

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΥΠΟΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΤΟΥ  
ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ Π ΤΩΝ ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ  
ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ**

ΑΣΠΑΣΙΑ ΣΠΥΡΙΔΑΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1999

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δ. Γανωτάκη στο εργαστήριο Βιοχημείας-Βιοφυσικής του Χημικού τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης. Από τη θέση αυτή θα ήθελα να απευθύνω θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Δ. Γανωτάκη για την αδιάκοπη επιστημονική καθοδήγηση του και την αμέριστη συμπαράσταση του κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ενα μεγάλο μέρος της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε στην ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. H.Michel στο Max-Planck-Institut fuer Biophysik στη Φρανκφούρτη σε συνεργασία με τον Dr. G. Fritzsch. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. H.Michel για την αμέριστη εκπαιδευτική και υλικοτεχνική υποστήριξη που μου πρόσφερε και τον Dr. G. Fritzsch για τις συζητήσεις και την πολύτιμη βοήθεια του κατά την παραμονή μου εκεί.

Επιπλέον, πρέπει να ευχαριστήσω τους Κ. Καβελάκη Ζ. Bojadzjiev, U. Tiefenbach, και G. Eichberger για την άριστη συνεργασία που είχαμε.

Επιθυμώ, επίσης, να εκφράσω θερμές ευχαριστίες προς τον Dr. U. Ermler που με πρωτοεισηγάγε στο χώρο της κρυσταλλογραφίας, τους Dr. L. Kampmann, A. Kuglstatter, G. Karaun για την πολύτιμη βοήθεια τους και τον Dr. W. Grabarse, η συμβολή του οποίου ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση του κρυσταλλογραφικού τμήματος της εργασίας μου.

Τον Επικ. Καθ. κ. Γ. Τσιώτη, τον Αναπλ. Καθ. κ. Κ. Κοτζαμπάση, τον Αναπλ. Καθ. κ. Μ. Κοκκινίδη και την Dr. L. Baciou ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία μας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, Δ. Φωτιάδη, Μ. Ψυλινάκη, Ε. Κουιμτζόγλου, Γ. Τσαγκατάκη, Κ. Περδικάκη, Dr. I. Chen, J. Ioannidis, Dr. Κ. Φωτεινού, Dr. Α. Μπάκου, Dr. Ν. Λυδάκη, Σ. Χρόνη, και τον αδερφό μου, Γ. Σπυριδάκη για την πολύτιμη συμπαράσταση τους, καθώς και όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του τμήματος Χημείας.

Μέλη της εξεταστικής επιτροπής:

- 1) Βαρώτσης Κωνσταντίνος, Αναπλ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 2) Γανωτάκης Δημήτριος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 3) Καραμπάτσος Γεράσιμος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 4) Κοκκινίδης Μιχαήλ, Αναπλ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 5) Κοτζαμπάσης Κυριάκος, Αναπλ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 6) Στεφάνου Ευριπίδης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 7) Τσιώτης Γεώργιος, Επικ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης.

Στους γονείς μου

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Σπυριδάκη Ασπασία

**Ημερομηνία Γέννησης:** 14 Φεβρουάριου 1969

**Τόπος Γέννησης:** Τορόντο, Καναδά

### **Σπουδές:**

*1992-1999:* Μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων Καθηγητής κ. Δ. Γανωτάκης).

*1992:* Πτυχίο Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

### **Εκπαιδευτική Εμπειρία:**

*5-16 Ιουλίου 1994:* Συμμετοχή στο EMBO Practical Course "Current Methods in Membrane Protein Research" στη Χαϊδελβέργη, Γερμανία.

*1994:* Βοηθός εκπαιδευτής στα Εργαστήρια Γενικής Χημείας I και II στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

*1993:* Βοηθός εκπαιδευτής στα Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας I και II στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

### **Ερευνητική Εμπειρία:**

*1992-1999:* Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με τίτλο: "Απομόνωση και χαρακτηρισμός υποσυμπλόκων του πυρήνα του φωτοσυστήματος II των ανωτέρων φυτών και μελέτη του μηχανισμού δράσης αναστολέων" (Απομόνωση μεμβρανικών πρωτεϊνών, βιοχημικός χαρακτηρισμός, κρυσταλλώσεις, κρυσταλλογραφία ακτίνων X).

*1995-1998:* Ερευνήτρια στο MPI fuer Biophysic στη Φρανκφούρτη, Γερμανία.

*Απρίλιος 1994-Ιούνιος 1994:* Ερευνήτρια στο MPI fuer Biophysic στη Φρανκφούρτη, Γερμανία.

*1991-1992:* Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με τίτλο: "Χαρακτηρισμός και κρυστάλλωση του πρωτεϊνικού συμπλόκου: 47kDa, 43kDa, D1, D2, 33kDa, 29kDa και

Cyt b<sub>559</sub> του φωτοσυστήματος II των ανωτέρων φυτών" υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δ. Γανωτάκη στο εργαστήριο Βιοχημείας-Βιοφυσικής του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

1990-1991: Έμμισθη προπτυχιακή φοιτήτρια στο εργαστήριο Βιοχημείας-Βιοφυσικής του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δ. Γανωτάκη.

#### **Υποτροφίες:**

1993-1994: Βαρδινογιάννια υποτροφία

Απρίλιος 1994-Ιούνιος 1994: EMBO

**Γλώσσες:** Αγγλικά, Γερμανικά

#### **Δημοσιεύσεις:**

1. Tubular crystals of a Photosystem II core complex. G. Tsiotis, T. Walz, A. Spyridaki, A. Lustig. *Journal of Molecular Biology*, 259 (1996) 241-248.
2. Structural analysis of Photosystem II: comparative study of cyanobacterial and higher plant Photosystem II complexes. L. Hasler, D. Ghanotakis, B. Fedke, A. Spyridaki, M. Miller, S.A. Mueller. *Journal of Structural Biology*, 119 (1997) 273-283.
3. The mode of action of capsaicin, a naturally occurring inhibitor of photosynthetic electron flow through photosystem II and the purple bacterial reaction center. A. Spyridaki, G. Fritsch, L. Baciou, E. Kouimtzoglou, H. Michel, D. Ghanotakis. Manuscript in preparation.

## **CURRICULUM VITAE**

### **SPYRIDAKI ASPASIA**

**DATE OF BIRTH:** February 14, 1969

**PLACE OF BIRTH:** Toronto, Canada

#### **EDUCATION:**

*1992-1999:* Graduate student Chemistry Department University of Crete (Supervisor Prof. D. Ghanotakis).

*1992:* B.Sc. in Chemistry Chemistry Department University of Crete

#### **EDUCATIONAL EXPERIENCE:**

*5-16 July 1994:* Participation in the EMBO Practical Course "Current Methods in Membrane Protein Research" in Heidelberg, Germany.

*1994:* Teaching assistant in the Analytical Chemistry Lab (undergraduate level), University of Crete.

*1993:* Teaching assistant in the General Chemistry Lab (undergraduate level), University of Crete.

#### **RESEARCH EXPERIENCE:**

*1992-1999:* Doctoral Dissertation: "Isolation and characterization of Photosystem II from higher plants" with Prof. D.F. Ghanotakis, Chemistry Department, University of Crete.

(Membrane protein purification, biochemical characterization, crystallization, X-ray crystallography)

*1995-1998:* Fellow at the MPI for Biophysics in Frankfurt, Molecular-Membranebiology Department, Germany.

*April 1994-June 1994:* Fellow at the MPI for Biophysics in Frankfurt, Molecular-Membranebiology Department, Germany.

*1991-1992*: Dissertation for B.Sc. diploma: "Characterization and crystallization of the protein complex: 47kDa, 43kDa, D1, D2, 33kDa, 29kDa and Cyt b<sub>559</sub> of Photosystem II from higher plants". University of Crete

*1990-1991*: Research assistant in the Biochemistry-Biophysics Lab (Prof. D.F. Ghanotakis) Chemistry Department, University of Crete.

**FELLOWSHIPS:**

*1993-1994*: Bardinogianneio

*April 1994-June 1994*: EMBO

**FOREIGN LANGUAGES:** English, German

**PUBLICATIONS:**

1. Tubular crystals of a Photosystem II core complex. G. Tsiotis, T. Walz, A. Spyridaki, A. Lustig. *Journal of Molecular Biology*, 259 (1996) 241-248.
2. Structural analysis of Photosystem II: comparative study of cyanobacterial and higher plant Photosystem II complexes. L. Hasler, D. Ghanotakis, B. Fedke, A. Spyridaki, M. Miller, S.A. Mueller. *Journal of Structural Biology*, 119 (1997) 273-283.
3. The mode of action of capsaicin, a naturally occurring inhibitor of photosynthetic electron flow through photosystem II and the purple bacterial reaction center. A. Spyridaki, G. Fritsch, L. Baciou, E. Kouimtzoğlu, H. Michel, D. Ghanotakis. Manuscript in preparation.



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ.....	12
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	15
SUMMARY .....	17
<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>19</b>
I.1 Φωτοσύνθεση.....	19
I.2 Οξυγονική φωτοσύνθεση .....	20
I.3 Η ηλεκτρονιακή ροή στα φυτά.....	22
I.4 Το Φωτοσύστημα II .....	25
I.5 Σύγκριση των κέντρων αντίδρασης του PSII και των μωβ μη θειούχων βακτηρίων.....	31
I.6 PSII-ζιζανιοκτόνα .....	36
I.7 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	41
I.8 Κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	44
I.9 Κρυσταλλογραφία ακτίνων X .....	47
<b>II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....</b>	<b>49</b>
<b>III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>52</b>
III.1 Υλικά .....	52
III.1.1 Αντιδραστήρια .....	52
III.1.2 Φυτικό υλικό .....	52
III.1.3 Διαλύματα .....	52
III.2 Μέθοδοι.....	53
III.2.1 Φυγοκέντρωση.....	54
III.2.2 Υπερφυγοκέντρωση.....	54
III.2.3 Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.....	54
III.2.4 Απομόνωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων.....	54
III.2.5 Ηλεκτρόφορηση .....	57
III.2.6 Διαδικασία διαπίδυσης.....	57
III.2.7 Συμπύκνωση των δειγμάτων .....	57

III.2.8 Τρισδιάστατη κρυστάλλωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων .....	58
III.2.9 Δυσδιάστατη κρυστάλλωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων.....	58
III.2.10 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χλωροφύλλης .....	58
III.2.11 Φασματοσκοπία απορρόφησης επαγόμενη με παλμούς φωτός .....	58
III.2.12 Προσδιορισμός έκλυσης οξυγόνου.....	59
III.2.13 Οπτική φασματοσκοπία απορρόφησης.....	59
III.2.14 Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού.....	59
III.2.15 Φασματοσκοπία φθορισμού.....	60
III.2.16 Ηλεκτρονική μικροσκοπία .....	60
III.2.17 Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.....	60
<b>IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>61</b>
<b>IV.1 Μελέτη της επίδρασης της ιστιδίνης πάνω στις πρωτεΐνες του φωτοσυστήματος II.....</b>	<b>61</b>
<b>IV.2 Απομόνωση, χαρακτηρισμός και τρισδιάστατη κρυστάλλωση υποσυμπλόκων του πυρήνα του φωτοσυστήματος II.....</b>	<b>63</b>
<b>IV.2.1 Σύμπλοκο 47-43 kDa-D1-D2-Cyt b<sub>559</sub>.....</b>	<b>63</b>
IV.2.1.1 Μέθοδος απομόνωσης του συμπλόκου.....	63
IV.2.1.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου .....	64
IV.2.1.3 Κρυστάλλωση του συμπλόκου .....	67
<b>IV.2.2 Σύμπλοκο 47-43-33-D1-D2-Cyt b<sub>559</sub>.....</b>	<b>81</b>
IV.2.2.1 Μέθοδος απομόνωσης του συμπλόκου.....	81
IV.2.2.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου .....	81
IV.2.2.3 Κρυστάλλωση του συμπλόκου .....	83
<b>IV.2.3 Σύμπλοκο 47 kDa-D1-D2-Cyt b<sub>559</sub> .....</b>	<b>90</b>
IV.2.3.1 Απομόνωση του συμπλόκου .....	90
IV.2.3.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου .....	91
IV.2.3.3 Κρυστάλλωση του συμπλόκου .....	93
<b>IV.3 Δομικές μελέτες πάνω στο φωτοσύστημα II με ηλεκτρονική μικροσκοπία ...</b>	<b>100</b>
<b>IV.3.1 Μελέτη των διαλυτοποιημένων συμπλόκων OTG-core και Tris-OTG-core με ηλεκτρονική μικροσκοπία και συγκριτική μελέτη.....</b>	<b>100</b>
<b>IV.3.2 Μελέτη του OTG-core με ηλεκτρονική κρυσταλλογραφία .....</b>	<b>102</b>
<b>IV.4 Μελέτη του μηχανισμού δράσης της καψακίνης, ενός αναστολέα της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων στο PSII και στο βακτηριακό RC .....</b>	<b>108</b>
<b>IV.4.1. Απομόνωση του κέντρου αντίδρασης από Rb. sphaeroides .....</b>	<b>109</b>
<b>IV.4.2 Επίδραση της καψακίνης στο βακτηριακό RC .....</b>	<b>109</b>
<b>IV.4.3 Επίδραση της καψακίνης στο PSII .....</b>	<b>110</b>
<b>IV.4.4 Προετοιμασία των κρυστάλλων του βακτηριακού κέντρου αντίδρασης και επεξεργασία τους με καψακίνη.....</b>	<b>112</b>
<b>IV.4.5 Δομική ανάλυση και βελτίωση.....</b>	<b>112</b>
<b>V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>120</b>

**VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 122**

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ

Å:	Angstroem
ADA:	N-(2-ακεταμιδο)-2-ιμινοδιοξικό οξύ
Ala:	αλανίνη
ATP:	αδενοσινο-5-τριφωσφορικός εστέρας
BICIN:	N,N δις (2-υδροξυαιθυλο)-γλυκίνη
Bis-Tris:	δις (2-υδροξυαιθυλο)-αμινο-τρις (υδροξυμεθυλο)-μεθάνιο
Ches:	2-κυκλοεξυλαμινο-αιθανοσουλφονικό οξύ
Chl:	χλωροφύλλη
CMC:	κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων
Cyt:	κυτόχρωμα
DCBQ:	2,6-διχλωρο-π-βενζοκινόνη
DCMU:	3-(3,4-διχλωροφαινυλο)-1,1-διμεθυλουρία
DM:	δεκυλο-β-D-μαλτοζίτης
DMPC:	διμυριστοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη
DMSO:	διμεθυλοσουλφοξείδιο
DMVNA:	8-μεθυλο-N-βανιλυλο-6-νοναναμίδιο
EPR:	ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός
Hepes:	2-[4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινο]-αιθανο σουλφονικό οξύ
His:	ιστιδίνη
HM:	6-O-(N-επτυλκαρβαμουλο)-μεθυλο-α-D-γλυκοπυρανοζίτης
HPT:	1,2,3-επτανετριόλη
HXT:	1,2,3-εξανετριόλη
HTG:	επτυλο-β-D-θειογλυκοζίτης
Ile:	ισολευκίνη
kDa:	kilodalton
LDAO:	δωδεκυλο-διμεθυλο-αμινοξείδιο
LHC:	σύμπλοκο συλλογής φωτός
LM:	δωδεκυλο-β-D-μαλτοζίτης

Mes:	2-μορφολινο-αιθανοσουλφονικό οξύ
Mops:	3-(N-μορφολινο) προπανο-σουλφονικό οξύ
MPD:	2-μεθυλο-2,4-πεντανοδιόλη
MVNA:	8-μεθυλο-N-βανιλλο-6-νοναμίδιο
MPEG:	πολυαιθυλενογλυκόλη μονομεθυλαιθέρας
NADP:	νικοτιδαμινο-αδενινο-δινουκλεοτιδο-φωσφορικός εστέρας
OEC:	σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου
OGP:	οκτυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτης
OTG:	οκτυλο-β-D-θειογλυκοπυρανοζίτης
P <sub>680</sub> :	πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης του φωτοσυστήματος II
P <sub>700</sub> :	πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης του φωτοσυστήματος I
PC:	πλαστοκυανίνη
PEG:	πολυαιθυλενογλυκόλη
Phe:	φαινυλαλανίνη
Pheo:	φαιοφυτίνη
PQ:	πλαστοκινόνη
PSI:	φωτοσύστημα I
PSII:	φωτοσύστημα II
PSII-core:	πυρήνας του φωτοσυστήματος II
Q <sub>A</sub> :	πρωτοταγής ηλεκτρονιοδέκτης του PSII και του βακτηριακού κέντρου αντίδρασης
Q <sub>B</sub> :	δευτεροταγής ηλεκτρονιοδέκτης του PSII και του βακτηριακού κέντρου αντίδρασης
RC:	κέντρο αντίδρασης
SDS:	δωδεκυλοθειικό νάτριο
SDS-PAGE:	πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδιου
Ser:	σερίνη
Thyl:	θυλακοειδή
Tris-PSII-core:	PSII-core κατεργασμένο με Tris
Tyr:	τυροσίνη
Tyr D:	τυροσίνη του PSII που δεν συμμετέχει στην οξειδωση του νερού

Tyr Z: τυροσίνη που λειτουργεί ως δευτεροταγής ηλεκτρονιοδότης στο PSII

Tris: τρισ-υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο

UM: ενδεκυλο-β-D-μαλτοζίτης

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. Με στόχο τη δομική μελέτη του πυρήνα του φωτοσυστήματος II αναπτύχθηκαν νέοι μέθοδοι για την απομόνωση διαφόρων υποσυμπλόκων του PSII-core. Τα σύμπλοκα αυτά, που περιείχαν τις απαραίτητες υπομονάδες για την διεξαγωγή του πρωτοταγούς διαχωρισμού φορτίου, είναι τα εξής:

α) Σύμπλοκο που περιέχει τις πρωτεΐνες 47 kDa, 32 kDa (D1), 34 kDa (D2), και το Cyt b<sub>559</sub>,

β) Σύμπλοκο που περιέχει τις παραπάνω πρωτεΐνες, καθώς επίσης και την εσωτερική κεραία, 43 kDa πρωτεΐνη και

γ) Σύμπλοκο που περιέχει όλες τις πρωτεΐνες που απαιτούνται για την έκλυση οξυγόνου (47 kDa, 43 kDa, 32 kDa, 34 kDa, Cyt b<sub>559</sub> και 33 kDa).

Τα σύμπλοκα απομονώθηκαν με εκλεκτική διαλυτοποίηση του φωτοσυστήματος II με διάφορα απορρυπαντικά και στη συνέχεια με τεχνικές ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας και υπερφυγοκέντρωσης ζώνης. Όλα τα σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν με οπτική φασματοσκοπία απορρόφησης, φασματοσκοπία EPR και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα τρισδιάστατης κρυστάλλωσης. Εξετάστηκαν όλοι οι βασικοί παράγοντες που σχετίζονται με την κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Επιπλέον, εξετάστηκε η δράση της ιστιδίνης στις πρωτεΐνες του πυρήνα του φωτοσυστήματος II, με στόχο τη σταθεροποίηση του συστήματος. Λήφθηκαν διάφορες κρυσταλλικές μορφές και οι καλύτεροι κρύσταλλοι μελετήθηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X.

2. Για τον εντοπισμό της θέσης των εξωτερικών πρωτεϊνών έγιναν μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε PSII-core σύμπλοκα, από τα οποία είχαν επιλεκτικά απομακρυνθεί οι πρωτεΐνες αυτές. Επιπλέον, αναπτύχθηκαν κυλινδρικοί κρύσταλλοι ενός PSII-core συμπλόκου, οι οποίοι εξετάστηκαν με ηλεκτρονική κρυσταλλογραφία. Από τις μελέτες αυτές λήφθηκαν πληροφορίες για τη κατάσταση ολιγομερισμού του PSII, καθώς και τη σχετική συναρμολόγηση και τοπολογία των υπομονάδων του.

3. Βρέθηκε ένας καινούριος αναστολέας, που αποτελεί φυσικό προϊόν, η καψακίνη. Η ένωση αυτή έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την ηλεκτρονιακή μεταφορά στο φυτικό PSII καθώς και στο βακτηριακό RC, στη θέση Q<sub>B</sub>. Η ανασταλτική δράση της καψακίνης μελετήθηκε με μετρήσεις του ρυθμού έκλυσης O<sub>2</sub> και φθορισμό στη περίπτωση του PSII, ενώ στο βακτηριακό RC χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία απορρόφησης επαγόμενη με παλμούς φωτός. Λόγω της απουσίας μιας αναλυτικής δομής του PSII, χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο το βακτηριακό κέντρο αντίδρασης από *Rb. sphaeroides*. Η κρυσταλλογραφική ανάλυση του RC με δεσμευμένη καψακίνη παρείχε δομικές πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις καψακίνης-πρωτεΐνης.



## SUMMARY

1. New methods were developed for the purification of several PSII-core subcomplexes in order to study the structure of the photosystem II core. The complexes, which contained the necessary subunits to carry out the primary charge separation, were the following:

a) A complex which contains the proteins: 47 kDa, 32 kDa (D1), 34 kDa (D2), and Cyt b<sub>559</sub>

b) A complex which contains the above proteins as well as the second interior antenna protein 43 kDa and

c) A complex which contains all the proteins required for oxygen evolution (47 kDa, 43 kDa, 32 kDa, 34 kDa, Cyt b<sub>559</sub> and 33 kDa)

The complexes were isolated by using selective solubilization of Photosystem II with different detergents, ion exchange chromatography and zonal centrifugation.

The above complexes were characterized by optical absorption spectroscopy, EPR spectroscopy and were used for three dimensional crystallization trials. The basic parameters which influence membrane protein crystallization were screened. Additionally, the action of histidine (a known oxygen radical scavenger) was examined on PSII-core proteins, in order to stabilize the system. Several crystal forms were obtained and the best crystals were measured by X-ray crystallography.

2. In order to localize the extrinsic proteins, electron microscopy measurements were carried out on solubilized PSII-core complexes, from which these proteins had been selectively extracted. Two dimensional crystals of a PSII-core complex were formed and were analyzed by electron crystallography. Information on the oligomerization state of PSII, the relative assembly and subunit topology was obtained from these studies.

3. A new naturally occurring inhibitor, capsaicin, was found, which has the ability to block the electron transfer of both plant PSII and bacterial RC, at the Q<sub>B</sub> site. The mode of action of capsaicin was investigated by O<sub>2</sub> evolution and fluorescence induction

measurements in the case of PSII and flash-induced absorbance spectroscopy in the case of the bacterial RC. In the absence of a high resolution structure of PSII, the bacterial RC from *Rb. sphaeroides* was used as a model for investigating capsaicin binding to the Q<sub>B</sub>-site. X-ray crystallographic analysis of the RC with bound capsaicin provided structural details of capsaicin-protein interactions.

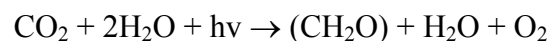
# I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## I.1 Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση είναι μια ενζυματική διεργασία πρωταρχικής σημασίας για τη ζωή πάνω στο πλανήτη μας. Όλη η ελεύθερη ενέργεια που χρησιμοποιείται από τα βιολογικά συστήματα προέρχεται από την ηλιακή ενέργεια, η οποία παγιδεύεται με τη φωτοσυνθετική διαδικασία. Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει συστήματα ικανά να δεσμεύουν το φως και να το μετατρέπουν σε χημική ενέργεια, με τη μορφή χρήσιμων μεταβολικά υδατανθράκων, που αποτελούν την βάση της διατροφής για όλους τους ετερότροφους οργανισμούς στη γη<sup>1</sup>. Επίσης, οι κύριες πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας (κάρβουνο, πετρέλαιο, φυσικά αέρια) είναι προϊόντα αποσύνθεσης βιολογικού υλικού, που προήλθε από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που έζησαν εκατομμύρια χρόνια πριν.

Συγκεκριμένα, οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν το φως για να λάβει χώρα μια μη θερμοδυναμικά ευνοούμενη οξειδοαναγωγική αντίδραση<sup>2</sup>. Το αναγωγικό ποικίλει ανάλογα με το είδος του φωτοσυνθετικού οργανισμού. Σε ορισμένα μωβ φωτοσυνθετικά βακτηρία ο ηλεκτρονιοδότης και ο ηλεκτρονιοδέκτης ανήκουν στο ίδιο οξειδοαναγωγικό ζεύγος (δισθενές και τρισθενές σιδηροκυτόχρωμα c<sub>2</sub>). Στην περίπτωση αυτή δεν υπάρχει καθαρή οξειδοαναγωγή και λαμβάνει χώρα κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Στα πράσινα και μωβ θειούχα βακτηρία αναγωγικό είναι το υδρόθειο, ενώ μερικά μωβ μη θειούχα βακτηρία χρησιμοποιούν ένα οργανικό δοτή ηλεκτρονίων, όπως ισοπροπανόλη η οποία οξειδώνεται σε ακετόνη.

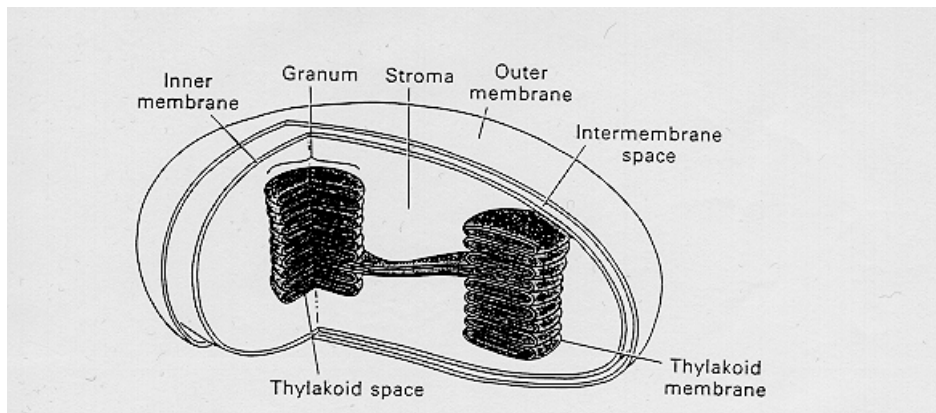
Η οξυγονική φωτοσύνθεση πιστεύεται ότι εμφανίστηκε αργότερα όταν κάποιο πρωτόγονο κυανοβακτήριο άρχισε να χρησιμοποιεί το νερό σαν αναγωγικό, ελευθερώνοντας O<sub>2</sub> ως παραπροϊόν. Αυτή η εξέλιξη της φωτοσύνθεσης οδήγησε στη μετατροπή της πρωταρχικής αναγωγικής ατμόσφαιρας σε οξυγονική<sup>3</sup> και επέτρεψε την ανάπτυξη της αναπνοής. Με το νερό σαν αναγωγικό, η οξειδοαναγωγική αντίδραση παίρνει τη παρακάτω μορφή:



Η ικανότητα παραγωγής οξυγόνου αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό των ανώτερων φυτών, των ευκαρυωτικών φυκών και των κυανοβακτηρίων.

## 1.2 Οξυγονική φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού, που απαιτεί τη συμμετοχή πολλών πρωτεϊνών και μικρών μορίων. Στα πράσινα φυτά όλες οι φωτοσυνθετικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται στους χλωροπλάστες (σχήμα 1). Οι χλωροπλάστες χαρακτηρίζονται από μια διπλή εξωτερική μεμβράνη, μια άμορφη φάση, το στρώμα, που περιέχει υδατοδιαλυτά ένζυμα και ένα σύστημα μεμβρανών, τις θυλακοειδείς μεμβράνες<sup>4</sup>. Οι μεμβράνες αυτές περικλείουν ένα εσωτερικό χώρο που λέγεται lumen και σχηματίζουν συσσωματώματα, τα grana. Οι περιοχές των grana ενώνονται μεταξύ τους με τις λεγόμενες μεμβράνες του στρώματος. Η πρωτεϊνική σύσταση των θυλακοειδών στα grana είναι διαφορετική από εκείνη των θυλακοειδών του στρώματος.

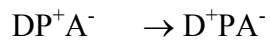
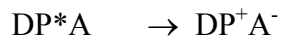
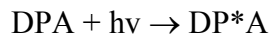


Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση του χλωροπλάστη<sup>5</sup>

Η έναρξη της φωτοσυνθετικής διαδικασίας γίνεται με την απορρόφηση ηλιακής ενέργειας στη περιοχή του ορατού φάσματος από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές. Στα πράσινα φυτά οι φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι η Chl a, η Chl b και τα καροτενοειδή. Οι χρωστικές αυτές είναι μη ομοιοπολικά δεσμευμένες σε μεμβρανικές πρωτεΐνες των θυλακοειδών και σχηματίζουν σύμπλοκα χρωστικών-πρωτεϊνών, που ονομάζονται

σύμπλοκα συλλογής φωτός<sup>6</sup>. Τα μόρια Chl b και τα καροτενοειδή αποτελούν τις βοηθητικές χρωστικές, που δρουν μεταφέροντας την ενέργεια που απορροφούν, σε μόρια Chl a. Με αυτό το τρόπο διευρύνουν το φάσμα της φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας.

Τα μόρια των χλωροφυλλών είναι οργανωμένα σε φωτοσυνθετικές μονάδες που περιέχουν 250-300 μόρια χλωροφυλλών κατά μέσο όρο. Τα μόρια αυτά παγιδεύουν την ηλιακή ενέργεια και την μεταφέρουν σε ένα κέντρο αντίδρασης και συγκεκριμένα σε ένα εξειδικευμένο μόριο Chl a, που αποτελεί τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη. Τα κέντρα αντίδρασης είναι ειδικά σύμπλοκα χρωστικών-πρωτεϊνών, όπου πραγματοποιούνται οι φωτοχημικές αντιδράσεις<sup>7</sup>. Η φωτεινή ενέργεια χρησιμοποιείται για να προάγει την Chl a (P) του κέντρου αντίδρασης σε μια διεγερμένη κατάσταση P\*. Το P\* είναι ένα ισχυρό αλλά ασταθές αναγωγικό, που ανάγει ένα κοντινό ηλεκτρονιοδέκτη A. Η επαναγωγή του P\* γίνεται με την οξείδωση ενός ηλεκτρονιοδότη D. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται ο πρωτοταγής διαχωρισμός φορτίου, ο οποίος μπορεί να περιγραφεί με τις παρακάτω εξισώσεις:

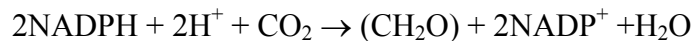
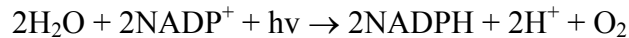


Στη συνέχεια τα D<sup>+</sup> και A<sup>-</sup> ανάγονται και οξειδώνονται, αντίστοιχα, με δευτεροταγή μεταφορά ηλεκτρονίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του πρωτοταγούς διαχωρισμού φορτίου και την παρεμπόδιση της επαναφοράς του ηλεκτρονίου στο αρχικό τροχιακό του πρωτοταγούς δοτή.

Στους οξυγονικούς οργανισμούς η φωτοσύνθεση εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο ενζυμικών συμπλόκων, του φωτοσυστήματος I και του φωτοσυστήματος II, τα οποία έχουν διαφορετικά κέντρα αντίδρασης. Οι πρωτοταγείς δότες του PSI-RC και του PSII-RC ονομάζονται P<sub>700</sub> και P<sub>680</sub>, αντίστοιχα, με βάση το μέγιστο μήκος κύματος, στο οποίο απορροφούν. Το PSI είναι το πιο αναγωγικό και μοιάζει με το φωτοσυνθετικό κέντρο των πράσινων θειούχων βακτηρίων. Το PSII είναι το κέντρο φωτόλυσης του νερού και παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με το φωτοσυνθετικό κέντρο των μωβ μη θειούχων βακτηρίων.

Κατά τη φωτοσύνθεση στα φυτά γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων από το H<sub>2</sub>O στον τελικό ηλεκτρονιοδέκτη NADP<sup>+</sup>. Με τη μεταφορά αυτή, ένα ασθενές οξειδωτικό (CO<sub>2</sub>) οξειδώνει ένα ασθενές αναγωγικό (H<sub>2</sub>O) για την παραγωγή ενός ισχυρού οξειδωτικού (O<sub>2</sub>) και ενός ισχυρού αναγωγικού (CH<sub>2</sub>O). Αυτή η διαδικασία είναι θερμοδυναμικά απαγορευμένη. Το ενεργειακό φράγμα που πρέπει να υπερνικηθεί είναι 1.2V και αυτό απαιτεί τη συνεργασία και των δύο φωτοσυστημάτων. Το PSI παρέχει ένα ισχυρό αναγωγικό, που οδηγεί στη σύνθεση του NADPH, ενώ το PSII παρέχει ένα ισχυρό οξειδωτικό, που οδηγεί στη σύνθεση O<sub>2</sub>.

Η πορεία της φωτοσύνθεσης μπορεί να χωριστεί σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την απορρόφηση φωτός από τις χρωστικές του χλωροπλάστη, την οξείδωση του H<sub>2</sub>O, την παραγωγή του NADPH και την σύνθεση του ATP, μέσω μιας σειράς αντιδράσεων, που λέγονται φωτεινές αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα στις θυλακοειδείς μεμβράνες. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την κατανάλωση του NADPH και του ATP για την αναγωγή του CO<sub>2</sub> σε CH<sub>2</sub>O, μέσω μιας σειράς αντιδράσεων, που πραγματοποιούνται στο στρώμα. Οι αντιδράσεις αυτές ονομάζονται σκοτεινές. Οι φωτεινές και οι σκοτεινές αντιδράσεις περιγράφονται με τις παρακάτω χημικές εξισώσεις:



### 1.3 Η ηλεκτρονιακή ροή στα φυτά

Αρχικά, η φωτεινή ενέργεια, που παγιδεύεται από τα μόρια των χρωστικών της φωτοσυνθετικής μεμβράνης, μεταφέρεται στα φωτοχημικά κέντρα αντίδρασης, μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενέργειας δια συντονισμού<sup>8</sup>. Στη περίπτωση του PSII, η απορρόφηση ενός φωτονίου από τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη του PSII, το P<sub>680</sub><sup>9</sup>, δημιουργεί το ισχυρό αναγωγικό P\*<sub>680</sub> (σχήμα 2). Αυτό ανάγει ένα μόριο φαιοφυτίνης<sup>10</sup> Pheo α (μια πορφυρίνη ταυτόσημης δομής με τη Chl a χωρίς όμως το μαγνήσιο). Η Pheo α λειτουργεί σαν ενδιάμεσος ηλεκτρονιακός μεταφορέας μεταξύ του P<sub>680</sub> και ενός συστήματος κινονών (Q<sub>A</sub> και Q<sub>B</sub>) που δρουν σε σειρά<sup>11,12</sup>. Η Q<sub>A</sub> είναι μια μόνιμα

δεσμευμένη πλαστοκινόνη, ενώ η  $Q_B$  είναι μια παροδικά δεσμευμένη πλαστοκινόνη που προέρχεται από τη δεξαμενή ελεύθερης πλαστοκινόνης της μεμβράνης. Με τη μεταφορά του ηλεκτρονίου στην  $Q_A$  επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση του πρωτοταγούς διαχωρισμού φορτίου. Η  $Q_A^-$  στη συνέχεια ανάγει την  $Q_B$ . Μετά από ένα δεύτερο διαχωρισμό φορτίου, η  $Q_B^-$  προσλαμβάνει ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο και πρωτονιώνεται σχηματίζοντας πλαστοκινόλη ( $QBH_2$ ). Οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων από το  $P_{680}$  στην πλαστοκινόνη είναι γνωστές σαν αντιδράσεις της αναγωγικής πλευράς του PSII. Η  $Q_B$ , η οποία είναι δεσμευμένη στην D1 (μια πρωτεΐνη του PSII-RC), μετά τη πρόσληψη του δεύτερου ηλεκτρονίου, αντικαθίσταται από ένα μόριο κινόνης που προέρχεται από την δεξαμενή πλαστοκινόνης. Έτσι οι  $Q_A$  και  $Q_B$  μαζί σχηματίζουν μια πύλη δύο ηλεκτρονίων, που συνδέει την αναγωγή δύο ηλεκτρονίων της πλαστοκινόνης με τις οξειδώσεις ενός ηλεκτρονίου του  $P_{680}$ .

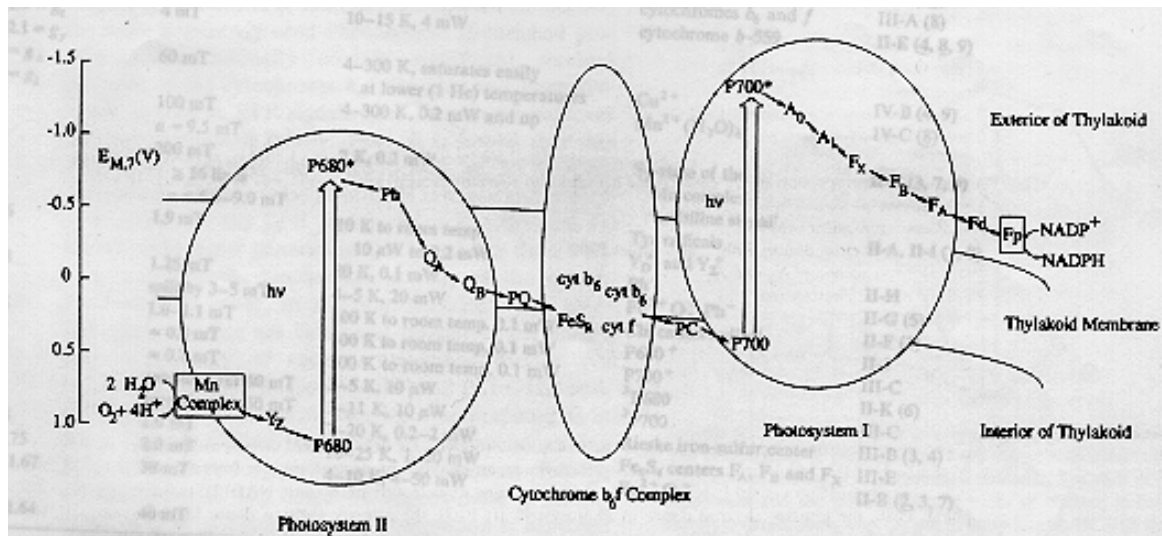
Η πλαστοκινόλη που ελευθερώνεται αποτελεί την πηγή ηλεκτρονίων για το σύμπλοκο Cyt  $b_6f$ . Μέσω του Cyt  $b_6f$  το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται σε ένα μικρό μόριο πλαστοκυανίνης (PC), που βρίσκεται στη lumen πλευρά της μεμβράνης. Η πλαστοκυανίνη αποτελεί τον ενδιάμεσο κρίκο για την μεταφορά των ηλεκτρονίων από το PSII προς το PSI.

