τη ροή αζώτου
4. Ο τελικός όγκος του μίγματος είναι 1ml ρυθμιστικού διαλύματος SMN (25mM MES, 400mM Sucrose, 15mM NaCl, pH 6,0)
5. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2ώρες πριν μετρηθεί στον αισθητήρα

Πρωτόκολλα πρωτεϊνικών απομονώσεων

Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από σπανάκι

Η διαδικασία απομόνωσης βασίζεται στο πρωτόκολλο των Berthold et al.[77]. Σημειώνεται ότι από την προηγούμενη ημέρα τα φύλλα σπανακιού πλένονται σχολαστικά και τοποθετούνται στο σκοτάδι για να καταναλωθεί το άμυλο διευκολύνοντας έτσι την απομόνωση. Επίσης, χρειάζεται χαμηλή θερμοκρασία για τη διατήρηση των πρωτεϊνών. Τέλος, ακριβώς πριν την απομόνωση, απομακρύνεται ο μίσχος από κάθε φύλλο.

Βήματα

1. Τα φύλλα αλέθονται στο μπλέντερ σε ρυθμιστικό διάλυμα αλέσεως, σε αναλογία 2:1 (ml διαλύματος : gr σπανακιού)
2. Το μίγμα φιλτράρεται από 8πλό φύλλο γάζας ώστε να απομακρυνθούν τα μεγάλα κομμάτια των φύλλων
3. Το διήθημα φυγοκεντρείται στα 700G για 2λεπτά στους 4°C ώστε να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα και τα μεγάλα οργανίδια
4. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στα 7.500G για 20λεπτά στους 4°C
5. Το ίζημα που καταβυθίστηκε διαλυτοποιείται ήπια σε ρυθμιστικό διάλυμα IRB (με χρήση πινέλου) μέχρι να είναι ομογενές όλο το μίγμα
6. Φυγοκεντρείται στα 7.500G για 20λεπτά στους 4°C
7. Το ίζημα διαλυτοποιείται ήπια σε μικρό όγκου ρυθμιστικό διάλυμα IRB (με χρήση πινέλου) μέχρι να είναι ομογενές όλο το μίγμα
8. Η διατήρηση του δείγματος γίνεται στους -80°C

**Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται στο σκοτάδι.

Διαλύματα

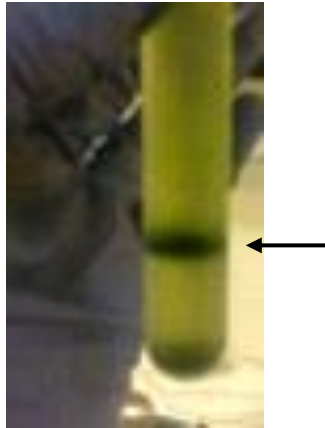
- Ρυθμιστικό διάλυμα αλέσεως: 20mM Tricine, 300mM Sucrose, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0,2% BSA, 1mM PMSF, pH 7,8
- Ρυθμιστικό διάλυμα IRB: 20mM Tricine, 70mM Sucrose, 5mM MgCl₂ pH 7,8

Απομόνωση χλωροπλάστων από τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*

Για να συλλέξουμε αρκετή ποσότητα δείγματος από τα κύτταρα καλλιεργούμε σε μεγάλο όγκο (18L). Η δυσκολία έγκειται στην ύπαρξη ενός μόνο χλωροπλάστη ανά κύτταρο, γεγονός που δεν ισχύει για τα κύτταρα από το σπανάκι.

Βήματα

1. Συλλέγουμε τα κύτταρα με τη χρήση αποβουτυρωτή
2. Τα επαναιωρούμε σε ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer_I) και φυγοκεντρούμε στα 1.000G για 5λεπτά στους 4°C
3. Επαναλαμβάνεται το βήμα 2 ώστε να ξεπλυθούν καλά τα κύτταρα
4. Ζυγίζουμε τα κύτταρα και τα επαναιωρούμε σε ρυθμιστικό διάλυμα αλέσεως (Buffer_II) σε αναλογία 1:2 (gr κυττάρων : ml δ/τος)
5. Προσθέτουμε γυάλινα σφαιρίδια σε αναλογία 1:2 (ml διαλύματος κυττάρων : ml σφαιριδίων) και σπάμε τα κύτταρα επαναλαμβάνοντας το μοτίβο 20'' ανάδευση:40'' παύση συνολικά για 15λεπτά
6. Ξεπλένουμε τα σφαιρίδια με Buffer_II μέχρι να αποχρωματιστούν
7. Φυγοκεντρούμε το διάλυμα στα 3.000G για 20λεπτά στους 4°C, ώστε οι χλωροπλάστες να ιζηματοποιηθούν
8. Το ίζημα επαναιωρείται σε Buffer_II και ομογενοποιείται καλά με τη χρήση πινέλου
9. Το δείγμα διαχωρίζεται με ασυνεχή διαβάθμιση σουκρόζης (1,5M – 1,0M – 0,75M) στα 4.000G για 35λεπτά στους 4°C
10. Συλλέγεται η πράσινη ζώνη μεταξύ των στρωμάτων 1,5M – 1,0M (Εικόνα 20), όπου περιέχονται οι χλωροπλάστες
11. Προστίθεται ίσου όγκου Buffer_II και φυγοκεντρείται στα 8.000G για 5λεπτά στους 4°C
12. Το ίζημα επαναιωρείται σε μικρή ποσότητα Buffer_II και το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C



Εικόνα 20. Διαβάθμιση σουκρόζης. Η μπάνα που σημειώνεται με το βέλος υποδεικνύει τους χλωροπλάστες

Διαλύματα

- Buffer_I: 100mM Tricine, 1mM MgCl₂, 450mM Sucrose, 0,1% BSA, 1mM PMSF, pH 7,6
- Buffer_II: 100mM Tricine, 1mM MgCl₂, 450mM Sucrose, pH 7,6
- Τα διαλύματα των διαβαθμίσεων έχουν τη σύσταση του Buffer_II με μοναδική διαφορά τη σύσταση της σουκρόζης

Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*

Για την απομόνωση ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία.

Βήματα

1. Συλλέγουμε τα κύτταρα με τη χρήση αποβουτυρωτή
2. Τα επαναιωρούμε σε ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer_I) και φυγοκεντρούμε στα 1.000G για 5λεπτά στους 4°C
3. Επαναλαμβάνεται το βήμα 2 ώστε να ξεπλυθούν καλά τα κύτταρα
4. Ζυγίζουμε τα κύτταρα και τα επαναιωρούμε σε ρυθμιστικό διάλυμα αλέσεως (Buffer_II) σε αναλογία 1:2 (gr κυττάρων : ml δ/τος)
5. Προσθέτουμε γυάλινα σφαιρίδια σε αναλογία 1:2 (ml διαλύματος κυττάρων : ml σφαιριδίων) και σπάμε τα κύτταρα επαναλαμβάνοντας το μοτίβο 20''ανάδευση:20''παύση συνολικά για 15λεπτά
6. Ξεπλένουμε τα σφαιρίδια με Buffer_II μέχρι να αποχρωματιστούν

7. Φυγοκεντρούμε το διάλυμα στα 3.000G για 5λεπτά στους 4°C, ώστε να απομακρύνουμε τα άσπαστα κύτταρα και τα μεγάλα οργανίδια
8. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στα 12.000G για 15λεπτά στους 4°C, ώστε να συλλέξουμε τις θυλακοειδής μεμβράνες
9. Το ίζημα επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer_III) και φυγοκεντρείται στα 25.000G για 30λεπτά στους 4°C
10. Οι θυλακοειδής μεμβράνες παραμένουν στο ίζημα και επαναιωρούνται σε μικρό όγκο Buffer_III
11. Η διατήρηση του δείγματος γίνεται στους -80°C

Διαλύματα

- Buffer_I: 70mM Tricine pH 7,5
- Buffer_II: 70mM Tricine, 350mM Sucrose, 5mM MgCl₂, 2,5% Polyvinylpyrrolidone, 0,2% BSA, 1,4% Ascorbic acid, 1mM EDTA, 1mM PMSF, pH 7,5
- Buffer_III: 8mM Tricine, 450mM Sucrose, 1mM MgCl₂, pH 7,5

Απομόνωση εμπλουτισμένων μεμβρανών PSII από κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*

Για την απομόνωση PSII πρώτα συλλέγουμε θυλακοειδής μεμβράνες και ακολουθούμε στη συνέχεια την παρακάτω διαδικασία.

Βήματα

1. Χρησιμοποιούμε Triton x-100 για να διαλυτοποιήσουμε τις θυλακοειδής μεμβράνες. Για τον υπολογισμό των ποσοτήτων ακολουθούμε τους εξής τύπους:

$$V_{\text{final}} = [\text{Chl}]_{\text{total}} / 2$$

$$V_{\text{Triton 25\%}} = [\text{Chl}]_{\text{total}} / 10$$

$$V_{\text{IRB}} = V_{\text{final}} - V_{\text{sample}} - V_{\text{Triton}}, \quad \text{όπου}$$

V_{final} : τελικός όγκος διαλύματος διαλυτοποίησης

$[Chl]_{total}$: τα ολικά mg χλωροφύλλης του προς διαλυτοποίηση δείγματος

$V_{Triton\ 25\%}$: όγκος του διαλύματος Triton που θα χρησιμοποιηθεί

V_{IRB} : ο όγκος του IRB διαλύματος που θα προστεθεί ώστε να επιτευχθεί η σωστή αναλογία δείγματος – απορρυπαντικού

2. Υπολογίζοντας τις αναλογίες, αναμειγνύουμε το IRB στο δείγμα των θυλακοειδών μεμβρανών και στη συνέχεια προσθέτουμε στάγδην το διάλυμα Triton σε ήπια ανάδευση. Αφού προστεθεί όλη η ποσότητα το αφήνουμε για 30λεπτά υπό ανάδευση
3. Φυγοκεντρούμε στα 48.000G για 45λεπτά στους 4°C
4. Διαλυτοποιούμε το ίζημα σε ρυθμιστικό διάλυμα SMN και φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες
5. Διαλυτοποιούμε σε πολύ μικρό όγκο στο διάλυμα SMN και το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα IRB: 20mM Tricine, 70mM Sucrose, 5mM MgCl₂ pH 7,8
- Διάλυμα Triton 25%: 25% v/v Triton X-100 σε διάλυμα IRB
- Ρυθμιστικό διάλυμα SMN: 25mM MES, 400mM Sucrose, 15mM NaCl, pH 6,0

Απομόνωση NiFe-Hydrogenase από το βακτήριο *Ralstonia paucula*

Για την απομόνωση από τον συγκεκριμένο οργανισμό δεν υπάρχει γνωστό πρωτόκολλο. Γενικότερα όμως στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για δύο είδη βακτηριακών υδρογενασών, κυτταροπλασματικών (Soluble Hydrogenase) ή αγκυροβολημένων στη μεμβράνη (Membrane Bound Hydrogenase). Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ένα γενικό πρωτόκολλο ώστε να εντοπιστεί το ένζυμο.