Παράλληλα, στο PSI ο φωτοεπαγόμενος διαχωρισμός φορτίου έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό της ρίζας  $P_{700}^+$ . Η ρίζα αυτή προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο από την πλαστοκυανίνη, ενώ το ηλεκτρόνιο του  $P_{700}$  μεταφέρεται στη πλευρά του στρώματος, μέσω ενός συστήματος κέντρων Fe-S και φερρεδοξίνης στο ένζυμο οξειδοαναγωγή φερρεδοξίνης-NADP<sup>+</sup> (FNR) σχηματίζοντας NADPH.

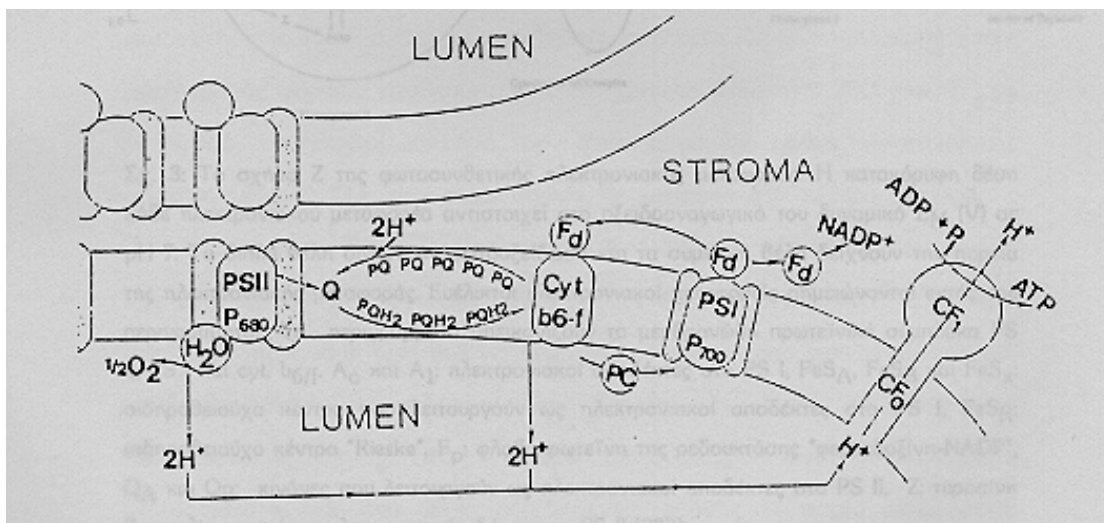
Η ρίζα  $P_{680}^+$ , που σχηματίζεται κατά τον πρωτοταγή διαχωρισμό φορτίου στο PSII, είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό, ικανό να αποσπά ηλεκτρόνια από το  $H_2O$ , μέσω μιας οξειδοαναγωγικά ενεργής τυροσίνης (Tyr Z) και του συμπλόκου του Mn, με αποτέλεσμα την παραγωγή  $O_2$ .

Όταν η ηλεκτρονιακή μεταφορά από το Mn μέσω της  $Y_Z$  είναι παρεμποδισμένη, άλλοι PSII συμπαραγοντες παρέχουν εναλλακτικούς δρόμους<sup>13</sup>. Το Cyt  $b_{559}$  και μια χλωροφύλλη δρουν σαν εναλλακτικοί δότες ηλεκτρονίων προς το οξειδωμένο  $P_{680}$ .

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των κέντρων αντίδρασης είναι η οργάνωση των συμπαραγόντων στη θυλακοειδή μεμβράνη (σχήμα 3), έτσι ώστε να παρέχουν μια ανυσματική μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου της μεμβράνης. Η ανυσματική μεταφορά ηλεκτρονίων είναι συζευγμένη με τη μεταφορά πρωτονίων προς το lumen. Αυτή η μεταφορά πρωτονίων παράγει μια διαμεμβρανική πρωτονιακή διαβάθμιση, η οποία αποτελεί την κινητήρια δύναμη για την σύνθεση του ATP από το ένζυμο ATP-συνθάση.



Σχήμα 2: Το σχήμα Z της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων<sup>12</sup>



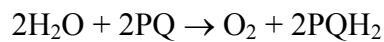
Σχήμα 3: Οργάνωση της θυλακοειδούς μεμβράνης<sup>14</sup>



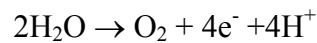
Οι θυλακοειδείς μεμβράνες περιέχουν τους παράγοντες μεταφοράς ενέργειας: τις πρωτεΐνες συλλογής φωτός, τα κέντρα αντίδρασης, τις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων και την ATP-συνθάση. Το PSII εντοπίζεται κυρίως στα θυλακοειδή των grana, ενώ το PSI και η ATP-συνθάση εντοπίζονται κυρίως στα θυλακοειδή του στρώματος. Το Cyt b<sub>6</sub>f είναι ομοιόμορφα κατανεμημένο και στις δυο περιοχές<sup>15</sup>.

#### 1.4 Το Φωτοσύστημα II

Το PSII είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών-χρωστικών με μοριακή μάζα γύρω στα 850 kDa<sup>16</sup>. Το σύμπλοκο αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια οξειδοαναγωγή νερού - πλαστοκινόνης καταλύοντας την αντίδραση:



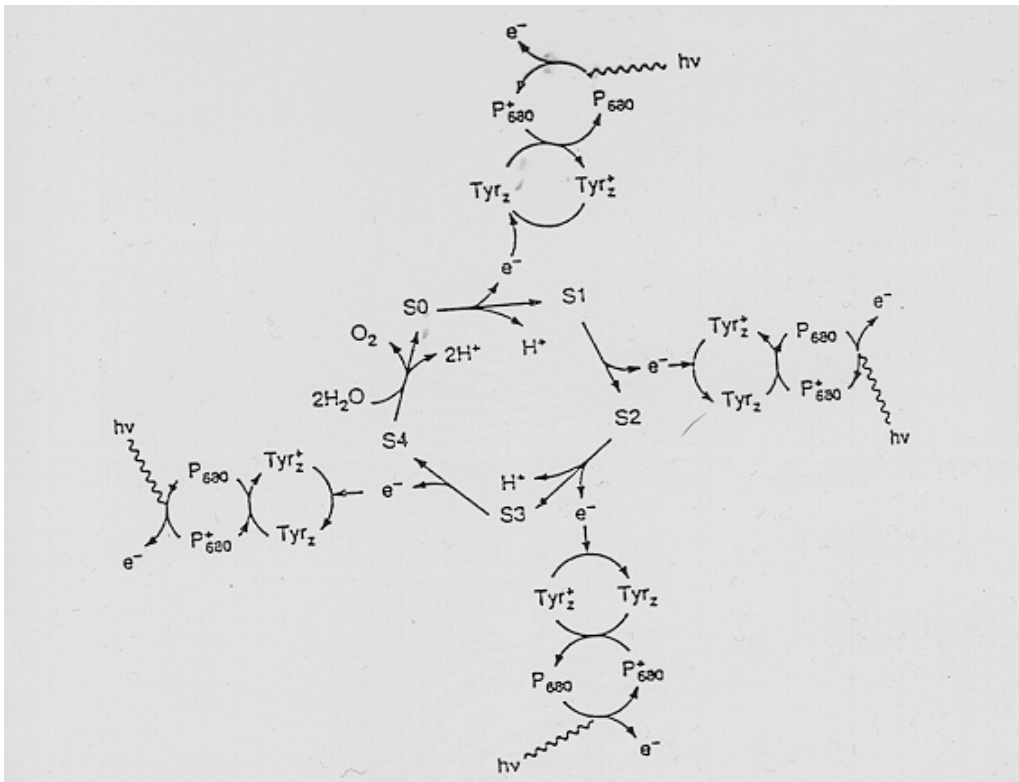
Ένας αριθμός ανόργανων συμπαραγόντων συνδέεται με την οξείδωση του νερού<sup>17</sup>. Το σύμπλοκο του μαγγανίου παρέχει τη θέση δέσμευσης και οξείδωσης του νερού. Για την παραγωγή ενός μορίου O<sub>2</sub> απαιτείται η μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων:



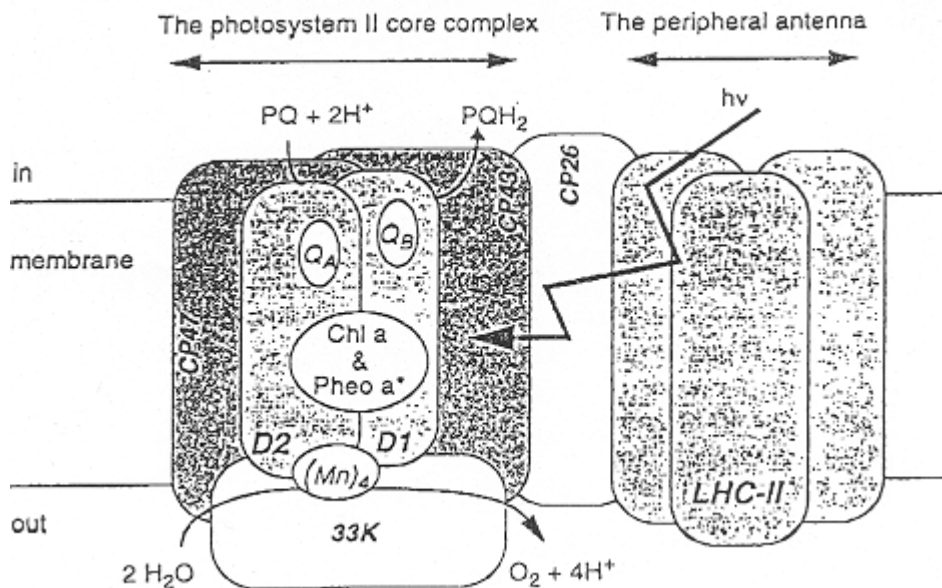
Επομένως, για να γίνει η διάσπαση του H<sub>2</sub>O πρέπει να γίνει η συσσώρευση τεσσάρων οξειδωτικών ισοδυνάμων. Αυτή η συσσώρευση λαμβάνει χώρα στο σύμπλοκο παραγωγής οξυγόνου που περιέχει τέσσερα ιόντα Mn στην καταλυτική του περιοχή<sup>18,19,20</sup>. Το σύμπλοκο του Mn έχει την μοναδική ιδιότητα να λειτουργεί σαν μια μπαταρία. Κάθε διαχωρισμός φορτίου στο PSII έχει σαν αποτέλεσμα την οξείδωση του OEC από τον οξειδωμένο πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη P<sub>680</sub><sup>+</sup>. Το σύμπλοκο ανακυκλώνεται, σύμφωνα με το μοντέλο του Kok<sup>21</sup>, μέσω πέντε διαφορετικών οξειδωτικών καταστάσεων, S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> (σχήμα 4). Η διαδοχική απόσπαση τεσσάρων ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο του Mn οδηγεί στην έκλυση ενός μορίου O<sub>2</sub>. Μετά από επώαση στο σκοτάδι<sup>22,23</sup> τα περισσότερα κέντρα αντίδρασης βρίσκονται στη κατάσταση S<sub>1</sub>, ενώ ένα μικρό κλάσμα των κέντρων (0-25%) βρίσκεται στην κατάσταση S<sub>0</sub>. Επιπλέον για να γίνει η οξείδωση του H<sub>2</sub>O, απαιτούνται<sup>24</sup> δύο ή τρία ιόντα Ca<sup>2+</sup> και ένας αριθμός ιόντων Cl<sup>-</sup>.

Το PSII απαρτίζεται από δύο διαφορετικής λειτουργίας σύμπλοκα χρωστικών-πρωτεϊνών: το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHCII)<sup>25</sup> και τον πυρήνα (PSII-core) (σχήμα 5). Το LHCII συνδέεται με τον πυρήνα μέσω τριών πρωτεϊνών δέσμευσης Chl a/b, που ονομάζονται CP24, CP26 και CP29. Ο πυρήνας περιέχει το κέντρο αντίδρασης, το σύμπλοκο παραγωγής οξυγόνου, ένα σύμπλοκο υδρόφιλων πρωτεϊνών που διευκολύνουν και ενισχύουν την παραγωγή οξυγόνου και μερικές υδρόφοβες πρωτεΐνες.

Υπερδιέγερση του PSII σε σχέση με το PSI, προκαλεί αναγωγή της δεξαμενής της πλαστοκινόνης<sup>26</sup>. Αυτό ενεργοποιεί μια κίνηση δεσμευμένη στο Cyt b<sub>6</sub>f που φωσφορυλιώνει το LHCII. Με την φωσφορυλίωση, το LHCII αποσυνδέεται από το PSII και κινείται από τις μεμβράνες των grana προς τις μεμβράνες του στρώματος, όπου μεταφέρει την ενέργεια ενεργοποίησης στο PSI και με αυτό τον τρόπο οξειδώνει τη δεξαμενή της πλαστοκινόνης του PSII. Εκτός του LHCII, φωσφορυλιώνονται και οι πρωτεΐνες CP43, D1 και D2.



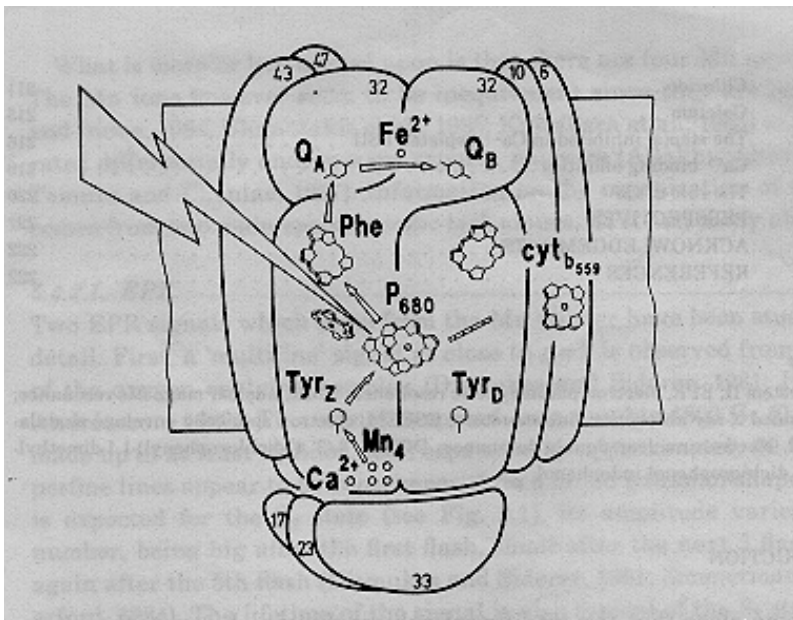
Σχήμα 4: Το μοντέλο του Kok<sup>27</sup>



Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση του πυρήνα του PSII και του LHCII<sup>28</sup>

Η βιοχημική βελτίωση της απομόνωσης των μεμβρανών του PSII είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση διαφόρων υποσυμπλόκων<sup>29,30,31</sup> του. Η επιλεκτική απομάκρυνση των επιμέρους πρωτεϊνών βοήθη στην καλύτερη κατανόηση των δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών του συμπλόκου.

Το μικρότερο υποσύμπλοκο του PSII, που έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα και είναι ικανό να καταλύει τη φωτοχημική διάσπαση του νερού, αποτελείται από τα εξής πολυπεπίδια: τις πρωτεΐνες CP47 και CP43 που αποτελούν την εσωτερική κεραία του PSII, τις πρωτεΐνες του κέντρου αντίδρασης D1 (32 kDa) και D2 (34 kDa), τις 10 kDa και 6 kDa, το Cyt b559, το προϊόν του γονιδίου psbI (4 kDa), την υδρόφιλη πρωτεΐνη 33 kDa και άλλες τρεις μικρότερες πρωτεΐνες<sup>30,31</sup> (σχήμα 6).



Σχήμα 6: Δομικό μοντέλο του PSII των ανωτέρων φυτών. Το μοντέλο περιλαμβάνει τα κυριότερα πολυπεπίδια και τους συμπαράγοντες που συμμετέχουν στη φωτοχημεία του PSII<sup>32</sup>.

Εκτός από τις παραπάνω πρωτεΐνες, το PSII περιλαμβάνει και άλλες εσωτερικές πρωτεΐνες με φαινομενικά μοριακά βάρη 24<sup>33</sup>, 22<sup>34</sup>, 10<sup>35</sup>, 6.5-7<sup>36</sup>, 3.3<sup>36</sup>, 4.8<sup>37</sup> και 2kDa<sup>38</sup>. Η λειτουργία τους είναι προς το παρόν άγνωστη. Πιστεύεται ότι μερικές είναι απαραίτητες για την αποτελεσματική λειτουργία του πυρήνα του PSII και ότι άλλες είναι υπολείμματα της εξέλιξης των φωτοσυνθετικών οργανισμών, χωρίς ιδιαίτερη λειτουργική σημασία.

Η 33 kDa μαζί με τις 23 kDa και 17 kDa αποτελούν τις εξωτερικές πρωτεΐνες του PSII. Τα πολυπεπίδια αυτά συγκρατούνται στη lumen πλευρά των θυλακοειδών με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και απομακρύνονται εύκολα με την έκθεση των μεμβρανών σε υψηλή ιονική ισχύ. Η 33 kDa εντοπίζεται σε όλους τους οξυγονικούς οργανισμούς, ενώ η 23 kDa και η 17 kDa απουσιάζουν στα κυανοβακτήρια<sup>39</sup>. Οι 23 kDa και 17 kDa πρωτεΐνες συνδέονται με την απαίτηση του συστήματος για ιόντα Ca<sup>2+</sup> και Cl<sup>-</sup>. Επιπλέον, η παρουσία της 23 kDa προστατεύει το σύμπλοκο του μαγγανίου από την επίδραση εξωγενών αναγωγικών, όπως η υδροκινόνη<sup>40</sup>.

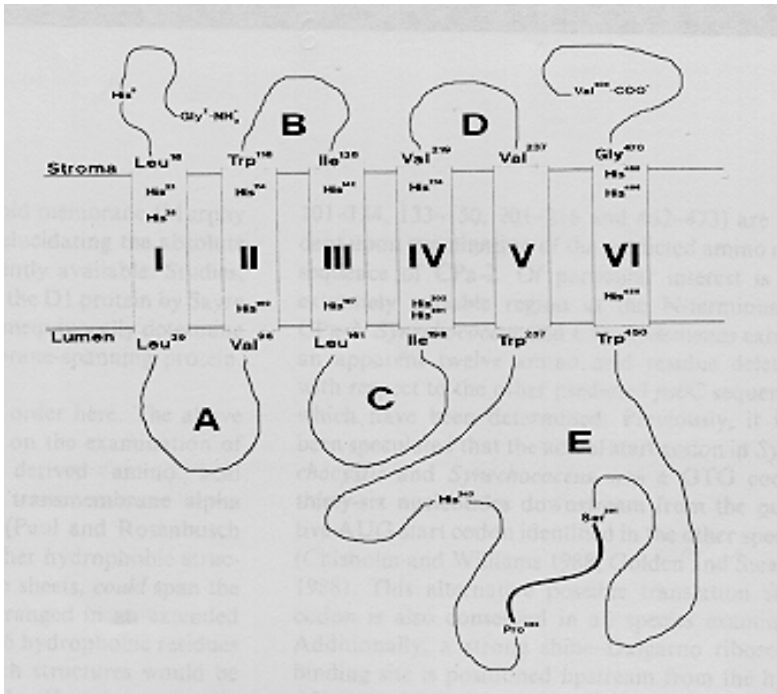
Η 33 kDa παίζει κεντρικό ρόλο στην σταθεροποίηση του συμπλόκου του μαγγανίου<sup>41,42</sup>. Μετά την απομάκρυνση της 33 kDa από παρασκευές PSII, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων χλωρίου<sup>43</sup> (μεγαλύτερες από 100mM) το σύμπλοκο του

μαγγανίου παραμένει σταθερό και έκλυση οξυγόνου λαμβάνει χώρα σε χαμηλά επίπεδα (περίπου 25%), ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις χλωρίου<sup>44,45,46</sup> (λιγότερο από 100mM) το σύμπλοκο αποσταθεροποιείται.

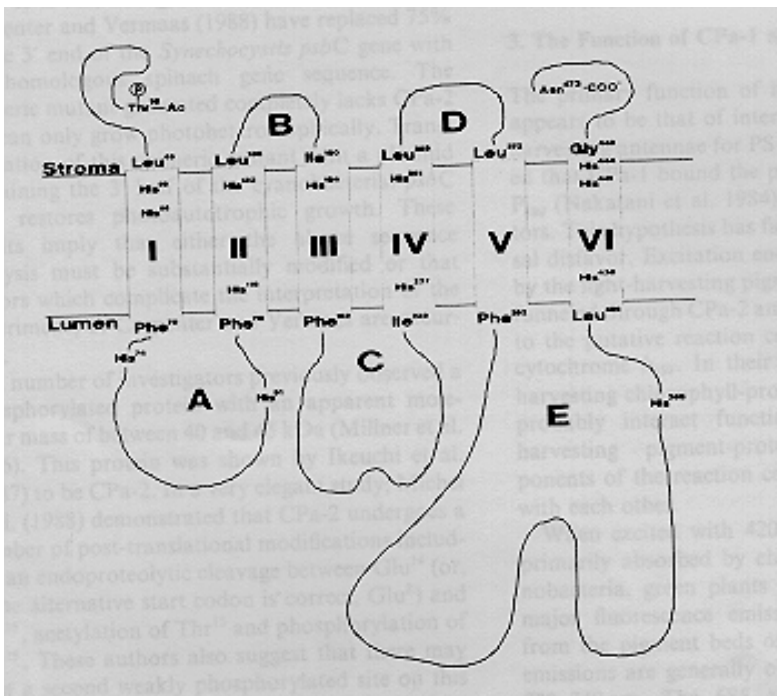
Οι πρωτεΐνες CP47 και CP43 λειτουργούν σαν εσωτερικοί αγωγοί της ενέργειας ενεργοποίησης από τη φωτοσυνθετική κεραία προς το φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II. Δομικά, οι δυο πρωτεΐνες είναι αρκετά όμοιες. Κάθε μια περιέχει έξι διαμεμβρανικές έλικες και ένα μεγάλο εξωτερικό βρόχο προς τη lumen πλευρά της μεμβράνης (σχήματα 7 και 8 αντίστοιχα)<sup>47,48,49</sup>. Η CP43 συνδέεται πιο χαλαρά στον πυρήνα του φωτοσυστήματος II, σε σχέση με την CP47. Χαοτροπικά μέσα ή επιπλέον κατεργασία με απορρυπαντικό αφαιρούν εύκολα την CP43<sup>50,51,52</sup>. Απουσία της CP43, το PSII-core παραμένει μερικά ενεργό<sup>53</sup>, ενώ χάνει τις πλαστοκινόνες Q<sub>A</sub> και Q<sub>B</sub>. Η CP47 είναι στενά συνδεδεμένη με το PSII-RC. Η πρωτεΐνη αυτή απομακρύνεται με επώαση σε συνδυασμό απορρυπαντικού και χαοτροπικού μέσου.

Το προϊόν του γονιδίου psbI περιέχει μια διαμεμβρανική έλικα<sup>54,55</sup>. Το Cyt b559 αποτελείται από ένα ετεροδιμερές δύο υπομονάδων<sup>56</sup>, την 9 kDa (α υπομονάδα) και την 4.5 kDa (β υπομονάδα). Κάθε υπομονάδα περιέχει μια μοναδική διαμεμβρανική έλικα. Το προϊόν του γονιδίου psbI και το Cyt b559 μπορούν να αφαιρεθούν με επιπλέον προσθήκη απορρυπαντικού, που δίνει το σύμπλοκο D1-D2, το οποίο είναι ικανό να διεξάγει το πρωτοταγή διαχωρισμό φορτίου<sup>57</sup>.

Οι πρωτεΐνες D1 και D2 απαρτίζουν το κέντρο αντίδρασης του PSII. Δομικά, οι δυο αυτές πρωτεΐνες παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες και σχηματίζουν ένα διμερές με ψευδοαξονική συμμετρία. Η κάθε μια περιέχει πέντε διαμεμβρανικές έλικες<sup>58</sup>. Το ετεροδιμερές των D1/D2 δεσμεύει όλους τους απαραίτητους συμπαράγοντες για να λάβει χώρα η φωτοχημική αντίδραση<sup>59</sup>. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι χλωροφύλλες του πρωτοταγούς δοτή P<sub>680</sub>, ο πρωτοταγής ηλεκτρονιοδέκτης Pheo α, η Q<sub>A</sub> και η Q<sub>B</sub>, ένας ανόργανος σίδηρος καθώς επίσης και οι οξειδοαναγωγικά ενεργές τυροσίνες Z και D. Επιπλέον, τέσσερις συμπληρωματικές χλωροφύλλες, μια μη φωτοχημικά ενεργή φαιοφυτίνη και ένα ή δυο β καροτένια πιθανώς να είναι δεσμευμένα.



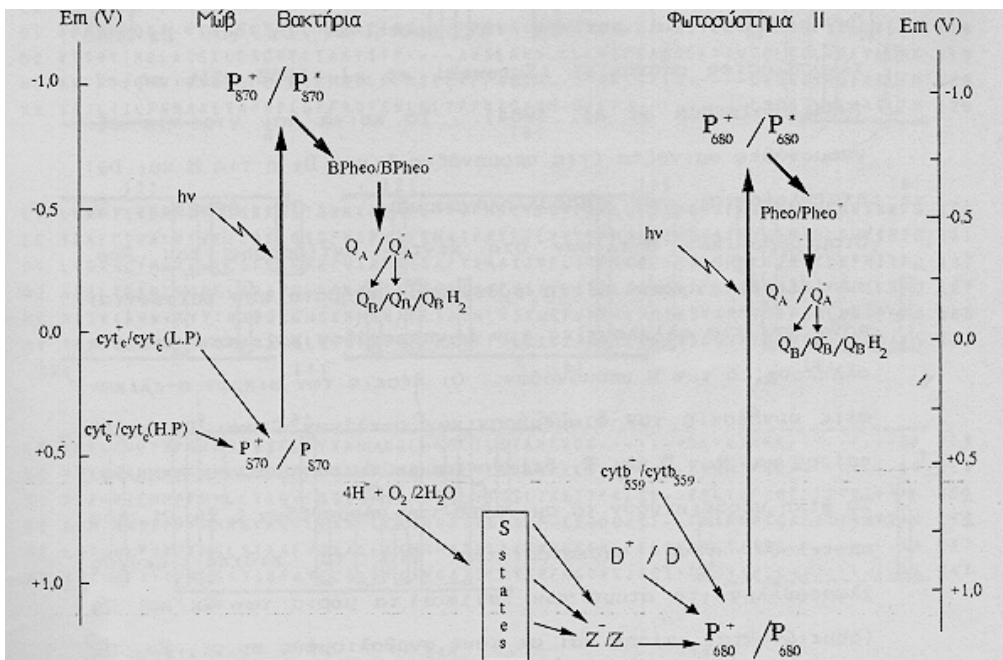
Σχήμα 7: Τοπολογία της πρωτεΐνης CP47, η οποία βασίζεται σε μελέτες υδροπαθητικότητας<sup>49</sup>.



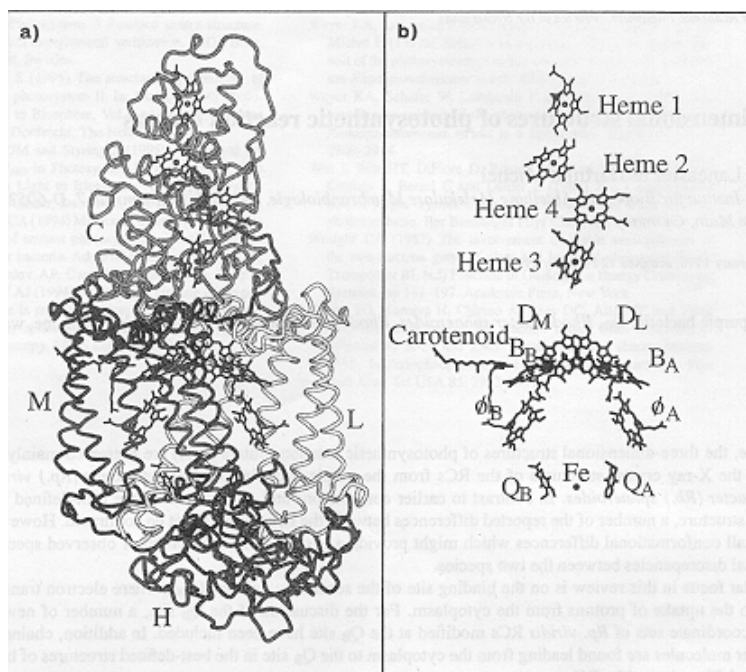
Σχήμα 8: Τοπολογία της πρωτεΐνης CP43, η οποία βασίζεται σε μελέτες υδροπαθητικότητας<sup>49</sup>.

## 1.5 Σύγκριση των κέντρων αντίδρασης του PSII και των μωβ μη θειούχων βακτηρίων

Τα φωτοσυνθετικά κέντρα αντίδρασης του PSII και των μωβ βακτηρίων εμφανίζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά<sup>60</sup>. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί ότι υπάρχουν μεγάλες δομικές και λειτουργικές ομοιότητες μεταξύ της αναγωγικής πλευράς<sup>61,62,63,64,65</sup> (σχήμα 9) του κέντρου αντίδρασης του PSII και των μωβ μη θειούχων βακτηρίων *Rps. viridis* και *Rb. sphaeroides*, των οποίων η δομή έχει προσδιοριστεί πλήρως<sup>66,67</sup>. Στα μωβ βακτήρια οι πρωτεΐνες του κέντρου αντίδρασης L και M σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές που περιέχει τα οξειδοαναγωγικά κέντρα: δύο βοηθητικές βακτηριοχλωροφύλλες BChl (μια σε κάθε υπομονάδα), δύο βακτηριοφαιοφυτίνες BPheo (μια σε κάθε υπομονάδα), δύο κινόνες την Q<sub>A</sub> (που συνδέεται κυρίως με την M) και την Q<sub>B</sub> (που συνδέεται κυρίως με την L), ένα ανόργανο Fe που αλληλεπιδρά και με τις δυο υπομονάδες και το ειδικό ζεύγος μορίων BChl που δρα ως ο πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης (σχήμα 10). Πιστεύεται ότι και στο PSII οι πρωτεΐνες του κέντρου αντίδρασης D1 και D2 έχουν μια παρόμοια διευθέτηση, με την D1 ομόλογη προς την L και την D2 ομόλογη προς την M. Αυτή η άποψη επιβεβαιώθηκε με την απομόνωση και το χαρακτηρισμό ενός PSII-RC που περιείχε τις D1, D2, Cyt b<sub>559</sub> και το προϊόν του γονιδίου *psbI*<sup>68,69</sup>.



Σχήμα 9: Σχηματική αναπαράσταση των κέντρων αντίδρασης των μωβ βακτηρίων και του PSII<sup>70</sup>



Σχήμα 10: Η δομή του RC από *Rps. viridis*.

α) Οι τέσσερις υπομονάδες

β) Οι δεκατέσσερις συμπαραγόντες<sup>71</sup>

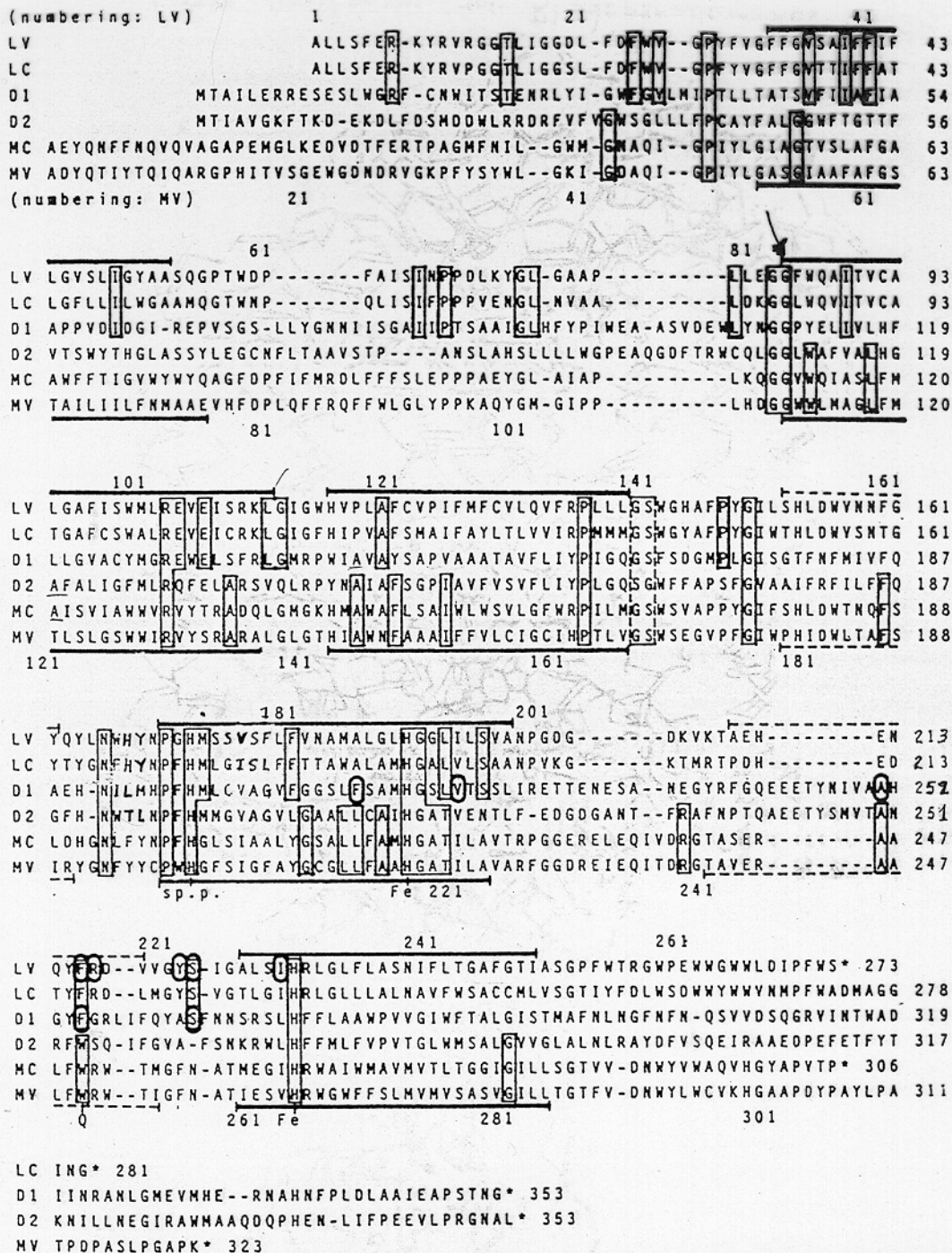
Η ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων μεταξύ των πρωτεϊνών D1, D2 και L, M, αντίστοιχα, αν και περιορισμένη, είναι σημαντική γιατί αφορά αμινοξέα με δομική σημασία όπως γλυκίνες, προλίνες και αργινίνες, καθώς επίσης και αμινοξέα που συμμετέχουν στη σύνδεση των συμπαραγόντων<sup>65</sup> (σχήματα 11 και 12). Συγκεκριμένα, διατηρούνται οι ιστιδίνες L-173 και M-200 (D1-198, D2-196, αντίστοιχα), που συναρμολύονται με τα άτομα του Mg του ειδικού ζεύγους BChl. Η αντιστοιχία αυτή οδηγεί στην άποψη ότι οι ιστιδίνες D1-198 και D2-196 αποτελούν τη θέση σύνδεσης του P<sub>680</sub>. Επίσης, διατηρούνται οι ιστιδίνες L-190, L-230, M-217, M-264 (D1-215, D1-272, D2-215, D2-269, αντίστοιχα), που συναρμολύονται με τον ανόργανο Fe. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι διατηρούνται τα αμινοξέα F216L και S223L (που αντιστοιχούν στα F255D1 και S264D1), τα οποία συμμετέχουν στη δέσμευση της Q<sub>B</sub> και των ζιζανιοκτόνων.



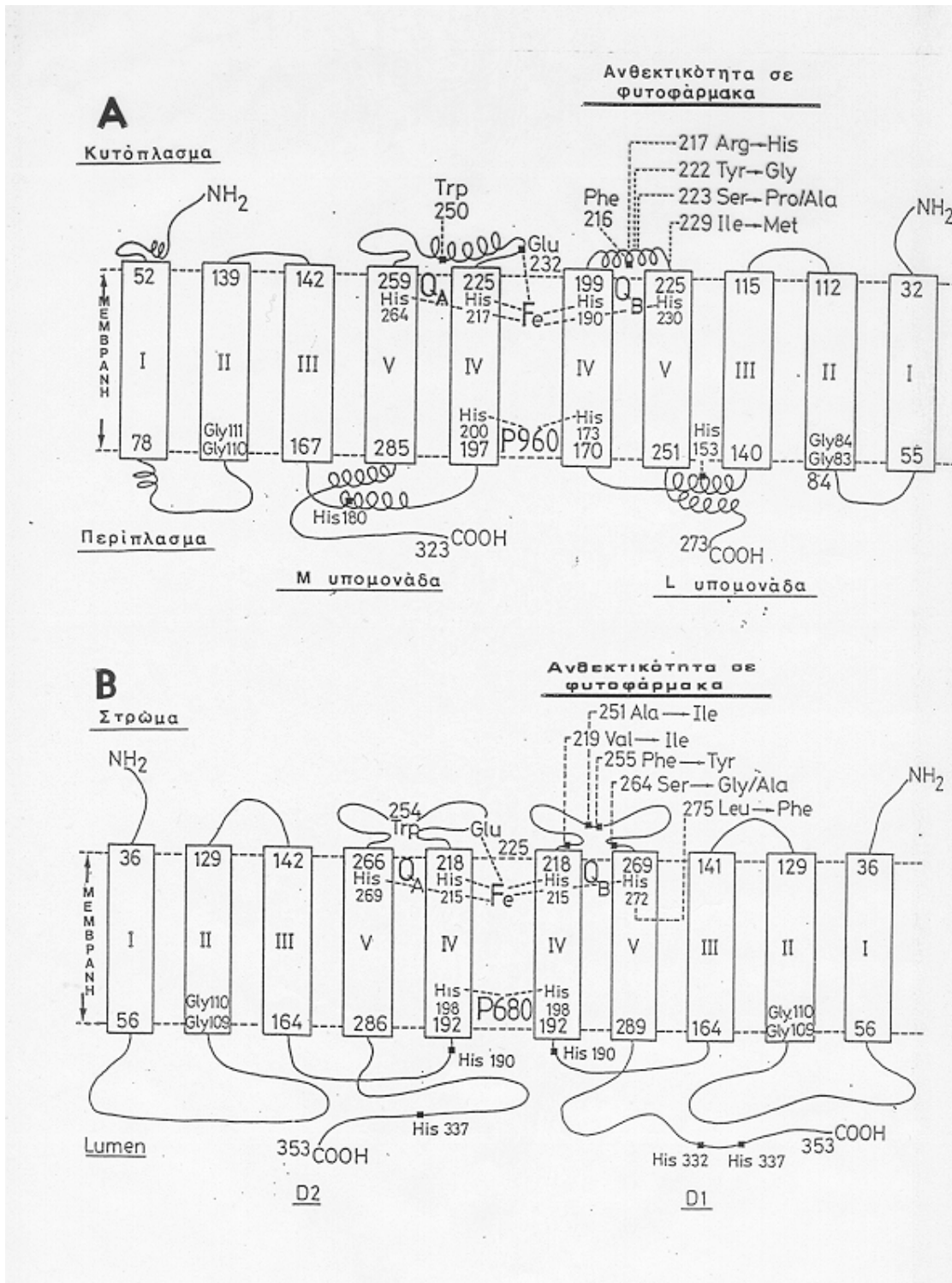
Οι Rhee et al.<sup>72</sup> ανέπτυξαν πρόσφατα δυσδιάστατους κρυστάλλους ενός PSII-core υποσυμπλόκου. Παρόλο που η πρωτεϊνική σύσταση των κρυστάλλων δεν προσδιορίστηκε, θεωρήθηκε ότι το υποσύμπλοκο περιείχε τις πρωτεΐνες D1, D2 και CP47 και η δομή του αναλύθηκε με ηλεκτρονική κρυσταλλογραφία στα 8Å διακριτικότητα. Σύγκριση της δομής με το βακτηριακό RC έδειξε ότι οι πρωτεΐνες D1 και D2 του PSII είναι όμοιες με τις βακτηριακές υπομονάδες L και M αντίστοιχα, όπως αναμένεται και από την ομολογία αλληλουχίας. Το γεγονός αυτό τους οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα δυο κέντρα αντίδρασης έχουν προέλθει από μια κοινή εξελικτική πορεία.

Αν και υπάρχει αξιόλογη ομολογία αλληλουχίας μεταξύ των δυο κέντρων αντίδρασης στην αναγωγική πλευρά, δεν υπάρχει καμία λειτουργική αναλογία μεταξύ τους στην οξειδωτική πλευρά. Αυτή η έλλειψη λειτουργικής αναλογίας αντικατοπτρίζεται από έλλειψη δομικής ομολογίας σε αυτήν την περιοχή μεταξύ PSII και των μωβ βακτηρίων.

Εκείνο που καθιστά τη λειτουργία του PSII μοναδική είναι η υψηλού δυναμικού αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που οδηγεί στην παραγωγή O<sub>2</sub>. Τα μωβ βακτηρία δεν εκλύουν O<sub>2</sub>, συνεπώς δεν θα κατέχουν τα δομικά μοτίβα που χρειάζονται για τη συναρμογή του συμπλόκου του μαγγανίου, ούτε τους ανόργανους συμπαραγόντες ούτε τις θέσεις δέσμευσης των εξωτερικών πρωτεϊνών του PSII.



Σχήμα 11: Οι αλληλουχίες των αμινοξέων των υπομονάδων L και M των μωβ βακτηρίων *Rps. viridis* (LV, MV) και *Rps. capsulatus* (LC, MC) συγκρίνονται με εκείνες των D1 και D2 από χλωροπλάστες σπανακιού. Τα κοινά αμινοξέα και για τις έξι υπομονάδες περικλείονται σε παραλληλόγραμμα. Οι θέσεις των διαμεμβρανικών α-ελίκων στο RC του *Rps. viridis* δείχνονται με τα ευθύγραμμα τμήματα που βρίσκονται πάνω από τις αλληλουχίες των L υπομονάδων και κάτω από τις αλληλουχίες των M υπομονάδων. Οι θέσεις των μικρών α-ελίκων στις συνδέσεις των διαμεμβρανικών α-ελίκων C και D, καθώς επίσης και των D και E, δείχνονται με διακεκομμένες γραμμές. Τα βέλη υποδεικνύουν τα αμινοξέα των υπομονάδων L και M, που αποτελούν τους υποκαταστάτες για το ειδικό ζεύγος χλωροφύλλης, το άτομο του Fe, και τα μόρια των Q<sub>A</sub> και Q<sub>B</sub> (σημειώνονται με τους συμβολισμούς sp.p., Fe, Q<sub>A</sub> και Q<sub>B</sub> αντίστοιχα). Οι κύκλοι φανερώνουν τα αμινοξέα, τα οποία αν υποστούν μετάλλαξη δίνουν RCs ανθεκτικά στα φυτοφάρμακα<sup>65</sup>.



Σχήμα 12Α: Διαγραμματική απεικόνιση της οργάνωσης των L και M υπομονάδων του RC από *Rps. viridis*, η οποία βασίζεται σε κρυσταλλογραφικά δεδομένα των Deisenhofer et al. (1985).

Σχήμα 12Β: Μοντέλο του τρόπου οργάνωσης των D1 και D2 υπομονάδων, το οποίο βασίζεται σε διαγράμματα υδροπαθητικότητας και σε συγκρίσεις με τη δομή των L και M υπομονάδων του σχήματος 12Α.<sup>73</sup>

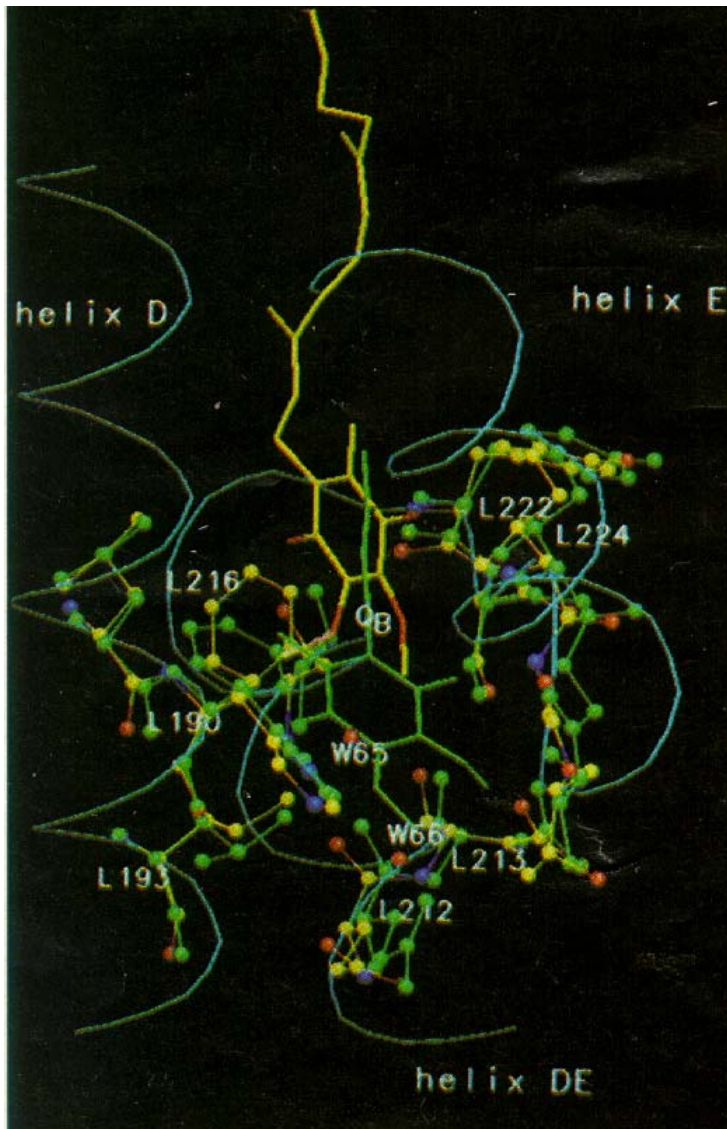
## 1.6 PSII-ζιζανιοκτόνα

Ένα κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ των δύο κέντρων αντίδρασης είναι η ιδιότητα της θέσης της  $Q_B$  να δεσμεύει μια σειρά από δομικά διαφορετικές ενώσεις<sup>74,75,76</sup>. Στις ενώσεις αυτές συμπεριλαμβάνονται και τα ζιζανιοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην γεωργία και ανήκουν σε διάφορες χημικές τάξεις: ουρία, τριαζίνες, ουρακίλες, φαινόλες και κυανοακρυλικά. Τα PSII-ζιζανιοκτόνα έχουν την ικανότητα να συναγωνίζονται με την κινόνη  $Q_B$  για την ίδια θέση δέσμησης, παρεμποδίζοντας έτσι την αναγωγή της, με συνέπεια την αναστολή της λειτουργίας του PSII.

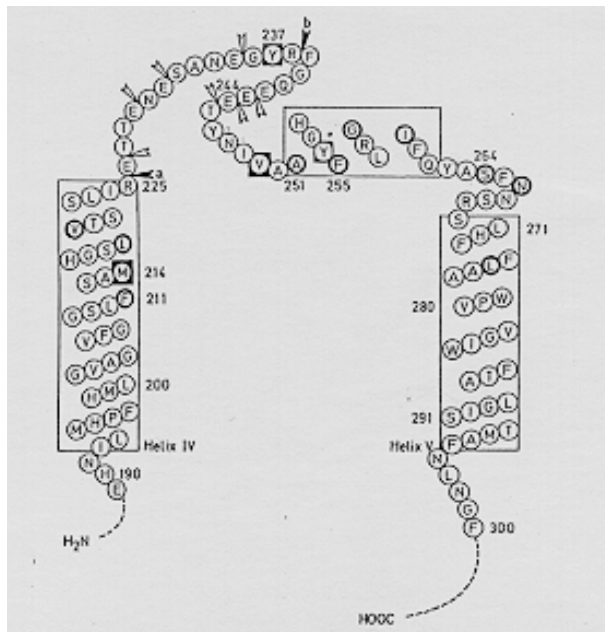
Σήμερα, έχουμε μια γενική εικόνα της αρχιτεκτονικής της κοιλότητας, όπου δεσμεύονται τα ζιζανιοκτόνα. Η εικόνα αυτή είναι κυρίως το αποτέλεσμα της κρυστάλλωσης του κέντρου αντίδρασης των μωβ βακτηρίων παρουσία διαφόρων ζιζανιοκτόνων και της ανάλυσης της δομής τους<sup>67,77,78</sup>. Στο σχήμα 13 φαίνεται η κοιλότητα δέσμησης της  $Q_B$  στο RC από *Rb. sphaeroides*.

Στο κέντρο αντίδρασης των μωβ βακτηρίων, η θέση δέσμησης των ζιζανιοκτόνων βρίσκεται στην L υπομονάδα στον συνδετικό βρόχο μεταξύ της τέταρτης (D) και της πέμπτης (E) διαμεμβρανικής έλικας (σχήμα 14). Οι αναλυτικές δομές των κέντρων αντίδρασης από τα φωτοσυνθετικά βακτηρία (*Rps. viridis* και *Rb. sphaeroides*) έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρότυπα για την κατασκευή τρισδιάστατων μοντέλων για ένα αριθμό υπομονάδων του PSII-RC συμπεριλαμβανομένης και της κοιλότητας δέσμησης των ζιζανιοκτόνων<sup>79,80,81,82,83</sup>.

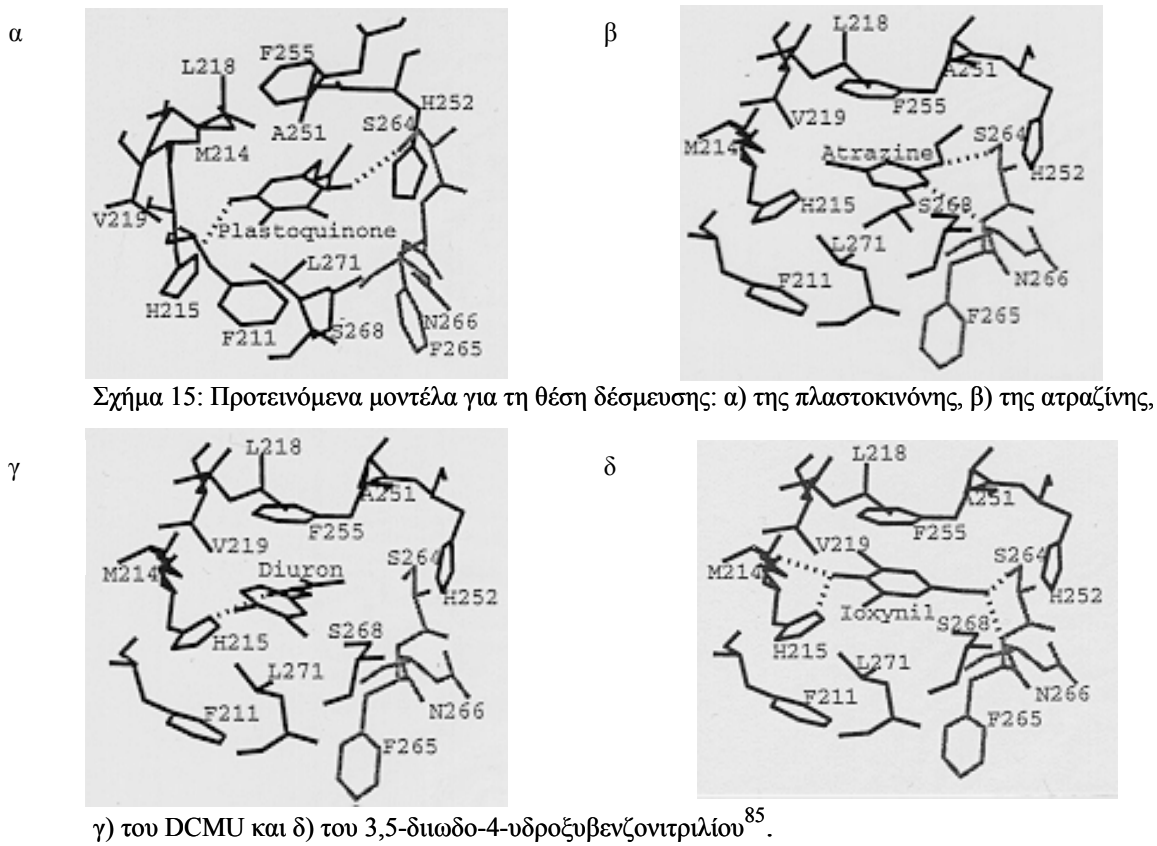
Σε αναλογία με το βακτηριακό RC, πιστεύεται ότι η θέση  $Q_B$  στο PSII σχηματίζεται αποκλειστικά από τα αμινοξέα της πρωτεΐνης D1, που αντιστοιχούν σε εκείνα της θέσης  $Q_B$  της L πρωτεΐνης<sup>84</sup>. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα His 215, Phe 255, Ser 264, Ser 268 της D1 υπομονάδας καταλαμβάνουν τις ίδιες θέσεις με τα αμινοξέα His 190, Phe 216, Ser 223, Ala 226, αντίστοιχα, της L υπομονάδας<sup>85</sup>. Το σχήμα 15 δείχνει την πλαστοκινόνη και μια σειρά από ζιζανιοκτόνα στη θέση  $Q_B$  στο PSII, σύμφωνα με προτεινόμενα μοντέλα.



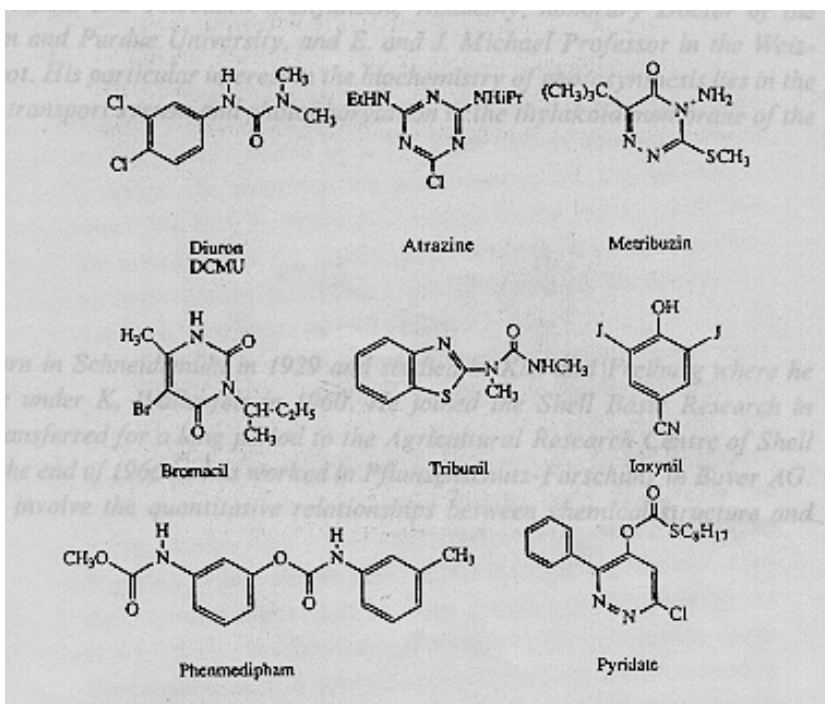
Σχήμα 13: Δομή της κοιλότητας δέσμευσης της  $Q_B$  στο RC Rb. sphaeroides και Rps. viridis. Στο σχήμα παρουσιάζονται οι δύο διαφορετικές θέσεις της  $Q_B$  (κίτρινο για το Rb. sphaeroides και πράσινο για το Rps. viridis)<sup>67</sup>.



Σχήμα 14: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής δέσμευσης των ζιζανιοκτόνων στο PSII<sup>86</sup>.



Στο σχήμα 16 παρουσιάζονται τα πιο γνωστά PSII-ζιζανιοκτόνα. Γενικά τα PSII-ζιζανιοκτόνα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: α) τα κλασσικά ζιζανιοκτόνα και β) οι φαινολικοί αναστολείς. Στα κλασσικά ζιζανιοκτόνα ανήκουν τα παράγωγα της ουρίας και της τριαζίνης. Κοινό στοιχείο των ενώσεων αυτών είναι η ύπαρξη της ομάδας X=C-NH (όπου X είναι N ή O) σε κοντινή προσέγγιση με ένα υδρόφοβο τμήμα. Αυτή η ομάδα αλληλεπιδρά μέσω δεσμών υδρογόνου με συγκεκριμένους πεπτιδικούς δεσμούς, που βρίσκονται σε μια πολική κοιλότητα στην D1 πρωτεΐνη. Η δεύτερη κατηγορία ζιζανιοκτόνων, οι φαινολικοί αναστολείς, δεσμεύονται στην ίδια κοιλότητα της D1 πρωτεΐνης, όπως τα κλασσικά ζιζανιοκτόνα, χωρίς όμως να αλληλεπιδρούν με τα ίδια ακριβώς αμινοξέα<sup>87</sup>.



Σχήμα 16: Ζιζανιοκτόνα που αναστέλλουν το PSII<sup>88</sup>.

Στα κλασσικά ζιζανιοκτόνα, η καρβονυλομάδα (όπως στην περίπτωση των παραγώγων της ουρίας και των τριαζινονών) ή μια αντίστοιχη ομάδα (όπως στην περίπτωση των τριαζινονών), είναι προσανατολισμένα προς την Ser 264. Στην περίπτωση των φαινολικών αναστολέων, η φαινολική ομάδα προσανατολίζεται προς την His 215.

Ωστόσο, παρά την αξιόλογη ομολογία στην αλληλουχία μεταξύ της θέσης δέσμευσης της  $Q_B$  των μωβ βακτηρίων και του PSII, οι φαινολικοί αναστολείς (με εξαίρεση το 2-ιωδο-4-νιτρο-6-ισοβουτυλο-φαινολη) και τα παράγωγα ουρίας έχουν μικρή έως αμελητέα δράση στο βακτηριακό RC. Αυτή η διαφοροποιημένη ενεργότητα των ζιζανιοκτόνων υποδηλώνει ότι υπάρχουν και κάποιες ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των δυο αντίστοιχων θέσεων δέσμευσης της  $Q_B$  στα βακτηρία και στο PSII.

Αποτέλεσμα της παρεμποδιστικής δράσης των ζιζανιοκτόνων στο PSII είναι η αναστολή της ηλεκτρονιακής ροής στα θυλακοειδή και κατά συνέπεια της σύνθεσης ATP. Επομένως, δεν παράγονται οι χρήσιμοι μεταβολικά υδατάνθρακες. Ωστόσο αυτός δεν είναι ο κύριος λόγος που οδηγεί στο θάνατο των φυτών.

Για το θάνατο των φυτών από τα ζιζανιοκτόνα ευθύνονται οι ελεύθερες ρίζες και οι ενεργές μορφές οξυγόνου, οι οποίες πιθανώς προέρχονται από τις ενδιάμεσες μορφές κάποιων οξειδοαναγωγικών παραγόντων. Αυτές οι ενεργές μορφές προκαλούν την οξείδωση της D1 πρωτεΐνης. Αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι η δράση των ζιζανιοκτόνων απαιτεί τη παρουσία φωτός.

Ακόμα και κάτω από φυσιολογικό φως, η D1 πρωτεΐνη διαρκώς καταστρέφεται και αντικαθίσταται από μια καινούρια<sup>89,90</sup>. Το σύμπλοκο που περιέχει την κατεστραμμένη D1, την D2, το Cyt b559 και το LHCI κινείται από τα θυλακοειδή των grana στα θυλακοειδή του στρώματος. Μια ενδογενής πρωτεάση κόβει την κατεστραμμένη D1 σε μια συγκεκριμένη θέση, στην Arg 238. Μια καινούρια D1 εισάγεται στο σύμπλοκο, το οποίο επιστρέφει στα θυλακοειδή των grana. Επειδή, η Arg 238 βρίσκεται στην περιοχή δέσμευσης του ζιζανιοκτόνου, το ζιζανιοκτόνο παρεμποδίζει τη δράση της πρωτεάσης, με συνέπεια το PSII να παραμένει ανενεργό. Η παραπέρα αναστολή της διόρθωσης της D1 προκαλεί αποσταθεροποίηση και διάλυση του PSII. Υπάρχουν όμως ζιζανιοκτόνα, τα οποία δεν παρεμποδίζουν την ανακύκλιση (turnover) της D1 κι αυτό λόγω του διαφορετικού προσανατολισμού τους μέσα στην κοιλότητα της  $Q_B$ . Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει το γεγονός ότι ορισμένοι αναστολείς (όπως οι φαινολικοί), ενώ έχουν *in vitro* δράση, παρεμποδίζοντας την ηλεκτρονιακή μεταφορά, είναι αδρανείς *in vivo*. Ωστόσο με αυτήν τη θεωρία δεν εξηγείται η *in vivo* δράση των



3,5-διωδο-4-υδροξυβενζονιτρίλιο και 3,5-διβρωμο-4-υδροξυβενζονιτρίλιο τα οποία δεν αναστέλλουν την ανακύκλωση της D1.

### **I.7 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών**

Είναι γνωστό ότι η φυσική τάση κάθε συστήματος που τείνει στην ισορροπία είναι να μεγιστοποιεί την εντροπία του. Παράλληλα, υπάρχει μια θερμοδυναμική απαίτηση για ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Το κύριο χαρακτηριστικό ενός κρυστάλλου είναι η περιοδική διευθέτηση των μορίων που τον αποτελούν, στο χώρο. Αυτή η συναρμολόγηση των μορίων σε ένα αυστηρό πλέγμα μειώνει την εντροπία του συστήματος. Οι αλληλεπιδράσεις, που κρατούν τα μόρια στο κρυσταλλικό πλέγμα, ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων, που περιέχεται στη στοιχειώδη κυψελίδα του πλέγματος. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι συγκεκριμένες και επαναλαμβάνονται στο χώρο με τέτοιο τρόπο ώστε να γίνεται μεγάλη μείωση της ελεύθερης ενέργειας. Η μείωση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος αποτελεί την κινητήρια δύναμη για κρυστάλλωση<sup>91</sup>.

Η κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης απαιτεί τον σταδιακό σχηματισμό ενός υπέρκορου διαλύματος της πρωτεΐνης. Με αυτό τον τρόπο, τα μόρια εξαναγκάζονται να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους δημιουργώντας μεγαλύτερα συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα αυτά, όταν γίνουν αρκετά μεγάλα, δεν είναι πλέον δυνατό να συγκρατηθούν από το διαλύτη και κατά συνέπεια, αποχωρίζονται από την υγρή φάση με παράλληλη επιστροφή του διαλύματος στην ισορροπία (κατάσταση κορεσμού).

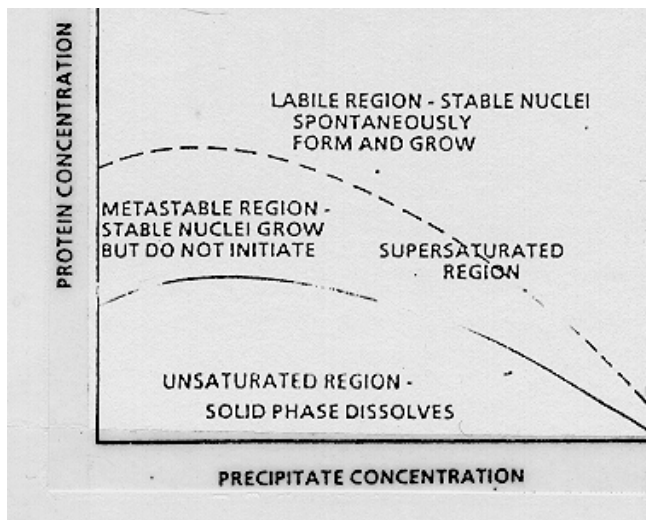
Η στερεή φάση δεν αναπτύσσεται αναγκαστικά μόλις το όριο κορεσμού ξεπεραστεί κι αυτό συμβαίνει γιατί απαιτείται ενέργεια ανάλογη με την ενέργεια ενεργοποίησης μιας αντίδρασης για να δημιουργηθεί η δεύτερη φάση, δηλαδή ένας σταθερός πυρήνας ενός κρυστάλλου ή ενός ιζήματος. Έτσι, ένα κινητικό ή ενεργειακό φράγμα, επιτρέπει στο σύστημα να απομακρυνθεί πολύ πέρα από τις συνθήκες ισορροπίας.

Το διάγραμμα φάσεων (σχήμα 17) που ακολουθεί, δείχνει τη μεταβολή των ορίων κορεσμού σε σχέση με τις συνθήκες και τις περιοχές όπου δημιουργούνται και μεγαλώνουν σταθεροί πυρήνες. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα φάσεων, υπάρχουν δύο

περιοχές υπερκορεσμού: η μετασταθής και η ζώνη πυρήνωσης. Ζώνη πυρήνωσης ονομάζεται η περιοχή όπου δημιουργούνται οι πυρήνες των κρυστάλλων. Μετασταθής ζώνη είναι η περιοχή όπου δεν δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλωσης, αλλά οι πυρήνες που προϋπάρχουν μπορούν να συνεχίζουν να μεγαλώνουν. Η ανάπτυξη του κρυστάλλου γίνεται με εναπόθεση μοριακών στρωμάτων στην επιφάνεια του και συνεχίζεται μέχρι να επανέλθει το σύστημα σε ισορροπία.

Ο ρυθμός ανάπτυξης του κρυστάλλου είναι συνάρτηση της απόστασης του διαλύματος από τη θέση ισορροπίας, δηλαδή την κατάσταση κορεσμού. Επομένως, ένας πυρήνας που σχηματίζεται μακριά από την ισορροπία, στην ζώνη πυρήνωσης, μεγαλώνει πολύ γρήγορα στην αρχή και καθώς το διάλυμα αραιώνεται και επανέρχεται στη μετασταθή περιοχή, μεγαλώνει ολοένα και πιο αργά. Όμως η κρυστάλλωση από διαλύματα με πολύ μεγάλο βαθμό υπερκορεσμού συχνά έχει σαν αποτέλεσμα πολλούς, μικρούς και ακανόνιστους κρυστάλλους, ακατάλληλους για ανάλυση ακτίνων X.

Σύμφωνα με το διάγραμμα φάσης, για την ιδανική ανάπτυξη ενός κρυστάλλου, το πρωτεϊνικό διάλυμα θα πρέπει να περάσει από την διαλυτή φάση στην ζώνη πυρήνωσης για τη δημιουργία των πυρήνων κρυστάλλωσης. Η παραμονή του διαλύματος στη ζώνη πυρήνωσης πρέπει να είναι σύντομη για να μη δημιουργηθούν πολλοί πυρήνες. Στη συνέχεια, το διάλυμα πρέπει να μεταπέσει στη μετασταθή ζώνη, όπου οι πυρήνες θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν για να δώσουν κρυστάλλους καλής ποιότητας και μεγέθους.



Σχήμα 17: Διάγραμμα φάσεων, στο οποίο απεικονίζεται η μεταβολή της διαλυτότητας μιας πρωτεΐνης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιδραστηρίου καταβύθισης<sup>91</sup>

Η πιο κοινή προσέγγιση για την κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης είναι η σταδιακή μεταβολή των χαρακτηριστικών του πρωτεϊνικού διαλύματος με σκοπό την επίτευξη των ιδανικών συνθηκών υπερκορεσμού. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι παράμετροι που επηρεάζουν τη διαλυτότητα και την κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης<sup>91,92</sup>. Οι δυσκολίες που παρουσιάζονται στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών, πηγάζουν από τη πολυπλοκότητα, την αστάθεια και τις δυναμικές ιδιότητες των μακρομορίων<sup>93</sup>. Οι κρύσταλλοι των μακρομορίων περιέχουν περίπου 50% διαλύτη, κατά μέσο όρο, ενώ η πρωτεΐνη καταλαμβάνει τον υπόλοιπο χώρο. Έτσι, οι κρύσταλλοι αυτοί μπορούν να θεωρηθούν ένα διατεταγμένο πήκτωμα (gel), με εκτεταμένους ενδιάμεσους χώρους, διαμέσου των οποίων μπορεί να γίνει ελεύθερη διάχυση του διαλύτη και άλλων μικρών μορίων. Σε αναλογία με τη μοριακή μάζα, ο αριθμός των δεσμών (γέφυρες άλατος, δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) που αναπτύσσει ένα απλό μόριο με τα γειτονικά μόρια στον κρύσταλλο υπερτερούν κατά πολύ, σε σχέση με τους ελάχιστους δεσμούς που εντοπίζονται στους κρυστάλλους των μακρομορίων. Το γεγονός ότι αυτές οι επαφές παρέχουν τις αλληλεπιδράσεις του πλέγματος, οι οποίες διατηρούν την ακεραιότητα του κρυστάλλου, εξηγεί τη τεράστια διαφορά μεταξύ των ιδιοτήτων των δύο ειδών κρυστάλλων.

<b>Πίνακας 1: Παράμετροι που επηρεάζουν την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών</b>
Πηγή μακρομορίου
Καθαρότητα
Ομοιογένεια
Πρωτεόλυση
Υποστρώματα, συνένζυμα, παρεμποδιστές
Πρόσθετα
pH
Ιονική ισχύς
Θερμοκρασία
Αντιδραστήριο καταβύθισης
Συγκέντρωση του αντιδραστηρίου καταβύθισης
Συγκέντρωση του μακρομορίου

### **I.8 Κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών**

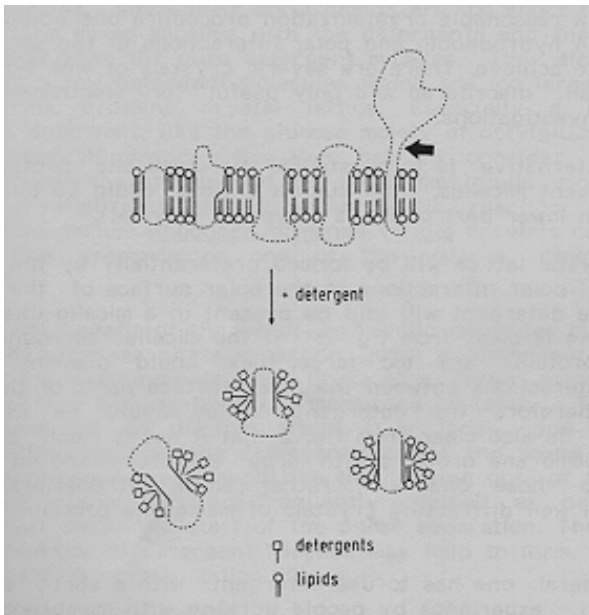
Οι δομικές μελέτες πάνω στις πρωτεΐνες υπήρξαν σημαντικές για την αποσαφήνιση πολλών ενζυματικών μηχανισμών. Για το λόγο αυτό, θεωρήθηκε απαραίτητη η επέκταση της μελέτης και στις μεμβρανικές πρωτεΐνες, καθώς διαδικασίες που καταλύονται από αυτές, όπως η φωτοσύνθεση, δεν είναι καλά κατανοητές.

Στην περίπτωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, όπου οι πρωτεΐνες είναι βυθισμένες μέσα σε διπλοστοιβάδες λιπιδίων, απαιτείται η χρήση απορρυπαντικού για τη διαλυτοποίηση και την κρυστάλλωση τους. Για πολλά χρόνια, θεωρούσαν ότι η κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών ήταν αδύνατη λόγω της αναγκαστικής παρουσίας του υψηλά αποδιαταγμένου απορρυπαντικού. Η θεωρία αυτή αποδείχθηκε εσφαλμένη με την κρυστάλλωση της βακτηριδιακής πορίνης<sup>94</sup> και της βακτηριοροδοψίνης<sup>95</sup>.

Μέχρι σήμερα έχουν λυθεί οι δομές από 8000 περίπου βιολογικά μακρομόρια, με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Ωστόσο, έχουν δημοσιευθεί αναλυτικές δομές μόνο από επτά οικογένειες μεμβρανικών πρωτεϊνών<sup>96,97</sup>. Το γεγονός αυτό τονίζει τις μεγάλες δυσκολίες που εμφανίζονται στο πεδίο των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι δυσκολίες οφείλονται στην αμφίφιλη φύση των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Κατέχουν μια υδρόφοβη επιφάνεια, η οποία έρχεται σε επαφή με τα λιπίδια της μεμβράνης και μια υδρόφιλη επιφάνεια, που είναι σε επαφή με τις πολικές ομάδες των λιπιδίων της μεμβράνης ή είναι εκτεθειμένη σε υδατική επαφή. Για το λόγο αυτό, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες δεν είναι διαλυτές σε υδατικά διαλύματα και για τη διαλυτοποίηση τους απαιτείται η παρουσία απορρυπαντικού, που προσομοιάζει το φυσικό τους περιβάλλον.

Τα απορρυπαντικά (σχήμα 18) είναι αμφίφιλα μόρια τα οποία έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν μικκύλια, όταν η συγκέντρωση υπερβεί μια συγκεκριμένη τιμή. Η συγκέντρωση αυτή ονομάζεται κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων. Το απορρυπαντικό καλύπτει την υδρόφοβη περιοχή της μεμβρανικής πρωτεΐνης με τις υδρόφοβες αλυσίδες του, σαν ζώνη. Οι πολικές ομάδες του απορρυπαντικού έρχονται σε επαφή με το υδατικό

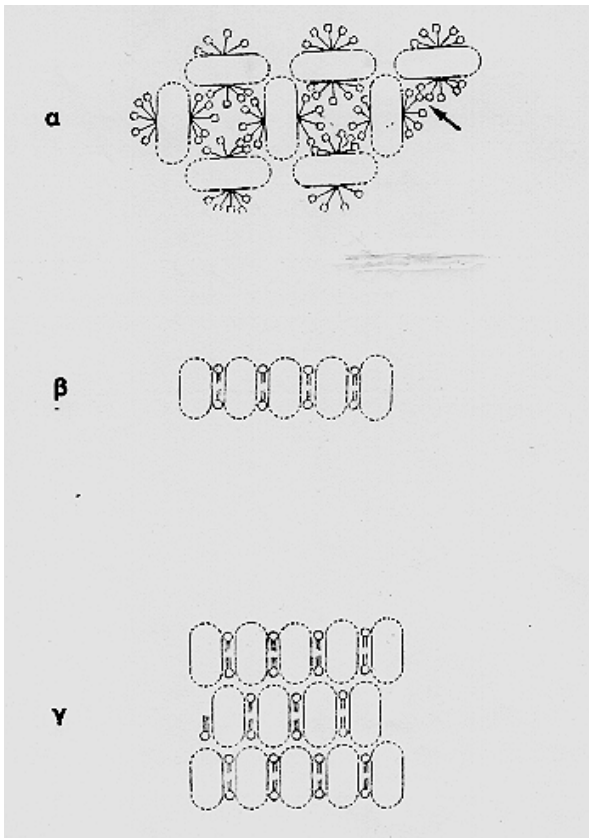
περιβάλλον. Με το σχηματισμό μικκυλίων, αποφεύγεται η άμεση επαφή μεταξύ των υδρόφοβων ομάδων της πρωτεΐνης και του νερού. Κατά τη διάλυση μεμβρανικών πρωτεϊνών με περίσσεια απορρυπαντικού, τα μικκύλια αντικαθιστούν τη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων. Σε ένα διάλυμα απορρυπαντικού πάνω από το CMC, κάθε μόριο πρωτεΐνης είναι ενσωματωμένη σε ένα μικκύλιο και με αυτό τον τρόπο μπορεί να διατηρήσει τις φυσιολογικές της ιδιότητες και λειτουργίες<sup>98,99,100,101</sup>.