Βήματα

1. Το βακτήριο καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό LB για 20ώρες, σε θερμοκρασία 33°C χωρίς ανάδευση
2. Τα κύτταρα συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση στα 7.000rpm για 15λεπτά στους 4°C
3. Επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα αλέσεως σε αναλογία 1:2 (gr κυτάρων : ml διαλύματος)
4. Τα κύτταρα σπάνε στους υπέρηχους (55 amplitude) συνολικά για 20λεπτά, όπου επαναλαμβάνεται το μοτίβο 15'' υπέρηχοι : 45'' παύση
5. Προστίθεται λυσοζύμη 50μg/ml και αφήνεται να δράσει για 20λεπτά
6. Απομακρύνονται τα άσπαστα κύτταρα με φυγοκέντρηση στα 7.000rpm για 15λεπτά στους 4°C
7. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στα 100.000G για 1ώρα στους 4°C, ώστε να διαχωριστούν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες από τις κυτταροπλασματικές
8. Το υπερκείμενο φυλάσσεται και το ίζημα επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα
9. Προστίθεται 1% Triton x-100 και φυγοκεντρείται στα 100.000G για 1ώρα στους 4°C, ώστε να ξεπλυθούν οι μεμβράνες και να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που έχουν μεγάλη συγγένεια με μεμβρανικές ή είναι ελαφρά προσδεμένες στη μεμβράνη.
10. Το υπερκείμενο φυλάσσεται και το ίζημα επαναιωρείται σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος

Διαλύματα

- Θρεπτικό LB: 1% w/v Peptone, 0,5% w/v Yeast extract, 0,5% w/v NaCl, pH ≈ 7,4
- Ρυθμιστικό διάλυμα αλέσεως: 50mM Tris-HCl, 2mM aminocaproic acid, 2mM benzamidine, pH 8,0
- Ρυθμιστικό διάλυμα: 50mM Tris-HCl, pH 8,0

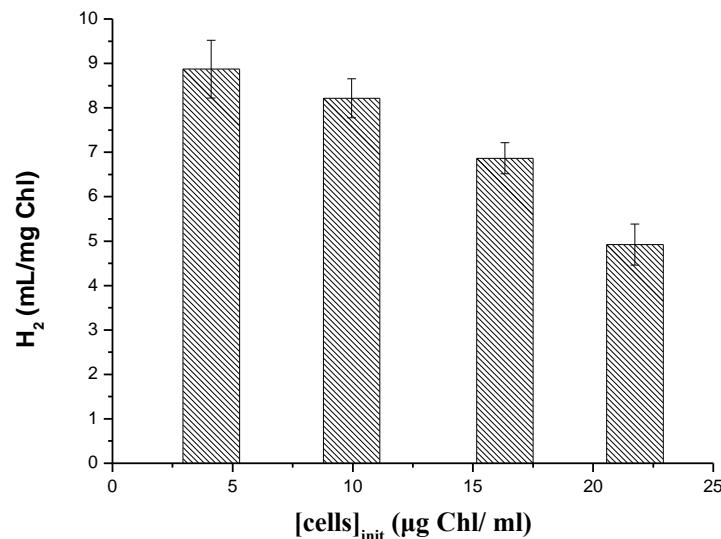
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελέτη παραγωγής υδρογόνου σε καλλιέργειες

Chlamydomonas reinhardtii

Βέλτιστη συγκέντρωση κυττάρων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων σε μία καλλιέργεια είναι το πρώτο σημαντικό βήμα. Το πλήθος των κυττάρων επηρεάζει το ρυθμό κατανάλωσης των θρεπτικών συστατικών, καθώς επίσης και το φως το οποίο φτάνει σε κάθε κύτταρο. Επιλέγοντας τέσσερις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις, παρασκευάστηκαν οι καλλιέργειες στέρησης θείου και μετά από επτά ημέρες μετρήθηκε το H_2 . Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα. Το παραγόμενο H_2 εκφράζεται σε ml ανά mg χλωροφύλλης και η αρχική συγκέντρωση κυττάρων σε μg χλωροφύλλης ανά ml καλλιέργειας.



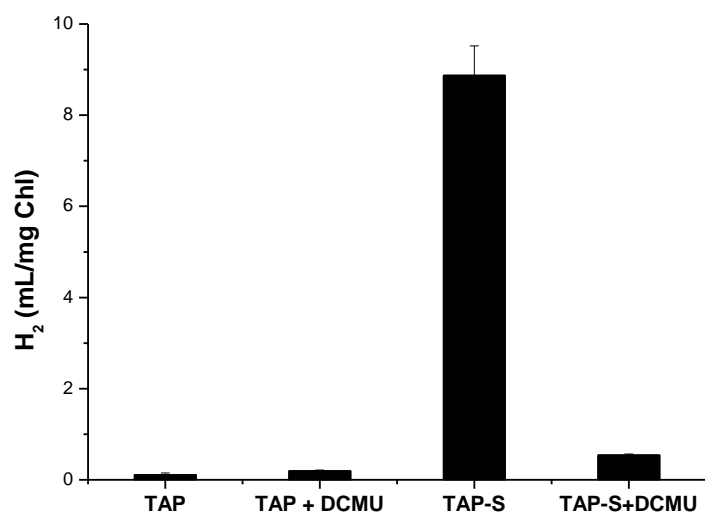
Είναι εμφανές ότι η αυξημένη συγκέντρωση κυττάρων έχει μειωμένη απόδοση H_2 . Σχεδόν χρησιμοποιώντας την πενταπλάσια ποσότητα κυττάρων το υδρογόνο μειώθηκε κατά 45%. Συγκεκριμένα η βέλτιστη απόδοση ήταν με $[\text{Chl}]_{\text{init}} 4,11 \mu\text{g ml}^{-1}$ όπου υπήρξε παραγωγή $8,87 \text{ml } H_2 \text{ mg Chl}^{-1}$, ενώ η παραγωγή H_2 με $[\text{Chl}]_{\text{init}} 21,74 \mu\text{g ml}^{-1}$ ήταν $4,92 \text{ml mg Chl}^{-1}$. Επίσης, λαμβάνοντας υπ' όψιν τις τυπικές αποκλίσεις παρατηρούμε ότι δεν μεταβάλλεται σημαντικά η απόδοση διπλασιάζοντας την

συγκέντρωση, δηλαδή περίπου μέχρι τα 8-10 $\mu\text{g Chl ml}^{-1}$. Έτσι για τα επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος αρχικών συγκεντρώσεων 4 – 8 $\mu\text{g Chl ml}^{-1}$.

Επίδραση DCMU

Η DCMU αποτελεί ένα ισχυρό παρεμποδιστή της φωτοσύνθεσης. Η δράση της εντοπίζεται στο PSII και συγκεκριμένα στο σημείο όπου προσδένεται η PQ_B . Έτσι παρεμποδίζει την μεταφορά ηλεκτρονίων από το PSII προς το PQ pool, και αυτό καθιστά το PSII μη λειτουργικό, εφόσον δεν μπορεί να διοχετεύσει τα ηλεκτρόνια από το νερό.

Ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιήσαμε αυτό το πείραμα ήταν για να διαπιστώσουμε την χρησιμότητα του PSII. Γνωρίζουμε ότι όσο παράγεται O_2 δεν μπορεί να παραχθεί H_2 . Απενεργοποιώντας την έκλυση O_2 (χρήση 20 μM DCMU) θα περιμέναμε να παρατηρήσουμε περισσότερο H_2 , γεγονός που δεν παρατηρήθηκε όπως φαίνεται στο διάγραμμα.



Αντίθετα, η απόδοση ήταν το 6,11% της απλής στέρησης S, δηλαδή μειώθηκε κατά 93,89%. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη βιβλιογραφία. Βέβαια τα συμπεράσματα δεν μπορούν να είναι αποκλειστικά για το PSII επειδή η DCMU μπορεί να επιδρά και σε άλλα σημεία του κυττάρου. Για το λόγο αυτό έχει δοκιμαστεί και η ατραζίνη (από Ανταλ 2009 σελ10) στην ίδια συγκέντρωση, η οποία επιδρά με τον ίδιο τρόπο. Συγκεκριμένα, αυτό που παρατήρησαν είναι ίδια πτώση στο παραγόμενο H_2 , γεγονός που ενισχύει τους ισχυρισμούς ότι το PSII είναι πολύ χρήσιμο για τη διαδικασία.

Επίδραση πηγής άνθρακα

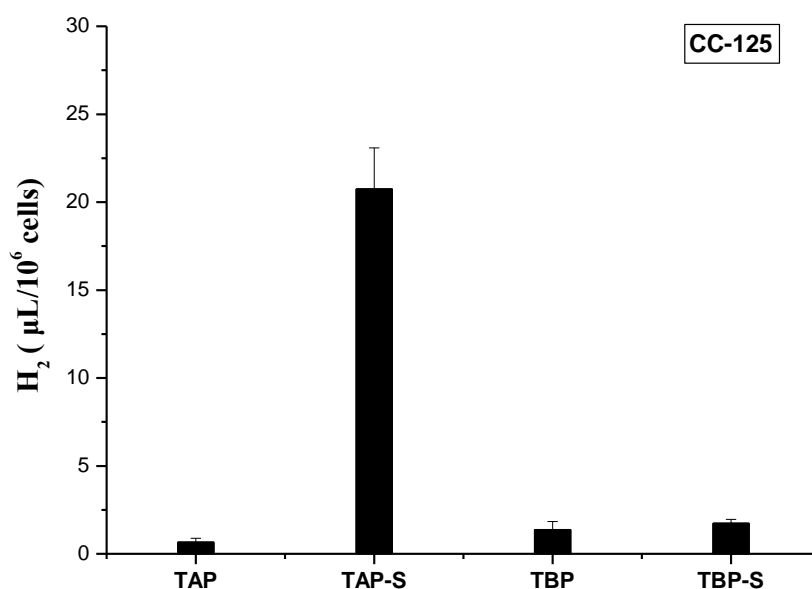
Η πηγή άνθρακα έχει διαπιστωθεί ότι είναι απαραίτητη για να ενισχυθεί το ανεξάρτητο από το PSII μονοπάτι. Ωστόσο, η απουσία της μας δίνει χρήσιμες πληροφορίες εφόσον το κύτταρο δεν μπορεί να συσσωρεύσει μεγάλες ποσότητες ενδογενών υποστρωμάτων τα οποία με τον καταβολισμό θα προσέφεραν ηλεκτρόνια στην PQ pool. Άρα, σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμε το H₂ που προέρχεται περισσότερο από το εξαρτώμενο μονοπάτι. Το θεραπευτικό μέσο καλλιέργειας για κάθε περίπτωση είναι το εξής:

TAP → οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα

TAP-S → οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα/ χωρίς θείο

TBP → ανθρακικό ιόν για περίσσεια CO₂ (25mM sodium bicarbonate)

TBP-S → ανθρακικό ιόν για περίσσεια CO₂/ χωρίς θείο



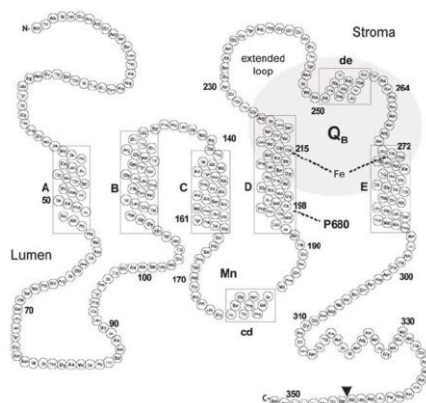
Όπως φαίνεται στο διάγραμμα του άγριου τύπου, στις περιπτώσεις όπου απουσιάζει η εναλλακτική πηγή άνθρακα εμφανίζεται ελάχιστη παραγωγή H₂. Συγκεκριμένα έχει μειωθεί κατά 91,66%. Για την εξαγωγή γενικού συμπεράσματος απαιτείται μεγάλη προσοχή εφόσον το σύστημα δεν είναι απλό. Η παρατήρηση αυτή δεν σημαίνει ότι το PSII συνεισφέρει στη συνολική παραγωγή H₂ μόνο κατά 8,34%, επειδή στην περίπτωση ύπαρξης εναλλακτικής πηγής άνθρακα ίσως ακολουθούνται μονοπάτια τα οποία ενισχύουν και το PSII εξαρτώμενο μονοπάτι εκτός από το ανεξάρτητο.