Σχήμα 18: Σχηματική αναπαράσταση της διαλυτοποίησης μεμβρανικών πρωτεϊνών<sup>102</sup>.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να σχηματίσουν τρία διαφορετικά είδη κρυστάλλων (σχήμα 19), ανάλογα με τη φύση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που επικρατούν<sup>102</sup>. Στους τρισδιάστατους κρυστάλλους κυριαρχούν οι υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις. Οι κρύσταλλοι αυτοί αποτελούνται από μικκύλια πρωτεΐνης-απορρυπαντικού. Στην περίπτωση αυτή, η διαδικασία κρυστάλλωσης είναι παρόμοια με εκείνη των υδρόφιλων πρωτεϊνών. Αντίθετα, στους δυσδιάστατους κρυστάλλους κυριαρχούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και οι κρύσταλλοι αυτοί περιέχουν λιπίδια. Τα λιπίδια οργανώνονται σε μια διπλοστοιβάδα. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ενσωματώνονται αυθόρμητα στην διπλοστοιβάδα, η οποία μιμείται το φυσικό τους περιβάλλον, ιδίως στην περίπτωση που οι πρωτεΐνες δεν περιέχουν μεγάλα υδρόφιλα

τιμήματα. Μερικές φορές λαμβάνουν χώρα και τα δύο είδη αλληλεπιδράσεων και σχηματίζονται κρύσταλλοι ενδιάμεσης μορφής, που αποτελούνται από στρώματα δυσδιάστατων κρυστάλλων. Παρά το γεγονός ότι στους δυσδιάστατους κρυστάλλους, οι πρωτεΐνες συνήθως δεν έχουν ιδιαίτερα υψηλή διάταξη, οι κρύσταλλοι αυτοί παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή μιας πρωτεΐνης, ακόμα και όταν είναι μέτριας ποιότητας.



Σχήμα 19: Τα είδη των κρυστάλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών<sup>102</sup>:

- α) Τρισδιάστατοι κρύσταλλοι
- β) Δυσδιάστατοι κρύσταλλοι και
- γ) Κρύσταλλοι ενδιάμεσου τύπου.

Σε κάθε στρατηγική κρυστάλλωσης πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η αμφίφιλη φύση των επιφανειών των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Κρίσιμο σημείο για τη τρισδιάστατη κρυστάλλωση τους είναι η επιλογή του απορρυπαντικού. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία φαίνεται καθαρά ότι έστω και μικρές χημικές διαφορές στο απορρυπαντικό μπορούν να

προκαλέσουν ουσιαστικές διαφορές στη συμπεριφορά των συμπλόκων απορρυπαντικού-πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό η επιλογή του απορρυπαντικού παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο, μετά τη σταθερότητα και την ομοιογένεια της πρωτεΐνης. Το μέγεθος του μορίου του απορρυπαντικού πρέπει να είναι τέτοιο, ώστε να επιτρέπει την αλληλεπίδραση μεταξύ των συμπλόκων πρωτεΐνης-απορρυπαντικού. Οι πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών μικκυλίων συνεισφέρουν στη σταθερότητα του κρυσταλλικού πλέγματος. Αυτό φαίνεται και από το γεγονός ότι η κρυστάλλωση γίνεται συχνά κοντά στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα διαχωρισμός φάσης, σε περιοχή πλούσια σε απορρυπαντικό και περιοχή με ελάχιστο απορρυπαντικό. Ο διαχωρισμός φάσης οφείλεται στην αφυδάτωση των μικκυλίων και επηρεάζεται από την προσθήκη του αντιδραστηρίου καταβύθισης και/ή τη μεταβολή της θερμοκρασίας. Για την κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών γίνεται συχνά χρήση μικρών αμφίφιλων μορίων (όπως η επτανετριόλη-1,2,3, η εξανετριόλη-1,2,3 και η βενζαμίδινη), που έχουν την τάση να σχηματίζουν μεικτά μικκύλια με τα μόρια του απορρυπαντικού. Τα μεικτά μικκύλια είναι μικρότερα σε μέγεθος από εκείνα του καθαρού απορρυπαντικού, με συνέπεια την ευκολότερη προσαρμογή τους στο κρυσταλλικό πλέγμα.

Τεχνικές που παρέχουν τη δυνατότητα ανάλυσης της δομής μεμβρανικών πρωτεϊνών σε ατομικό επίπεδο είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων X, η ηλεκτρονική μικροσκοπία και το NMR. Από τις τεχνικές αυτές, η κρυσταλλογραφία ακτίνων X εξακολουθεί μέχρι και σήμερα να παρέχει την πιο άμεση, λεπτομερή και ακριβή περιγραφή της μακρομοριακής δομής.

## **I.9 Κρυσταλλογραφία ακτίνων X**

Όταν μια παράλληλη μονοχρωματική δέσμη ακτίνων X προσπέσει σε έναν κρύσταλλο και σκεδαστεί, δημιουργείται ενισχυτική συμβολή μόνο σε εκείνες τις διευθύνσεις, στις οποίες οι σκεδαζόμενες ακτίνες είναι σε φάση, δηλαδή η διαφορά των δρόμων τους είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος  $\lambda$ . Τα σημεία ενός κρυσταλλικού πλέγματος σχηματίζουν σύνολα ισαπέχοντων παράλληλων επιπέδων. Ένα ορισμένο σύνολο τέτοιων επιπέδων χαρακτηρίζεται από τρεις δείκτες  $h, k, l$  όπου  $a/h, b/k, c/l$  είναι τα σημεία τομής των αξόνων του πλέγματος από τα επίπεδα. Όπως δείχθηκε από

τον W.L.Bragg, τα σύνολα των επιπέδων (hkl) αποτελούν τη βάση για μια απλή αναπαράσταση της περίθλασης των ακτίνων X από τους κρυστάλλους. Μεταξύ ακτίνων που σκεδάζονται από διαδοχικά επίπεδα υπάρχει διαφορά δρόμου ίση με  $2d_{hkl}\eta\mu\theta$ , όπου  $d_{hkl}$  η κάθετη απόσταση μεταξύ των επιπέδων (hkl) και  $\theta$  η γωνία πρόσπτωσης. Για να είναι οι σκεδαζόμενες ακτίνες σε φάση, πρέπει η διαφορά δρόμου να είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος, δηλαδή πρέπει  $2d_{hkl}\eta\mu\theta=n\lambda$ . Από την εξίσωση αυτή προκύπτει το όριο της διακριτικής ικανότητας (resolution) ενός κρυστάλλου<sup>103</sup>:

$$d_{\min}=\lambda/2\eta\mu\theta_{\max}.$$

Ένα πλήρες διάγραμμα περίθλασης μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από μια τρισδιάστατη διευθέτηση κηλίδων, που σχηματίζει ένα κανονικό πλέγμα. Κάθε κηλίδα αναγνωρίζεται από μια τριπλέτα δεικτών h,k,l (από τα h,k,l επίπεδα από τα οποία προέρχεται). Οι θέσεις των ανακλάσεων και η συμμετρία των διαγραμμάτων περίθλασης αποκαλύπτουν το μέγεθος της στοιχειώδους κυψελίδας και τα στοιχεία συμμετρίας της. Οι σχετικές εντάσεις των ανακλάσεων καθορίζονται από την κατανομή του σκεδάζοντα υλικού στη στοιχειώδη κυψελίδα.



## II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η έρευνα πάνω στο πεδίο της φωτοσύνθεσης, σήμερα, έχει τρεις βασικούς στόχους:

α) Τη διαλεύκανση του ακριβούς μηχανισμού της, που θα οδηγήσει σε διεύρυνση των γνώσεων μας πάνω στη βιοχημεία-βιοενεργητική,

β) Τη δυνατότητα καλύτερης εκμετάλλευσης της ηλιακής ενέργειας και

γ) Την αύξηση της αγροτικής παραγωγής (πιο αποδοτικά φυτά και καλύτερα/πιο εκλεκτικά ζιζανιοκτόνα).

Παρά την αξιόλογη πρόοδο στις γνώσεις μας γύρω από τη δομή και τη λειτουργία του PSII, οι μοναδικές μηχανιστικές ιδιότητες αυτού του συμπλόκου παραμένουν αδιευκρίνιστες. Ένα μοντέλο ολόκληρου του λειτουργικού ενζύμου θα επέτρεπε το σχηματισμό μιας λεπτομερούς μηχανιστικής εικόνας της μεταφοράς φορτίου και της παραγωγής οξυγόνου. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X παραμένει η μοναδική μέθοδος για την επίλυση της δομής σε ατομικό επίπεδο. Παρά τις εντατικές προσπάθειες σε παγκόσμιο επίπεδο, μέχρι σήμερα, η παραγωγή ενός αναλυτικού μοντέλου έχει παρεμποδιστεί από την έλλειψη κρυστάλλων κατάλληλης ποιότητας για δομική ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Συνεπώς, είναι αναγκαία η ανάπτυξη κατάλληλων πρωτόκολλων για την τρισδιάστατη κρυστάλλωση του PSII.

Το PSII είναι αποδεδειγμένα ένα από τα πιο δύσκολα μεμβρανικά σύμπλοκα για μελέτη σε δομικό επίπεδο, για πολλούς λόγους. Προφανείς λόγοι είναι το σχετικά μεγάλο του μέγεθος και ο αμφίφιλος χαρακτήρας του, αφού αποτελείται από υδρόφιλες και υδρόφοβες πρωτεΐνες. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το PSII είναι ανομοιογενές ακόμα και σε ανέπαφες θυλακοειδείς μεμβράνες. Υπάρχουν ρυθμιστικοί μηχανισμοί οι οποίοι καθορίζουν τη σύσταση του συμπλόκου ανάλογα με τις συνθήκες φωτισμού. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι η σύσταση του μεταβάλλεται ως προς τα δεσμευμένα φωτοσυλλεκτικά πολυπεπίδια, που ρυθμίζονται κάθε φορά με μηχανισμούς φωσφορυλίωσης. Επίσης, μια ιδιαιτερότητα του PSII είναι η αυξημένη ευαισθησία ορισμένων πρωτεϊνών του και κυρίως της D1, η οποία υφίσταται διαρκή ανακύκλωση.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η κρυστάλλωση ολόκληρου του ενζυμικού συμπλόκου του PSII είναι εξαιρετικά δύσκολη. Επιπλέον, επειδή το LHCIΙ φαίνεται να είναι εντοπισμένο στην περιφέρεια του συμπλόκου, η παραγωγή τρισδιάστατων κρυστάλλων του PSII θα απαιτούσε τη συμμετοχή του LHCIΙ στο σχηματισμό του κρυσταλλικού πλέγματος. Ωστόσο, λόγω της πολλαπλής ετερογένειας του LHCIΙ, θα ήταν δύσκολο να πάρουμε κρυστάλλους υψηλής διάταξης.

Για το λόγο αυτό, το PSII συνήθως κατεργάζεται με απορρυπαντικό, που το διασπά σε δυο κλάσματα: την κεραία και τον πυρήνα. Αφού απομακρυνθεί η κεραία, μερικά από τα υπολειπόμενα συστατικά όπως οι CP-πρωτεΐνες ή οι εξωτερικές πρωτεΐνες, οι οποίες δεν είναι τόσο ισχυρά δεσμευμένες στον πυρήνα, χάνονται κατά τις διαδικασίες καθαρισμού ή κρυστάλλωσης. Η απομάκρυνση των εξωτερικών πολυπεπτιδίων έχει σαν συνέπεια τη μείωση των, σημαντικών για τη κρυστάλλωση, εκτεταμένων υδρόφιλων επιφανειών. Με στόχο την μείωση της ετερογένειας, το PSII μπορεί να επεξεργασθεί παραπέρα με υψηλές συγκεντρώσεις απορρυπαντικού ή με χαοτροπικά μέσα, έτσι ώστε να ληφθούν PSII-core σύμπλοκα, που περιέχουν τα απαραίτητα συστατικά για να διεξάγουν τον πρωτοταγή διαχωρισμό φορτίου. Τέτοιες κατεργασίες όμως, συνήθως οδηγούν σε παρασκευές, που στερούνται του OEC. Αν και η δομή του OEC παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, το συστατικό αυτό είναι ιδιαίτερα ασταθές και εισάγει ανομοιογένεια, αφού υπάρχει σε περισσότερες από μια οξειδοαναγωγικές καταστάσεις.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν δυο αναφορές για την τρισδιάστατη κρυστάλλωση PSII συμπλόκων<sup>104,105</sup>. Ωστόσο και στις δυο περιπτώσεις, η περίθλαση των κρυστάλλων δεν ήταν ικανοποιητική, ώστε να προσφέρει σημαντικές κρυσταλλογραφικές πληροφορίες.

Σκοπός της διατριβής αυτής ήταν η απομόνωση, ο χαρακτηρισμός και η κρυστάλλωση διαφόρων υποσυμπλόκων του πυρήνα του PSII, για την προσέγγιση των συνθηκών που θα επιτρέψουν την ανάλυση της δομής του. Στην εργασία αυτή έγινε συστηματική προσπάθεια εξέτασης όλων των βασικών παραγόντων, που σχετίζονται με την κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Επιπλέον, εξετάστηκε η δράση της ιστιδίνης στις πρωτεΐνες του πυρήνα του φωτοσυστήματος II, με στόχο τη σταθεροποίηση του

συστήματος. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, έχει βρεθεί ότι η ιστιδίνη μπορεί να δράσει ως αποσβέστης ενεργών μορφών οξυγόνου.

Παράλληλα, επειδή η ηλεκτρονική μικροσκοπία έχει τη δυνατότητα να παρέχει δομικές πληροφορίες, όσον αφορά την τοπολογία και τη σχετική συναρμογή των υπομονάδων, πραγματοποιήθηκε μελέτη του PSII με τεχνικές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές προσεγγίσεις:

α) Ηλεκτρονική μικροσκοπία σε PSII σύμπλοκα διαλυτοποιημένα σε απορρυπαντικό, στα οποία είχε γίνει επιλεκτική απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών και στη συνέχεια συγκριτική μελέτη και

β) Ηλεκτρονικές κρυσταλλογραφικές μελέτες πάνω σε δυσδιάστατους κρυστάλλους.

Τέλος, με σκοπό τον εντοπισμό φυσικών προϊόντων με ζιζανιοκτόνο δράση, εξετάστηκε ο μηχανισμός δράσης της καψακίνης, η οποία δεσμεύεται στη θέση  $Q_B$ . Η ομοιότητα που παρουσιάζει η κοιλότητα αυτή, με εκείνη του βακτηριακού κέντρου αντίδρασης, η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς, έδωσε τη δυνατότητα μιας πιο λεπτομερούς διερεύνησης.

## **III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **III.1 Υλικά**

#### **III.1.1 Αντιδραστήρια**

Τα απορρυπαντικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Calbiochem, Biomol, Boeringer και VEGATEC, ενώ τα υπόλοιπα αντιδραστήρια είχαν αγοραστεί από τις εταιρείες Roth, Sigma, Fluka, και Merck. Η ποιότητα των αντιδραστηρίων ήταν analytical grade. Το νερό ήταν απιονισμένο με στήλη ιονοανταλλακτικών ρητινών και αποστειρωμένο με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια της HAMPTON RESEARCH (MEMBFAC KIT FORMULATION) για τη κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών.

#### **III.1.2 Φυτικό υλικό**

Οι απομονώσεις των συμπλόκων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη προέρχονται από τους παρακάτω φωτοσυνθετικούς οργανισμούς:

1. *Spinacia oleracea*
2. *Lactuca sativa*
3. *Brassica campestris*
4. *Beta vulgaris*
5. *Rhodobacter sphaeroides*

#### **III.1.3 Διαλύματα**

Διάλυμα αλέσεως (grinding buffer): 0.4 M NaCl, 20 mM HEPES (pH=7.5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA και 0.2 % w/v BSA

1<sup>ο</sup> διάλυμα επαναιώρησης: (1st resuspension buffer): 0.15 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub> και 25 mM MES (pH=6)

2<sup>ο</sup> διάλυμα επαναιώρησης: (2nd resuspension buffer): 15 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM AsCH και 25 mM MES (pH=6)

Διάλυμα SMN: 0.4 mM sucrose, 15 mM NaCl και 25 mM MES (pH=6)  
Διάλυμα Triton: 25% w/v Triton στο 2<sup>ο</sup> διάλυμα επαναιώρησης  
Διάλυμα Tris: 0.8 mM Tris (pH=8.2)  
Διάλυμα ακετόνης: 80% v/v ακετονη σε H<sub>2</sub>O  
Διάλυμα DCBQ: 1% w/v 2,6-DCBQ/MeOH  
Διάλυμα PEG 6000: 20% w/v PEG 6000 και 25 mM MES  
Διάλυμα OTG: 0.8% w/v OTG σε SMN  
Διάλυμα OTG: 6% w/v OTG, 40 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Bis-Tris pH=6.5  
Διάλυμα MN: 10 mM NaCl, 50 mM MES pH=6  
Διάλυμα: 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM sucrose, 15 mM NaCl και 25 mM MES (pH=6)  
Διάλυμα: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM sucrose, 15 mM NaCl και 25 mM MES (pH=6)  
Διάλυμα HM: 2% HM, 0.4 mM sucrose, 15 mM NaCl και 25 mM MES (pH=6)  
Διάλυμα: 0.04% w/v LM, 20 mM MES pH=5.2  
Διάλυμα: 1M NaCl, 0.04% w/v LM, 20 mM MES pH=5.2  
Διάλυμα: 1% w/v LM, 0.04% w/v LM, 20 mM MES pH=5.2  
Διάλυμα MVNA: 18.75 mM MVNA σε MeOH  
Διάλυμα: 0.3% w/v OTG, 0.03% w/v LM, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM Bis-Tris pH=6.5  
Διάλυμα: 1.5% w/v Taurine, 0.04% w/v LM, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Bis-Tris pH=6.5  
Διάλυμα: 500 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.5% w/v Taurine, 0.04% w/v LM, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Bis-Tris pH=6.5

### III.2 Μέθοδοι

Η απομόνωση των διαφόρων φωτοσυνθετικών πρωτεϊνικών συμπλόκων βασίστηκε σε μεθόδους φυγοκέντρωσης, ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας, και υπερφυγοκέντρωσης ζώνης. Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδιου, της φασματοσκοπίας απορρόφησης, της φασματοσκοπίας ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού, της ηλεκτροκτρονικής κρυσταλλογραφίας και της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X.

### **III.2.1 Φυγοκέντρωση**

Οι φυγοκεντρήσεις έγιναν με φυγόκεντρο Heraeus SEPATECH, τύπου Suprafuge 22, χρησιμοποιώντας κεφαλές HFA 2194 ή κεφαλές HFA 14290, ή φυγόκεντρο SIGMA τύπου 3K20, με την κεφαλή Nr. 12158.

### **III.2.2 Υπερφυγοκέντρωση**

Οι υπερφυγοκεντρήσεις έγιναν με μια υπερφυγόκεντρο τύπου Beckman L8-70M, χρησιμοποιώντας κεφαλή 45Ti.

### **III.2.3 Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία**

Η ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας της Pharmacia που αποτελείται από δύο περισταλτικές αντλίες τύπου P1, ανιχνευτή UV (280nm), καταγραφικό και μονάδα προγραμματισμού GP 250. Το υλικό της στήλης ήταν Q-Sepharose ή S-Sepharose Fast-Flow. Όλα τα διαλύματα είχαν εξεραρωθεί και διηθηθεί με φίλτρα μεγέθους πόρων 0.45μm.

### **III.2.4 Απομόνωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων**

#### **A) Θυλακοειδή**

Οι θυλακοειδείς μεμβράνες απομονώνονται από τα φύλλα των διαφόρων φυτών ως εξής<sup>106</sup>:

Αρχικά, τα φύλλα των φυτών αναμειγνύονται με το ρυθμιστικό διάλυμα άλεσης σε αναλογία 250 ml διαλύματος/300 gr φύλλων. Ακολουθεί μηχανική διάσπαση των ιστών χρησιμοποιώντας μίξερ. Η άλεση διαρκεί 30 sec και στη συνέχεια το μείγμα διηθείται με γάζα. Το διήθημα φυγοκεντρείται στα 7500xg για 15 min, ώστε να καταβυθιστούν οι χλωροπλάστες, ενώ στο υπερκείμενο παραμένουν τα υπόλοιπα κυτταρικά οργανίδια. Το ίζημα διαλυτοποιείται στο πρώτο διάλυμα επαναιώρησης, που

αποτελεί μέσο υψηλής ιονικής ισχύς, έτσι ώστε να σπάσει η εξωτερική μεμβράνη των χλωροπλαστών. Στη συνέχεια το επαναιώρημα φυγοκεντρείται στα 7500xg για 10min για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών του στρώματος. Το ίζημα που λαμβάνεται περιέχει τις θυλακοειδείς μεμβράνες, το οποίο επαναιωρείται σε διάλυμα SMN, ομογενοποιείται και αποθηκεύεται στους -40°C.

## B) Φωτοσύστημα II

Για την απομόνωση του PSII<sup>107</sup> από τις θυλακοειδείς μεμβράνες γίνεται διαλυτοποίηση του παραπάνω ιζήματος με το δεύτερο διάλυμα επαναιώρησης έτσι ώστε, η τελική συγκέντρωση να είναι 2.5 mg Chl/ml. Το διάλυμα ομογενοποιείται με μηχανικό ομογενοποιητή και στη συνέχεια προστίθεται στάγδην διάλυμα απορρυπαντικού Triton X-100 25% w/w, ώστε η τελική αναλογία Chl/Triton να είναι ίση με 25/1 w/w. Το διάλυμα θυλακοειδών μεμβρανών και απορρυπαντικού επωάζεται για μίση ώρα στο σκοτάδι στους 4°C με ήπια ανάδευση, για να διασπαστεί η θυλακοειδής μεμβράνη στα επιμέρους θυλακοειδή του στρώματος και θυλακοειδή των grana. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρωση στα 48000xg για μίση ώρα, ώστε να καταβυθιστούν τα θυλακοειδή των grana. Το ίζημα που είναι εμπλουτισμένο σε μεμβράνες PSII επαναιωρείται σε διάλυμα SMN και φυγοκεντρείται στα 48000xg για μίση ώρα. Το τελικό ίζημα διαλυτοποιείται σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιείται, προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύεται στους -40°C.

## Γ) Πυρήνας του Φωτοσυστήματος II (PSII-core)

Για την απομόνωση του πυρήνα του PSII χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικοί μέθοδοι, που στηρίζονται σε κατεργασία των PSII μεμβρανών με ένα από τα απορρυπαντικά: OTG<sup>108</sup> ή HM<sup>109</sup>.

### *OTG-core*

Μεμβράνες του PSII μέσα σε SMN κατεργάζονται με 0.4% (w/w) OTG, ώστε η τελική συγκέντρωση χλωροφύλλης να είναι 0.5 mg/ml και επωάζονται για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στα 40000xg για τριάντα λεπτά, με αποτέλεσμα να καταβυθίζονται τα πολυπεπίδια 22 και 10 kDa μαζί με τυχόν αδιαλυτοποιήτο υλικό. Το υπερκείμενο αναμιγνύεται με μισό όγκο διαλύματος SMN και προστίθεται MgCl<sub>2</sub> με

τελική συγκέντρωση 10 mM, που διευκολύνει τη καταβύθιση του LHCI. Το μείγμα επωάζεται για πέντε λεπτά και κατόπιν φυγοκεντρείται στα 40000xg για δέκα λεπτά. Το υπερκείμενο, που περιέχει το PSII-core αναμιγνύεται με ίσο όγκο διαλύματος 20% PEG 6000 και συλλέγεται το PSII-core κατόπιν καταβύθισης του με φυγοκέντρηση στα 40000xg για τριάντα λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται μια έκπλυση του PSII-core με SMN.

#### *HM-core*

Μεμβράνες του PSII διαλυτοποιημένες σε SMN με συγκέντρωση χλωροφύλλης 0.75 mg/ml αναμιγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος SMN, το οποίο περιέχει 60 mM HM και το μείγμα επωάζεται για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση στα 40000xg για τριάντα λεπτά. Το υπερκείμενο αναμιγνύεται με μισό όγκο διαλύματος SMN και προστίθεται 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση στα 40000xg για είκοσι λεπτά. Το υπερκείμενο, που περιέχει το PSII-core, αναμιγνύεται με ίσο όγκο διαλύματος 40% PEG 6000 και συλλέγεται το PSII-core κατόπιν καταβύθισης του με φυγοκέντρηση στα 40000xg για τριάντα λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται μια έκπλυση του PSII-core με SMN.

Το OTG-core στερεί τις CP29, CP26, 22 kDa και 10 kDa πρωτεΐνες, ενώ διατηρεί και τις τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες. Η απομόνωση με το HM οδηγεί σε σύμπλοκο με παρόμοια πρωτεϊνική σύσταση με το OTG-core με τη μόνη διαφορά ότι το HM-core διατηρεί τις υπομονάδες CP29, CP26 και CP24.

#### Δ) Tris-PSII-core

Το Tris-PSII-core<sup>110</sup> είναι ο υδρόφοβος πυρήνας του PSII, χωρίς τις εξωτερικές πρωτεΐνες (33kDa, 23kDa, 17kDa) και το μαγγάνιο. Για την απομόνωση του συμπλόκου, ίζημα PSII-core επαναιωρείται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος Tris, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση χλωροφύλλης να είναι 0.5 mg/ml. Το διάλυμα επωάζεται για μίση ώρα στους 4°C κάτω από φως δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 48000xg για μίση ώρα, για την απομάκρυνση των υδρόφιλων πρωτεϊνών και του μαγγανίου. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις του ιζήματος με διάλυμα SMN και φυγοκέντρηση στα 48000xg για μίση ώρα. Το τελικό ίζημα επαναιωρείται σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιείται και αποθηκεύεται στους -40°C.



### E) Υποσύμπλοκα του PSII-core

Η απομόνωση των υποσυμπλόκων του PSII-core πραγματοποιείται με διαλυτοποίηση του PSII-core με απορρυπαντικό LM και στη συνέχεια γίνεται διαχωρισμός είτε με FPLC χρησιμοποιώντας στήλη S ή Q sepharose είτε με υπερφυγοκέντρηση ζώνης.

### **III.2.5 Ηλεκτρόφορηση**

Η πολυπεπτιδική σύνθεση των συμπλόκων αναλύεται με ηλεκτρόφορηση σε σύστημα ασυνεχούς πήκτωματος (gel) SDS/ουρίας/πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli<sup>111</sup>. Κατόπιν αποδιάταξης των πρωτεϊνών με το απορρυπαντικό SDS, οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται αρχικά μέσω ενός πήκτωματος συσσώρευσης (stacking gel) και στη συνέχεια μέσω ενός πήκτωματος διαχωρισμού (resolving gel). Το πήκτωμα συσσώρευσης περιέχει 6% πολυακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου, ενώ το πήκτωμα διαχωρισμού αποτελείται από μια διαβάθμιση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου (16-22%), του δισ-ακρυλαμιδίου (0.27-0.37%) και της σουκρόζης (0-6%) και τα δύο τμήματα περιέχουν 6.5 M ουρία. Η σταθεροποίηση (fixing) των πρωτεϊνών γίνεται με διάλυμα 50 % MeOH/ 10% CH<sub>3</sub>COOH και η χρώση με διάλυμα Coomassie Blue R-250.

### **III.2.6 Διαδικασία διαπίδυσης**

Για τις διαδικασίες διαπίδυσης χρησιμοποιούνται σωληνοειδείς μεμβράνες της BIOMOL τύπου 8 ή 20, με ικανότητα διαπερατότητας μορίων μοριακού βάρους μέχρι 16 kDa. Οι μεμβράνες διαπίδυσης κατεργάζονται αρχικά με υδατικό διάλυμα 5 μM EDTA για 30min στους 100°C.

### **III.2.7 Συμπύκνωση των δειγμάτων**

Το δείγμα συμπυκνώνεται, αρχικά με υπερδιήθηση χρησιμοποιώντας μεμβράνες τριοξικής κυτταρίνης με τη συσκευή Sartorius (M 165-26) και τελικά με φυγοκέντρηση στις 4500 στροφές/λεπτό στους 4°C με Centrisart I (SM 132-49).

### **III.2.8 Τρισδιάστατη κρυστάλλωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων**

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα χρησιμοποιούνται για μια σειρά πειραμάτων κρυστάλλωσης. Η λήψη των τρισδιάστατων κρυστάλλων γίνεται με τη μέθοδο διάχυσης ατμών χρησιμοποιώντας τη τεχνική της καθήμενης σταγόνας. Σε κάθε κοιλότητα της γέφυρας προστίθεται 10-50 ml δείγματος του πρωτεϊνικού διαλύματος που περιέχει το αντιδραστήριο καταβύθισης, το πρόσθετο και  $\text{NaN}_3$ , αφού προηγουμένως φυγοκεντρηθεί για 2min στα 8000xg. Στη δεξαμενή (reservoir) προστίθεται ένα υδατικό διάλυμα κάποιου άλατος. Μέσω της αέριας φάσης, η συγκέντρωση του άλατος στη δεξαμενή ισορροπεί με εκείνη της σταγόνας. Η ισορροπία επιτυγχάνεται με μεταφορά του νερού από τη σταγόνα στο διάλυμα άλατος.

### **III.2.9 Δυσδιάστατη κρυστάλλωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων**

Για τον σχηματισμό δυσδιάστατων κρυστάλλων, τα πρωτεϊνικά δείγματα διαλυτοποιούνται με απορρυπαντικό και αναμιγνύονται με λιπίδια. Τα δείγματα αυτά στη συνέχεια αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα και επωάζονται σε διάφορες θερμοκρασίες.

### **III.2.10 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χλωροφύλλης**

Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης προσδιορίζεται φασματοσκοπικά, σύμφωνα με τη μέθοδο Arnon<sup>112</sup>. Αρχικά, γίνεται εκχύλιση της χλωροφύλλης με υδατικό διάλυμα ακετόνης 80%. Το αιώρημα φυγοκεντρείται στις 15000 στροφές/λεπτό για την απομάκρυνση των αδιάλυτων πρωτεϊνών. Η απορρόφηση του διαλύματος χλωροφύλλης μετράται στα 645 nm και 663 nm. Στους υπολογισμούς χρησιμοποιούνται οι συντελεστές απορρόφησης 20 και 8 mg/(ml.cm) αντίστοιχα.

### **III.2.11 Φασματοσκοπία απορρόφησης επαγόμενη με παλμούς φωτός**

Η κινητική επανασύνδεσης ανιχνεύεται στα 865nm μετά από παροχή ακτινικών παλμών laser με ένα φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης.

### **III.2.12 Προσδιορισμός έκλυσης οξυγόνου**

Η ενεργότητα των συμπλόκων, ως προς την ικανότητα παραγωγής οξυγόνου, προσδιορίζεται πολαρογραφικά χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρόδιο τύπου Clark της εταιρείας YSI. Το ηλεκτρόδιο αυτό αποτελείται από κάθοδο λευκόχρυσου και άνοδο αργύρου με διαφορά δυναμικού 0.8 V. Το σύστημα των ηλεκτροδίων απομονώνεται από το δείγμα μέσω μιας μεμβράνης που επιτρέπει τη διέλευση μόνο μικρών μορίων και ιόντων. Η ρύθμιση του ηλεκτροδίου γίνεται με απιονισμένο νερό, κορεσμένο σε οξυγόνο στους 25°C.

Ακτινικό φως παράγεται από δυο λάμπες βολφραμίου ισχύος 250 W, το οποίο στη συνέχεια διέρχεται από διάλυμα 0.2% w/v CuSO<sub>4</sub>, ώστε να απορροφάται η θερμότητα (μεγάλα μήκη κύματος). Το φως, πριν εισέλθει στο δείγμα, διέρχεται από κόκκινο πλαστικό φίλτρο, απορροφώντας τα μικρά μήκη κύματος για την προστασία των πρωτεϊνικών δεσμών. Τελικά το φως που περιέχει μήκη κύματος μεταξύ 500 και 700 nm, εστιάζεται στο δείγμα έτσι ώστε να δημιουργούνται συνθήκες φωτοκορεσμού. Σε κάθε μέτρηση η κυψελίδα περιέχει 3 ml SMN, 290 μM DCBQ ως τεχνητό ηλεκτρονιοδέκτη, ενώ η συγκέντρωση χλωροφύλλης του δείγματος είναι 50 μM. Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου προσδιορίζεται με μέτρηση της κλίσης της καμπύλης παραγωγής οξυγόνου. Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου εκφράζεται σε  $\mu\text{mole O}_2/[(\text{mg Chl})\cdot\text{hr}]$ .

### **III.2.13 Οπτική φασματοσκοπία απορρόφησης**

Τα φάσματα απορρόφησης των δειγμάτων καταγράφονται με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Perkin-Elmer (τύπου λ-6 ή 330) σε θερμοκρασία δωματίου.

### **III.2.14 Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού**

Η φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία δωματίου γίνεται με φασματόμετρο EPR της εταιρείας BRUCKER, τύπου ER 200D X-ζώνης. Η ακτινοβολία των δειγμάτων γίνεται με λάμπα προβολέα ισχύος 150W. Σαν δοτής και δεκτής ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται σιδηροκυανιούχο και σιδηρικούανιούχο νάτριο αντίστοιχα.

### **III.2.15 Φασματοσκοπία φθορισμού**

Μετρήσεις φθορισμού πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου με ένα Plant Efficiency Analyzer της Hansatech Instruments Ltd.

### **III.2.16 Ηλεκτρονική μικροσκοπία**

Η εξέταση των δειγμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία γίνεται με διαλυτοποίηση των συμπλόκων με απορρυπαντικό, και προσρόφηση τους σε χαρτί διήθησης και στη συνέχεια ακολουθεί ψυκτοξήρανση για ανάλυση μάζας ή αρνητική χρώση με φορμικό ουρανύλιο για single particle averaging. Τα δείγματα εξετάζονται με ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Hitachi H7000.

Για την ηλεκτρονική κρυσταλλογραφία οι κρύσταλλοι υφίστανται ψυκτοξήρανση και στη συνέχεια σκίαση με μίγμα πλατίνας-άνθρακα.

### **III.2.17 Κρυσταλλογραφία ακτίνων X**

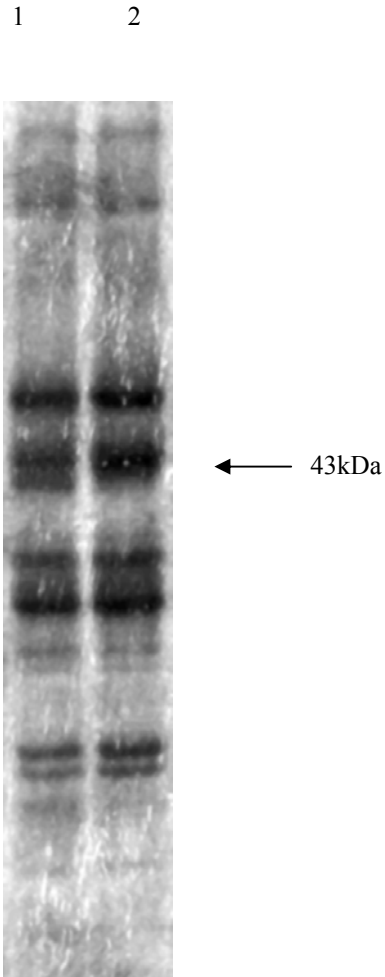
Η εξέταση των κρυστάλλων με περίθλαση ακτίνων X έγινε στο EMBL στο Αμβούργο Γερμανίας, στο σταθμό BW6 του DESY (Deutsches Electron Synchrotron).

## IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### IV.1 Μελέτη της επίδρασης της ιστιδίνης πάνω στις πρωτεΐνες του φωτοσυστήματος II

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί δύο τρισδιάστατες κρυσταλλώσεις υποσυμπλόκων του PSII-core<sup>104,105</sup>. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις η ποιότητα των κρυστάλλων δεν επέτρεψε την ανάλυση της δομής του PSII με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Επιπλέον αναφέρεται η ύπαρξη εκτεταμένης αποικοδόμησης των επιμέρους πρωτεϊνών. Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μπορεί να προέρχεται από τη δράση πρωτεασών ή ενεργών μορφών οξυγόνου<sup>113,114,115,116</sup>. Όσον αφορά τη πρωτεόλυση, είναι γνωστή η προστατευτική δράση του πρωτεολυτικού παρεμποδιστή α2-μακροσφαιρίνη<sup>104</sup>. Για τον λόγο αυτό στην εργασία αυτή έγινε προσπάθεια σταθεροποίησης των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας ένα γνωστό αποσβέστη (scavenger) ενεργών μορφών οξυγόνου, την ιστιδίνη<sup>117,118,119,120</sup>.

Η επίδραση της ιστιδίνης, μελετήθηκε πάνω στο σύμπλοκο Tris-PSII-core. Συγκεκριμένα έγινε επώαση δυο δειγμάτων Tris-PSII-core με συγκέντρωση χλωροφύλλης 1 mg/ml, από τα οποία το ένα περιείχε 25 mM ιστιδίνης, στο σκοτάδι στους 16°C για οκτώ μέρες. Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την πρωτεϊνική τους σύσταση. Στο σχήμα 20 φαίνεται ότι στο Tris-PSII-core (ζώνη 1) γίνεται αποικοδόμηση της πρωτεΐνης 43 kDa, ενώ στο PSII-core με την ιστιδίνη (ζώνη 2), η πρωτεΐνη αυτή παραμένει σταθερή.



Σχήμα 20: Gel ηλεκτροφόρησης των συστημάτων:

1. PSII-core
2. PSII-core με ιστοιδίνη

### Συζήτηση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά γίνεται φανερή η προστατευτική δράση της ιστοιδίνης. Η αποικοδόμηση της 43 kDa ακόμα και κάτω από ήπιες συνθήκες φωτισμού, σε παρασκευές PSII κατεργασμένες με Tris έχει ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία<sup>113</sup>. Ωστόσο δεν έχει διευκρινιστεί αν ο μηχανισμός αποικοδόμησης περιλαμβάνει πρωτεολυτικά ένζυμα ή ενεργές μορφές οξυγόνου. Από τη μελέτη αυτή φαίνεται ότι ακόμα και κάτω από ήπιες συνθήκες φωτισμού, η διάσπαση των πρωτεϊνών του PSII μπορεί να αποδοθεί εν μέρει σε ενεργές μορφές οξυγόνου.

## **IV.2 Απομόνωση, χαρακτηρισμός και τρισδιάστατη κρυστάλλωση υποσυμπλόκων του πυρήνα του φωτοσυστήματος II**

Όταν πρόκειται για την κρυστάλλωση ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην επιλογή του κατάλληλου συμπλόκου καθώς επίσης και στη μέθοδο απομόνωσης του. Εκτός από το γεγονός ότι η πρωτεϊνική σύσταση καθορίζει τη σταθερότητα και την ομοιογένεια του συμπλόκου, η παρουσία ή μη υδρόφιλων πρωτεϊνών ή έστω υδρόφιλων τμημάτων, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την κρυστάλλωση του. Για τον λόγο αυτό απομονώθηκαν μια σειρά υποσυμπλόκων του πυρήνα του φωτοσυστήματος II από τα οποία είχαν απομακρυνθεί επιλεκτικά ορισμένες πρωτεΐνες. Τα σύμπλοκα OTG- και HM-core που χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικά συστήματα για τις απομονώσεις, στερούνται των πρωτεϊνών 22 και 10 kDa, οι οποίες δεν είναι απαραίτητες για την φωτοσυνθετική διάσπαση του H<sub>2</sub>O.

### **IV.2.1 Σύμπλοκο 47-43 kDa-D1-D2-Cyt b<sub>559</sub>**

#### IV.2.1.1 Μέθοδος απομόνωσης του συμπλόκου

Το Tris-OTG-core πλένεται με το διάλυμα A (25 mM MES, pH=5.2, 0.04% w/v LM) και φυγοκεντρείται. Το ίζημα επαναιωρείται στο διάλυμα A, έτσι ώστε η συγκέντρωση της χλωροφύλλης να είναι 0.45 mg/ml. Στη συνέχεια το δείγμα διαλυτοποιείται με ίσο όγκο διαλύματος (A+1% LM w/v). Μετά από πέντε λεπτών επώαση και φυγοκέντρωση στα 40000xg ώστε να απομακρυνθεί το αδιαλυτοποιήτο PSII-core, το υπερκείμενο διηθείται με φίλτρο μεγέθους πόρων 0.22μ και αραιώνεται με ίσο όγκο διαλύματος A. Το δείγμα αυτό φορτώνεται σε κατιονοανταλλακτική κολώνα από S-sepharose, η οποία έχει ισορροπηθεί με διάλυμα (A+5mM NaCl). Η κολώνα πλένεται με το διάλυμα αυτό για να απομακρυνθεί το αδέσμευτο PSII-core και τυχόν αδέσμευτες πρωτεΐνες και στη συνέχεια με διάλυμα (A+100mM NaCl) εκλούεται το καθαρό σύμπλοκο.

Το σύμπλοκο υφίσταται διαπίδυση για πέντε ώρες με ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH για την απομάκρυνση των αλάτων. Στη συνέχεια το δείγμα συμπυκνώνεται μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση.

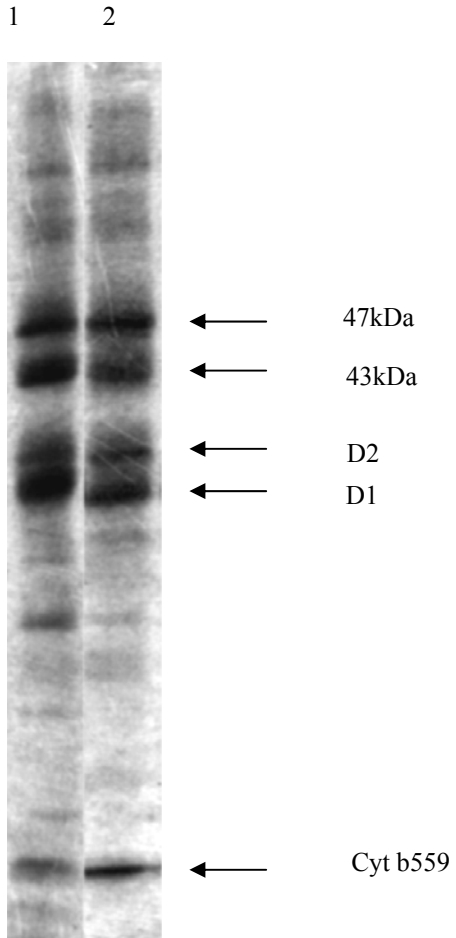
#### IV.2.1.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου

Η πολυπεπτιδική σύσταση του συμπλόκου αναλύθηκε με ηλεκτρόφορηση πηκτής SDS/πολυακρυλαμιδίου/ουρίας (σχήμα 21). Από τη ζώνη 2 φαίνεται ότι το σύμπλοκο περιέχει τις πρωτεΐνες 47 kDa, 43 kDa, D1, D2 και το Cyt b559, ενώ η ζώνη 1 δείχνει τη σύσταση του OTG-core.

Το σχήμα 22 δείχνει το φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου σε θερμοκρασία δωματίου. Το φάσμα παρουσιάζει δυο μέγιστα που οφείλονται στη παρουσία Chl a (673nm και 436nm). Το σημείο καμπής στα 490nm είναι ενδεικτικό της παρουσίας των καροτενοειδών, ενώ η έλλειψη ενός σημείου καμπής στα 650 nm υποδηλώνει την απουσία της Chl b.

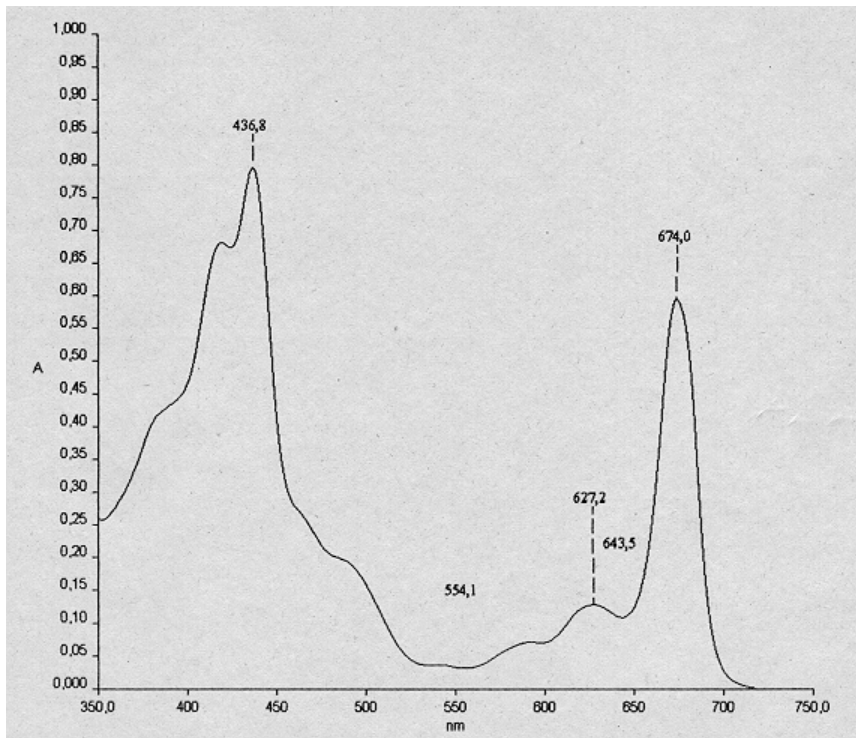
Λόγω της απουσίας της 33 kDa πρωτεΐνης, το σύμπλοκο είναι ανενεργό ως προς την έκλυση οξυγόνου. Η φωτοχημική του ενεργότητα εξετάστηκε με φασματοσκοπία EPR (σχήμα 23). Το σήμα 1, γνωστό ως σήμα Ps, προέρχεται από τη ρίζα της Tyr D<sup>+</sup>, που έχει παραμείνει σε οξειδωμένη μορφή. Όταν το σύμπλοκο ακτινοβοληθεί σε θερμοκρασία δωματίου παρατηρείται το σήμα 3, που προέρχεται από τη ρίζες Tyr D<sup>+</sup> και Tyr Z<sup>+</sup>. Μετά την ακτινοβολήση και παραμονή στο σκοτάδι για 1 λεπτό, παρατηρείται το σήμα που προέρχεται από τη ρίζα Tyr D<sup>+</sup>, αφού η ρίζα Tyr Z<sup>+</sup> επανανάγεται γρήγορα (200 μsec). Η διαφορά μεταξύ των σημάτων 3 και 2 αποδίδεται κυρίως στην Tyr Z<sup>+</sup>. Όπως φαίνεται από το σχήμα το σύμπλοκο έχει την ικανότητα να φωτοοξειδώνει την Tyr Z.



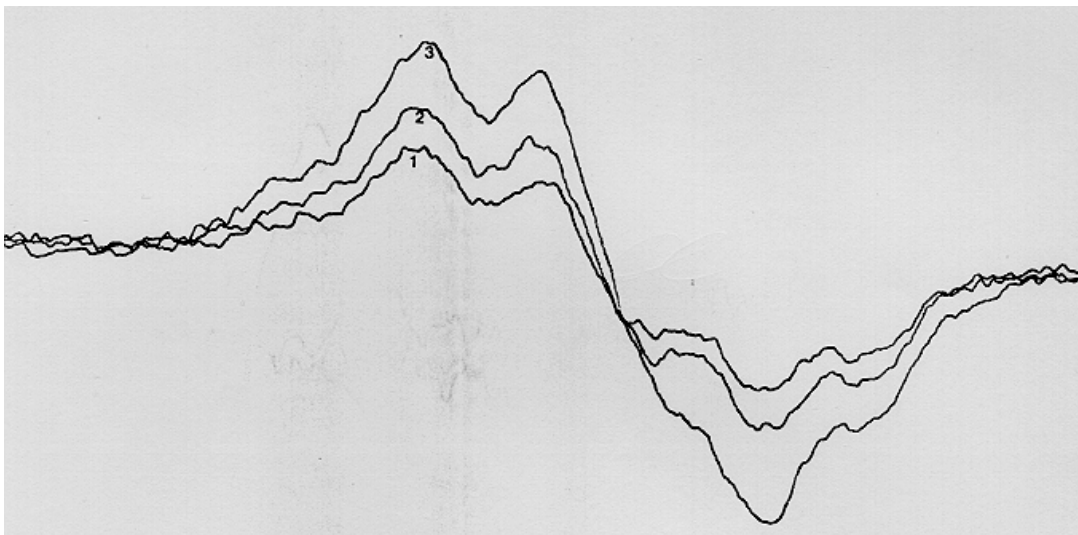


Σχήμα 21: Gel ηλεκτροφόρησης των συστημάτων:

1. Tris-OTG-core
2. 47/43/RC



Σχήμα 22: Οπτικό φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου 47/43/RC



Σχήμα 23: EPR φάσμα του συμπλόκου 47/43/RC σε θερμοκρασία δωματίου

1. Φάσμα που καταγράφηκε στο σκοτάδι
2. Φάσμα που καταγράφηκε ένα λεπτό μετά τον τερματισμό της ακτινοβόλησης
3. Φάσμα που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια συνεχούς ακτινοβόλησης

Παράμετροι φασματοφωτόμετρου: ενίσχυση σήματος (gain),  $6.3 \times 10^6$ , ισχύς μικροκυμάτων, 20mW, διαμόρφωση (modulation), 4Gpp.

#### IV.2.1.3 Κρυστάλλωση του συμπλόκου

Για την κρυστάλλωση του συμπλόκου έγινε συστηματική εξέταση όλων των βασικών παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν οι παράγοντες που φαίνονται στους παρακάτω πίνακες. Σημαντικό βοήθημα για την ανάπτυξη των κρυστάλλων αποτέλεσε η δουλειά της Φωτεινού<sup>104</sup> με την κρυστάλλωση του συμπλόκου 10S-core. Ωστόσο οι κρύσταλλοι του

---

συμπλόκου αυτού δεν ξεπερνούσαν τα 24 Å διακριτικότητα.

---

<b>Πηγή του μακρομορίου</b>
Spinacia oleracea
Lactuca sativa
Brassica campestris
Beta vulgaris

Πίνακας 2

<b>pH</b>	<b>Ρυθμιστικό διάλυμα</b>
5.5	MES
6	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
6	MES
6	Bis-Tris
6.5	BES
7	HEPES
7.5	Bicine
7.5	Tris
8	Tris
8.5	Tris
9	Ches

Πίνακας 3

<b>Υπόστρωμα</b>
DCMU
MVNA
DMVNA

Πίνακας 4

<b>Πρόσθετο</b>
διοξάνιο
πυριδίνη
MnCl <sub>2</sub>
CaCl <sub>2</sub>
MgCl <sub>2</sub>
ZnCl <sub>2</sub>
His

Πίνακας 5

<b>Μικρό αμφίφιλο</b>
HPT
HXT
L- πιπεριдино-καρβονικο οξύ
D- πιπεριдино-καρβονικο οξύ

Πίνακας 6

<b>Αντιδραστήριο καταβύθισης</b>
MPD
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
PEG 2000
PEG 3350
PEG 4000
PEG 6000
MPEG 2000

Πίνακας 7

<b>Απορρυπαντικό</b>
Dodecylmaltoside
Undecylmaltoside
Decylmaltoside
Dodecylmaltoside + octylthioglucoside
Dodecylmaltoside + heptylthioglucoside
Dodecylmaltoside + MEGA-10

Πίνακας 8

<b>Διάλυμα δεξαμενής</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
NaCl
PEG
PEG + NaCl

Πίνακας 9

<b>Θερμοκρασία</b>
4°C
8°C
13°C
18°C
21°C

Πίνακας 10

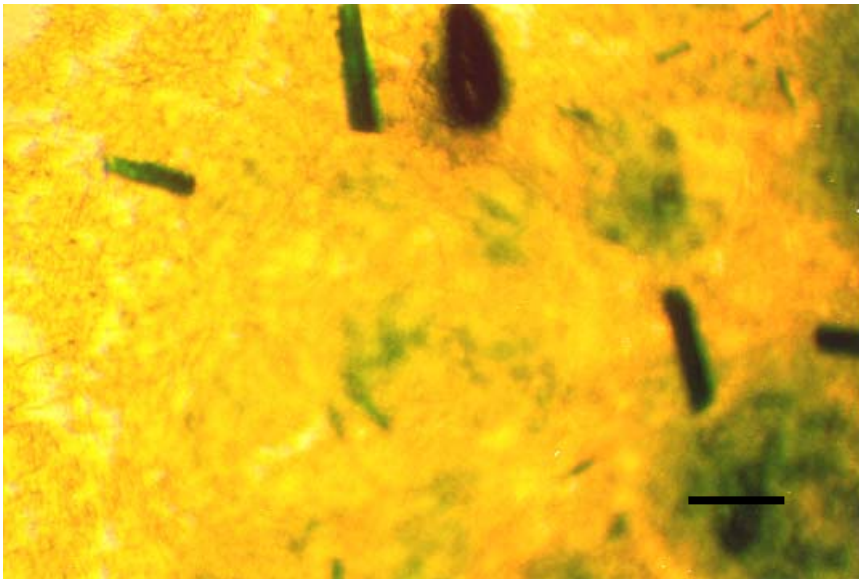
#### Πηγή του μακρομορίου

Η κρυστάλλωση PSII-core υποσυμπλόκων ξεκινώντας από διάφορα φυτά έδωσε θετικά αποτελέσματα στη περίπτωση του σπανακιού (*Spinacia oleracea*), του ζαχαρότευτλου (*Brassica campestris*) και του μαρουλιού (*Lactuca sativa*), ενώ αρνητικά αποτελέσματα έδωσε το σέσκουλο (*Beta vulgaris*). Μεταξύ των τριών πρώτων πηγών καλύτερα αποτελέσματα έδωσε το PSII από σπανάκι, παρέχοντας τέσσερα είδη κρυστάλλων, βελονοειδείς, ραβδόμορφους, αστερόμορφους και κρυστάλλους σχήματος

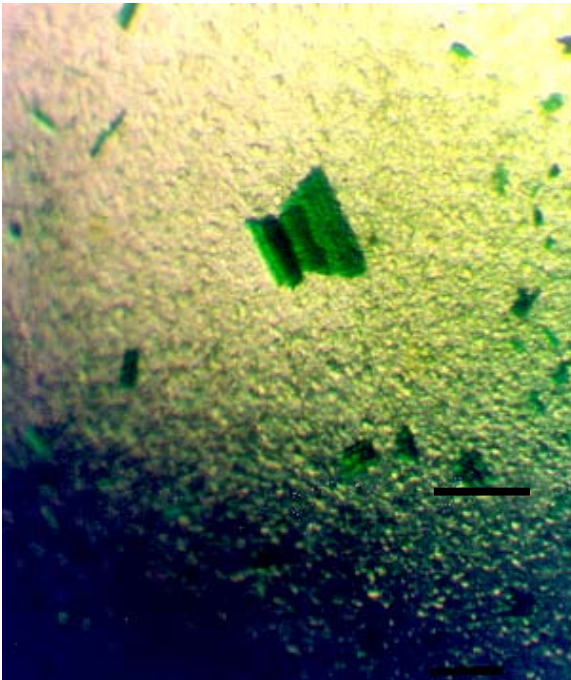
παραλληλεπιπέδου (σχήματα 24, 25, 26 και 27, αντίστοιχα). Το PSII από ζαχαρότευτλο, έδωσε βελονοειδείς και κυβικούς κρυστάλλους (σχήματα 28 και 29, αντίστοιχα), ενώ το PSII από μαρούλι απέδωσε μόνο βελονοειδείς κρυστάλλους (σχήμα 30).



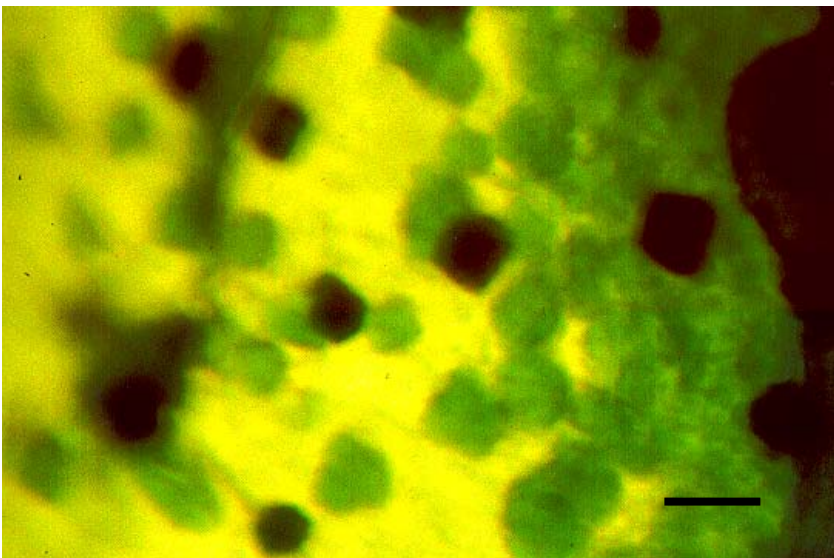
Σχήμα 24: Βελονοειδείς κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 2.5% w/v PEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 0.02% w/v OTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



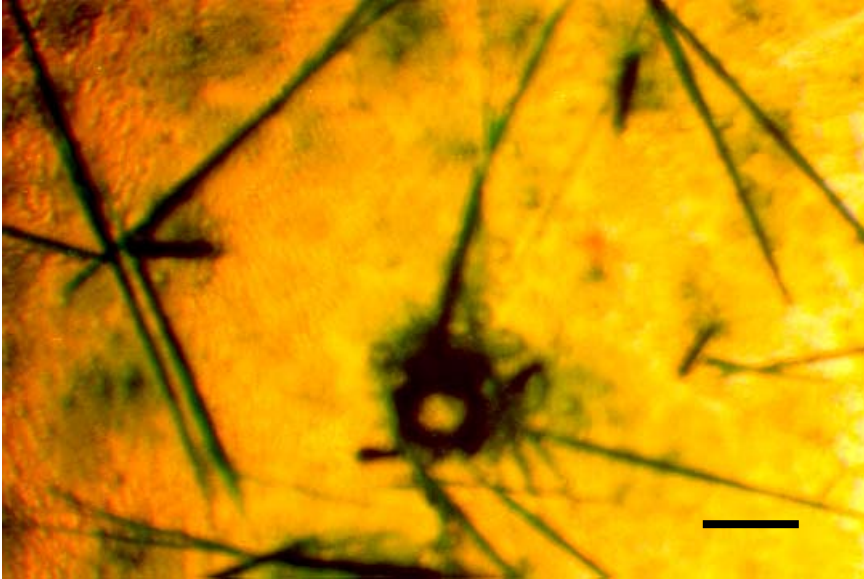
Σχήμα 25: Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 4% w/v PEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v HTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 350mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



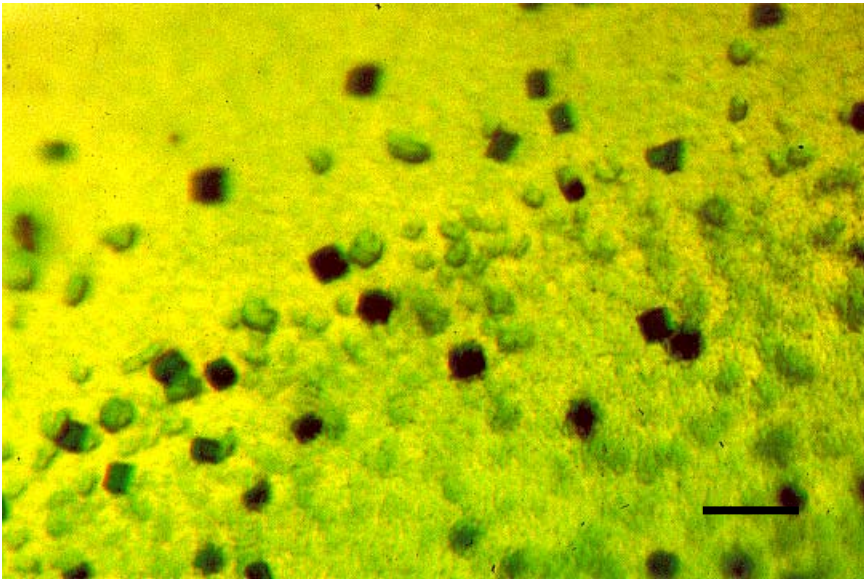
Σχήμα 26: Αστερόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3% w/v PEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 0.02% w/v OTG, διάλυμα δεξαμενής 300mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



Σχήμα 27: Κρύσταλλοι σχήματος παραλληλεπίπεδου του συμπλόκου 47/43/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3.5% w/v PEG 2000, 20mM Tris (pH=8), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v OTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 250mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1.2mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.

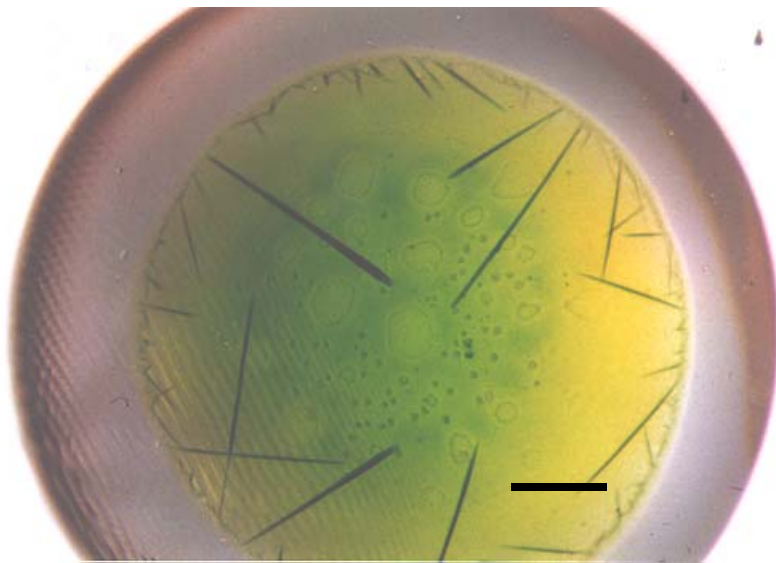


Σχήμα 28: Βελονοειδείς κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από ζαχαρότευτλο. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 4% w/v PEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v HTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 200mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



Σχήμα 29: Κυβικοί κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από ζαχαρότευτλο. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 4% w/v PEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 0.2% HTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 250mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.





Σχήμα 30: Βελονοειδείς κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από μαρούλι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3.5% w/v PEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v HTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 250mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 1mm.

### Πρωτεόλυση

Έχει παρατηρηθεί ότι οι πρωτεΐνες του PSII υφίστανται εκτεταμένη πρωτεόλυση. Η πρωτεόλυση αποτελεί πηγή ετερογένειας, η οποία έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην ποιότητα των κρυστάλλων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένας πρωτεολυτικός παρεμποδιστής, η α2-μακροσφαιρίνη. Η παρουσία της ένωσης αυτής, είναι γνωστό ότι παρεμποδίζει σε μεγάλο βαθμό τη πρωτεολυτική δραστηριότητα και για αυτό χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα των κρυσταλλώσεων.

### Συγκέντρωση του δείγματος

Εξετάστηκαν δείγματα με συγκέντρωση χλωροφύλλης από 0.7-1.5 mg/ml. Η καταλληλότερη συγκέντρωση ήταν μεταξύ 1 και 1.2 mg/ml. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις εμφανιζόταν μικροκρύσταλλοι ή μη κρυστάλλωση, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις το σύμπλοκο καθίζανε.

### pH

Δοκιμάστηκαν οι τιμές του pH από 5.5 έως 9.0. Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκε μεγάλη εξάρτηση από το pH, αφού αυτό ρυθμίζει τον ιονισμό των πολικών ομάδων και κατά συνέπεια τις αλληλεπιδράσεις που συγκροτούν το κρυσταλλικό

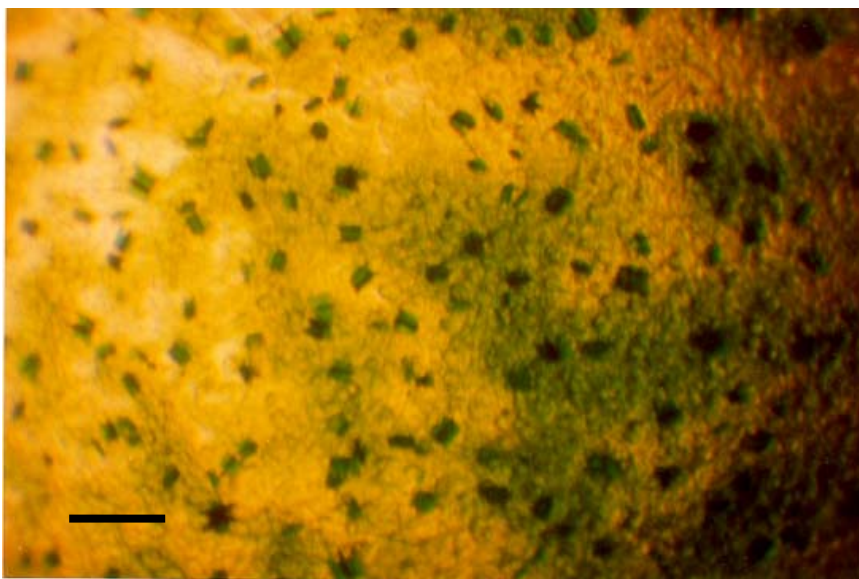
πλέγμα. Επιπλέον το pH έχει άμεση επίδραση στη σταθερότητα των πρωτεϊνών. Τα δείγματα ήταν σταθερά σε pH μεταξύ των τιμών 6.0 και 8.0. Οι τιμές του pH εκτός της περιοχής αυτής κατέληξαν σε μετουσίωση ή καθίζηση της πρωτεΐνης. Κρύσταλλοι λήφθηκαν σε pH 6.0 και 8.0, ενώ στις ενδιάμεσες τιμές προέκυψε ίζημα ή διαχωρισμός φάσης. Με αύξηση του pH στα 8.0, ο απαραίτητος χρόνος για να ολοκληρωθεί η διαδικασία κρυστάλλωσης αυξήθηκε από μια εβδομάδα σε ένα μήνα, οδηγώντας σε μεγαλύτερους και περισσότερο συμπαγείς κρυστάλλους. Επίσης σε pH 8.0 φαίνεται να παρεμποδίζεται ο σχηματισμός βελονοειδών κρυστάλλων και επίσης να μειώνεται η παρουσία του διαχωρισμού φάσης.

### Υπόστρωμα

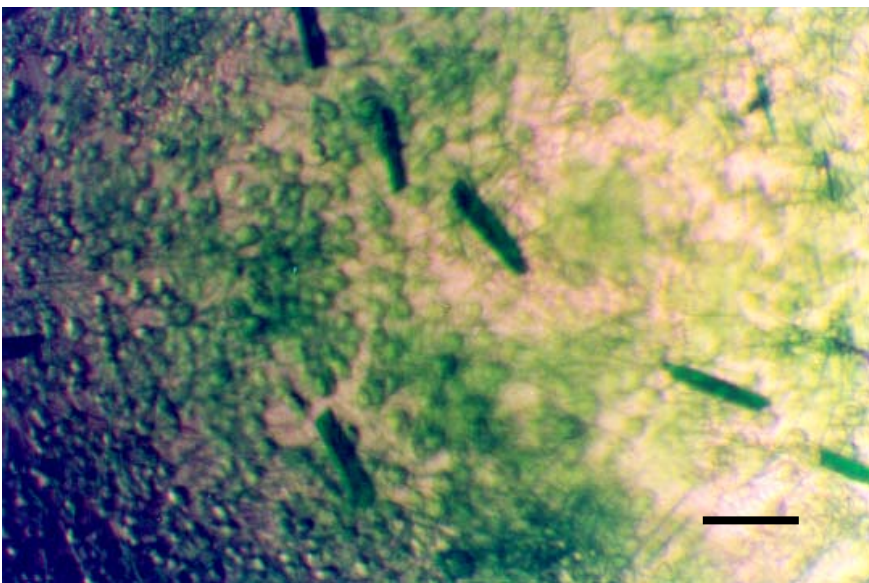
Γενικά η κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης επηρεάζεται από την παρουσία υποστρωμάτων. Η ύπαρξη υποστρώματος μπορεί να οδηγήσει σε πιο σταθερή διαμόρφωση και να επηρεάσει θετικά τη κρυστάλλωση. Για αυτό και δοκιμάσαμε κρυσταλλώσεις παρουσία του γνωστού αναστολέα DCMU, καθώς και δυο ενώσεων, των οποίων η ανασταλτική δράση αποδεικνύεται σε παρακάτω κεφαλαίο, της MVNA και της DMVNA. Ωστόσο μόνο το MVNA έδωσε θετικά αποτελέσματα σε ορισμένες περιπτώσεις.

### Πρόσθετο

Από τα πρόσθετα που χρησιμοποιήθηκαν μόνο η ιστιδίνη έδωσε θετικά αποτελέσματα, ενώ τα υπόλοιπα δεν επέφεραν καμία βελτίωση. Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται οι κρύσταλλοι του συμπλόκου που μεγάλωσαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες απουσία (σχήμα 31) και παρουσία ιστιδίνης (σχήμα 32). Χωρίς ιστιδίνη λήφθηκαν αστερόμορφοι κρύσταλλοι, ενώ παρουσία ιστιδίνης αναπτύχθηκαν ραβδόμορφοι κρύσταλλοι, που είναι πιο συμπαγείς.



Σχήμα 31: Αστερόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3% w/v PEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 0.02% w/v OTG, διάλυμα δεξαμενής 300mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm



Σχήμα 32: Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3% w/v PEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 0.02% w/v OTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 300mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm

### Μικρό αμφίφιλο

Από τα μικρά αμφίφιλα που δοκιμάστηκαν μόνο το HPT έδωσε θετικά αποτελέσματα, ενώ τα άλλα προκαλούσαν διαχωρισμό φάσης ή ίζημα.

### Αντιδραστήριο καταβύθισης

Ως αντιδραστήρια καταβύθισης μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλατα, οργανικοί διαλυτές και διαφορά ευδιάλυτα πολυμερή. Από τα αντιδραστήρια καταβύθισης το πιο αποτελεσματικό ήταν η PEG, ενώ τα υπόλοιπα οδήγησαν σε μη κρυστάλλωση ή μετουσίωση των πρωτεϊνών. Το μοριακό βάρος του πολυμερούς φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη και το είδος των κρυστάλλων. Δοκιμάστηκαν PEG με μοριακά βάρη 2000, 3350, 4000, 6000 καθώς και η MPEG 2000. Τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε η PEG 2000 και MPEG 2000, ενώ τα μεγαλύτερα έδωσαν ίζημα ή διαχωρισμό φάσης.

### Απορρυπαντικό

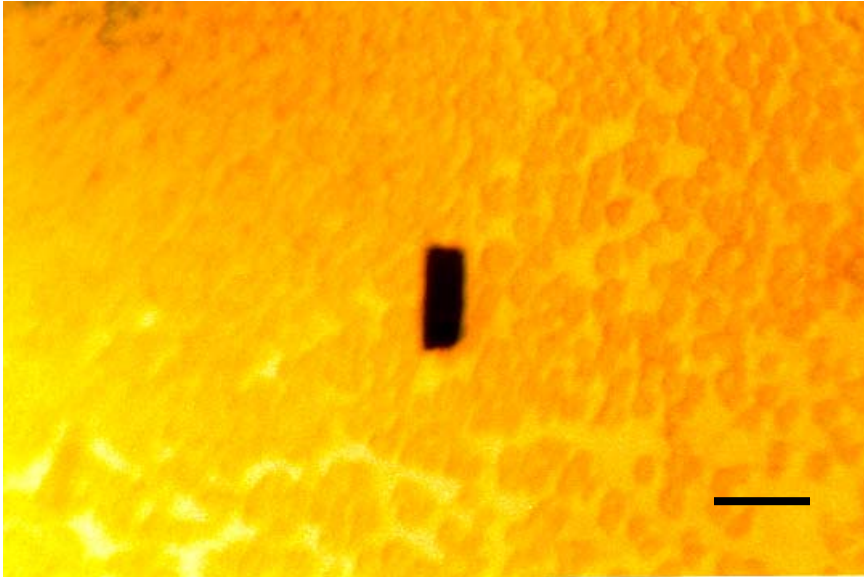
Τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν με LM. Το DM έδωσε μικρότερους κρυστάλλους (σχήμα 36). Επίσης δοκιμάστηκε και συνδυασμός απορρυπαντικών. Το δεύτερο απορρυπαντικό χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις κάτω από το CMC του, ώστε να δράσει σαν μικρό αμφίφιλο. Ως δεύτερο απορρυπαντικό έδρασαν θετικά τα OTG και HTG. Το HTG ενώ είναι κατά μια  $-CH_2-$  ομάδα μικρότερο από το OTG, έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με αυτό.

### Διάλυμα της δεξαμενής

Το διάλυμα που περιέχει η δεξαμενή επηρεάζει την κινητική της κρυστάλλωσης. Από τα διαφορά διαλύματα που εξετάστηκαν, μόνο το  $KH_2PO_4$  έδωσε κρυστάλλους.

### Θερμοκρασία

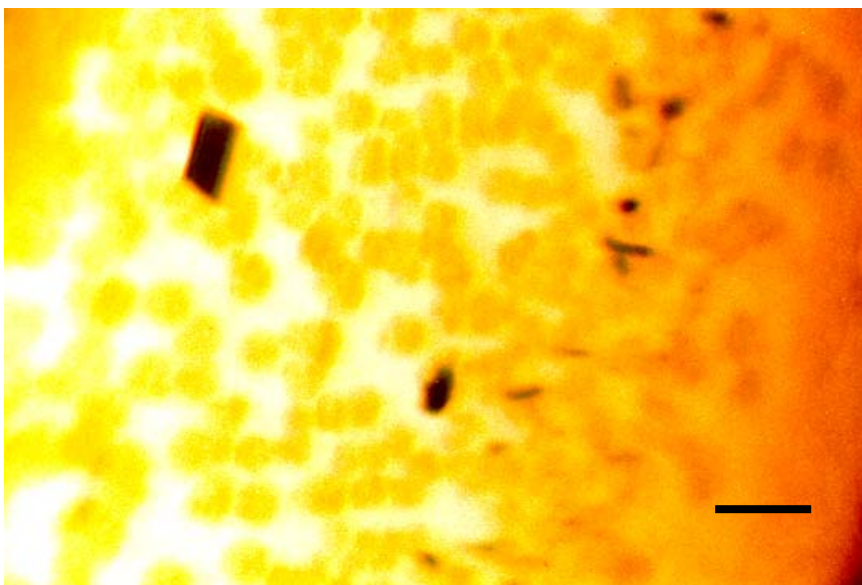
Η θερμοκρασία επηρεάζει αφενός τη σταθερότητα των πρωτεϊνών και αφετέρου ρυθμίζει την κινητική της κρυστάλλωσης. Από τις θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν  $18^{\circ}C$ . Σε μικρότερες θερμοκρασίες οι κρυσταλλώσεις απαιτούσαν περισσότερο χρόνο και οδηγούσαν συνήθως σε κακοσχηματισμένους κρυστάλλους, ενώ σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες εμφανιζόταν διαχωρισμός φάσης ή μετουσίωση.



Σχήμα 33: Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3.5% w/v MPEG 2000, 20mM Tris (pH=8), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v HTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 250mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1.1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm



Σχήμα:34: Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3% w/v PEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 1% w/v HPT, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 300mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



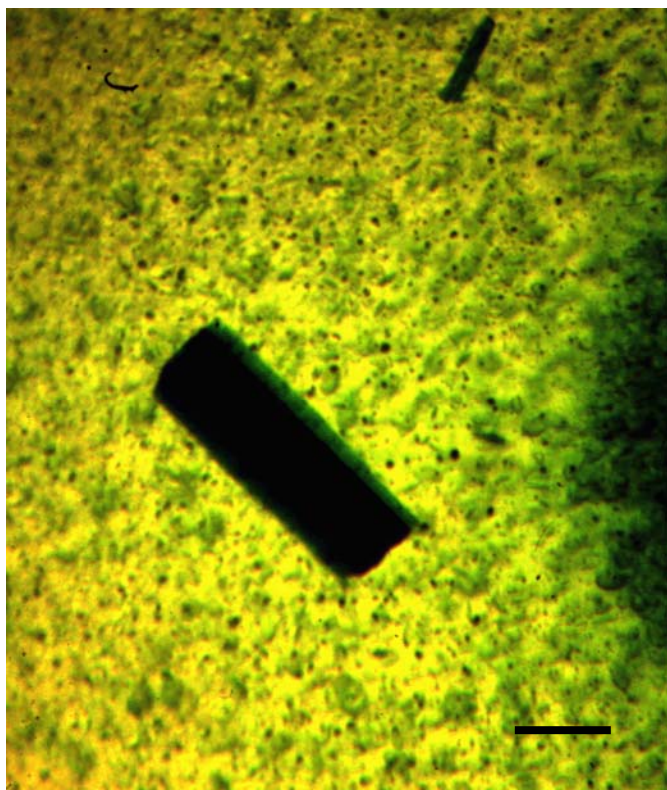
Σχήμα 35: Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3.3% w/v MPEG 2000, 20mM Tris (pH=8), 0.4% w/v DM, 0.2% w/v OTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 300mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $T=18^\circ\text{C}$ , 1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.