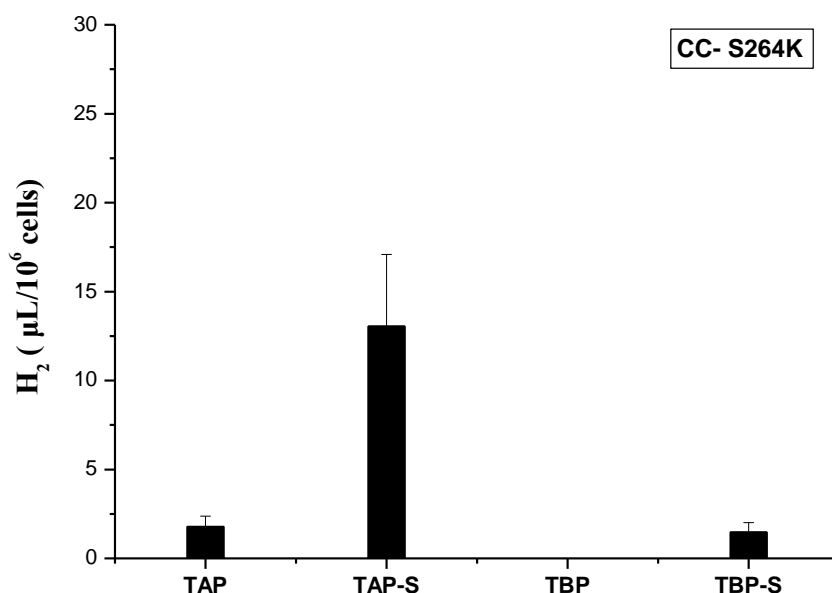
Δοκιμή μεταλλαγμάτων

Με σκοπό τη συλλογή περισσότερων πληροφοριών για το ρόλο του PSII χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα στελέχη, τα οποία έχουν υποστεί τροποποιήσεις στη φωτοσυνθετική διαδικασία. Η χρήση μεταλλάξεων για τη μελέτη ενός συστήματος παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Το βασικότερο είναι η ικανότητα παρατήρησης διαφοροποιήσεων εξαιτίας πολύ συγκεκριμένων αλλαγών. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν τη διαγραφή ή προσθήκη ολόκληρου γονιδίου, τμημάτων του γονιδίου ή ακόμα και στοχευμένη αλλαγή ενός μόνο κωδικονίου η οποία θα επιφέρει αλλαγή σε ένα μόνο αμινοξύ.

Επειδή η μεταλλάξεις που πραγματοποιήθηκαν στα παρακάτω στελέχη έχουν στόχο τη φωτοσυνθετική λειτουργία, η ποσότητα χλωροφύλλης δεν είναι η ίδια σε όλα τα στελέχη. Για να γίνει ικανή η σύγκριση των αποτελεσμάτων η ποσότητα του παραγόμενου H_2 εκφράστηκε ανά αριθμό κυττάρων, ο οποίος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Neubauer.

Το **S264K** εμφανίζει ανθεκτικότητα στην ατραζίνη, ένα μόριο που χρησιμοποιείται ως ζιζανιοκτόνο. Αυτό οφείλεται στην αλλαγή ενός αμινοξέος στο Q_B site, δηλαδή στη θέση πρόσδεσης της PQ_B στο PSII. Ειδικότερα, η σερίνη 264 της υπομονάδας D1 έχει αντικατασταθεί από μία λυσίνη. Οι διαφορές μεταξύ της σερίνης και της λυσίνης εντοπίζονται σε δύο σημεία. Αρχικά, η σερίνη διαθέτει πλευρική ομάδα με ένα άτομο άνθρακα ενώ η λυσίνη διαθέτει μεγαλύτερη πλευρική αλυσίδα με τέσσερα άτομα άνθρακα. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε στερεοχημικές παρεμποδίσεις στην σχηματιζόμενη κοιλότητα της πρωτεΐνης. Επιπλέον, η πλευρική ομάδα της σερίνης διαθέτει υδροξυλομάδα (-OH), δηλαδή ελαφρώς όξινη ομάδα. Αντίθετα, η λυσίνη φέρει αμινομάδα ($-NH_3^+$) δηλαδή βασική ομάδα. Η διαφορά αυτή είναι σημαντική γιατί μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στο φορτίο της περιοχής. Παρόλα αυτά, το μετάλλαγμα εμφανίζει λειτουργική φωτοσυνθετική δράση, αν και παρατηρούνται μικρότερα επίπεδα έκλυσης O_2 (phd thesis) σε σχέση με τον άγριο τύπο.

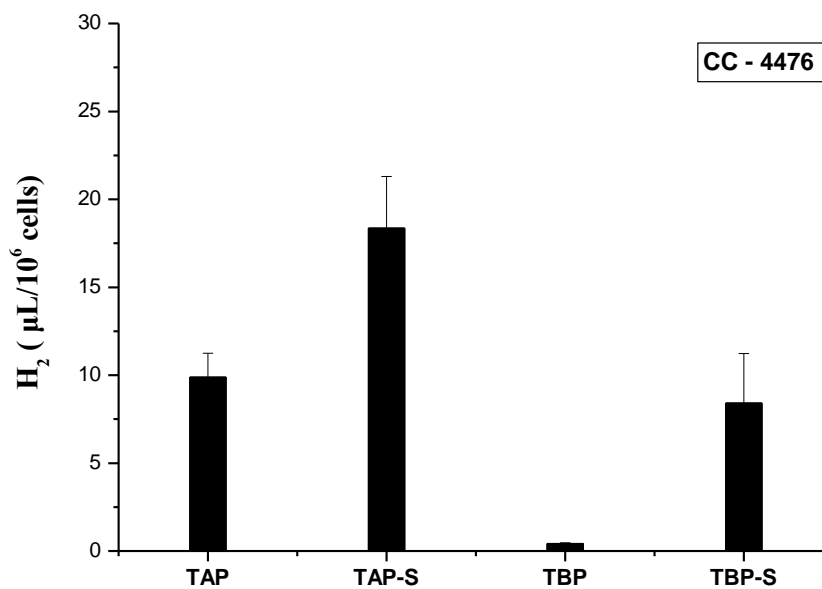
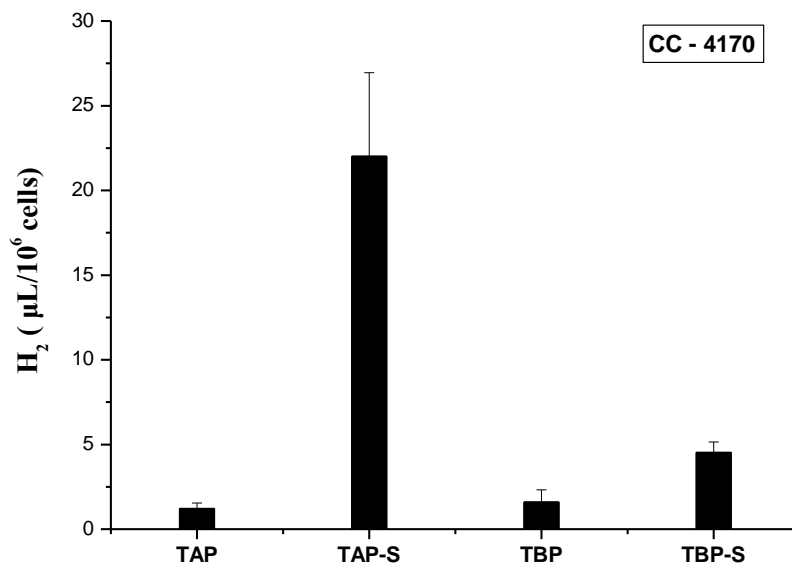




Η παραγωγή του H₂ που παρατηρείται στο θρεπτικό TAP-S είναι μικρότερη σε σχέση με τον άγριο τύπο (CC-125). Σε αυτοτροφικές συνθήκες (TBP-S) εμφανίζει περίπου την ίδια παραγωγή.

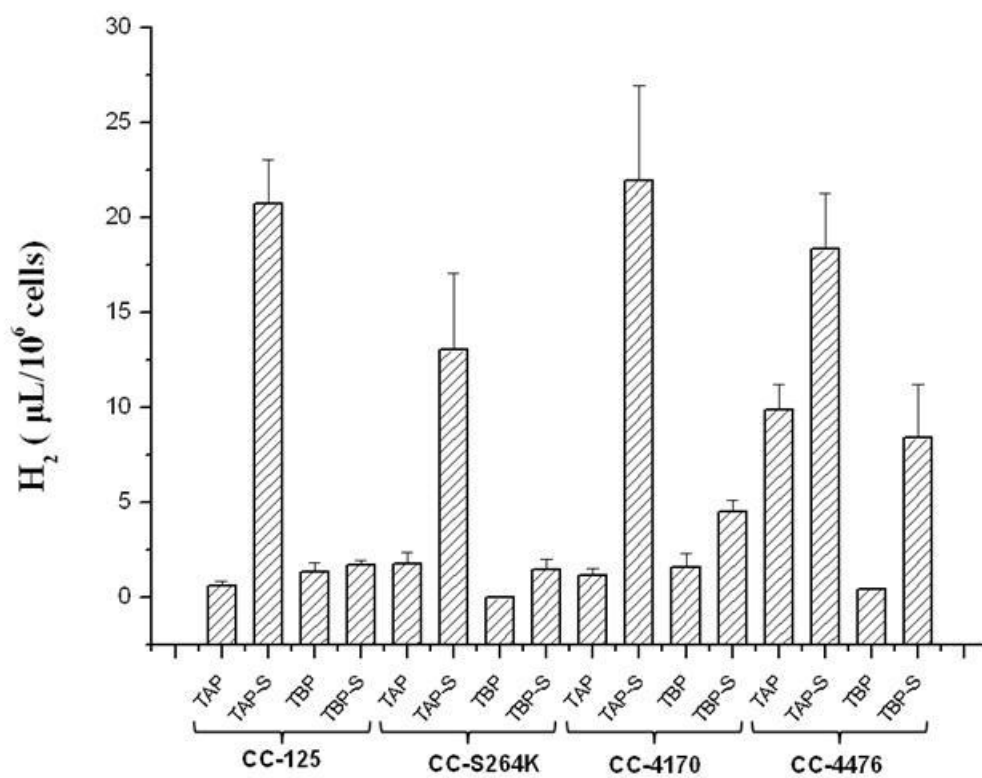
Τα δύο επόμενα μεταλλαγμένα στελέχη έχουν διαφοροποιήσεις στη φωτοσυνθετική κεραία. Ειδικότερα, εκφράζουν ατελή πρωτεϊνική κεραία και αυτό έχει ως συνέπεια την αλλαγή στην ποσότητα της χλωροφύλλης ανά κύτταρο.

Η ιδέα για την αλλαγή της φωτοσυνθετικής κεραίας έχει προταθεί αρκετά χρόνια πριν [78-80]. Ο λόγος ήταν η χαμηλή αποδοτικότητά της. Αναλυτικότερα, τα κύτταρα του άγριου τύπου αναπτύσσουν μεγάλες φωτοσυνθετικές κεραίες συγκριτικά με τα φωτοσυστήματα που διαθέτουν. Η ύπαρξη μεγάλου αριθμού μορίων χλωροφύλλης δίνει την ικανότητα απορρόφησης περισσότερων φωτονίων, ώστε να επιτυγχάνεται η φωτοσύνθεση σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού, γεγονός που δείχνει την μεγάλη αποδοτικότητα της κεραίας. Σε υψηλή ένταση φωτονίων όμως, η αποδοτικότητα ανά χλωροφύλλη μειώνεται δραματικά, επειδή απορροφώνται πολλά περισσότερα φωτόνια από εκείνα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα φωτοσυστήματα. Το ποσοστό των μη εκμεταλλεύσιμων φωτονίων φτάνει μέχρι και το 80%. Η μείωση του συμπλόκου συλλογής φωτός προτάθηκε από τους Radmer και Kok [79], ώστε να δημιουργηθεί ένας οργανισμός που θα μετατρέπει την φωτεινή ενέργεια αποδοτικότερα, το οποίο πραγματοποιήθηκε αργότερα από τον A. Melis.



Τα αποτελέσματα της στέρησης S (TAP-S) είναι όμοια με εκείνα του άγριου τύπου. Βέβαια, οι τιμές του CC-4170 είναι υψηλότερες γεγονός που στηρίζει την αναγκαιότητα του ενεργού PSII. Επίσης, αξιοσημείωτη είναι η παραγωγή H₂ που παρουσιάζεται σε αυτοτροφικές συνθήκες έλλειψης S (TBP-S), η οποία είναι 2,5 φορές μεγαλύτερη στο CC-4170 και σχεδόν 5 φορές μεγαλύτερη στο CC-4476 από τον άγριο τύπο. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η φυσιολογική καλλιέργεια (TAP) του CC-4476, η οποία εμφανίζει παραγωγή H₂ στο 53,8% της στέρησης S του ίδιου στελέχους και 15 φορές περισσότερο H₂ από την αντίστοιχη καλλιέργεια του άγριου τύπου.

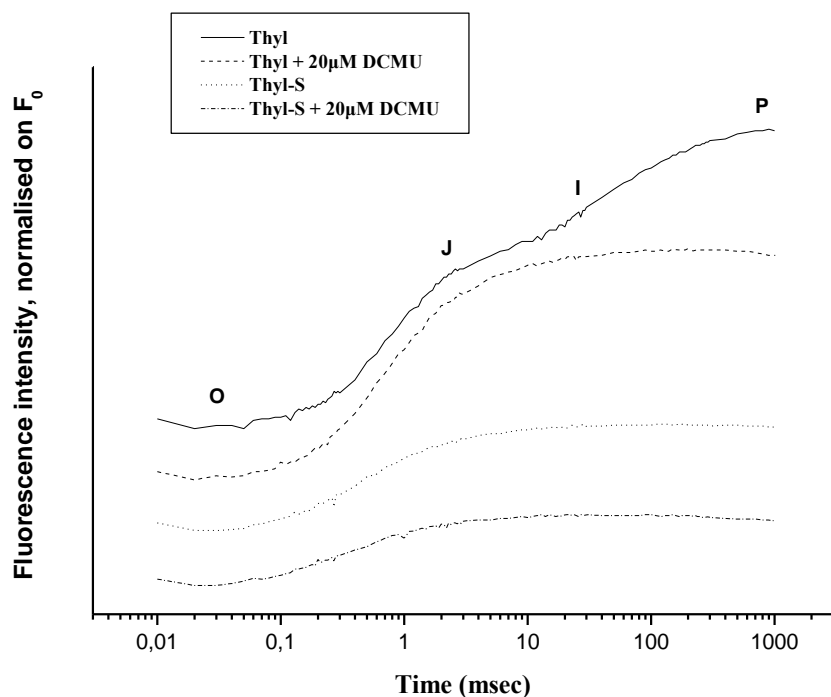
Το παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζει το παραγόμενο H_2 από τις τέσσερις συνθήκες για κάθε στέλεχος.



Μελέτη φωτοσυνθετικού μηχανισμού

Επίδραση της DCMU στον επαγόμενο φθορισμό απομονωμένων θυλακοειδών μεμβρανών

Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήσαμε το φθορισμό είναι για να πάρουμε πληροφορίες για τη λειτουργία του PSII υπό συνθήκες στέρησης. Συγκεκριμένα συγκρίναμε την παρεμπόδιση της DCMU για να διακρίνουμε ομοιότητες ή διαφορές με τις επιδράσεις της στέρησης. Επειδή δεν γνωρίζουμε τις ακριβείς συνέπειες της DCMU στις υπόλοιπες λειτουργίες του κυττάρου, η σύγκριση πραγματοποιήθηκε σε απομονωμένες θυλακοειδής μεμβράνες. Στα δείγματα προστέθηκαν 20 μ M DCMU και στη συνέχεια επώαστηκαν για 10λεπτά στο σκοτάδι. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται ο φθορισμός και των τεσσάρων συνθηκών, κανονικοποιημένος ως προς F_0 (ένταση του φθορισμού στα 50 μ sec).



Οι θυλακοειδής μεμβράνες από τη φυσιολογική καλλιέργεια παρουσιάζονται με το μαύρο χρώμα και δεν φαίνεται καμία αλλοίωση στην υφή της καμπύλης. Αντίθετα, όταν το ίδιο δείγμα επώαστηκε με τη DCMU παρατηρείται ότι η καμπύλη αυξάνεται με την ίδια κλίση μέχρι να φτάσει τη μέγιστη τιμή (F_m) σε μικρότερο χρονικό διάστημα (≈ 20 msec). Δηλαδή, παραλείπεται το σημείο I. Πρακτικά, αυτό σημαίνει την παρεμπόδιση της

ηλεκτρονιακής ροής, δηλαδή την απουσία δέκτη στην θέση της PQ_B και την άμεση αναγωγή της θέσης PQ_A . Αντίστοιχη καμπύλη παρουσίασαν οι θυλακοειδής μεμβράνες από τα κύτταρα που είχαν υποστεί στέρηση S τριών ημερών. Επίσης, όταν το ίδιο δείγμα επώαστηκε με DCMU η καμπύλη δεν διαφοροποιήθηκε.

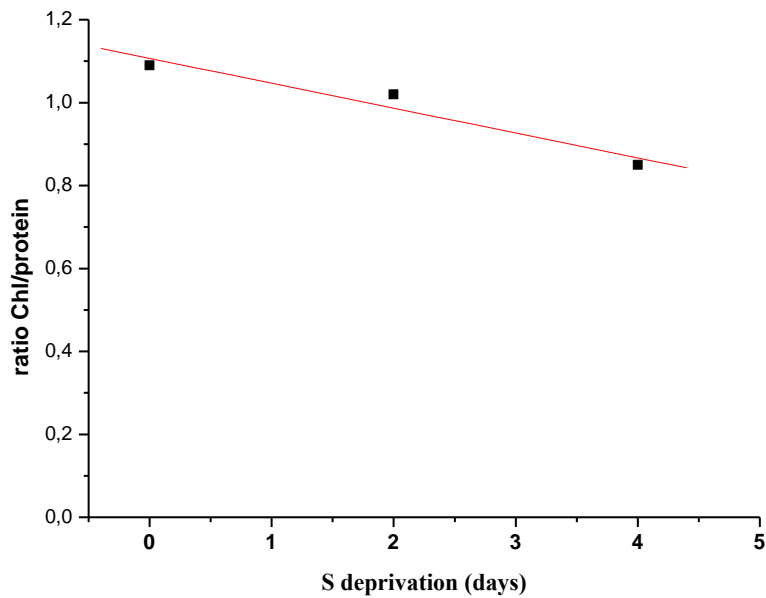
Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα ενεργά κέντρα PSII παρεμποδίζονται λόγω μειωμένης ικανότητας να προωθήσουν τα ηλεκτρόνια προς την PQ_B . Σε περίπτωση που η PQ_A παραμείνει ανηγμένη, τότε η φωτεινή ενέργεια ξοδεύεται με άλλους τρόπους όπως ο φθορισμός ή θερμότητα.

Μετρήσεις ενεργότητας απομονωμένου PSII

Από κύτταρα τα οποία ήταν σε στέρηση S δύο και τεσσάρων ημερών, καθώς και από φυσιολογική καλλιέργεια απομονώθηκαν μεμβράνες εμπλουτισμένες σε PSII με σκοπό την μέτρηση ενεργότητάς του. Σε όλα τα δείγματα ακολουθήσαμε τους ίδιους χειρισμούς κατά τη διάρκεια της απομόνωσης (χαμηλή θερμοκρασία και σκοτεινές συνθήκες) και στο τέλος μετρήθηκε η ικανότητα έκλυσης O_2 με τη χρήση επιλεκτικού ηλεκτροδίου τύπου Clark. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές του παραγόμενου O_2 καθώς και τα ποσοστά ενεργότητας συγκριτικά με το control (TAP).

Δείγμα	O_2 ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$)	O_2 %
Control	218,13 \pm 26,8	100,00
2 days -S	99,57 \pm 22,05	45,65
4 days -S	59,21 \pm 25,13	27,14

Ωστόσο, για περισσότερη ακρίβεια πρέπει να σημειώσουμε ότι παρατηρήσαμε τη διαφοροποίηση του λόγου $\text{Chl}_{\text{total}}:\text{πρωτεΐνη}$ στα διαφορετικά δείγματα. Αυτό έγινε αντιληπτό από τη διαφορά του ιξώδους των δειγμάτων ίδιας συγκέντρωσης $\text{Chl}_{\text{total}}$, το οποίο αυξανόταν ανάλογα με τις ημέρες στέρησης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη λιγότερης Chl ανά PSII ή με διαφορετικό τρόπο έκφρασης την ύπαρξη περισσότερης πρωτεΐνης για την ίδια ποσότητα Chl. Με χρήση της μεθόδου Bradford υπολογίστηκε η σχετική συγκέντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων και συσχετίστηκε με τη Chl. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η αλλαγή του λόγου $\text{Chl}_{\text{total}}:\text{πρωτεΐνη}$ αναλογικά με τις ημέρες στέρησης S.

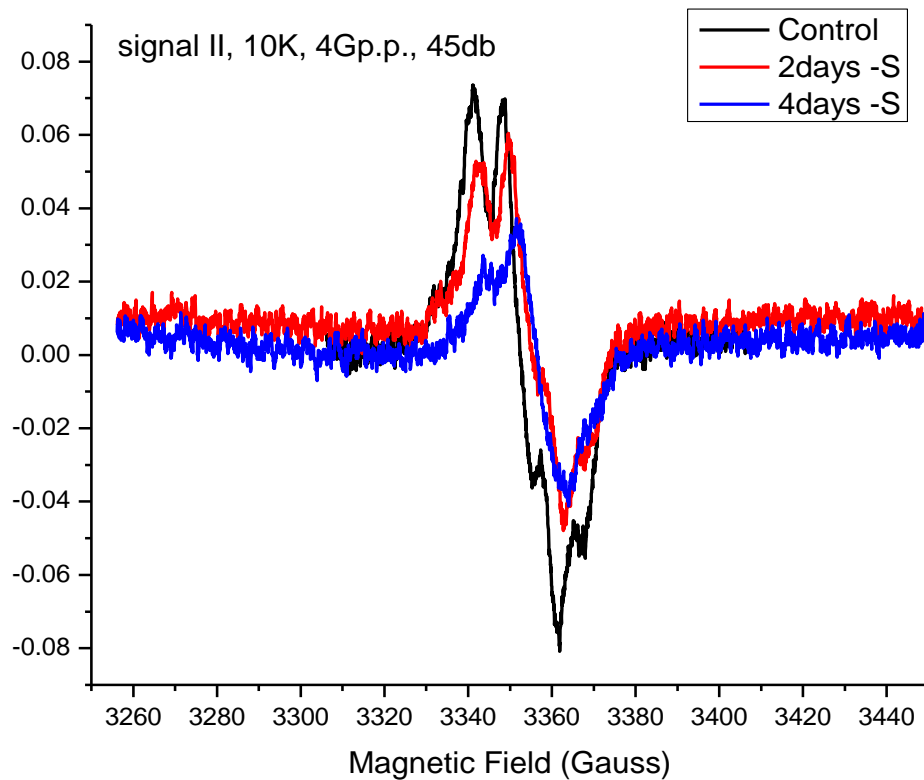


Λόγο αυτού του φαινομένου, οι μετρήσεις του O_2 δεν θα έπρεπε να εκφραστούν ανά Chl αλλά ανά πρωτεΐνη ώστε να γίνει σωστά η ποσοτικοποίηση της απενεργοποίησης. Όμως γνωρίζουμε ότι η ύπαρξη περισσότερης πρωτεΐνης στην κυψελίδα μέτρησης ενεργότητας οδηγεί σε χαμηλότερες ποσοστιαίες τιμές από εκείνες που υπολογίσαμε. Πράγματι, στη βιβλιογραφία αναφέρονται μεγαλύτερα ποσοστά απενεργοποίησης, με την έκλυση O_2 να παραμένει στο 8% της αρχικής μετά από τέσσερις ημέρες στέρησης [46].