Τελικά οι καλύτεροι κρύσταλλοι που λήφθηκαν ήταν ραβδόμορφοι (σχήμα 36) με διαστάσεις  $0.4 \times 0.2 \times 0.2 \text{ mm}$ . Οι κρύσταλλοι αυτοί αναπτύχθηκαν στους  $18^\circ\text{C}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 20mM pH=8, παρουσία των απορρυπαντικών LM 0.04% w/v και OTG 0.2% w/v με 25mM His, ενώ ως αντιδραστήριο καταβύθισης χρησιμοποιήθηκε MPEG 2000 3.5% w/v. Το δείγμα, το οποίο είχε συγκέντρωση 1.0 mg Chl/ml, εξισορροπήθηκε έναντι διαλύματος δεξαμενής που περιείχε 300 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Οι κρύσταλλοι εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να περιθλούν τις ακτίνες X. Η περίθλαση εκτείνεται μόνο σε χαμηλή διακριτικότητα, κάτω από  $20 \text{ \AA}$  (σχήμα 37).

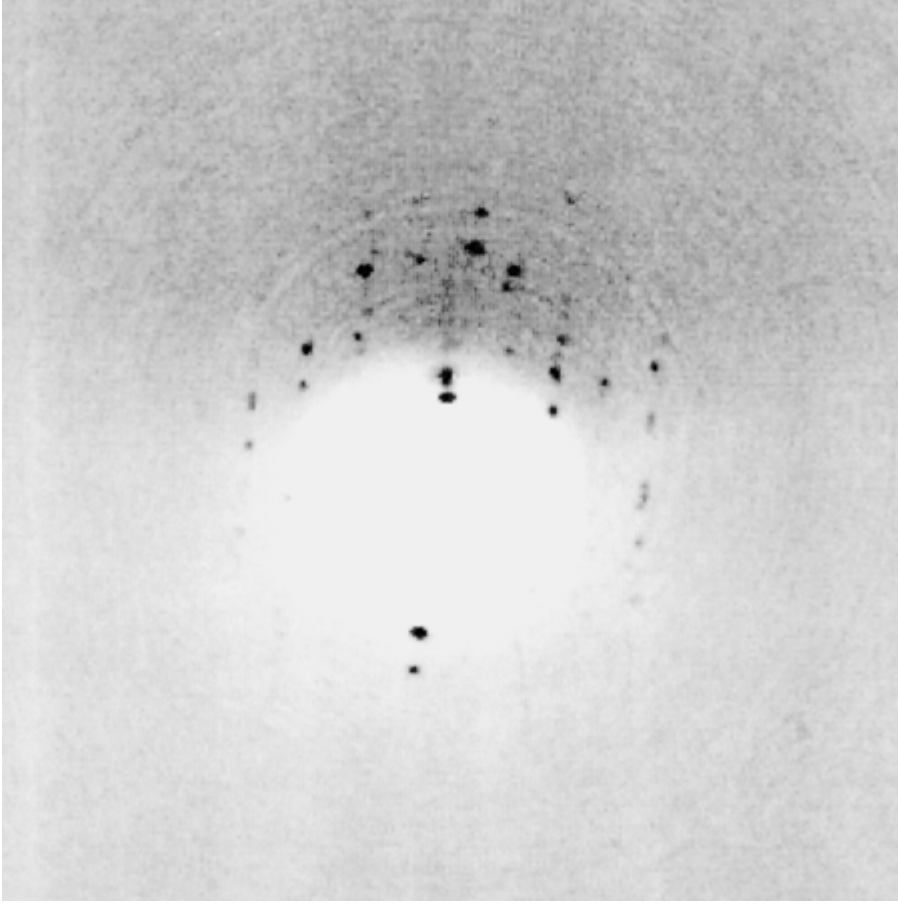
Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι βέλτιστες συνθήκες για τη κρυστάλλωση του συμπλόκου.

<b>Συγκέντρωση δείγματος</b>	1-1.2 mgChl/ml
<b>pH</b>	8
<b>Πρόσθετο</b>	25 mM His
<b>Αντιδραστήριο καταβύθισης</b>	3-4% w/v PEG/M PEG 2000
<b>Απορρυπαντικό</b>	0.04% w/v LM + 0.2% w/v OTG/HTG
<b>Διάλυμα δεξαμενής</b>	250-300 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$
<b>Θερμοκρασία</b>	18°C

Πίνακας 11



Σχήμα 36: Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3.5% w/v MPEG 2000, 20mM Tris (pH=8), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v OTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 300mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1.0mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



Σχήμα 37: Διάγραμμα περίθλασης του κρυστάλλου του συμπλόκου 47/43/RC, ο οποίος κρυσταλλώθηκε με τις παραπάνω συνθήκες.



## IV.2.2 Σύμπλοκο 47-43-33-D1-D2-Cyt b<sub>559</sub>

### IV.2.2.1 Μέθοδος απομόνωσης του συμπλόκου

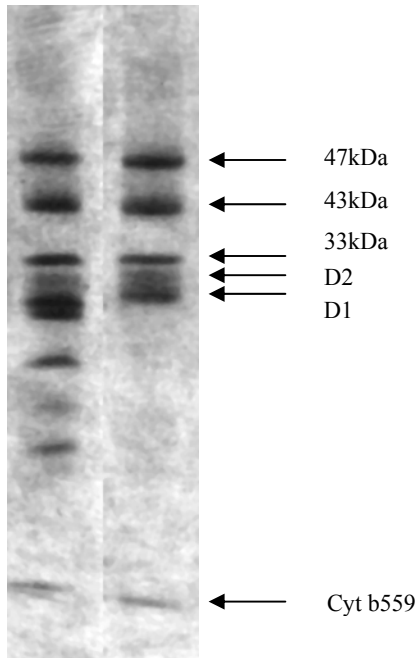
Το HM core κατεργάζεται με 0.5 % w/v LM σε ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Mes pH=5.2, ώστε η τελική συγκέντρωση χλωροφύλλης να είναι 0.45 mg/ml. Μετά από πεντάλεπτη επώαση το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στα 40 000 g. Το υπερκείμενο φορτώνεται σε κατιονοανταλλακτική κολώνα S-sepharose, η οποία είχε προηγουμένως ισορροπηθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει επιπλέον 5 mM NaCl. Η κολώνα πλένεται με το διάλυμα αυτό για να απομακρυνθεί το αδέσμευτο PSII-core και τυχόν αδέσμευτες πρωτεΐνες και στη συνέχεια με ρυθμιστικό διάλυμα, που περιέχει 100 mM NaCl εκλούεται το καθαρό σύμπλοκο.

Το σύμπλοκο υφίσταται διαπίδυση για πέντε ώρες με ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH για την απομάκρυνση των αλάτων. Στη συνέχεια το δείγμα συμπυκνώνεται μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση.

### IV.2.2.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου

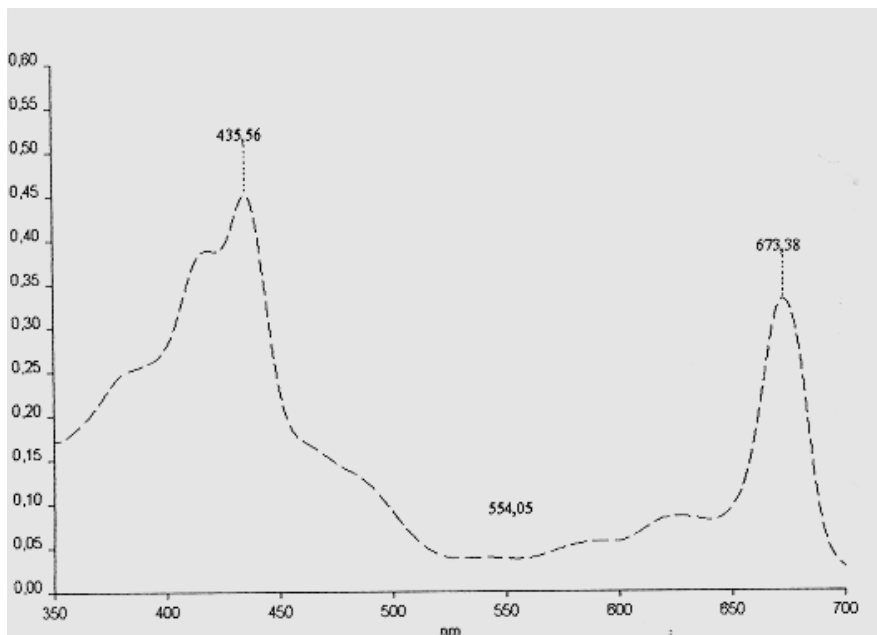
Χαρακτηρισμός του συμπλόκου με SDS-PAGE (σχήμα 38, ζώνη 2) δείχνει ότι το σύμπλοκο περιέχει τη πλήρη σειρά των πρωτεϊνών που χρειάζονται για την έκλυση οξυγόνου (47 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 33 kDa, 32 kDa και Cyt b<sub>559</sub>). Από τη σχετική ένταση της μπάντας της 33 kDa, υπολογίστηκε ότι το ποσοστό που παραμένει δεσμευμένη στο σύμπλοκο είναι περίπου 90%. Το σχήμα 39 δείχνει το φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου σε θερμοκρασία δωματίου. Το φάσμα παρουσιάζει δυο μέγιστα που οφείλονται στη παρουσία Chl a (673nm και 436nm). Το σημείο καμπής στα 490nm είναι ενδεικτικό της παρουσίας των καροτενοειδών, ενώ η έλλειψη ενός σημείου καμπής στα 650 nm υποδηλώνει την απουσία της Chl b. Η φωτοχημική ενεργότητα του συμπλόκου αποδείχτηκε με φασματοσκοπία EPR (σχήμα 40).

1 2

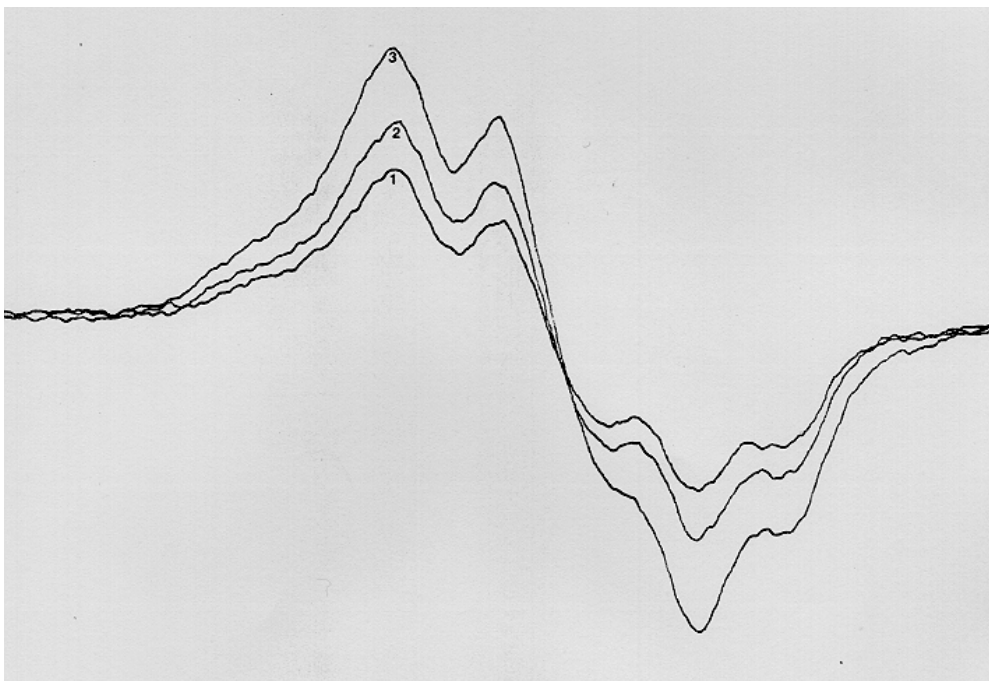


Σχήμα 38: Gel ηλεκτροφόρησης των συστημάτων:

1. HM-core
2. 47/43/33/RC



Σχήμα 39: Οπτικό φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου 47/43/33/RC



Σχήμα 40: EPR φάσμα του συμπλόκου 47/43/33/RC σε θερμοκρασία δωματίου

1. Φάσμα που καταγράφηκε στο σκοτάδι
2. Φάσμα που καταγράφηκε ένα λεπτό μετά τον τερματισμό της ακτινοβολήσης
3. Φάσμα που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια συνεχούς ακτινοβολήσης

Παράμετροι φασματοφωτόμετρου: ενίσχυση σήματος (gain),  $6.3 \times 10^6$ , ισχύς μικροκυμάτων, 20mW, διαμόρφωση (modulation), 4Gpp.

#### IV.2.2.3 Κρυστάλλωση του συμπλόκου

Για την κρυστάλλωση του συμπλόκου δοκιμάστηκαν όλοι οι παράγοντες που αναφέρονται στους πίνακες, ενώ ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε το σπανάκι εφόσον από τα προηγούμενα πειράματα κρίθηκε ως το καλύτερο σύστημα.

#### Συγκέντρωση του δείγματος

Εξετάστηκαν δείγματα με συγκέντρωση χλωροφύλλης από 0.7-1.5 mg/ml. Η καταλληλότερη συγκέντρωση ήταν μεταξύ 1 και 1.2 mg/ml. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις εμφανιζόταν μικροκρύσταλλοι ή μη κρυστάλλωση, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις το σύμπλοκο καθίζανε.

## pH

Πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν σε pH μεταξύ των τιμών 6.0 και 8.0. Οι καλύτεροι κρύσταλλοι λήφθηκαν σε pH=8, ενώ τα χαμηλότερα pH έδωσαν μόνο βελονοειδείς κρυστάλλους.

## Υπόστρωμα

Δοκιμάστηκε η κρυστάλλωση του συμπλόκου παρουσία των αναστολεων DCMU, MVNA και DMVNA. Ωστόσο η παρουσία τους δεν επέφερε κάποια βελτίωση.

## Πρόσθετο

Μεταξύ των αλάτων που δοκιμάστηκαν, θετικά αποτελέσματα έδωσε μόνο το  $ZnCl_2$ , ενώ από τα υπόλοιπα πρόσθετα μόνο η His επέφερε βελτίωση.

## Μικρό αμφίφιλο

Από τα μικρά αμφίφιλα που δοκιμάστηκαν κανένα δεν είχε θετική επίδραση.

## Αντιδραστήριο καταβύθισης

Από τα αντιδραστήρια καταβύθισης το πιο αποτελεσματικό ήταν η PEG. Δοκιμάστηκαν PEG με μοριακά βάρη 2000, 3350, 4000, 6000 καθώς και η MPEG 2000. Τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε η PEG και MPEG 2000, ενώ τα μεγαλύτερα έδωσαν ίζημα ή διαχωρισμό φάσης.

## Απορρυπαντικό

Τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν με LM σε συνδυασμό με OTG ή HTG.

## Διάλυμα δεξαμενής

Από τα διάφορα διαλύματα που εξετάστηκαν, μόνο το  $KH_2PO_4$  έδωσε κρυστάλλους.

## Θερμοκρασία

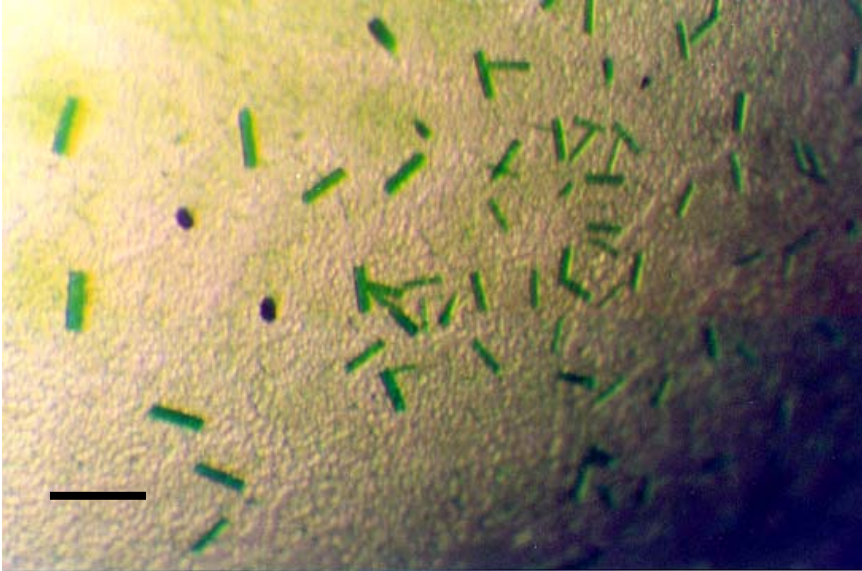
Από τις θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν 13°C. Σε μικρότερες θερμοκρασίες οι κρυσταλλώσεις απαιτούσαν περισσότερο χρόνο και

οδηγούσαν συνήθως σε κακοσχηματισμένους κρυστάλλους, ενώ σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες εμφανιζόταν διαχωρισμός φάσης ή μετουσίωση.

Τέλος, δοκιμάστηκαν τα αντιδραστήρια της HAMPTON RESEARCH για κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Ωστόσο όλες οι συνθήκες οδήγησαν σε μικρούς βελονοειδείς κρυστάλλους ή μη κρυστάλλωση.

1.	1.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.1 M ADA pH 6.5
2.	12% PEG 4000, 2% Isopropanol, 0.1 M ADA pH 6.5, 0.1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
3.	1.0 M NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> , 0.1 M ADA pH 6.5
4.	12% PEG 6000, 0.1 M ADA pH 6.5, 0.1 M MgCl <sub>2</sub>
5.	12% MPD, 0.1 M ADA pH 6.5
6.	1 M MgSO <sub>4</sub> , 0.1 M ADA pH 6.5, 0.1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
7.	4% PEG 400, 0.1 M ADA pH 6.5, 0.3 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
8.	1.0 M di Na/K PO <sub>4</sub> , 0.1 Na Hepes pH 7.5, 0.1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
9.	10% PEG 4000, 0.1 Na Hepes pH 7.5, 0.1 M NaCl
10.	18% PEG 400, 0.1 Na Hepes pH 7.5, 0.1 M MgCl <sub>2</sub>
11.	1.0 M K/Na Tartate, 0.1 Na Hepes pH 7.5
12.	18% PEG 400, 0.1 Na Hepes pH 7.5, 0.1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
13.	10% PEG 4000, 0.1 Na Hepes pH 7.5, 0.1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
14.	12% MPD, 0.1 Na Hepes pH 7.5, 0.1 M sodium citrate
15.	1.0 M sodium citrate, 0.1 Na Hepes pH 7.5
16.	4% PEG 400, 0.1 Na Hepes pH 7.5, 0.6 M MgSO <sub>4</sub>
17.	4% MPD, 0.1 Na Hepes pH 7.5, 0.6 M MgSO <sub>4</sub>
18.	0.1 M K/Na Tartate, 0.1 Na Hepes pH 7.5, 0.1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
19.	12% MPD, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20.	1.0 M di Na/K PO <sub>4</sub> , 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO
21.	0.1 M Na acetate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
22.	0.1 M NaCl, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
23.	12% PEG 6000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
24.	0.4 M MgSO <sub>4</sub> , 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.1 M K/Na Tartate
25.	0.2 M LiSO <sub>4</sub> , 0.1 M Tris HCl pH 8.5
26.	0.5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.1 M Tris HCl pH 8.5
27.	5% PEG 400, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.1 M Na citrate

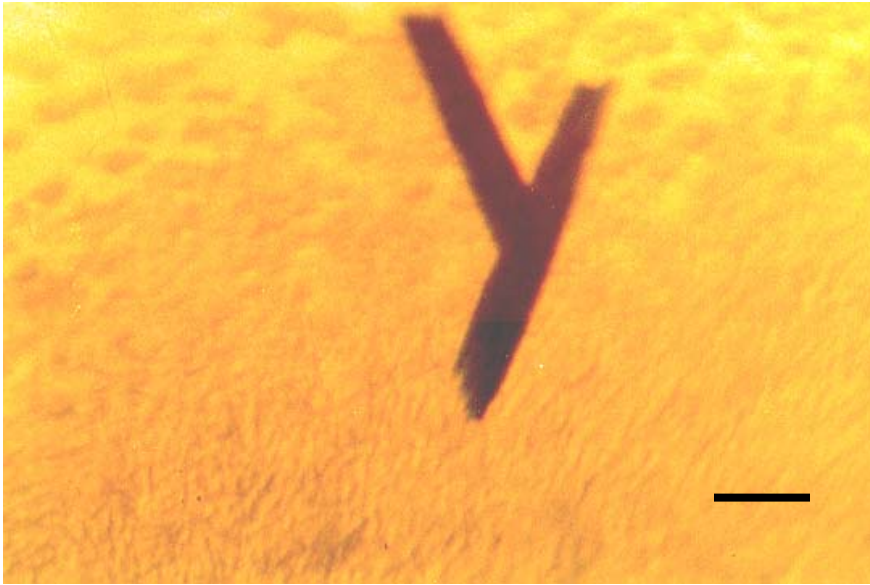
Πίνακας 12



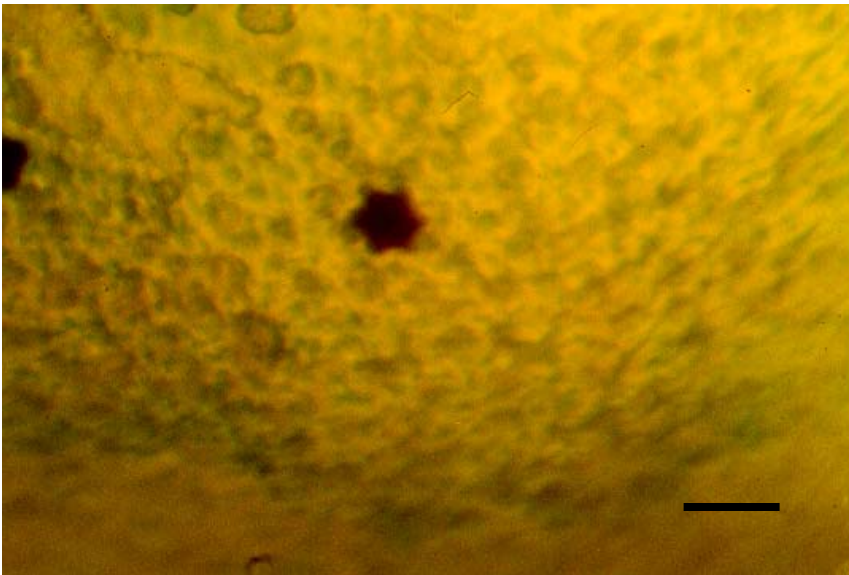
Σχήμα 41: Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/33/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 2.5% w/v PEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 0.02% w/v OTG, διάλυμα δεξαμενής 150mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1.0mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



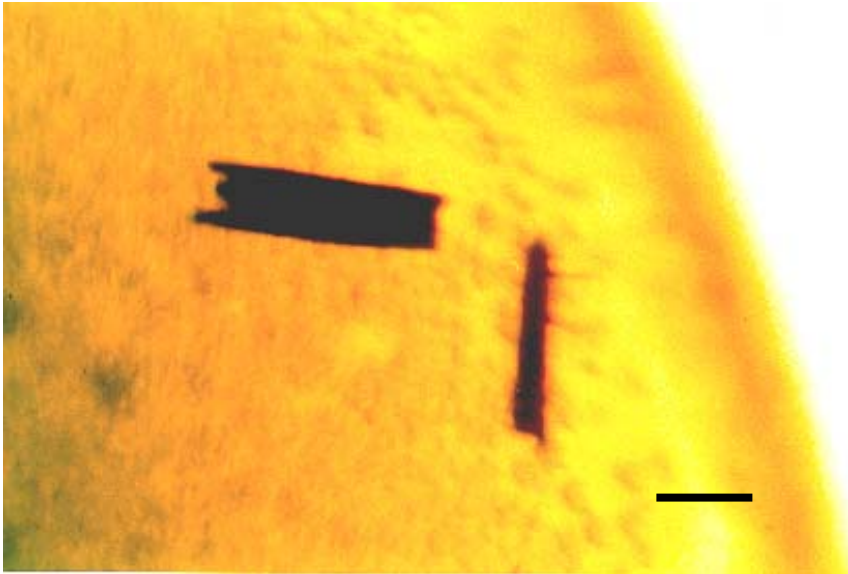
Σχήμα 42: Βελονοειδείς κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/33/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3.5% w/v MPEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v OTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 300mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1.0mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



Σχήμα 43: Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/33/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3.3% w/v MPEG 2000, 20mM Tris (pH=8), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v OTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 300mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1.0mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



Σχήμα 44: Αστερόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/33/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3% w/v PEG 2000, 20mM Tris (pH=8), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v OTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 250mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=18 °C, 1.2mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



Σχήμα 45: Κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/33/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3.2% w/v MPEG 2000, 20mM Tris (pH=8), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v HTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 250mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $T=18^\circ\text{C}$ , 1.0mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.

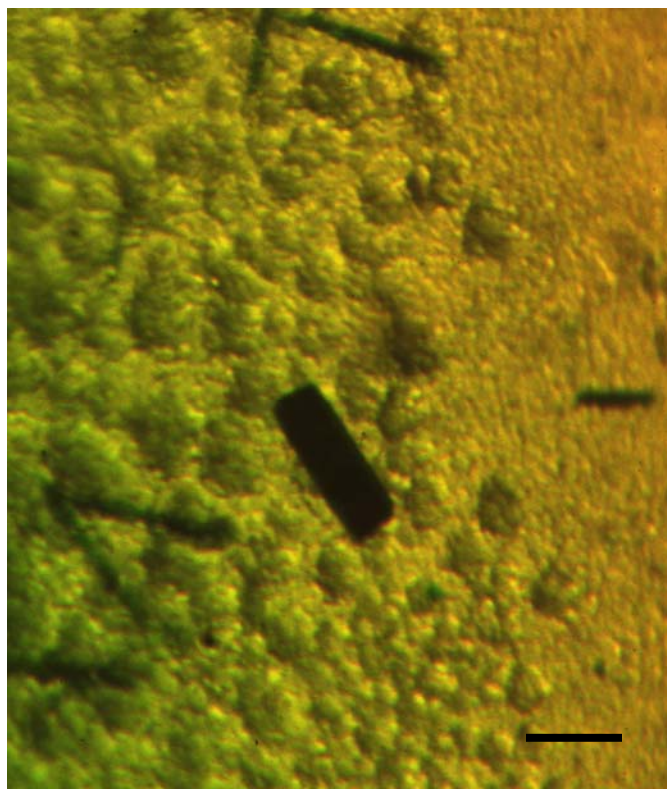
Τελικά οι καλύτεροι κρύσταλλοι που λήφθηκαν ήταν ραβδόμορφοι (σχήμα 46) με διαστάσεις 0.4 x 0.1 x 0.1 mm. Οι κρύσταλλοι αυτοί αναπτύχθηκαν στους  $13^\circ\text{C}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 20mM pH=8, παρουσία των απορρυπαντικών LM 0.04% w/v και OTG 0.2% w/v με 25mM His, ενώ ως αντιδραστήριο καταβύθισης χρησιμοποιήθηκε PEG 2000 3.3% w/v. Το δείγμα, το οποίο είχε συγκέντρωση 1.1 mg Chl/ml, εξισορροπήθηκε έναντι διαλύματος δεξαμενής που περιείχε 300 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Οι κρύσταλλοι εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να περιθλούν τις ακτίνες X. Το διάγραμμα περίθλασης του κρυστάλλου φαίνεται στο σχήμα 47. Η διακριτική ικανότητα που λήφθηκε ήταν 10 Å.

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι βέλτιστες συνθήκες για τη κρυστάλλωση του συμπλόκου.

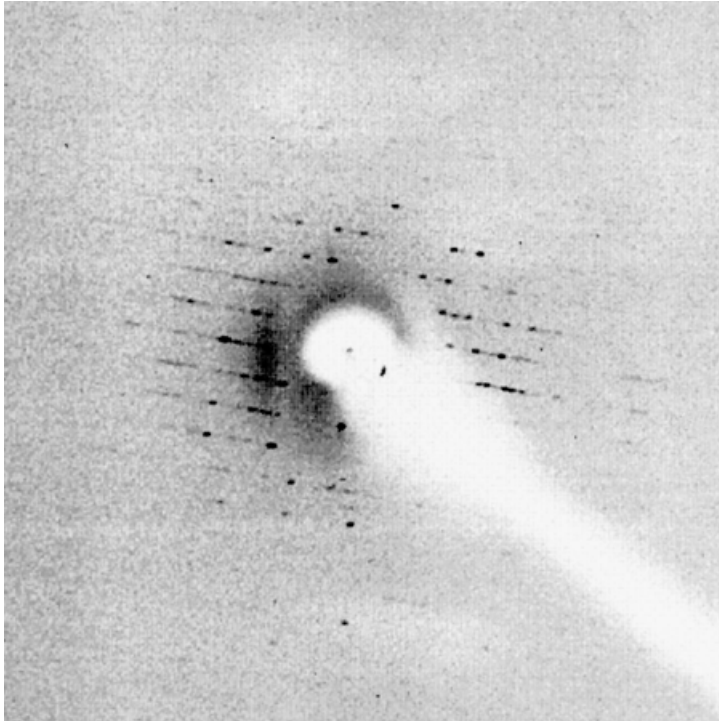


<b>Συγκέντρωση δείγματος</b>	1-1.2 mgChl/ml
<b>pH</b>	8
<b>Πρόσθετο</b>	25 mM His
<b>Αντιδραστήριο καταβύθισης</b>	3-4% w/v PEG/MPEG 2000
<b>Απορρυπαντικό</b>	0.04% w/v LM + 0.2% w/v OTG/HTG
<b>Διάλυμα δεξαμενής</b>	250-300 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$
<b>Θερμοκρασία</b>	13°C

Πίνακας 13



Σχήμα 46: Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/43/33/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 3.3% w/v PEG 2000, 20mM Tris (pH=8), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v OTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 300mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , T=13 °C, 1.1mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



Σχήμα 47: Διάγραμμα περίθλασης του κρυστάλλου του συμπλόκου 47/43/33/RC, ο οποίος κρυσταλλώθηκε με τις παραπάνω συνθήκες.

### IV.2.3 Σύμπλοκο 47 kDa-D1-D2-Cyt b<sub>559</sub>

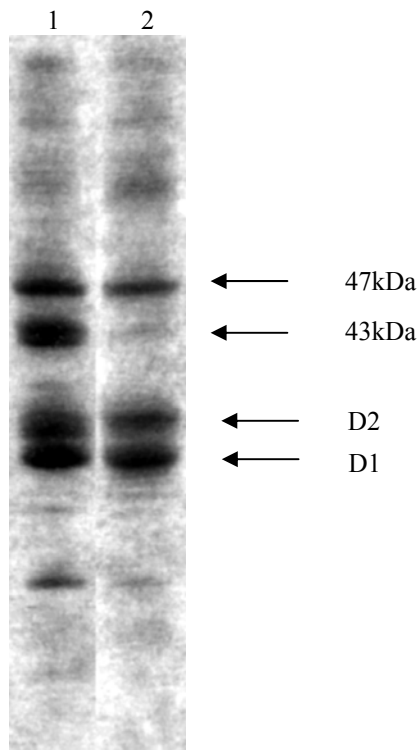
#### IV.2.3.1 Απομόνωση του συμπλόκου

Το Tris-OTG-core επαναιωρείται σε διάλυμα (MN +5 mM CaCl<sub>2</sub>), έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση χλωροφύλλης να είναι 1mg/ml. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος (6% OTG + 40mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Bis-Tris pH=6.5). Το δείγμα επωάζεται για μια ώρα και κατόπιν φυγοκεντρείται για 30min στα 40000xg. Το υπερκείμενο φορτώνεται σε διαβάθμιση συγκέντρωσης σουκρόζης 10-35% (w/v) διαλύματος που περιέχει 25 mM Bis-Tris pH=6.5, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.3% OTG και 0.04% LM και στη συνέχεια υφίσταται υπερφυγοκέντρωση στα 200 000 g για 17 ώρες. Με το τρόπο αυτό λαμβάνονται τρεις μπάντες. Η μεσαία μπάντα η οποία είναι ικανοποιητικά απαλλαγμένη από την CP43 φορτώνεται σε ανιον ανταλλακτική κολώνα Q-sepharose, ισορροπημένη με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 20 mM Bis-Tris pH=6.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NaCl, 1.5% w/v ταυρίνη, 0.04% w/v LM και επιπλέον 20 mM MgSO<sub>4</sub>. Το καθαρό 47/RC σύμπλοκο εκλούεται με αύξηση της ιονικής ισχύς στα 75 mM MgSO<sub>4</sub>. Το

σύμπλοκο υφίσταται διαπίδυση για πέντε ώρες με ρυθμιστικό διάλυμα καταλλήλου pH για την απομάκρυνση των αλάτων και στη συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση.

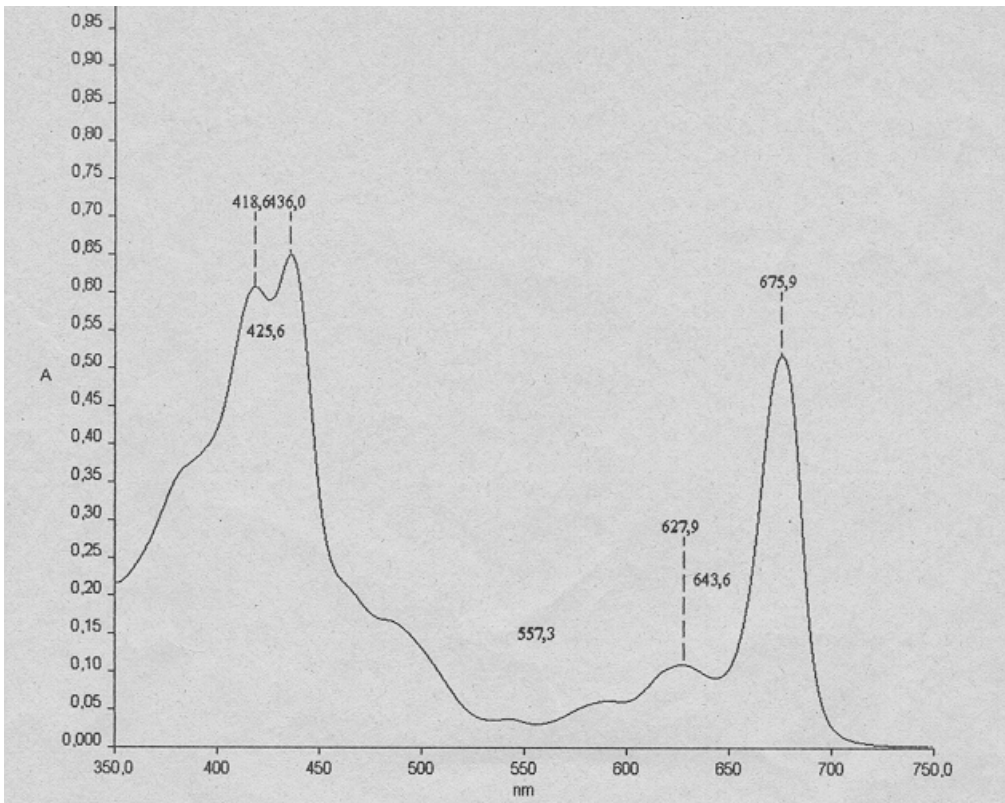
#### IV.2.3.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου

Το υποσύμπλοκο του πυρήνα του PSII που απομονώνεται με τον παραπάνω τρόπο είναι απαλλαγμένο από όλη την 43 kDa όπως φαίνεται από το σχήμα 48, ζώνη 2. Το φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου σε θερμοκρασία δωματίου φαίνεται στο σχήμα 49. Ο εμπλουτισμός στα συστατικά του ενεργού κέντρου συνοδεύεται από την εμφάνιση μιας διακριτής κορυφής στα 417 nm που οφείλεται στη συνεισφορά από την Pheo a και τη Soret ταινία του οξειδωμένου Cyt b<sub>559</sub>. Η φωτοχημική ενεργότητα του συμπλόκου αποδείχτηκε με φασματοσκοπία EPR (σχήμα 50).

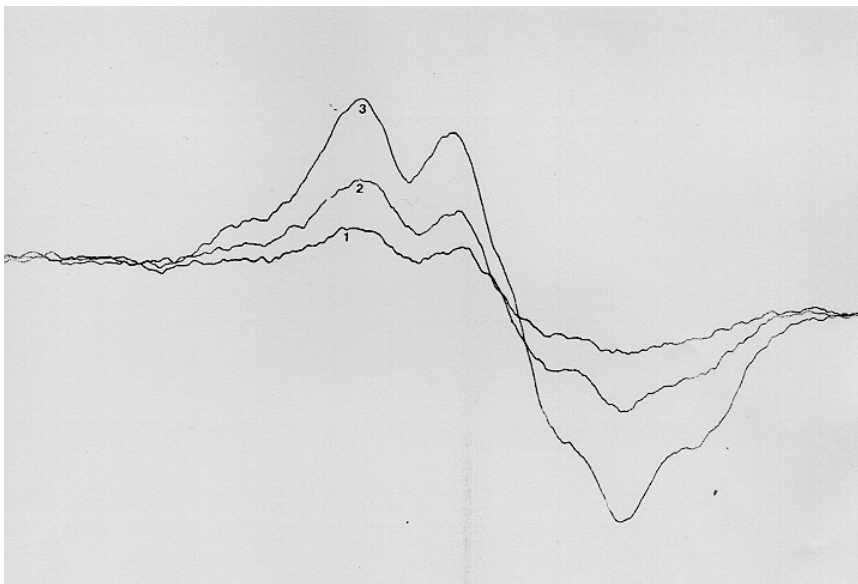


Σχήμα 48: Gel ηλεκτροφόρησης των συστημάτων:

1. Tris-OTG-core
2. 47/RC



Σχήμα 49: Οπτικό φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου 47/RC



Σχήμα 50: EPR φάσμα του συμπλόκου 47/RC σε θερμοκρασία δωματίου

1. Φάσμα που καταγράφηκε στο σκοτάδι
2. Φάσμα που καταγράφηκε ένα λεπτό μετά τον τερματισμό της ακτινοβολήσης
3. Φάσμα που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια συνεχούς ακτινοβολήσης

Παράμετροι φασματοφωτόμετρου: ενίσχυση σήματος (gain),  $6.3 \times 10^6$ , ισχύς μικροκυμάτων, 20mW, διαμόρφωση (modulation), 4Gpp.