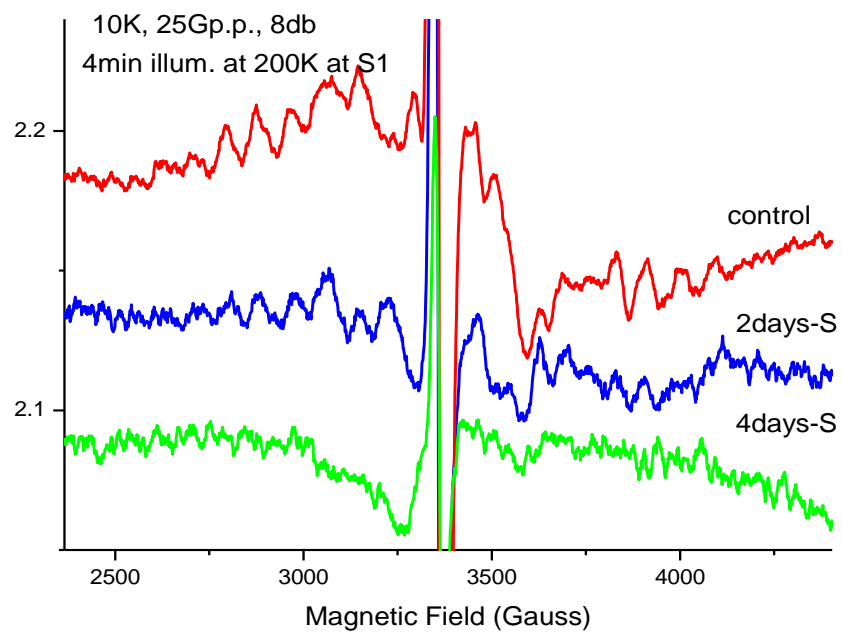
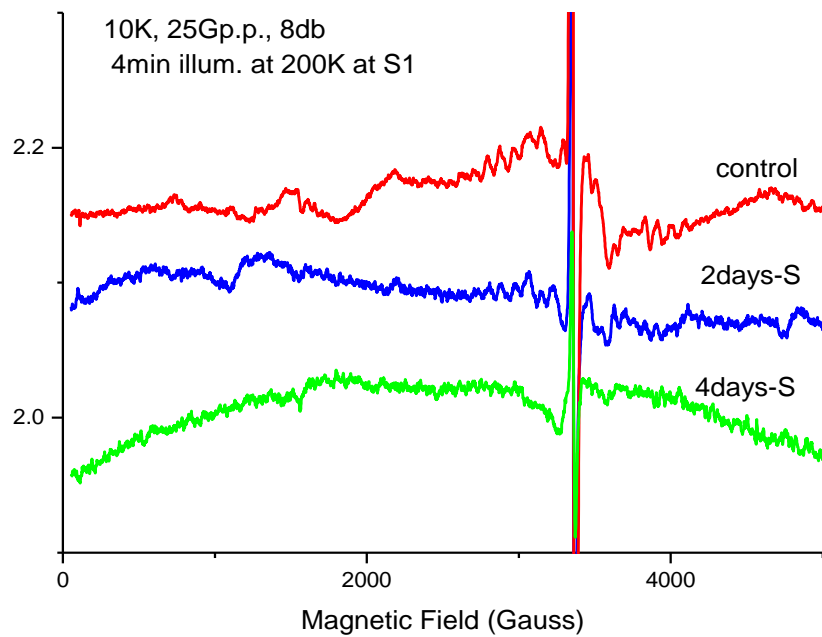
Μελέτη απομονωμένου PSII με φασματοσκοπία EPR

Με τη φασματοσκοπία EPR εντοπίστηκαν βασικές καταστάσεις του μονοπατιού που ακολουθεί το ηλεκτρόνιο και συγκρίθηκαν με του φυσιολογικού, ώστε να προκύψουν στοιχεία για την παρεμπόδιση που υφίσταται.

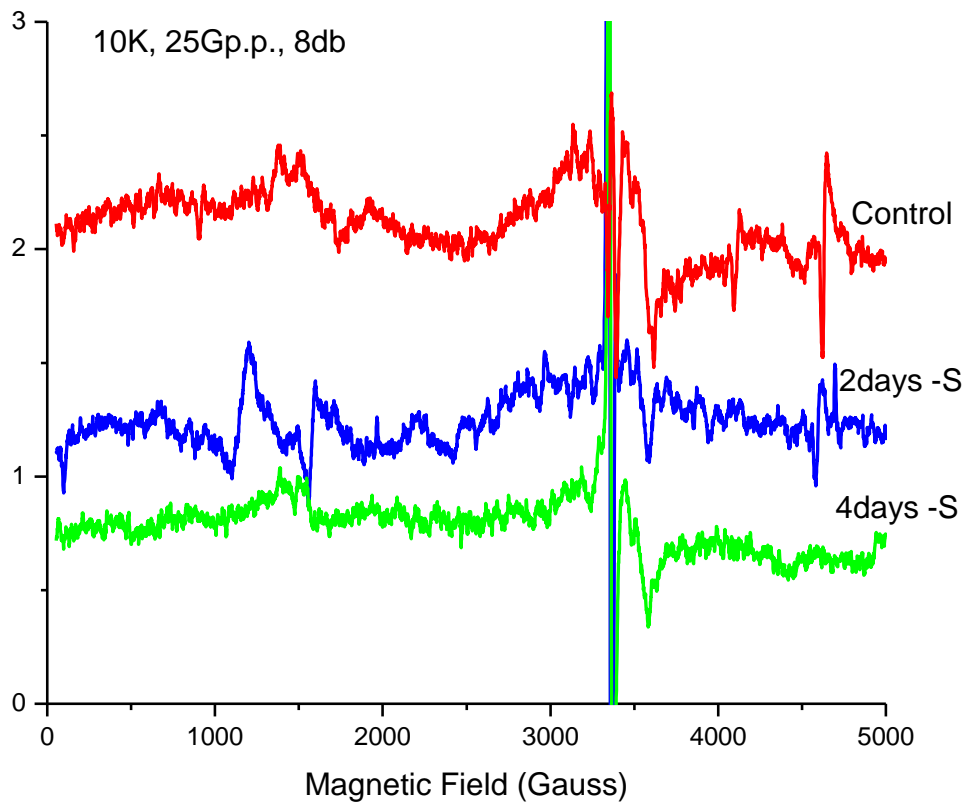
Αρχικά αναγνωρίστηκε το signal II, το οποίο φαίνεται στο control και στο δείγμα που αναπτύχθηκε σε συνθήκες έλλειψης S για 2 ημέρες. Στην περίπτωση του δείγματος 4 ημερών χωρίς S, το signal II φαίνεται να είναι παραμορφωμένο.



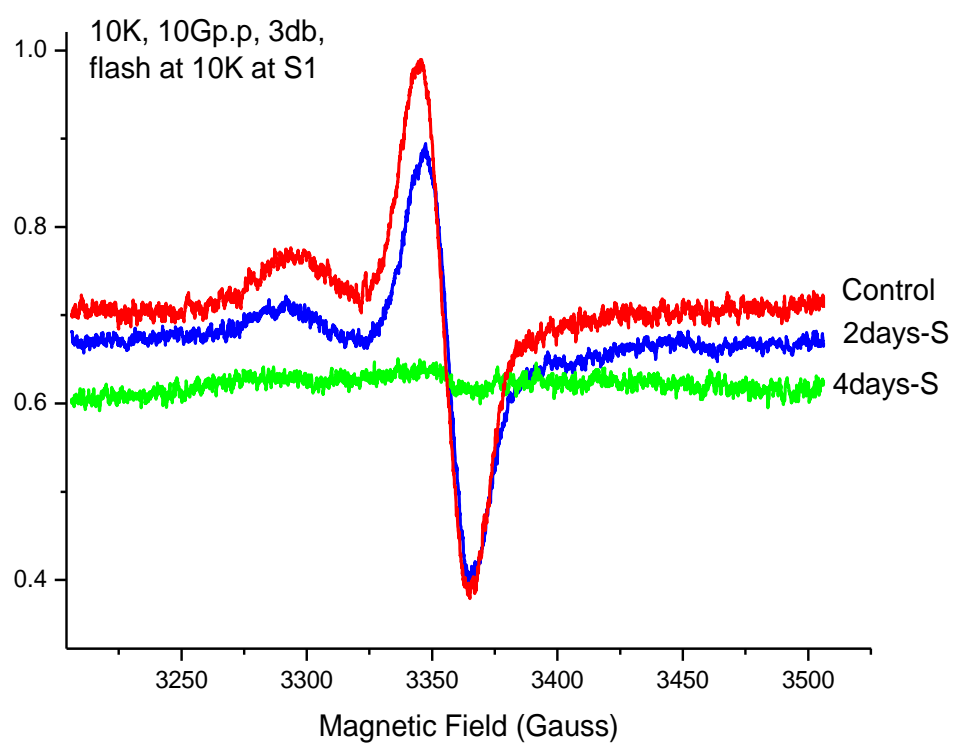
Για την παρατήρηση του σήματος της κατάστασης S2, τα δείγματα φωτίστηκαν στην S1 στους 200K (σε 'μπάνιο' αιθανόλης με ξηρό πάγο) για 4 λεπτά. Η ένταση του πολυγραμμικού σήματος στο control δείγμα είναι μεγαλύτερη από εκείνη στο δείγμα που έμεινε για 2 μέρες χωρίς S, ενώ απουσιάζει στην περίπτωση του δείγματος που έμεινε για 4 μέρες χωρίς θείο (ολόκληρη η περιοχή και κοντά στο $g=2$). Επιπλέον, υπάρχει μία μικρή ένδειξη ύπαρξης του σήματος στο $g=4.1$ στο control δείγμα.



Το σήμα της Q_A^- ανιχνεύθηκε στα 3 δείγματα. Το control φωτίστηκε για 30 min στους 77 K (σε υγρό άζωτο), ενώ τα υπόλοιπα 2 φωτίστηκαν για 4 min στους 200 K. Το σήμα της Q_A^- φαίνεται στο control δείγμα ενώ στα υπόλοιπα δείγματα δεν είναι τόσο ξεκάθαρο.

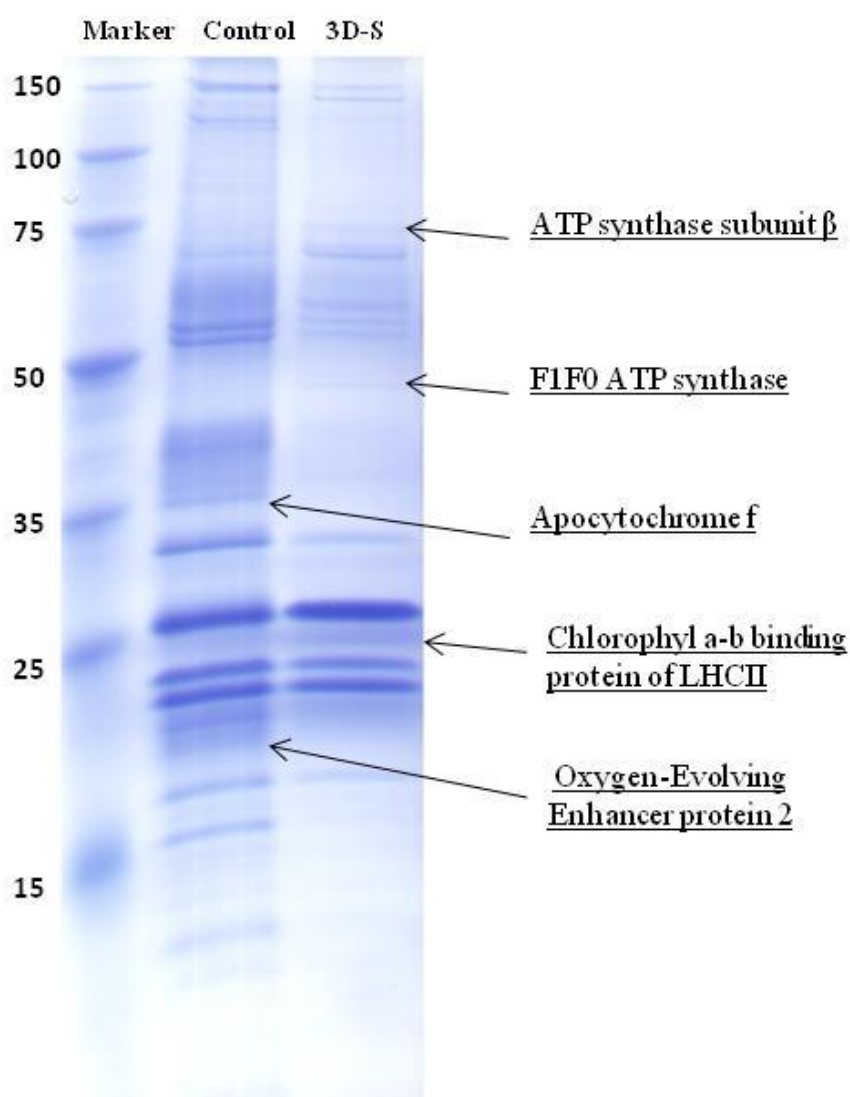


Τέλος, συγκρίθηκε το σήμα της S1 TyrZ^{*} στα 3 δείγματα με ορατό φωτισμό στην S1 στους 10 K (σε υγρό ήλιο). Η ένταση του σήματος της είναι μεγαλύτερη στο control δείγμα από αυτήν στο δείγμα που αναπτύχθηκε χωρίς θείο για 2 μέρες ενώ στο δείγμα που αναπτύχθηκε με έλλειψη θείου για 4 μέρες απουσιάζει το σήμα αυτό. Το σήμα της S1 TyrZ^{*} που δημιουργείται με ορατό φωτισμό στην S1 στους 10 K έχει την ιδιότητα να μειώνεται σταδιακά με τον χρόνο στους 10 K, γεγονός που παρατηρήθηκε και στο control και στο δείγμα σε συνθήκες άνευ θείου για 2 μέρες. Στην περίπτωση του δείγματος που αναπτύχθηκε σε συνθήκες έλλειψης θείου για 4 μέρες διερευνήθηκε η πιθανότητα δημιουργίας του σήματος της S1 TyrZ^{*} με ορατό φωτισμό στους 10 K σε 2 μορφές της κατάστασης S1 (active και resting). Το σήμα απουσιάζει και στις 2 περιπτώσεις.



Διαφορές πρωτεϊνικής σύστασης χλωροπλαστών & θυλακοειδών μεμβρανών

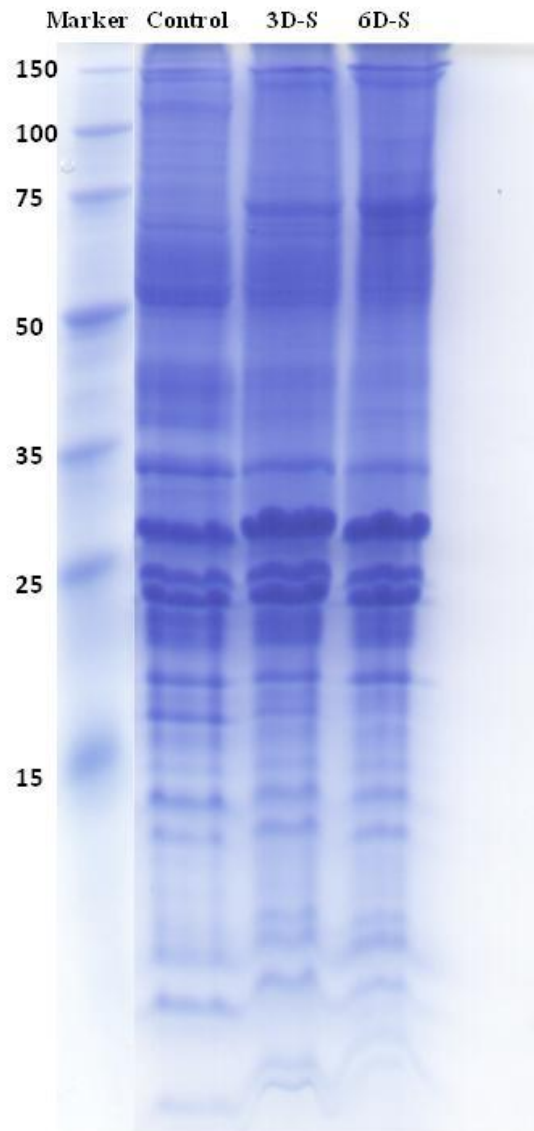
Για να εντοπιστούν διαφορές στην πρωτεϊνική έκφραση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE). Το βασικό αντικείμενο μελέτης ήταν κυρίως στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό αλλά και στη γενική εικόνα της διαδικασίας παραγωγής H_2 . Συνεπώς, σε πρώτο επίπεδο ανιχνεύθηκαν αλλαγές στον χλωροπλάστη του κυττάρου, όπου εντοπίζονται τα κύρια μονοπάτια του μηχανισμού παραγωγής H_2 . Επιλέχθηκε η απομόνωση χλωροπλαστών έπειτα από 3 ημέρες στέρησης, όπου είναι το σημείο στο οποίο το κύτταρο βρίσκεται σε έλλειψη O_2 και έχει ήδη ξεκινήσει η παραγωγή H_2 . Η εικόνα που παρατηρήθηκε είναι η εξής (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. SDS-PAGE σε ολόκληρους χλωροπλάστες υπό φυσιολογικές συνθήκες και στέρηση S

Όπως φαίνεται, υπάρχουν αρκετές διαφορές σε εντάσεις, από τις οποίες ορισμένες ταυτοποιήθηκαν και παρουσιάζονται στην εικόνα.

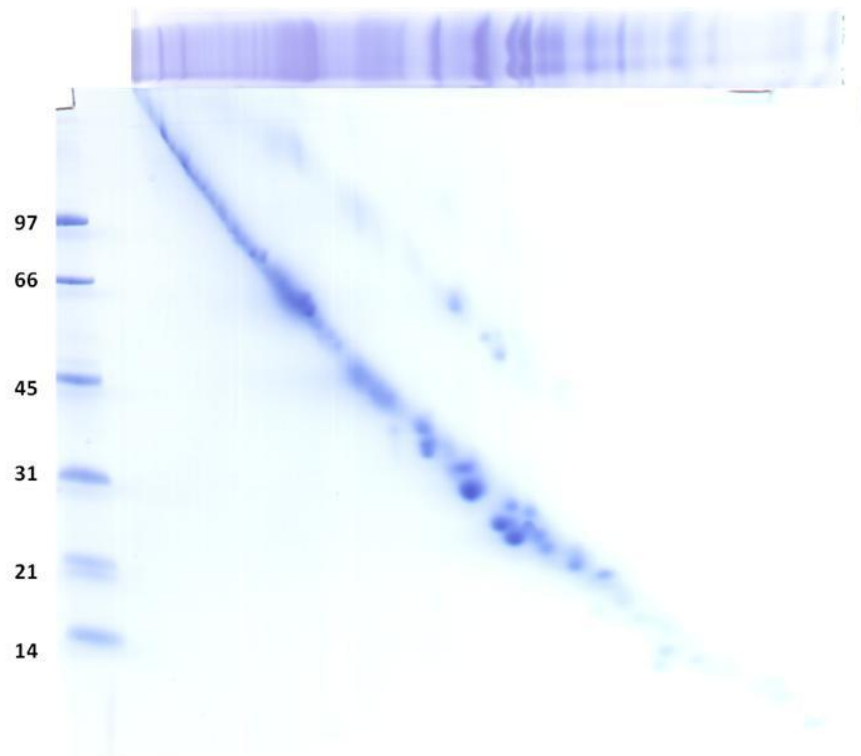
Στη συνέχεια απομονώθηκαν θυλακοειδής μεμβράνες την ίδια χρονική περίοδο στέρησης, δηλαδή 3 ημερών, και επιπλέον 6 ημερών με σκοπό την εντονότερη εμφάνιση των διαφορών. Η εικόνα φαίνεται παρακάτω, στην οποία εμφανίζονται αρκετές διαφορές (Εικόνα 22).



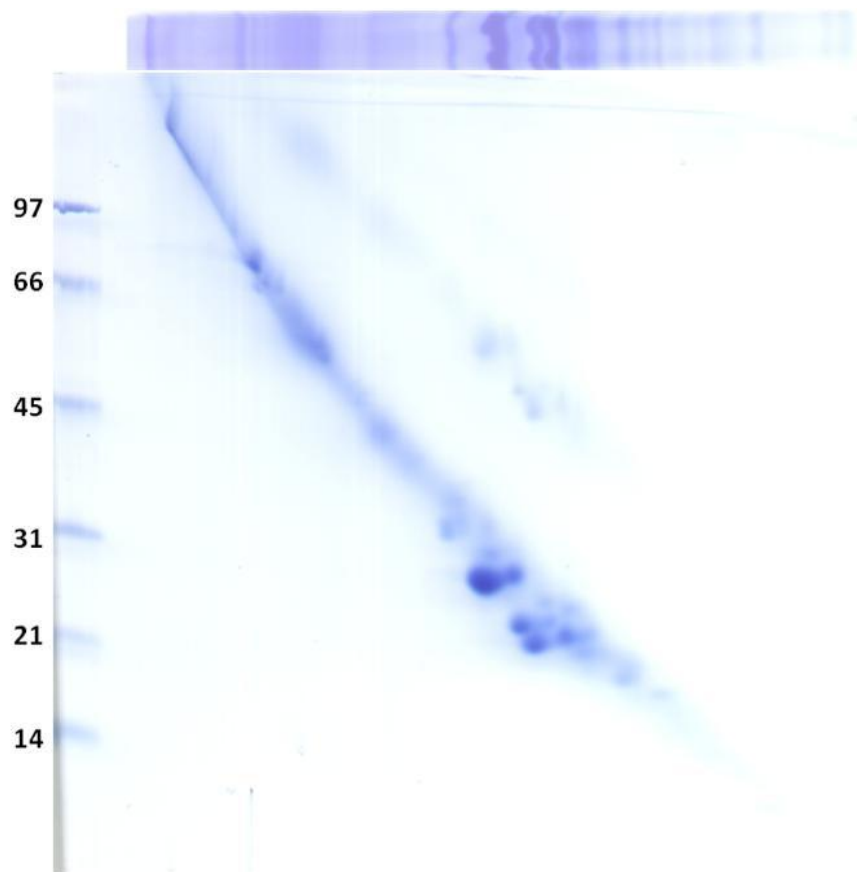
Εικόνα 22. SDS-PAGE σε θυλακοειδής μεμβράνες υπό φυσιολογικές συνθήκες και υπό στέρηση S τριών και έξι ημερών

Για καλύτερη ανάλυση του δείγματος λόγω αρκετής ποσότητας πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δεύτερης διάστασης ώστε να διαχωριστούν καλύτερα οι πρωτεΐνες.

TAP



TAP_3D-S



Βιοσύστημα φωτοπαραγωγής H₂

Στην απομόνωση που πραγματοποιήθηκε συλλέξαμε τέσσερα συνολικά δείγματα, τις συνολικές μεμβράνες, τις συνολικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, τις συνολικές μεμβράνες ύστερα από έκπλυση και το υπερκείμενο της πλύσης. Όλα τα δείγματα εκτός από τις πλυμένες μεμβράνες εμφάνισαν ενεργότητα ακολουθώντας τα πρωτόκολλα που περιγράφονται. Τα βήματα που ακολούθησαν για τον περαιτέρω διαχωρισμό των πρωτεϊνών (χρωματογραφία συγγένειας και μοριακής διήθησης) απενεργοποιούσαν τις υδρογενάσες και έτσι δεν υπήρχε η ικανότητα να παρατηρήσουμε το κλάσμα στο οποίο βρίσκονται. Επίσης, προσπαθήσαμε να εντοπίσουμε τις πρωτεΐνες σε μη αποδιατακτικό gel (CNE), εφαρμόζοντας ειδική χρώση η οποία εμφανίζει μόνο την μάντα της υδρογενάσης εκμεταλλεύοντας την ενεργότητά της. Ούτε αυτή η προσέγγιση έδειξε κάποιο αποτέλεσμα. Πιθανή εξήγηση είναι λόγω του φορτίου της, το οποίο δεν της επιτρέπει να εισχωρήσει στην πηκτή.

Οι προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών απέτυχαν, ωστόσο δοκιμάστηκε το σύστημα συνδυάζοντας τα θυλακοειδή με τα πολύπλοκα πρωτεϊνικά δείγματα του βακτηρίου. Για να ξεπεραστεί η παρεμπόδιση λόγω του παραγόμενου O₂, στο σύστημα προστέθηκε το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης και γλυκόζη. Οι μετρήσεις που έγιναν ήταν ποιοτικές και όχι ποσοτικές, εφόσον δεν υπήρχε τρόπος να γνωρίζουμε την ποσότητα της υδρογενάσης.