#### IV.2.3.3 Κρυστάλλωση του συμπλόκου

Για την κρυστάλλωση του συμπλόκου δοκιμάστηκαν όλοι οι παράγοντες που αναφέρονται στους πίνακες, ενώ ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε το σπανάκι.

##### Συγκέντρωση του δείγματος

Εξετάστηκαν δείγματα με συγκέντρωση χλωροφύλλης από 0.7-1.5 mg/ml. Η καταλληλότερη συγκέντρωση ήταν μεταξύ 0.7 και 0.85 mg/ml. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις εμφανιζόταν μικροκρύσταλλοι ή μη κρυστάλλωση, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις το σύμπλοκο καθίζανε.

##### pH

Κρυσταλλώσεις δοκιμάστηκαν σε pH από 6.0 έως 8.0. Οι καλύτεροι κρύσταλλοι λήφθηκαν σε pH=6 και 6.5, ενώ τα μεγαλύτερα pH έδωσαν ίζημα.

##### Υπόστρωμα

Δοκιμάστηκε η κρυστάλλωση του συμπλόκου παρουσία των παρεμποδιστών DCMU, MVNA και DMVNA. Ωστόσο η παρουσία τους δεν επέφερε κάποια βελτίωση.

##### Πρόσθετο

Από τα πρόσθετα που χρησιμοποιήθηκαν κανένα δεν επέφερε κάποια βελτίωση.

##### Μικρό αμφίφιλο

Από τα μικρά αμφίφιλα που δοκιμάστηκαν κανένα δεν είχε θετική επίδραση.

##### Αντιδραστήριο καταβύθισης

Από τα αντιδραστήρια καταβύθισης το πιο αποτελεσματικό ήταν η PEG. Δοκιμάστηκαν PEG με μοριακά βάρη 2000, 3350, 4000, 6000 καθώς και η MPEG. Τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε η PEG 2000, ενώ τα μεγαλύτερα έδωσαν ίζημα ή διαχωρισμό φάσης.

### Απορρυπαντικό

Κρύσταλλοι λήφθηκαν παρουσία των απορρυπαντικών LM και UM σε συνδυασμό με OTG.

### Διάλυμα της δεξαμενής

Από τα διαλύματα που εξετάστηκαν, κρυστάλλους έδωσαν το NaCl καθώς και ο συνδυασμός NaCl και PEG 2000.

### Θερμοκρασία

Από τις θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν 18°C. Σε μικρότερες θερμοκρασίες οι κρυσταλλώσεις απαιτούσαν περισσότερο χρόνο και οδηγούσαν συνήθως σε κακοσχηματισμένους κρυστάλλους, ενώ σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες εμφανιζόταν διαχωρισμός φάσης ή μετουσίωση.

Τέλος, δοκιμάστηκαν τα αντιδραστήρια της HAMPTON RESEARCH για κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Ωστόσο όλες οι συνθήκες οδήγησαν σε μικρούς βελονοειδείς κρυστάλλους ή μη κρυστάλλωση.

1.	18% 400, 0.1 M Na citrate pH 5.6, 0.1 M NaCl
2.	12% PEG 4000, 0.1 M Na citrate pH 5.6, 0.1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
3.	12% PEG 4000, 0.1 M Na citrate pH 5.6, 0.1 M NaCl
4.	12% PEG 6000, 0.1 M Na citrate pH 5.6, 0.1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
5.	4% PEG 400, 0.1 M Na citrate pH 5.6, 0.1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
6.	12% PEG 4000, 2% Isopropanol, 0.1 M ADA pH 6.5, 0.1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
7.	12% PEG 6000, 0.1 M ADA pH 6.5, 0.1 M MgCl <sub>2</sub>
8.	12% MPD, 0.1 M ADA pH 6.5
9.	4% PEG 400, 0.1 M ADA pH 6.5, 0.3 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
10.	1.0 M di Na/K PO <sub>4</sub> , 0.1 Na HEPES pH 7.5, 0.1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
11.	10% PEG 4000, 0.1 Na HEPES pH 7.5, 0.1 M NaCl
12.	18% PEG 400, 0.1 Na HEPES pH 7.5, 0.1 M MgCl <sub>2</sub>
13.	1.0 M K/Na Tartate, 0.1 Na HEPES pH 7.5
14.	18% PEG 400, 0.1 Na HEPES pH 7.5, 0.1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
15.	10% PEG 4000, 0.1 Na HEPES pH 7.5, 0.1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
16.	12% MPD, 0.1 Na HEPES pH 7.5, 0.1 M sodium citrate
17.	1.0 M sodium citrate, 0.1 Na HEPES pH 7.5
18.	4% PEG 400, 0.1 Na HEPES pH 7.5, 0.6 M MgSO <sub>4</sub>
19.	4% MPD, 0.1 Na HEPES pH 7.5, 0.6 M MgSO <sub>4</sub>
20.	0.1 M K/Na Tartate, 0.1 Na HEPES pH 7.5, 0.1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
21.	12% MPD, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
22.	1.0 M di Na/K PO <sub>4</sub> , 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
23.	0.1 M Na acetate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
24.	0.1 M NaCl, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
25.	12% PEG 6000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
26.	0.4 M MgSO <sub>4</sub> , 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.1 M K/Na Tartate
27.	5% PEG 400, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.1 M Na citrate

Πίνακας 14

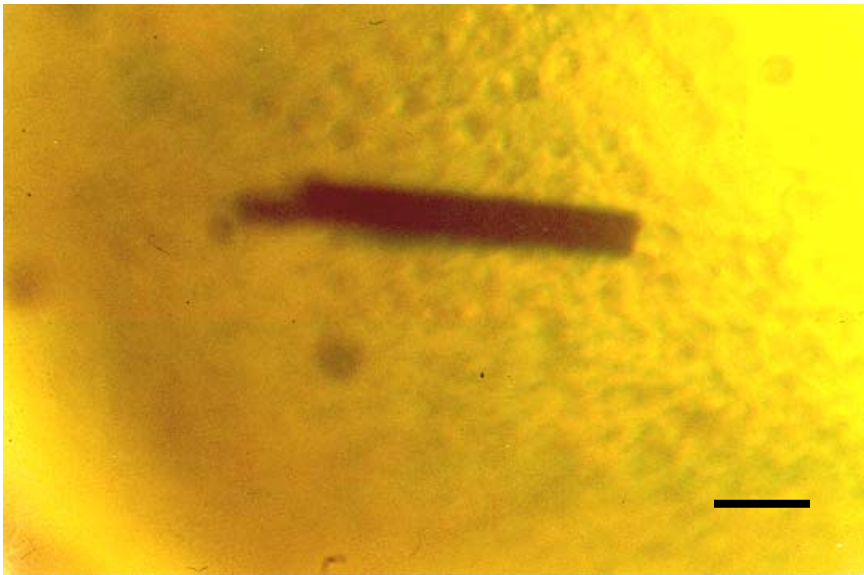
Τελικά οι καλύτεροι κρύσταλλοι που λήφθηκαν ήταν εξαγωνικοί (σχήμα 52) μεγέθους περίπου 0.1 x 0.1 x 0.1 mm. Οι κρύσταλλοι αυτοί αναπτύχθηκαν στους 18°C σε ρυθμιστικό διάλυμα KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM pH=6, παρουσία των απορρυπαντικών LM 0.04% w/v και OTG 0.2% w/v, ενώ ως αντιδραστήριο καταβύθισης χρησιμοποιήθηκε PEG 2000 5% w/v. Το δείγμα, το οποίο είχε συγκέντρωση 0.85 mg Chl/ml, εξισορροπήθηκε έναντι

διαλύματος δεξαμενής που περιείχε 400 mM NaCl. Οι κρύσταλλοι εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να περιθλούν τις ακτίνες X. Η διακριτική ικανότητα που λήφθηκε ήταν 15 Å (σχήμα 53).

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι βέλτιστες συνθήκες για τη κρυστάλλωση του συμπλόκου.

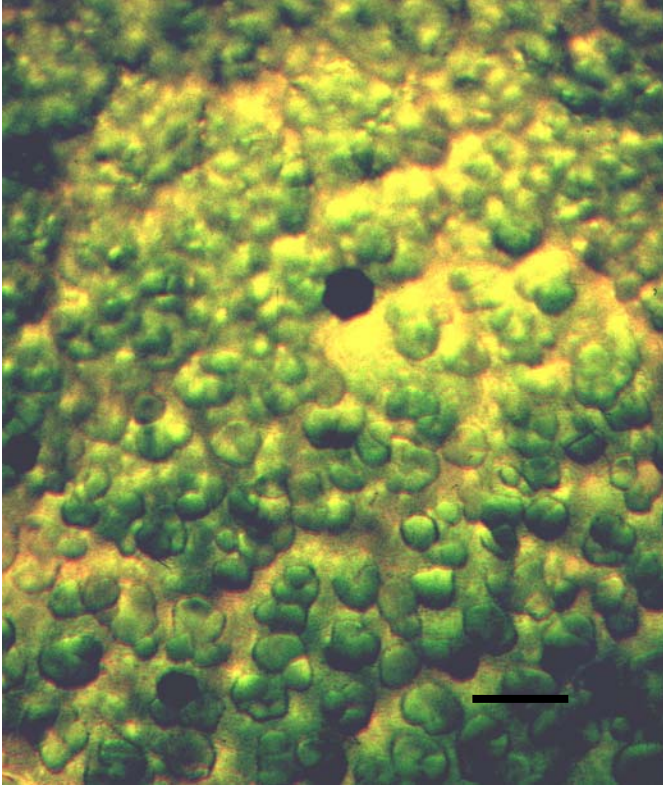
<b>Συγκέντρωση δείγματος</b>	0.7-0.85 mg Chl/ml
<b>pH</b>	6/6.5
<b>Αντιδραστήριο καταβύθισης</b>	4-5.5% w/v PEG 2000
<b>Απορρυπαντικό</b>	0.04% w/v LM/0.1% w/v UM+0.2% w/v OTG/HTG
<b>Διάλυμα δεξαμενής</b>	400-450 mM NaCl/100-300 mM NaCl+ 9% w/v PEG 2000
<b>Θερμοκρασία</b>	18°C

Πίνακας 15

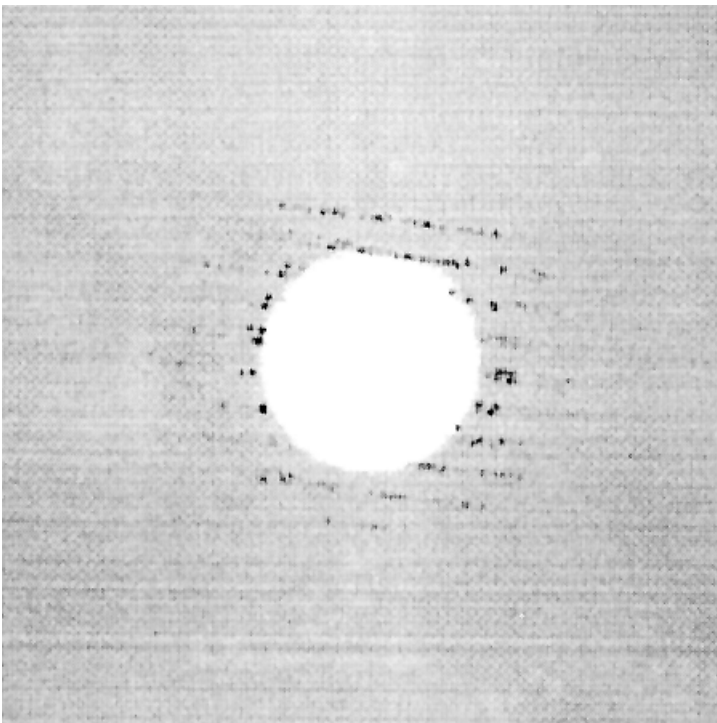


Σχήμα 51: Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 5% w/v PEG 2000, 20mM Bis-Tris (pH=6.5), 0.1% w/v UM, 0.2% w/v OTG, διάλυμα δεξαμενής 200mM NaCl και 9% w/v PEG 2000, T=18 °C, 0.75mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.





Σχήμα 52: Εξαγωνικοί κρύσταλλοι του συμπλόκου 47/RC από σπανάκι. Συνθήκες κρυστάλλωσης: 5% w/v PEG 2000, 20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6), 0.04% w/v LM, 0.2% w/v OTG, 25mM His, διάλυμα δεξαμενής 400mM NaCl, T=18 °C, 0.85 mg Chl/ml. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25mm.



Σχήμα 53: Διάγραμμα περίθλασης του κρυστάλλου του συμπλόκου 47/RC, ο οποίος κρυστάλλώθηκε με τις παραπάνω συνθήκες.

## Συζήτηση

Η απομόνωση και η κρυστάλλωση PSII-core υποσυμπλόκων ξεκινώντας από διαφορά φυτά έδειξε ότι το σπανάκι αποτελεί την καλύτερη πηγή. Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί κρυσταλλώσεις PSII-core υποσυμπλόκων από σπανάκι, μπιζέλι, καλαμπόκι και κολοκύθα<sup>105</sup>. Ωστόσο και από τις αναφορές αυτές γίνεται φανερό ότι το καλύτερο σύστημα από ανώτερα φυτά μέχρι σήμερα πηγάζει από το σπανάκι.

Τα σύμπλοκα που απομονώθηκαν στερούνται των πρωτεϊνών 22, 10 και CP29 οι οποίες δεν είναι απαραίτητες για την φωτοσυνθετική διάσπαση του H<sub>2</sub>O. Τα τρία καινούρια πρωτόκολλα απομόνωσης παρουσιάζουν υψηλή απόδοση και οδηγούν σε ιδιαίτερα αναπαραγωγίμους κρυστάλλους. Ωστόσο η διακριτικότητα των κρυστάλλων παραμένει χαμηλή, που υποδηλώνει την ύπαρξη υψηλής μωσαικότητας, η οποία πρέπει να οφείλεται στην ετερογένεια του συστήματος.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το PSII είναι από τη φύση του ανομοιογενές και ασταθές. Φαίνεται λοιπόν ότι στη προσπάθεια μας να απομονώσουμε ένα ομοιογενές σύμπλοκο, επάγονται νέες ετερογένειες, καθώς γίνεται ολοένα και πιο ασταθές. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο 47/RC αποτελεί το μικρότερο σύμπλοκο που απομονώθηκε και είναι γνωστό ότι οι τρεις αυτές πρωτεΐνες βρίσκονται σε στενή αλληλεπίδραση. Όμως, καθώς ελλατώνεται ο αριθμός των πρωτεϊνών, αυξάνεται η ευαισθησία των D1 και D2, η οποία είναι παράγοντας ετερογένειας.

Στη περίπτωση του συμπλόκου 47/43/RC, η παρουσία της 43 kDa είναι πιθανό να ευθύνεται για τη χαμηλή διακριτικότητα των κρυστάλλων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η 43 kDa δεν δεσμεύεται ισχυρά με το ενεργό κέντρο και επιπλέον είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη.

Από τα σύμπλοκα αυτά πιο αποτελεσματικό υπήρξε το υποσύμπλοκο του HM-core που περιέχει την εξωτερική πρωτεΐνη 33 kDa. Η παρουσία αυτής της πρωτεΐνης πιστεύουμε ότι είναι σημαντική γιατί, ως γνωστό, προστατεύει το σύμπλοκο του μαγγανίου και είναι απαραίτητη για την ενεργότητα του PSII. Για πρώτη φορά επιτυγχάνεται η κρυστάλλωση ενός PSII συμπλόκου το οποίο περιέχει όλες τις απαραίτητες πρωτεΐνες για την έκλυση οξυγόνου. Επιπλέον η 33 kDa πρωτεΐνη εισάγει

ένα υδρόφιλο τμήμα στο σύμπλοκο, που παίζει καθοριστικό ρόλο για την ανάπτυξη των υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων για την κρυστάλλωση και πιθανώς να είναι αυτός ο λόγος που οι συγκεκριμένοι κρύσταλλοι έδωσαν τη καλύτερη διακριτικότητα. Ωστόσο είναι πιθανό η 33 kDa, να εισάγει ετερογένεια εφόσον δεν συνδέεται τόσο ισχυρά στο απομονωμένο σύμπλοκο. Συγκεκριμένα υπολογίστηκε ότι το ποσοστό της 33 kDa που παραμένει δεσμευμένη στο σύμπλοκο μετά την απομόνωση του είναι περίπου 90%. Σημαντικό ρόλο στις κρυσταλλώσεις έπαιξε η παρουσία της ιστιδίνης, η οποία αποδείχτηκε ότι ασκεί προστατευτική δράση στο PSII και συγκεκριμένα στην πρωτεΐνη 43 kDa.

### **IV.3 Δομικές μελέτες πάνω στο φωτοσύστημα II με ηλεκτρονική μικροσκοπία**

Έχουν αναπτυχθεί δύο συμπληρωματικές προσεγγίσεις για την παροχή δομικών πληροφοριών, όσον αφορά τη τοπολογία και τη σχετική συναρμογή των υπομονάδων στο PSII, με ηλεκτρονική μικροσκοπία.

α) Μελέτες χαμηλής διακριτικής ικανότητας πάνω σε μεμβράνες ή σύμπλοκα διαλυτοποιημένα σε απορρυπαντικό και

β) Ηλεκτρονικές κρυσταλλογραφικές μελέτες πάνω σε δυσδιάστατους κρυστάλλους.

Βασιζόμενοι σε μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχουν προταθεί ποικιλία μοντέλων για το PSII. Γενικά οι γνώμες είναι διχασμένες όσον αφορά την ερμηνεία της παρατηρούμενης αξονικής συμμετρίας και έχουν διατυπωθεί δυο προτάσεις για τη κατάσταση ολιγομερισμού του PSII in vivo:

- 1) Το PSII αποτελεί μονομερές που παρουσιάζει ψευδοαξονική συμμετρία<sup>121,122,123,124,125</sup> και
- 2) Η εναλλακτική λύση της διμερούς μορφής όπου τα επιμέρους τμήματα παρουσιάζουν ασύμμετρη δομή<sup>126,127,128,129</sup>.

#### **IV.3.1 Μελέτη των διαλυτοποιημένων συμπλόκων OTG-core και Tris-OTG-core με ηλεκτρονική μικροσκοπία και συγκριτική μελέτη**

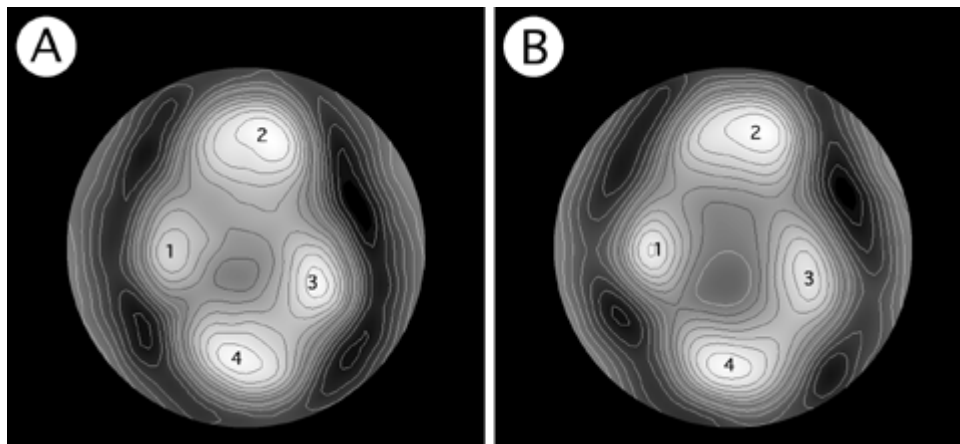
Σωματίδια του OTG-core και Tris-OTG-core διαλυτοποιημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 20mM Mes και 0.04% LM, προσροφήθηκαν σε πλέγμα χαλκού και στη συνέχεια έγινε ψυκτοξήρανση για ανάλυση μάζας ή αρνητική χρώση με φορμικό ουρανύλιο για single particle averaging. Τα δείγματα εξετάστηκαν με ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Hitachi H7000.

Διαλυτοποιημένο OTG-core που διατηρεί και τις τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες μελετήθηκε με STEM και υπολογίστηκε ότι το σύμπλοκο έχει μοριακή μάζα 327 ( $\pm 64$ )

kDa. Οι όψεις του συμπλόκου μελετήθηκαν με single particle analysis. Τα ελλειψοειδή σωματίδια είχαν διαστάσεις (13.6 x 9.7) nm. Στο σχήμα 54A φαίνεται η πάνω όψη του σωματιδίου, που παρουσιάζει τέσσερις περιοχές πρωτεϊνικής πυκνότητας και μια κεντρική κοιλότητα. Οι δύο κύριες πυκνότητες (2,4) βρίσκονται πάνω στον μεγάλο άξονα προς τη περιφέρεια του σωματιδίου, ενώ οι δύο δευτερεύουσες πυκνότητες (1,3) εντοπίζονται πάνω στον μικρό άξονα, παρουσιάζοντας έτσι μια ψευδοαξονική συμμετρία. Η απόσταση μεταξύ των κύριων περιοχών πυκνότητας βρέθηκε να είναι 9.9nm, ενώ εκείνη μεταξύ των δευτερεύουσων είναι 6.4nm.

Τα σωματίδια του Tris-OTG-core εμφανίζουν τα ίδια γενικά χαρακτηριστικά (σχήμα 54B), με τέσσερις περιοχές πρωτεϊνικής πυκνότητας και μια κεντρική κοιλότητα με ψευδοαξονική συμμετρία. Μόνο που στη περίπτωση αυτή, η πυκνότητα στη θέση 3 είναι λίγο μικρότερη και η κεντρική κοιλότητα αρκετά μεγαλύτερη.

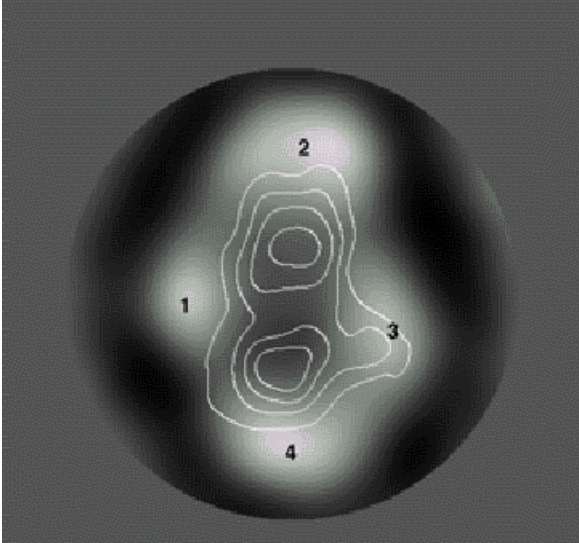
Για τον εντοπισμό των εξωτερικών πρωτεϊνών υπολογίστηκαν συγκριτικοί χάρτες μεταξύ των OTG-core και Tris-OTG-core συμπλόκων (σχήμα 55). Οι χάρτες αυτοί παρουσιάζουν δύο περιοχές πυκνότητας που αποδίδονται στις εξωτερικές πρωτεΐνες.



Σχήμα 54:

A: Ηλεκτρονιογραφία του συμπλόκου OTG-core

B: Ηλεκτρονιογραφία του συμπλόκου Tris-OTG-core



Σχήμα 55: Συγκριτικός χάρτης μεταξύ του OTG-core και του Tris-OTG-core

#### IV.3.2 Μελέτη του OTG-core με ηλεκτρονική κρυσταλλογραφία

Το OTG-core επαναιωρήθηκε σε διάλυμα SMN που περιέχει 0.4% OTG και αναμίχθηκε με DMPC διαλυτοποιημένο σε 1.3% OTG σε αναλογία λιπιδίου/πρωτεΐνης μεταξύ 0.1 και 1. Το δείγμα στη συνέχεια αραιώθηκε στον τετραπλάσιο όγκο με 50 mM 2-Hepes και επώαστηκε σε θερμοκρασίες από 6 έως 22°C. Οι κρύσταλλοι υπόστηκαν ψηκτοξήρανση και στη συνέχεια σκίαση με μίγμα πλατίνας-άνθρακα.

Με επανασύσταση του OTG-core σε DMPC σχηματίστηκαν κυλινδρικοί κρύσταλλοι με διάμετρο 73(±5) nm και μήκος 1-2 μm (σχήμα 56). Η πολυπεπτιδική σύσταση των κρυστάλλων εξετάστηκε με SDS-PAGE. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 57, (ζώνη 1), το διαλυτοποιημένο OTG-core περιείχε τις πρωτεΐνες CP47, CP43, D1, D2, CP29, CP26 καθώς και τέσσερα πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα μικρότερη από 10 kDa. Επιπλέον και οι τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες ήταν παρούσες στο σύμπλοκο. Η ζώνη 2 δείχνει τη πρωτεϊνική σύσταση των κρυστάλλων, που όπως φαίνεται στερούν τις πρωτεΐνες 17 και 23 kDa. Με την τεχνική της σκίασης αποκαλύφθηκε η πάνω επιφάνεια των κρυστάλλων, που επέτρεψε τον προσδιορισμό των παραμέτρων του κρυσταλλικού πλέγματος. Η μοναδιαία κυψελίδα είχε ρομβικό σχήμα ( $a=16.2$  nm,  $b=13.7$ nm,  $\gamma=142.4^\circ$ ) και περιείχε δύο επιμήκη τμήματα χωρισμένα με μια κεντρική κοιλότητα, έτσι ώστε να παρουσιάζει μια ψευδοαξονική συμμετρία (σχήμα 58). Επειδή οι διαστάσεις του πλέγματος ήταν πολύ μικρές για να χωράει ένα διμερές PSII ανά μοναδιαία κυψελίδα έγινε ανάλυση μάζας χρησιμοποιώντας STEM και στη συνέχεια αναλυτική υπερφυγοκέντρωση και υπολογίστηκε ότι κάθε στοιχειώδης κυψελίδα περιέχει πρωτεϊνική

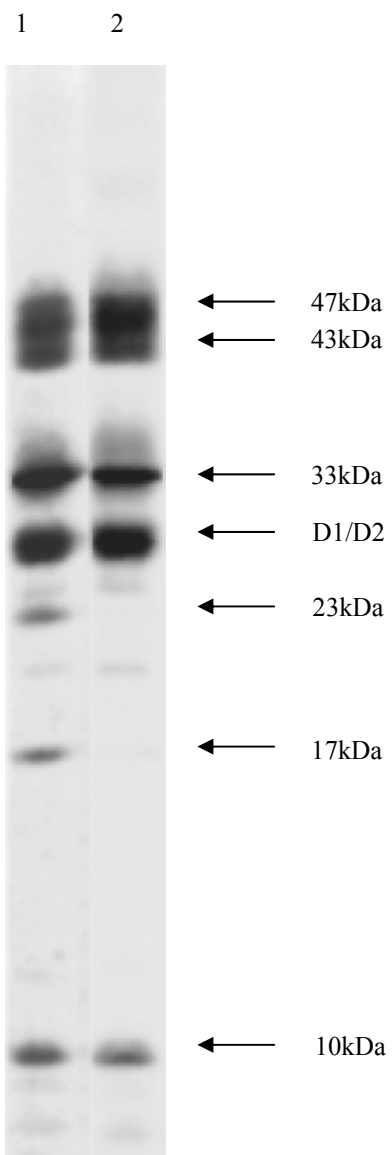
μάζα των 318 kDa. Αυτό αντιστοιχεί στη θεωρητική μάζα ενός συμπλόκου PSII-core χωρίς τις 17 kDa και 23 kDa.

Χρησιμοποιήθηκε ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία με αντίσωμα της 33 kDa ώστε να βρεθεί ο προσανατολισμός του συμπλόκου.



Σχήμα 56: Δυσδιάστατοι κρύσταλλοι του OTG-core

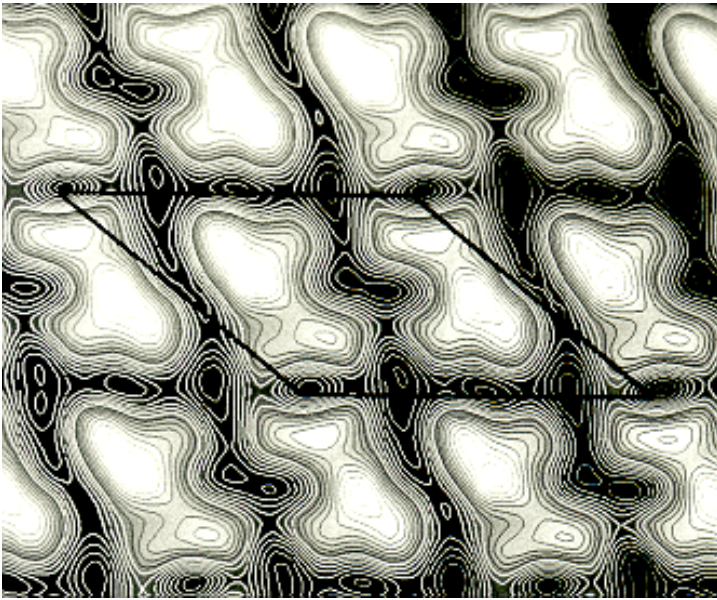
Από τις μελέτες αυτές προέκυψε το μοντέλο της τοπολογίας των υπομονάδων του PSII-core, που φαίνεται στο σχήμα 59. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό το ετεροδιμερές των D1/D2 πρωτεϊνών καταλαμβάνει το κέντρο του συμπλόκου, ενώ οι πρωτεΐνες CP43 και CP47 εντοπίζονται στη περιφέρεια του.



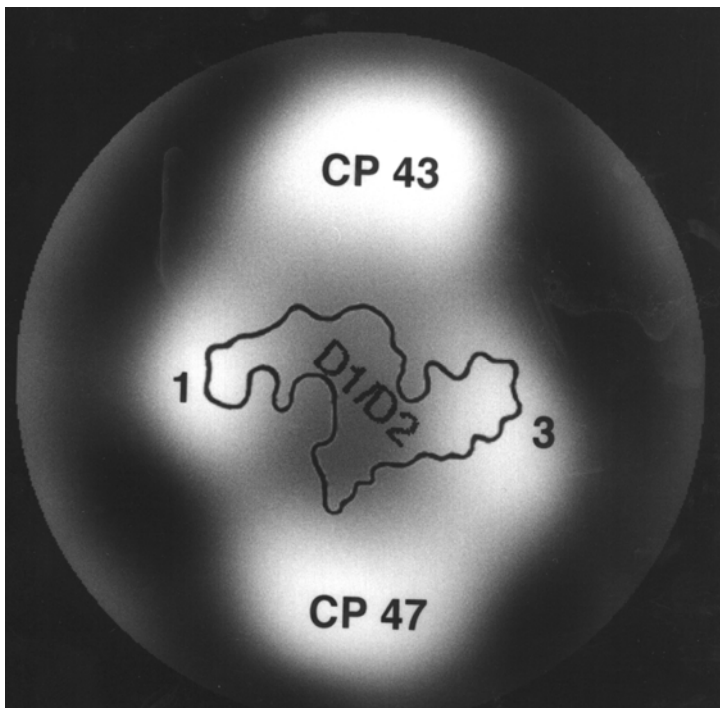
Σχήμα 57: Gel ηλεκτροφόρησης των συστημάτων:

1. OTG-core
2. Κυλινδρικών κρυστάλλων





Σχήμα 58: Ηλεκτρονιογραφία των κρυστάλλων του OTG-core



Σχήμα 59: Μοντέλο της τοπολογίας των υπομονάδων του PSII-core

## Συζήτηση

Με ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία εντοπίστηκε η lumen πλευρά του συμπλόκου στο εξωτερικό των κρυστάλλων. Αυτό σημαίνει ότι το PSII στους κρυστάλλους είναι ανεστραμμένο σε σχέση με τον φυσικό του προσανατολισμό στα grana.

Σύμφωνα με το single particle analysis, το OTG-core σύμπλοκο έχει διαστάσεις οι οποίες συμφωνούν με τα αποτελέσματα μετρήσεων πάνω σε μονομερή PSII-core<sup>130</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την άποψη ότι κάθε στοιχειώδης κυψελίδα περιλαμβάνει ένα μονομερές του PSII-core. Επιπλέον το σύμπλοκο αυτό παρουσιάζει μορφολογία παρόμοια με εκείνη του OTG-core που είχε επανασυσταθεί σε λιπίδια<sup>124</sup>.

Αντίστοιχες συγκριτικές μελέτες με single particle analysis πάνω σε κυανοβακτήρια<sup>125</sup> επέτρεψαν τον εντοπισμό της θέσης της 33 kDa κοντά στην περιοχή 4 (σχήμα 55). Η θέση των εξωτερικών πρωτεϊνών έχει προταθεί, με βάση συγκριτική ανάλυση δυσδιάστατων κρυστάλλων<sup>131</sup>, ενώ η θέση της 33 kDa έχει εντοπισθεί και από τους Boekema et al.<sup>128</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με το μοντέλο που προτείνεται στην εργασία αυτή.

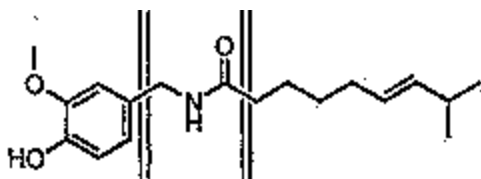
Λόγω της περιφερειακής θέσης των κοιλοτήτων στις περιοχές 2 και 4 στις ηλεκτρονιογραφίες του σχήματος 54, θεωρήθηκε ότι η CP43 και η CP47 βρίσκονται στη περιφέρεια του συμπλόκου, εφόσον αυτές οι πρωτεΐνες κατέχουν αξιόλογα υδρόφιλα τμήματα στη lumen πλευρά. Η ερμηνεία αυτή συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των Ford et al.<sup>123</sup>

Πειράματα πρωτεϊνικής διασύνδεσης (crosslinking) και επισήμανση με αντισώματα έναντι του εξωτερικού βρόγχου της CP47<sup>132</sup> υποδεικνύουν την στενή αλληλεπίδραση της με την 33 kDa. Επειδή οι CP47 και CP43 πιστεύεται ότι βρίσκονται στις περιοχές 2 και 4, η τελευταία πιθανώς ανήκει στην CP47, ώστε να βρίσκεται κοντά στην 33 kDa. Επομένως η θέση 2 πρέπει να ανήκει στην CP43, ενώ οι θέσεις 1 και 3 αποδίδονται στο ετεροδιμερές D1/D2. Η κεντρική θέση του ετεροδιμερούς και οι περιφερειακές θέσεις των CP47 και CP43 συμφωνούν με την παρατηρούμενη ψευδοαξονική συμμετρία, αφού υπάρχει 1:1:1:1 στοιχειομετρία μεταξύ των πρωτεϊνών<sup>133</sup> και σημαντική ομοιότητα μεταξύ των D1 και D2 καθώς επίσης και μεταξύ των CP43 και

CP47<sup>30</sup>. Το μοντέλο αυτό (σχήμα 59) βρίσκεται σε αντίθεση με μοντέλα που υποστηρίζουν ασύμμετρη τοπολογία των υπομονάδων του PSII-core. Ωστόσο το μοντέλο αυτό επαληθεύτηκε πρόσφατα με αντίστοιχη μελέτη που έγινε πάνω σε απομονωμένο PSII-RC από σπανάκι<sup>134</sup>. Στο σχήμα 59 παρατίθεται το περίγραμμα του βακτηριακού κέντρου αντίδρασης<sup>84</sup>, το οποίο ταιριάζει στις θέσεις 1 και 3.

#### IV.4 Μελέτη του μηχανισμού δράσης της καψακίνης, ενός αναστολέα της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων στο PSII και στο βακτηριακό RC

Η καψακίνη είναι γνωστή στη βιβλιογραφία για την ανασταλτική της δράση στην αναπνευστική αλυσίδα και συγκεκριμένα στη θέση της NADH-ουβικινόνης οξειδοαναγωγάσης<sup>135,136,137,138,139</sup>. Η ένωση αυτή αποτελεί φυσικό προϊόν και είναι η καυστική ουσία που βρίσκεται στα είδη κόκκινης πιπεριάς. Αποτελείται από τρία τμήματα (σχήμα 60): μια υποκατεστημένη φαινολική ομάδα, ένα αμίδιο και μια υδρόφοβη αλυσίδα, φέροντας τα γενικά χαρακτηριστικά φαινολικού και ουρίας τύπου PSII-αναστολέων. Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η δράση της καψακίνης στην φωτοσύνθεση και συγκεκριμένα στα φυτά και στα μωβ βακτήρια. Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα κέντρα αντίδρασης των οργανισμών αυτών παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες στη θέση δέσμευσης της  $Q_B$ . Βασική διαφορά μεταξύ των κέντρων αντίδρασης από *Rb. sphaeroides* και *Rps. viridis* είναι η μετατόπιση της  $Q_B$  κινόνης κατά  $5\text{\AA}$ <sup>67</sup>. Στο RC από *Rps. viridis* η  $Q_B$  είναι περισσότερο βυθισμένη μέσα στη  $Q_B$  κοιλότητα, ενώ στο *Rb. sphaeroides* η  $Q_B$  εντοπίζεται πιο ψηλά, στη περισσότερο υδρόφοβη περιοχή της κοιλότητας. Συνέπεια αυτής της μετατόπισης είναι οι διαφορετικές αλληλεπιδράσεις της  $Q_B$  με το πρωτεϊνικό περιβάλλον. Η δομή του RC από *Rb. sphaeroides* έχει αναλυθεί από τρεις διαφορετικές ομάδες με μοριακή αντικατάσταση και η κοιλότητα δέσμευσης της  $Q_B$  έχει μελετηθεί εκτενώς. Λόγω της απουσίας μιας αναλυτικής δομής του PSII, ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης της καψακίνης με τη θέση  $Q_B$ , μελετήθηκε στο βακτηριακό RC από *Rb. sphaeroides*. Η δευτεροταγής κινόνη  $Q_B$  στο *Rb. sphaeroides*, που είναι μια ουβικινόνη, αναπτύσσει πολικές αλληλεπιδράσεις, μέσω του καρβονυλίου της, με το πεπτιδικό άζωτο της Ile L224 και το πεπτιδικό καρβονύλιο της Tyr L222. Επίσης το ένα μέθοξυ οξυγόνο της κινόνης αλληλεπιδρά με το πεπτιδικό άζωτο της Ile L224, ενώ το άλλο αλληλεπιδρά με την His L190 μέσω ενός μορίου νερού.