Αρχικά εξετάστηκαν οι ολικές μεμβράνες και οι ολικές κυτταροπλασματικές σε φως, όπου μόνο οι κυτταροπλασματικές έδειξαν παραγωγή H₂. Έτσι, στη συνέχεια ασχοληθήκαμε μόνο με αυτό το δείγμα σχεδιάζοντας κάποια “τυφλά” συστήματα, ώστε να πάρουμε πληροφορίες για τον πιθανό μηχανισμό. Τα συστήματα που εξετάστηκαν ήταν τα εξής:

Samples	Total Soluble R. <i>paucula</i> proteins	Spinach Thylakoid membranes	Light	H ₂ production
1	√	X	√	X
2	√	√	X	X
3	X	√	√	X

Από τους παραπάνω συνδυασμούς καταλαβαίνουμε ότι υπάρχει συνεργασία μεταξύ των θυλακοειδών μεμβρανών και των πρωτεϊνών του βακτηρίου. Επίσης φαίνεται ότι η ύπαρξη του φωτός παίζει σημαντικό ρόλο, το οποίο υποστηρίζει τη χρήση του νερού ως δότη ηλεκτρονίων.

Ένα επιπλέον ‘τυφλό’ σύστημα είναι εκείνο απουσία της οξειδάσης της γλυκόζης, το οποίο έδειξε πολύ χαμηλές τιμές παραγωγής H₂. Η παρατήρηση αυτή είναι λογική, αφού ανεξαρτήτως μηχανισμού, το O₂

παρεμποδίζει την υδρογενάση. Ελέγχθηκε και η παρουσία της γλυκόζης, η οποία με την πληθώρα των πρωτεϊνών ίσως συμμετείχε σε άλλα μονοπάτια και οδηγούσε στην εμφάνιση H_2 .

Δοκιμάσαμε ακόμα την προσθήκη DCBQ, η οποία μείωσε αρκετά την παραγωγή H_2 . Το αποτέλεσμα αυτό μας δίνει πληροφορίες για τη συμμετοχή του PSI, η οποία φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας, εφόσον η DCBQ δέχεται τα ηλεκτρόνια από το PSII εμποδίζοντας έτσι την ηλεκτρονιακή ροή προς το PSI.

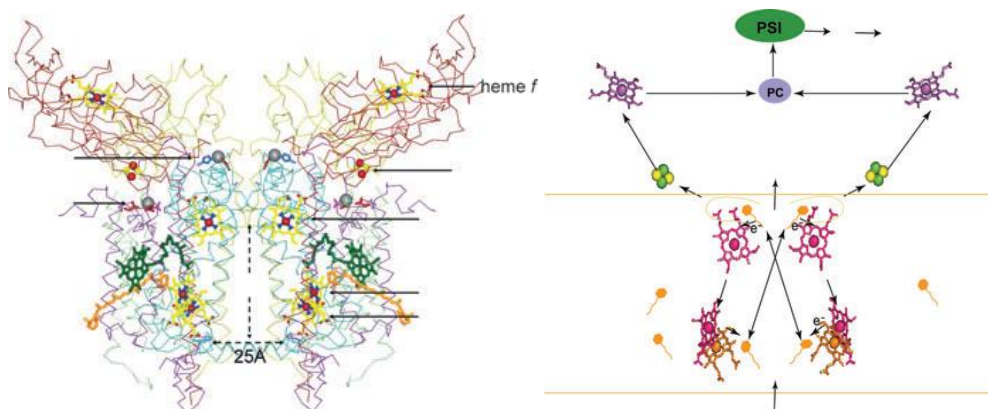
ΣΥΣΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παραγωγή H_2 από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς παρουσιάζει μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση για την παραγωγή ενέργειας. Τα περισσότερα στοιχεία του μηχανισμού έχουν διευκρινιστεί αλλά παραμένουν ορισμένα σημεία που δεν είναι ξεκάθαρα. Τα πειράματα που διεξήχθησαν είχαν στόχο την διαλεύκανση αυτών των σημείων, συγκεκριμένα για το ρόλο του PSII και τον τρόπο ρύθμισής του, καθώς και για το λόγο διεξόδου του κυττάρου προς την παραγωγή H_2 .

Οι διαφοροποιήσεις στις συνθήκες των καλλιεργειών, είτε με προσθήκη DCMU είτε της ύπαρξης πηγής άνθρακα, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το PSII είναι σημαντικό για τη διαδικασία. Επίσης, αυτή η άποψη ενισχύεται και από τα πειράματα των μεταλλαγμένων στελεχών. Συγκεκριμένα από τα στελέχη CC-4170 και 4476 φαίνεται ότι η ενίσχυση της αποδοτικής χρήσης της φωτεινής ενέργειας έχει ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη παραγωγή H_2 . Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραγωγή H_2 από το CC-4476 σε αυτοτροφικές συνθήκες υπό στέρηση S (TBP-S). Ειδικότερα, σε αυτή την κατάσταση πρέπει να προσδιοριστεί ο ρόλος της Rubisco και τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου, ώστε να διευκρινιστεί ο μηχανισμός που συνεισφέρει σε μεγαλύτερο ποσοστό. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η παρατήρηση H_2 σε συνθήκες ανάπτυξης (TAP) του ίδιου στελέχους. Το ενδιαφέρον σε αυτή την περίπτωση εντοπίζεται στην ύπαρξη φυσιολογικών συνθηκών, οι οποίες έχουν προσφέρει ικανοποιητική ποσότητα H_2 , μεγαλύτερη από το 50% της στέρησης. Η παρατήρηση αυτή μας δίνει μία πολύ σημαντική πληροφορία. Η παραγωγή H_2 δεν είναι τυχαίο αποτέλεσμα της έλλειψης του S, εφόσον μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μεγάλα ποσοστά από φυσιολογικές συνθήκες. Αυτό προϋποθέτει ένα ισχυρό λόγο για τον οποίο το κύτταρο ενεργοποιεί αυτό το μονοπάτι.

Η ταυτοποίηση ορισμένων πρωτεϊνικών διαφορών ενισχύει αυτό το συμπέρασμα. Αρχικά, είναι γνωστό ότι η παρουσία της πρωτεΐνης OEE2 (Oxygen Evolving Enhancer protein 2) είναι απαραίτητη για την έκλυση O_2 [81]. Τα μειωμένα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης στην στέρηση S δείχνουν την ανικανότητα παραγωγής O_2 , ανεξάρτητα από την ύπαρξη της D1 υπομονάδας. Επίσης, παρατηρείται η μειωμένη έκφραση του αποκυτοχρώματος f, το οποίο αποτελεί μια βασική πρωτεΐνη του κυτοχρώματος b_6f . Η απουσία της επάγει διαφοροποιήσεις στην δομή του κυτοχρώματος, επομένως και στη λειτουργία του. Αυτό επιδρά με δύο τρόπους στο PSII. Αρχικά, η δυσλειτουργία του σημαίνει μειωμένη εκμετάλλευση των ηλεκτρονίων από την PQ pool, η οποία τροφοδοτείται και από τους δύο μηχανισμούς (εξαρτώμενος και ανεξάρτητος), οδηγώντας έτσι σε δυσκολία της ηλεκτρονιακής ροής και παροδική απενεργοποίηση

του PSII. Δεύτερον, υπάρχουν ενδείξεις για την ενεργοποίηση του LHCIΙ μέσω μιας κινάσης, η οποία εκκινείται από τη σύνδεση της PQ στην κοιλότητα Q_o του κυτοχρώματος [82]. Η απουσία της f υπομονάδας ίσως δημιουργεί επιπτώσεις στη λειτουργία του LHCIΙ και αντίστοιχα στην ενεργότητα του PSII.



Εικόνα 23. Δομή κυτοχρώματος b₆f και ηλεκτρονιακή ροή από τις PQH₂ προς το PSI

Στη συνολική εικόνα παρατηρείται μία τάση ελέγχου της διαδικασίας έκλυσης O₂ καθώς και η πολυπλοκότητα του συστήματος εφόσον όλες οι διεργασίες είναι αλληλένδετες. Η προσπάθεια περισσότερων ταυτοποιήσεων συνεχίζεται ώστε να σχηματιστεί μία γενικότερη εικόνα των πρωτεϊνών στους χλωροπλάστες και στις θυλακοειδής μεμβράνες, υποθέτοντας ότι η παρατήρηση αυτή θα βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών.

Το αποτέλεσμα του επαγόμενου φθορισμού των θυλακοειδών μεμβρανών δείχνει ξεκάθαρα ότι η παρεμπόδιση των ενεργών κέντρων αντίδρασης του PSII είναι όμοια με εκείνη της DCMU. Συγκεκριμένα, φαίνεται η δυσκολία διοχέτευσης των ηλεκτρονίων από το νερό στην PQ pool. Η παρατήρηση αυτή, συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές αναφορές [59, 83] και ενισχύεται από τα προηγούμενα αποτελέσματα, όπου λόγω της δυσλειτουργίας του cyt b₆f, η PQ pool παραμένει υπερ-ανηγμένη.

Από τις μετρήσεις EPR, συμπεραίνεται το φαινόμενο της απενεργοποίησης του PSII. Παρουσιάζει ενδιαφέρον η αλλοίωση στο signal II του δείγματος όπου είχε παραμείνει 4 ημέρες σε έλλειψη S, γεγονός που θα ερευνηθεί περαιτέρω για να διευκρινιστεί η αιτία. Επίσης, στο μέλλον θα εξεταστούν δείγματα από την πρώτη ημέρα στέρησης μέχρι και την Πέμπτη, καθώς και ολόκληρα κύτταρα.

Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στην υπόθεση ύπαρξης ενός μηχανισμού γονιδιακής ρύθμισης, του οποίου η ενεργοποίηση έχει ως κατάληξη την

δημιουργία H_2 . Αυτό που χρειάζεται να εξακριβωθεί, είναι ο προσδιορισμός του τρόπου εκκίνησης του μηχανισμού καθώς και της αιτίας. Σε μελλοντικά πειράματα θα μπορούσε να συγκριθεί η κατάσταση του στελέχους CC-4476 σε φυσιολογικές συνθήκες (TAP) με εκείνη της στέρησης (TAP-S), τόσο σε επίπεδο καλλιέργειας όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ώστε να αναγνωριστούν τα κοινά τους σημεία.

Όσο αφορά την κατασκευή του βιοσυστήματος φωτοπαραγωγής H_2 , τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, εφόσον παρατηρήθηκε έκλυση H_2 μόνο σε συνθήκες φωτός και συνεργασίας των φωτοσυνθετικών πρωτεϊνών με εκείνες του βακτηρίου. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας του βακτηριακού δείγματος και εξαιτίας των αποτυχημένων προσπαθειών απομόνωσης της υδρογενάσης, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε τον ακριβή μηχανισμό. Οι παρατηρήσεις στα συστήματα που μελετήθηκαν υποδεικνύουν την ηλεκτρονιακή ροή μέσω των φωτοσυστημάτων, εφόσον στο σκοτάδι δεν εμφανίστηκε H_2 . Για τον πλήρη χαρακτηρισμό του μηχανισμού χρειάζεται μεγάλη καθαρότητα της υδρογενάσης καθώς και υψηλή ενεργότητα. Επίσης, τα μέρη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που συμμετέχουν μπορούν να διευκρινιστούν με τη χρήση συγκεκριμένων παρεμποδιστών, οι οποίοι δρουν σε εξειδικευμένα σημεία της ηλεκτρονιακής ροής κατά μήκος των θυλακοειδών μεμβρανών. Η απομόνωση καθαρής και ενεργής υδρογενάσης θα πρέπει να γίνει κάτω από αναερόβιες συνθήκες, ώστε να μειωθεί η έκθεση της στο ατμοσφαιρικό O_2 . Σε περίπτωση δημιουργίας ενός αποδοτικού συστήματος, το επόμενο βήμα είναι η απομόνωση ανθεκτικότερης υδρογενάσης (από θερμοφιλά βακτήρια) και ίσως η δοκιμή ακινητοποίησης σε μήτρες πολυμερών, οι οποίες προσφέρουν σταθερότητα σε πρωτεϊνικά συστήματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Goodenough, U.W., et al., *Molecular-Genetics of Sexuality in Chlamydomonas*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1995. **46**: p. 21-44.
2. Rochaix, J., A. Goldschmidt-Clermont, and S. Merchant, *The molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, in *In Advances in Photosynthesis* 1998, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands. p. 7.
3. Harris, E., *In The Chlamydomonas* 2009: Elsevier.
4. Huzisige, H. and B. Ke, *Dynamics of the History of Photosynthesis Research*. Photosynthesis Research, 1993. **38**(2): p. 185-209.
5. VanHelmont, J.-B., *Ortus Medicinae*. 1648: p. 108-109.
6. Mariotte, E., *Essais de physique: premier essai de la vegetation des plantes; seconde essai de physique de la nature de l'air*. 1679.
7. Hales, S., *Vegetable staticks, or, an account of some statical experiments on the sap in vegetation*. 1727.
8. Priestley, J., *Observations on different kinds of air*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1772. **62**(1): p. 147-264.
9. Ingenhousz, J., *Experiments upon vegetables, discovering their great power of purifying the common air in the sunshine, and of injuring it in the shade and at night*. Elmsley and Payne, London, 1779.
10. Ingenhousz, J., *Ober die Nahrung der Pflanzen und die Dfingung des Bodens*. Voigt Magazin, 1789: p. 97-105.
11. Senebier, J., *Memoiresphysicochimiques sur la l'influence de la lumiere solaire pour modifier les etres de trois regnes, surtout ceux du regne vegetal*. 1782.
12. Barnes, C.R., *On the food of green plants*. Botan Gazette, 1893(18): p. 403.
13. Blackman, F.F., *Optima and limiting factors*. Annals of Botany, 1905(19): p. 281-295.
14. Willstlitter, R. and A. Stoll, *Untersuchungen fiber Chlorophyll*. Justus Springer, Berlin, 1913.
15. Niel, C.V., *Photosynthesis in bacteria, in "Contribution to Marine Biology"* 1929, Stanford, California: Stanford University Press.
16. M. Calvin and A Benson, *The Path of Carbon in Photosynthesis*. Science, 1948(107): p. 476-480.
17. Gaffron, H., E. Fager, and J. Rosenberg, *Intermediates in photosynthesis: Formation and transformation of phosphoglyceric acid*. Symposium Society Experimental Biology, 1951(5): p. 87-114.
18. Hill, R. and F. Bendall, *Function of the two cytochrome components in chloroplasts. A working hypothesis*. Nature, 1960(186): p. 136-137.
19. Arnon, D., *Extracellular photosynthetic reactions*. Nature, 1951(167): p. 1008-1010.

20. Duysens LNM, A. J, and K. BM, *Two photochemical systems in photosynthesis*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1961(190): p. 188-190.
21. Kok, B. and G. Hoeh, *Spectral changes in photosynthesis*, in "Light and life"1961, Baltimore: Johns Hopkins Press. 397-416.
22. Witt, H., A. Muller, and B. Rumberg, *Experimental evidence for the mechanism of photosynthesis*. Nature, 1961(191): p. 967-969.
23. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism*. Nature, 1961(191): p. 144-148.
24. Joliot, P. and A. Joliot, *A polarographic method for detection of oxygen production and reduction of Hill reagent by isolated chloroplasts*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1968(153): p. 625-634.
25. Deisenhofer, J., et al., *X-ray structural analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from Rhodospseudomonas viridis*. Journal of Molecular Biology, 1984(180): p. 385-398.
26. Marcus, R.A. and N. Sutin, *Electron Transfers in Chemistry and Biology*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1985. **811**(3): p. 265-322.
27. Fotinou, C., et al., *Characterization of a Photosystem-II Core and Its 3-Dimensional Crystals*. Photosynthesis Research, 1993. **37**(1): p. 41-48.
28. Gaffron, H. and J. Rubin, *Fermentative and Photochemical Production of Hydrogen in Algae*. J Gen Physiol, 1942. **26**(2): p. 219-40.
29. Arnon, D., A. Mitsui, and A. Paneque, *Photoproduction of hydrogen gas coupled with photosynthetic phosphorylation*. Science, 1961(134): p. 1425-1425.
30. Kessler, E., *Effect of anaerobiosis on photosynthetic reactions and nitrogen metabolism of algae with and without hydrogenase*. Archives of Microbiology, 1973(93): p. 91-100.
31. Kessler, E., *Hydrogenase, photoreduction and anaerobic growth of algae*. , in *In Algal Physiology and Biochemistry*.1974, Blackwell: Oxford. p. 454-473.
32. Stuart, T.S. and H. Gaffron, *Mechanism of Hydrogen Photoproduction by Several Algae .2. Contribution of Photosystem-II*. Planta, 1972. **106**(2): p. 101-&.
33. Moller, I.M. and W. Lin, *Membrane-Bound Nad(P)H Dehydrogenases in Higher-Plant Cells*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1986. **37**: p. 309-334.
34. Reeves, M. and E. Greenbaum, *Long-term endurance and selection studies in hydrogen and oxygen photoproduction by Chlamydomonas reinhardtii*. Enzyme and Microbial Technology, 1985(10): p. 169-174.
35. Benemann, J., et al., *Hydrogen evolution by a chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973(70): p. 2317-2320.

36. Bishop, N., M. Frick, and L. Jones, *Photohydrogen production in green algae: water serves as the primary substrate for hydrogen and oxygen production.*, in *Biological Solar Energy Conversion*, A Mitsui, et al., Editors. 1977, Academic Press: New York. p. 3-22.
37. McBride, A., et al., *Mutational analysis of Chlamydomonas reinhardi: application to biological solar energy conversion.*, in *Biological Solar Energy Conversion*, A Mitsui, et al., Editors. 1977, Academic Press: New York. p. 77-86.
38. Weaver, P.F., S. Lien, and M. Seibert, *Photobiological Production of Hydrogen*. Solar Energy, 1980. **24**(1): p. 3-45.
39. Greenbaum, E., *Photosynthetic Hydrogen and Oxygen Production - Kinetic-Studies*. Science, 1982. **215**(4530): p. 291-293.
40. Greenbaum, E., *Energetic efficiency of hydrogen photoevolution by algal water-splitting*. Biophysical Journal, 1988(54): p. 365-368.
41. Miura, Y., *Hydrogen production by biophotolysis based on microalgal photosynthesis*. Process Biochemistry, 1995(30): p. 1-7.
42. Ghirardi, M.L., R.K. Togasaki, and M. Seibert, *Oxygen sensitivity of algal H₂- production*. Appl Biochem Biotechnol, 1997. **63-65**: p. 141-51.
43. Roessler, P.G. and S. Lien, *Activation and Denovo Synthesis of Hydrogenase in Chlamydomonas*. Plant Physiology, 1984. **76**(4): p. 1086-1089.
44. Happe, T., B. Mosler, and J. Naber, *Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. European Journal of Biochemistry, 1994(222): p. 769-774.
45. Benemann, J., *Hydrogen biotechnology: Progress and prospects*. Nature Biotechnology, 1996. **14**(9): p. 1101-1103.
46. Melis, A., et al., *Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology, 2000. **122**(1): p. 127-135.
47. Davies, J.P., F. Yildiz, and A.R. Grossman, *Mutants of Chlamydomonas with Aberrant Responses to Sulfur Deprivation*. Plant Cell, 1994. **6**(1): p. 53-63.
48. Yildiz, F.H., J.P. Davies, and A.R. Grossman, *Characterization of Sulfate Transport in Chlamydomonas-Reinhardtii during Sulfur-Limited and Sulfur-Sufficient Growth*. Plant Physiology, 1994. **104**(3): p. 981-987.
49. Wykoff, D.D., et al., *The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology, 1998. **117**(1): p. 129-139.
50. Zhang, L.P. and A. Melis, *Probing green algal hydrogen production*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 2002. **357**(1426): p. 1499-1507.
51. Matthew, T., et al., *The metabolome of Chlamydomonas reinhardtii following induction of anaerobic H₂ production by sulfur depletion*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(35): p. 23415-25.
52. Zhang, L.P., T. Happe, and A. Melis, *Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-*

- producing Chlamydomonas reinhardtii (green alga)*. *Planta*, 2002. **214**(4): p. 552-561.
53. Happe, T. and A. Kaminski, *Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*, 2001.
 54. Happe, T. and J. Naber, *Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*, 1993(214): p. 475-481.
 55. Ghirardi, M.L., et al., *Microalgae: a green source of renewable H₂*. *Trends in Biotechnology*, 2000. **18**(12): p. 506-511.
 56. Mus, F., et al., *Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2005. **1708**(3): p. 322-332.
 57. Fouchard, S., et al., *Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived Chlamydomonas cells*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. **71**(10): p. 6199-6205.
 58. Mattoo, A.K. and M. Edelman, *Intramembrane translocation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32-kDa herbicide-binding protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(6): p. 1497-501.
 59. Antal, T.K., et al., *Relationships between H₂ photoproduction and different electron transport pathways in sulfur-deprived Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009. **34**(22): p. 9087-9094.
 60. Melis, A., *Photosynthetic H₂ metabolism in Chlamydomonas reinhardtii (unicellular green algae)*. *Planta*, 2007. **226**(5): p. 1075-1086.
 61. Chochois, V., et al., *Hydrogen Production in Chlamydomonas: Photosystem II-Dependent and -Independent Pathways Differ in Their Requirement for Starch Metabolism*. *Plant Physiology*, 2009. **151**(2): p. 631-640.
 62. Kosourov, S., et al., *A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived Chlamydomonas reinhardtii under different growth conditions*. *Journal of Biotechnology*, 2007. **128**(4): p. 776-787.
 63. Tolstygina, I.V., et al., *Hydrogen production by photoautotrophic sulfur-deprived Chlamydomonas reinhardtii pre-grown and incubated under high light*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009. **102**(4): p. 1055-61.
 64. Tsygankov, A.A., et al., *Hydrogen production by sulfur-deprived Chlamydomonas reinhardtii under photoautotrophic conditions*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006. **31**(11): p. 1574-1584.
 65. Fontecilla-Camps, J.C., et al., *Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases*. *Chem Rev*, 2007. **107**(10): p. 4273-303.
 66. Kim, D.H. and M.S. Kim, *Hydrogenases for biological hydrogen production*. *Bioresource Technology*, 2011. **102**(18): p. 8423-8431.

67. Happe, T. and J.D. Naber, *Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. European Journal of Biochemistry, 1993. **214**(2): p. 475-81.
68. Horch, M., et al., *NAD(H)-coupled hydrogen cycling - structure-function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases*. Febs Letters, 2012. **586**(5): p. 545-56.
69. Winkler, M., S. Kawelke, and T. Happe, *Light driven hydrogen production in protein based semi-artificial systems*. Bioresour Technol, 2011. **102**(18): p. 8493-500.
70. Gorman, D.S. and R.P. Levine, *Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardi*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **54**(6): p. 1665-9.
71. Arnon, D.I., *Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris*. Plant Physiology, 1949. **24**(1): p. 1-15.
72. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
73. Schagger, H. and G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem, 1987. **166**(2): p. 368-79.
74. Wittig, I., M. Karas, and H. Schagger, *High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes*. Molecular & Cellular Proteomics, 2007. **6**(7): p. 1215-25.
75. Candiano, G., et al., *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. Electrophoresis, 2004. **25**(9): p. 1327-33.
76. Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nature Protocols, 2006. **1**(6): p. 2856-2860.
77. Berthold, D.A., G.T. Babcock, and C.F. Yocum, *A Highly Resolved, Oxygen-Evolving Photosystem-II Preparation from Spinach Thylakoid Membranes - Electron-Paramagnetic-Res and Electron-Transport Properties*. Febs Letters, 1981. **134**(2): p. 231-234.
78. Myers, J., *Algal culture*, in *Encyclopedia chem technol interscience* 1957: NY. p. 649-80.
79. Radmer, R. and B. Kok, *Photosynthesis - Limited Yields, Unlimited Dreams*. Bioscience, 1977. **27**(9): p. 599-605.
80. Sukenik, A., J. Bennett, and P. Falkowski, *Light-Saturated Photosynthesis - Limitation by Electron-Transport or Carbon Fixation*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1987. **891**(3): p. 205-215.
81. Mayfield, S.P., et al., *Expression of the nuclear gene encoding oxygen-evolving enhancer protein 2 is required for high levels of photosynthetic oxygen evolution in Chlamydomonas reinhardtii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**: p. 749-753.

82. Zito, F., et al., *The Qo site of cytochrome b6f complexes controls the activation of the LHCII kinase*. Embo Journal, 1999. **18**(11): p. 2961-9.
83. Antal, T.K., et al., *The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived Chlamydomonas reinhardtii cells*. Biochimica Et Biophysica Acta, 2003. **1607**(2-3): p. 153-60.