Σχήμα 60: Η δομή της καψακίνης

#### IV.4.1. Απομόνωση του κέντρου αντίδρασης από *Rb. sphaeroides*

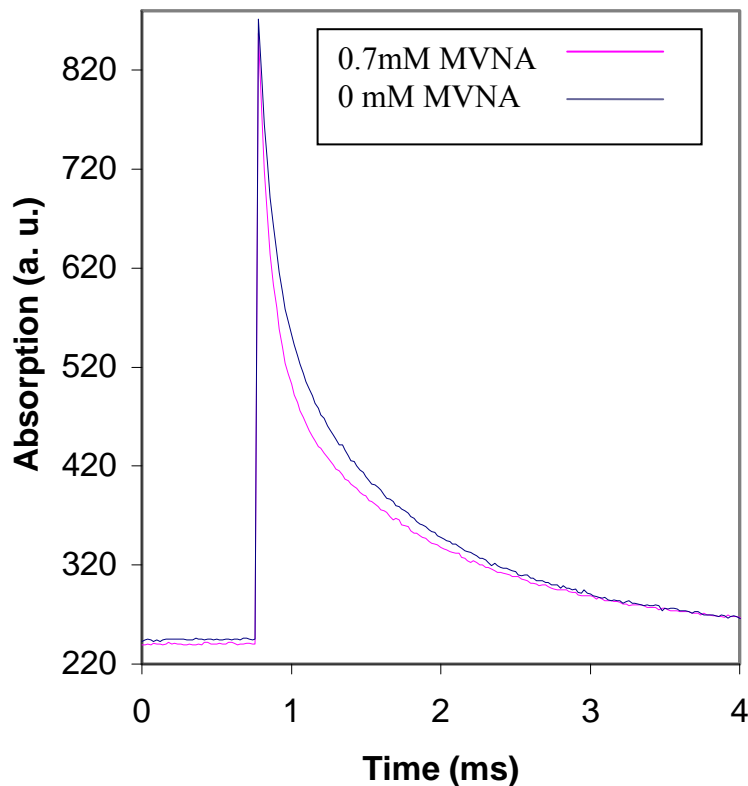
Η απομόνωση του RC από *Rb. sphaeroides* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Buchanan et al<sup>140</sup>. Γενικά η  $Q_B$  χάνεται κατά τη διαδικασία καθαρισμού και κρυστάλλωσης του RC. Ωστόσο για την ποσοτική απομάκρυνση της  $Q_B$ , το RC επώαστηκε για μια ώρα σε φως της ημέρας παρουσία 0.4% LDAO με ήπια ανάδευση. Οι συνθήκες αυτές ευνοούν τη διέγερση του πρωτοταγούς δοτή D και την επαγομένη ηλεκτρονιακή μεταφορά, που οδηγεί σε αναγωγή της  $Q_B$  και διάχυση της  $QBH_2$  έξω από την  $Q_B$  κοιλότητα.

Το δείγμα στη συνέχεια αραιώθηκε στο τετραπλάσιο του όγκου του με ρυθμιστικό διάλυμα και κατόπιν συμπυκνώθηκε στην αρχική του συγκέντρωση. Η διαδικασία επώασης επαναλήφθηκε για μίση ώρα. Επειδή η αναγωγή της  $Q_B$  ενισχύεται με μείωση του pH στο 7.0, η διαδικασία απομάκρυνσης της  $Q_B$  καθώς και τα επακόλουθα στάδια καθαρισμού πραγματοποιήθηκαν σε pH 7.0. Τελικά, το RC καθαρίστηκε με μια κολώνα DEAE Sepharose FF. Λήφθηκαν μόνο τα κλάσματα με λόγο  $OD_{280}/OD_{800} < 1.25$ , τα οποία στη συνέχεια συμπυκνώθηκαν μέχρι  $OD_{800}=59$ .

#### IV.4.2 Επίδραση της καψακίνης στο βακτηριακό RC

Τιτλοδοτήσεις της ενεργότητας της δευτεροταγούς κινόνης πραγματοποιήθηκαν με φασματοσκοπία απορρόφησης επαγόμενη με παλμούς φωτός. Ο ρυθμός του ανασυνδυασμού φορτίου  $P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$  προσδιορίστηκε με παρακολούθηση της εξαφάνισης του οξειδωμένου δοτή  $P^+$  στα 864 nm.

Το σχήμα 61 δείχνει τη κινητική επαναφοράς, με και χωρίς καψακίνη. Φαίνεται ότι παρουσία καψακίνης γίνεται πιο γρήγορος ανασυνδυασμός φορτίου, που υποδηλώνει την αντικατάσταση της  $Q_B$  από καψακίνη. Από τη σχετική ένταση της αργής φάσης του ανασυνδυασμού φορτίου, που αποδίδεται στην  $Q_B$ , υπολογίστηκε ότι 0.7 mM της ένωσης οδηγούν σε 20% αναστολή.

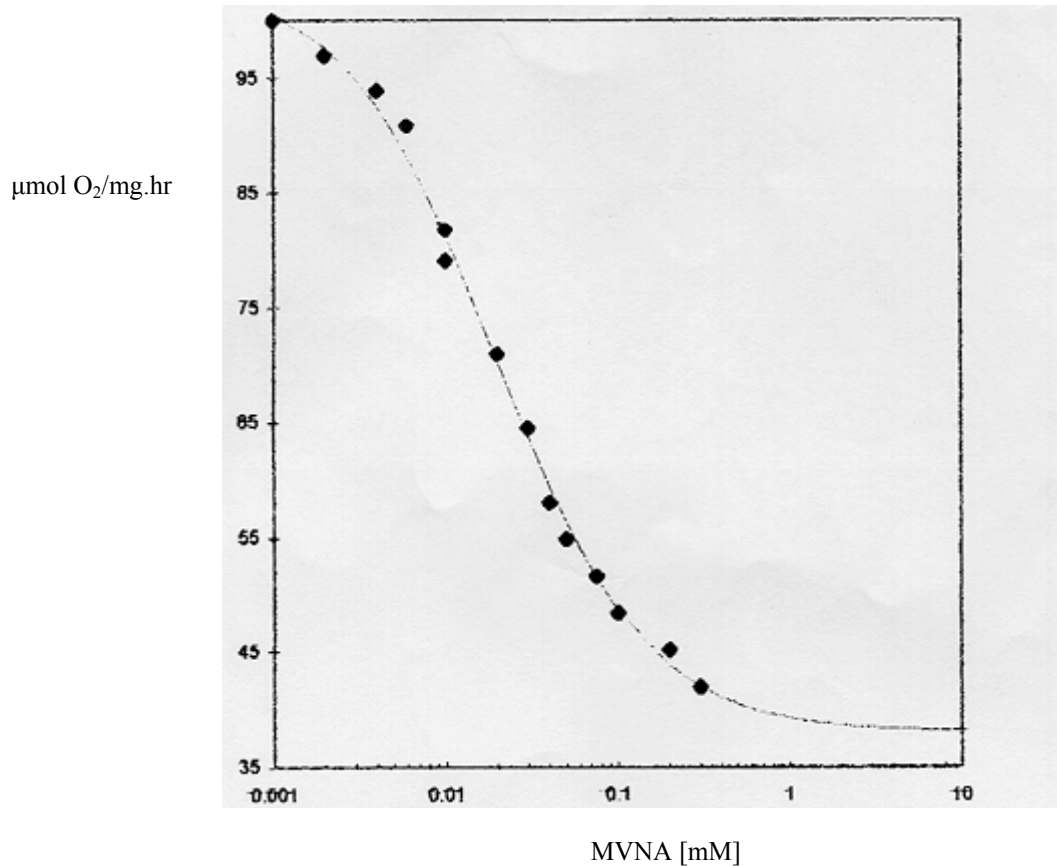


Σχήμα 61: Κινητική επαναφοράς του RC από Rb. sphaeroides παρουσία καψακίνης.

#### IV.4.3 Επίδραση της καψακίνης στο PSII

Η επίδραση της καψακίνης στο PSII και στο core μελετήθηκε με μέτρηση του ρυθμού έκλυσης οξυγόνου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων καψακίνης. Το σχήμα 62 δείχνει την επίδραση της καψακίνης στον ρυθμό έκλυσης οξυγόνου του PSII. Φαίνεται

ότι η καψακίνη αναστέλλει την παραγωγή οξυγόνου. Χρησιμοποιώντας κλασσική κινητική για συναγωνιστική αναστολή υπολογίστηκε ότι η σταθερά διάστασης  $K_i$  της καψακίνης είναι 12.6  $\mu\text{M}$ . Τα αποτελέσματα στο core ήταν ακριβώς τα ίδια.



Σχήμα 62: Καμπύλη τιτλοδότησης της αναστολής του PSII, σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της καψακίνης, όπως υπολογίστηκε από τους ρυθμούς έκλυσης οξυγόνου.

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φθορισμού στο PSII σε θερμοκρασία δωματίου και μελετήθηκε η επίδραση της καψακίνης σε σύγκριση με εκείνη του γνωστού ζιζανιοκτόνου DCMU (πίνακας 16). Σύμφωνα με τους Strasser et al.<sup>141</sup>, η παρεμπόδιση της ηλεκτρονιακής μεταφοράς στην αναγωγική πλευρά του PSII, συνοδεύεται από μια μείωση της φωτοχημικής απόδοσης ( $F_v/F_m$ ). Στον πίνακα

παρουσιάζονται οι τιμές των Fv/Fm σε ανέπαφο PSII, PSII με DCMU (10 μM) και PSII με καψακίνη (0.6 mM). Παρατηρήθηκε ότι η καψακίνη συμπεριφέρεται ανάλογα με το DCMU.

	<b>Control</b>	<b>DCMU</b>	<b>MVNA</b>
Fv/Fm	0.801	0.590	0.718

Πίνακας 16

#### **IV.4.4 Προετοιμασία των κρυστάλλων του βακτηριακού κέντρου αντίδρασης και επεξεργασία τους με καψακίνη**

Οι κρυσταλλώσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών στους 18°C. Το πρωτεϊνικό διάλυμα περιείχε 95μM RC, 0.1% LDAO, 3% 1,4-διοξάνιο, 3% HPT, 1% HXT και 0.7 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7) ως αντιδραστήριο καταβύθισης. Το διάλυμα εξισορροπείται έναντι διαλύματος δεξαμενής που περιείχε 1.5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Οι κρύσταλλοι του βακτηριακού RC (χωρίς την Q<sub>B</sub>) επώαστηκαν για τρεις μέρες με καψακίνη 2.6 mM.

#### **IV.4.5 Δομική ανάλυση και βελτίωση**

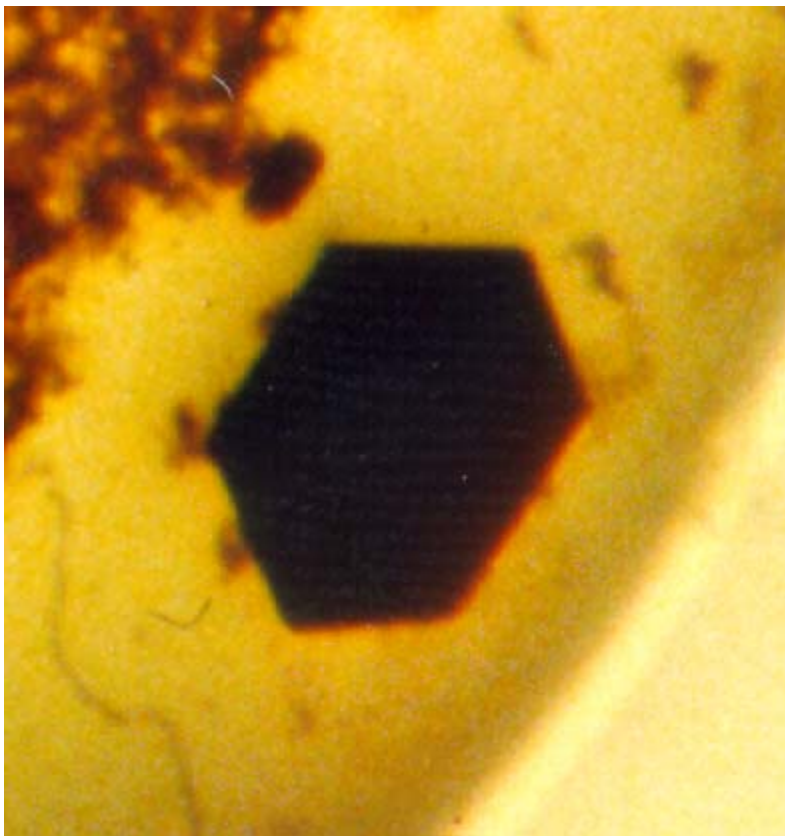
Τα διαγράμματα περίθλασης συλλέχθηκαν από ένα μονοκρύσταλλο χρησιμοποιώντας μονοχρωματική ακτινοβολία μήκους κύματος 1.3 Å στο synchrotron στο EMBL (DESY). Τα διαγράμματα επεξεργάστηκαν με τα προγράμματα DENZO και SCALEPACK. Η δομή από τους Fritzsche et al.<sup>142</sup> χρησιμοποιήθηκε σαν μοντέλο για την προσέγγιση των αρχικών φάσεων και τη κατασκευή ενός αρχικού μοντέλου.

Οι αρχικές συντεταγμένες για την καψακίνη λήφθηκαν χρησιμοποιώντας το molecular modeling package, SYBYL. Το λαμβανόμενο μοντέλο στη συνέχεια βελτιώθηκε χρησιμοποιώντας ένα πρόγραμμα ελαχιστοποίησης της ενέργειας, το XPLO2D. Η κρυσταλλογραφική βελτίωση ολόκληρου του μοντέλου πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα CNS. Επιθεώρηση και ανασυγκρότηση (refitting) του μοντέλου έγιναν με το molecular graphics πρόγραμμα O.

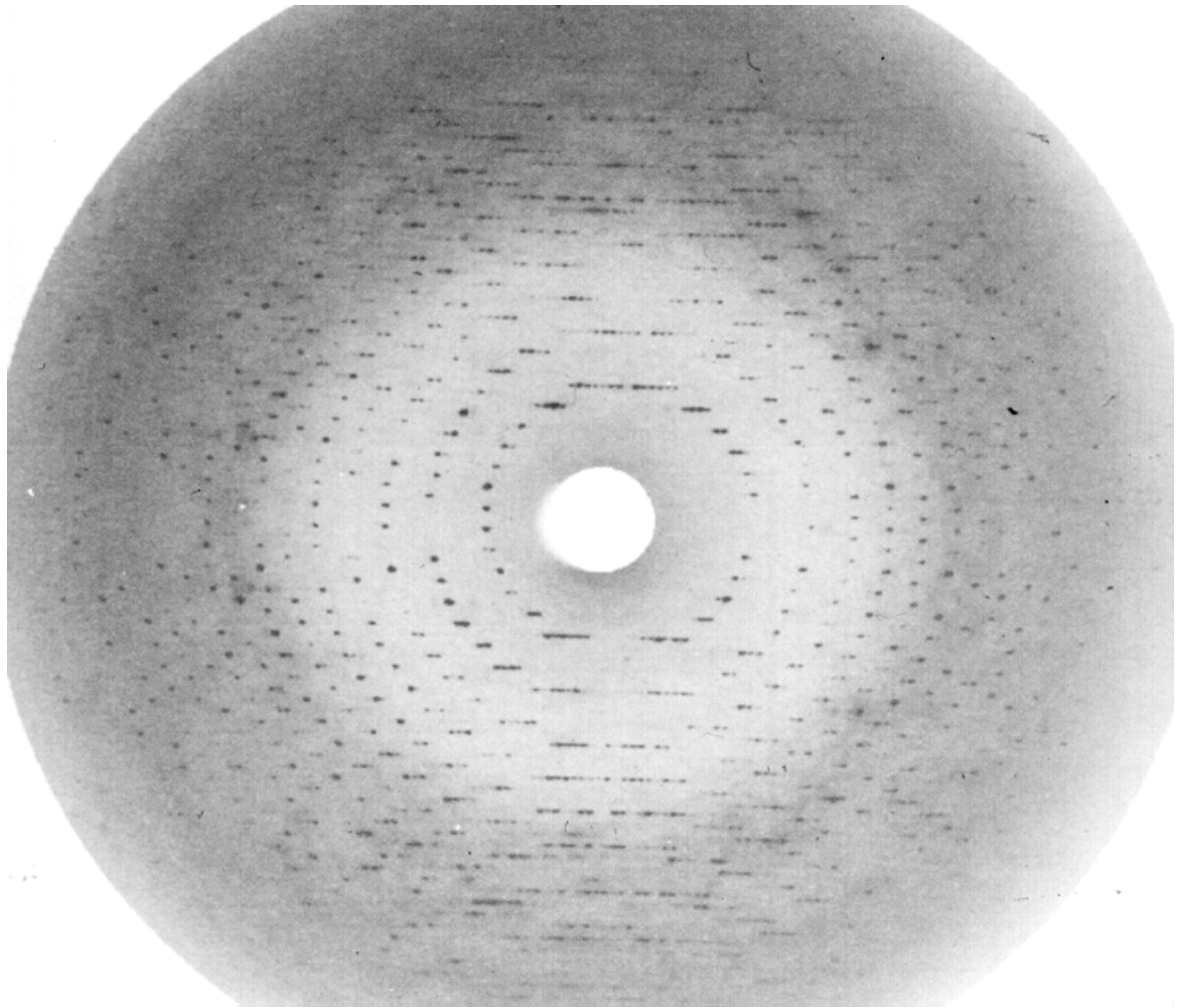


Οι κρύσταλλοι ήταν τριγωνικοί P3121 (σχήμα 63) και παρουσίαζαν μέγιστη διακριτικότητα 2.7 Å (σχήμα 64). Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας ήταν 141.50 Å 141.50 Å 187.15 Å 90° 90° 120°. Το τελικό μοντέλο είχε δείκτη αξιοπιστίας (R-factor) 20.3%.

Κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες X του βακτηριακού RC με δεσμευμένη καψακίνη παρείχε δομικές πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις καψακίνης-πρωτεΐνης. Ο ηλεκτρονιακός χάρτης στη κοιλότητα δέσμευσης της  $Q_B$ , όπως υπολογίστηκε κατόπιν παράλειψης της ουβικινόνης φαίνεται στο σχήμα 65. Το σχήμα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην  $Q_B$  κοιλότητα ταίριαζε απόλυτα με τις διαστάσεις του μορίου της καψακίνης και επέτρεψε τον εντοπισμό της ακριβής θέσης του. Το σχήμα 66 δείχνει τον ηλεκτρονιακό χάρτη στην  $Q_B$  κοιλότητα αφού είχε συμπεριληφθεί το μόριο της καψακίνης, ενώ στο σχήμα 67 παρουσιάζεται η δομή της  $Q_B$  κοιλότητας, όπως προκύπτει από την κρυσταλλογραφική μελέτη.



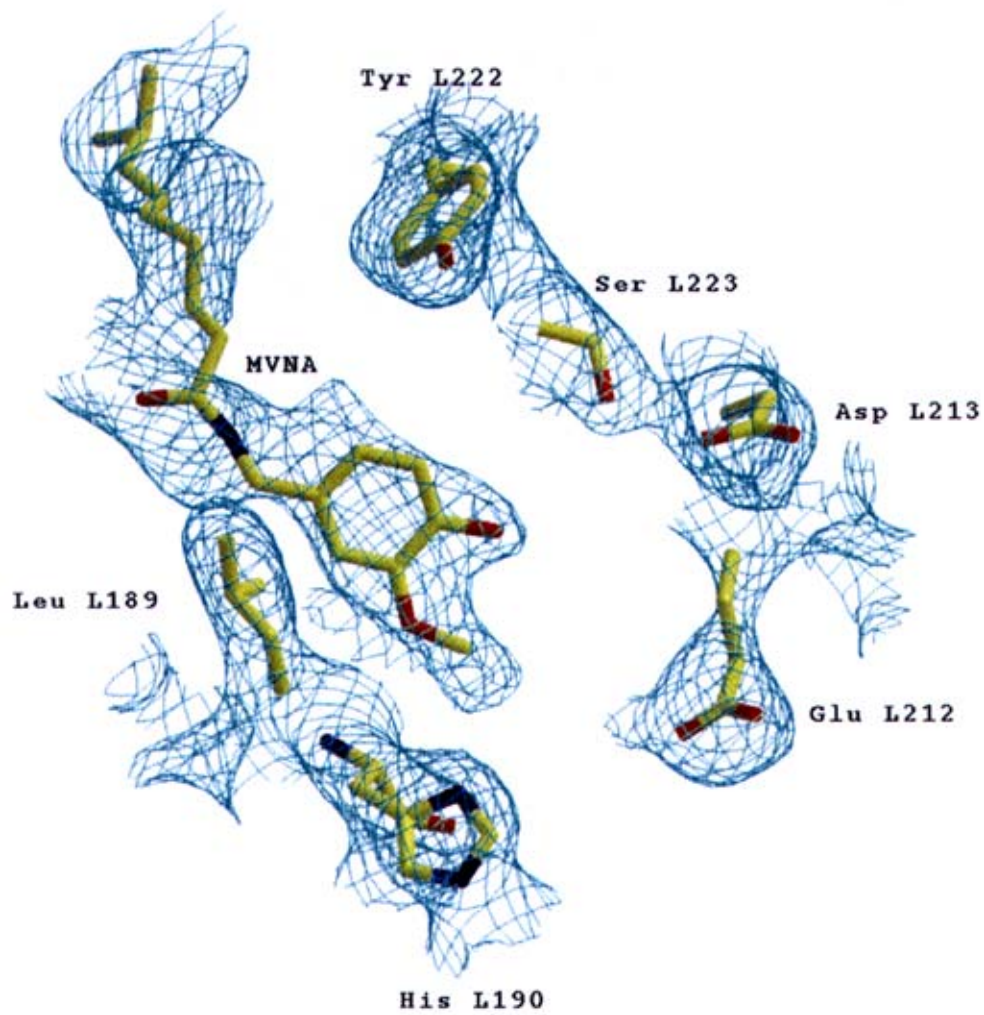
Σχήμα 63: Κρύσταλλος του βακτηριακού RC από Rb. Sphaeroides



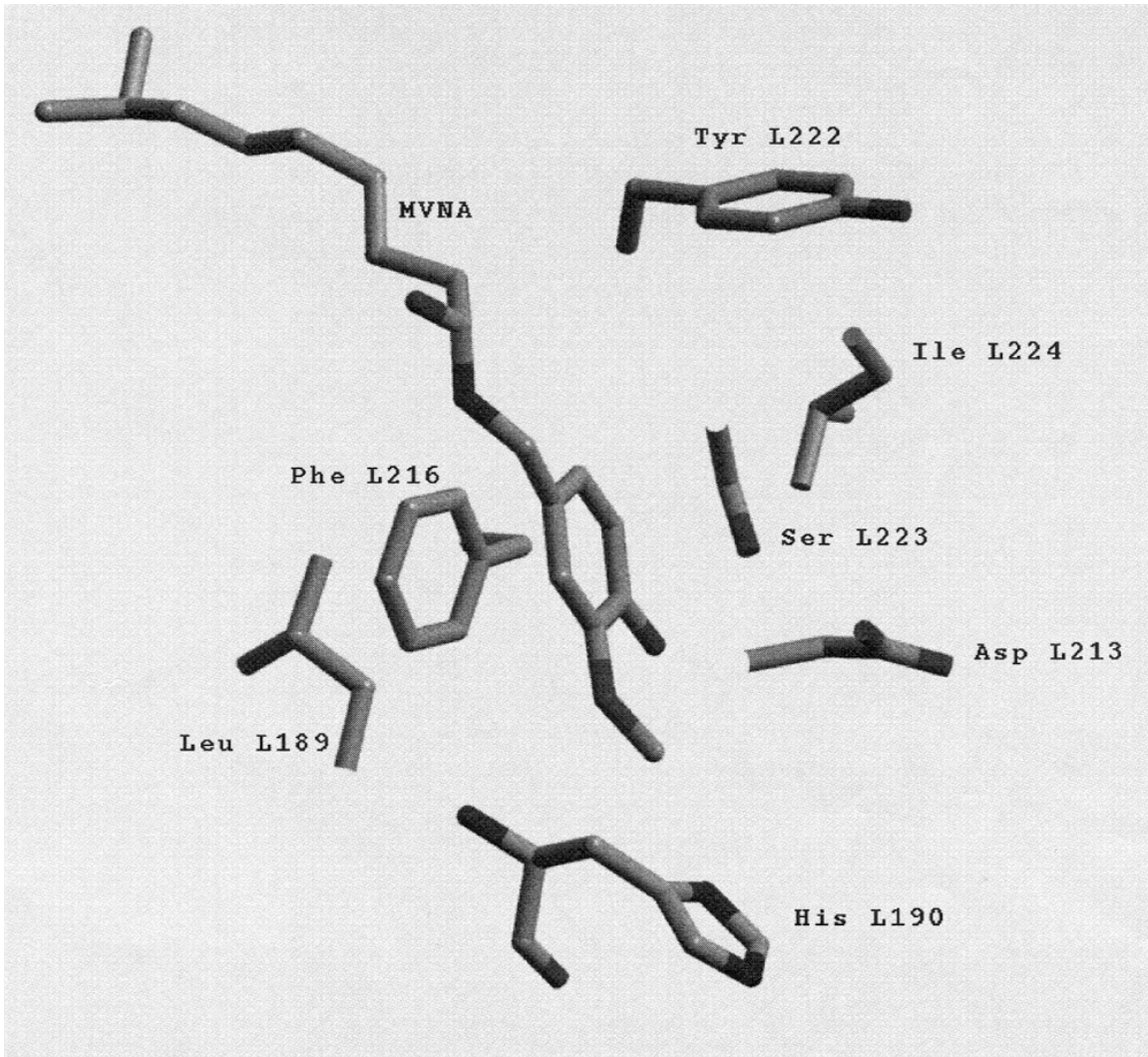
Σχήμα 64: Διάγραμμα περίθλασης του κρυστάλλου του βακτηριακού RC από *Rb. Sphaeroides*



Σχήμα 65: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας της κοιλότητας δέσμευσης της  $Q_B$ , όπως υπολογίστηκε κατόπιν παράλειψης της ουβικινόνης.



Σχήμα 66: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας της Q<sub>B</sub> κοιλότητας, όπως υπολογίστηκε συμπεριλαμβανομένου και του μορίου της καψακίνης



Σχήμα 67: Η δομή της Q<sub>B</sub> κοιλότητας παρουσία καψακίνης.

## Συζήτηση

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν καθαρά ότι η καψακίνη δρα σαν συναγωνιστικός αναστολέας στη θέση  $Q_B$ , στο φυτικό PSII και στο βακτηριακό RC. Στο PSII παρουσιάζει σταθερά διάστασης  $K_I$  12.6  $\mu\text{M}$ , ενώ στο βακτηριακό RC η παρεμποδιστική της δράση είναι πολύ ασθενής. Κρυσταλλογραφική ανάλυση του RC με δεσμευμένη καψακίνη παρείχε δομικές λεπτομέρειες για τις αλληλεπιδράσεις καψακίνης-πρωτεΐνης. Ο μέσος παράγοντας θερμοκρασίας (B-factor) για την καψακίνη ήταν ιδιαίτερα υψηλός (σχεδόν  $100 \text{ \AA}^2$ ), ενώ ο μέσος παράγοντας θερμοκρασίας για ολόκληρη τη δομή ήταν  $56.5 \text{ \AA}^2$ , υποδηλώνοντας ότι η θέση δέσμευσης είναι μόνο μερικά κατειλημμένη. Ο ηλεκτρονιακός χάρτης του σχήματος υποδεικνύει την ακριβή θέση της καψακίνης στην κοιλότητα της  $Q_B$ .

Όπως η ουβικινόνη, έτσι και η καψακίνη εκτείνεται σε ολόκληρη την κοιλότητα (σχήμα 67). Σε σύγκριση με την ουβικινόνη, η καψακίνη εντοπίζεται πιο χαμηλά, προς την υδρόφιλη περιοχή της κοιλότητας. Η θέση αυτή ευνοεί την ανάπτυξη πολικών αλληλεπιδράσεων, λόγω της θέσης των υποκαταστατών της φαινολικής ομάδας. Η καψακίνη σχηματίζει δύο ασθενείς δεσμούς υδρογόνου με την πρωτεΐνη. Η υδροξυλομάδα μπορεί να δράσει σαν δοτής υδρογόνου στο οξυγόνο της πλάγιας αλυσίδας της Ser L223, ενώ το μεθοξυ οξυγόνο μπορεί να δεχτεί ένα υδρογόνο από την πεπτιδική αμινομάδα της His L190. Η φαινολική ομάδα του αναστολέα βρίσκεται στο κάτω τμήμα της κοιλότητας σε απόσταση γύρω στα  $4 \text{ \AA}$  από την Phe L216. Οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι είναι σχεδόν παράλληλοι μεταξύ τους και αλληλεπιδρούν με δυνάμεις van der Waals. Προφανώς οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναστολέα και της πρωτεΐνης συνεισφέρουν το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας δέσμευσης. Το αμίδιο της καψακίνης που θα μπορούσε να δράσει σαν δοτής και δεκτής υδρογόνου, φαίνεται να μην έχει συμμετοχή στη δέσμευση της, λόγω του ότι βρίσκεται στην υδρόφοβη περιοχή της κοιλότητας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, η καψακίνη θα μπορούσε να ενταχθεί στην κατηγορία των φαινολικών αναστολέων στο βακτηριακό RC, αν και γενικά πιστεύεται ότι οι αναστολείς αυτού του τύπου είναι αδρανείς στα βακτήρια.

Λόγω της υψηλής ομολογίας της θέσης  $Q_B$  μεταξύ του βακτηριακού κέντρου αντίδρασης και του PSII, πιστεύουμε ότι η καψακίνη έχει παρόμοιο προσανατολισμό στη

θέση Q<sub>B</sub> στο PSII, και ιδιαίτερα αφού τα αμινοξέα (His 190, Ser 223, Phe 216) που συμμετέχουν στη δέσμευση της καψακίνης στο βακτηριακό RC διατηρούνται και στο PSII (His 215, Ser 264, Phe 255). Η άποψη αυτή συμφωνεί και με προτεινόμενα μοντέλα του PSII, όπου η πλαστοκινόνη Q<sub>B</sub> έχει αντικατασταθεί από φαινολικούς αναστολείς<sup>85</sup>.

## V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Αναπτύχθηκαν μέθοδοι για την απομόνωση τριών διαφορετικών υποσυμπλόκων του πυρήνα του φωτοσυστήματος II. Τα σύμπλοκα αυτά περιείχαν τις απαραίτητες υπομονάδες για την διεξαγωγή του πρωτοταγούς διαχωρισμού φορτίου και είναι τα εξής:

α) Σύμπλοκο που περιέχει τις πρωτεΐνες 47 kDa, 32 kDa (D1), 34 kDa (D2), και το Cyt b<sub>559</sub>,

β) Σύμπλοκο που περιέχει τις παραπάνω πρωτεΐνες, καθώς επίσης και την εσωτερική κεραία, 43 kDa πρωτεΐνη και

γ) Σύμπλοκο που περιέχει όλες τις πρωτεΐνες που απαιτούνται για την έκλυση οξυγόνου (47 kDa, 43 kDa, 32 kDa, 34 kDa, Cyt b<sub>559</sub> και 33 kDa).

Η απομόνωση και η κρυστάλλωση των PSII-core υποσυμπλόκων ξεκινώντας από διαφορά φυτά έδειξε ότι το σπανάκι αποτελεί την καλύτερη πηγή. Τα τρία καινούρια πρωτόκολλα απομόνωσης παρουσιάζουν υψηλή απόδοση και οδηγούν σε ιδιαίτερα αναπαραγωγίμους κρυστάλλους. Σημαντικό ρόλο στις κρυσταλλώσεις έπαιξε η παρουσία της ιστιδίνης, η οποία αποδείχτηκε ότι ασκεί προστατευτική δράση στο PSII και συγκεκριμένα στην πρωτεΐνη 43 kDa.

Για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε η κρυστάλλωση ενός PSII συμπλόκου το οποίο περιέχει όλες τις απαραίτητες πρωτεΐνες για την έκλυση οξυγόνου. Η παρουσία της 33 kDa πρωτεΐνης στο σύμπλοκο αυτό, εισάγει ένα υδρόφιλο τμήμα, που παίζει καθοριστικό ρόλο για την κρυστάλλωση και πιθανώς να είναι αυτός ο λόγος που οι συγκεκριμένοι κρύσταλλοι έδωσαν τη καλύτερη διακριτικότητα (10Å). Ωστόσο η χαμηλή διακριτικότητα των κρυστάλλων δεν επέτρεψε την ανάλυση της δομής του PSII.

Επιτευχθηκε η βελτίωση της διακριτικής ικανότητας των κρυστάλλων από τα 24 Å στα 10 Å.

2. Με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε PSII-core σύμπλοκα διαλυτοποιημένα σε απορρυπαντικό κατόπιν εκλεκτικής απομάκρυνσης των εξωτερικών



πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκαν συγκριτικές μελέτες για τον εντοπισμό της 33 kDa πρωτεΐνης. Επιπλέον, αναπτύχθηκαν κυλινδρικοί κρύσταλλοι ενός PSII-core συμπλόκου, οι οποίοι αναλύθηκαν με ηλεκτρονική κρυσταλλογραφία. Από τις μελέτες αυτές εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι το PSII υπάρχει σε μονομερή μορφή και προσδιορίστηκε η τοπολογία των υπομονάδων του. Συγκεκριμένα προτείνονται οι περιφερειακές θέσεις για τις CP43 και CP47 πρωτεΐνες και η κεντρική θέση για το ετεροδιμερές D1/D2, έτσι ώστε το σύμπλοκο να παρουσιάζει μια ψευδοαξονική συμμετρία.

3. Ένα φυσικό προϊόν, η καψακίνη, βρέθηκε ότι έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την ηλεκτρονιακή μεταφορά στο φυτικό PSII καθώς και στο βακτηριακό RC. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν καθαρά ότι η καψακίνη δρα σαν συναγωνιστικός αναστολέας στη θέση  $Q_B$  και στα δύο αυτά συστήματα. Λόγω της απουσίας μιας αναλυτικής δομής του PSII, η δέσμευση της καψακίνης στη θέση  $Q_B$  διερευνήθηκε στο βακτηριακό κέντρο αντίδρασης από *Rb. sphaeroides*.

Κρυσταλλογραφική ανάλυση του RC με δεσμευμένη καψακίνη παρείχε δομικές λεπτομέρειες για τις αλληλεπιδράσεις καψακίνης-πρωτεΐνης. Ο μέσος παράγοντας θερμοκρασίας (B-factor) για την καψακίνη ήταν ιδιαίτερα υψηλός, υποδηλώνοντας ότι η θέση δέσμευσης είναι μόνο μερικά κατειλημμένη. Ο ηλεκτρονιακός χάρτης που λήφθηκε υποδεικνύει την ακριβή θέση της καψακίνης στην κοιλότητα της  $Q_B$ . Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναστολέα και της πρωτεΐνης φαίνεται να συνεισφέρουν το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας δέσμευσης. Το αμίδιο της καψακίνης φαίνεται να μην έχει συμμετοχή στη δέσμευση της. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, η καψακίνη θα μπορούσε να ενταχθεί στην κατηγορία των φαινολικών αναστολέων στο βακτηριακό RC, αν και γενικά πιστεύεται ότι οι αναστολείς αυτού του τύπου είναι αδρανείς στα βακτήρια.

Λόγω της υψηλής ομοιότητας της θέσης  $Q_B$  μεταξύ του βακτηριακού κέντρου αντίδρασης και του PSII, πιστεύουμε ότι η καψακίνη έχει παρόμοιο προσανατολισμό στη θέση  $Q_B$  στο PSII, και ιδιαίτερα αφού τα αμινοξέα που συμμετέχουν στη δέσμευση της καψακίνης στο βακτηριακό RC διατηρούνται και στο PSII.

## VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- <sup>1</sup> Barber, J. and Andersson, B. (1994) *Nature* 370, 31-34.
- <sup>2</sup> Clayton, R.K. (1980) *Photosynthesis: physical mechanisms and chemical patterns*, Cambridge University Press, Cambridge.
- <sup>3</sup> Schopf, J.W. and Walter, M.R. (1982) In: *The Biology of Cyanobacteria* (Carr, N.G. and Whitton, B.A. eds) Blackwells, Oxford, 543-565.
- <sup>4</sup> Albertsson, P.-A. (1995) *Photosynth. Res.* 46, 141-149.
- <sup>5</sup> Stryer, L., *Biochemistry*
- <sup>6</sup> Jansson, S. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1184, 1-19.
- <sup>7</sup> Ghanotakis, D.F. and Yocum, C.F. (1990) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 255-276.
- <sup>8</sup> Sauer, K. (1978) *Acc. Chem. Res.* 11, 257-267.
- <sup>9</sup> Doring, G., Regner, G. and Witt, H.T. (1969) *Z. Naturforsch* 24b, 1139-1143.
- <sup>10</sup> Klimov, V.V., Dolan, E. and Ke, B. (1980) *FEBS Lett.* 112, 97-100.
- <sup>11</sup> Diner, B.A. and Babcock, G. (1984) In: *Structure, Dynamics and Energy Conversion Efficiency in Photosystem II*.
- <sup>12</sup> De Paula, J.C. (1987) Ph.D. Thesis, Yale University, New Haven.
- <sup>13</sup> Thomson, L.K. and Brudwig, G.W. (1988) *Biochemistry* 27, 6653-6658.
- <sup>14</sup> Marder, J.B. and Barber, G. (1989) *Plant, Cell and Environment* 12, 595-614.
- <sup>15</sup> Cohen, Y. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 1-30.
- <sup>16</sup> Bricker, T.M. and Ghanotakis, D.F. (1994) *Introduction to Oxygen Evolution and the Oxygen-Evolving Complex*.
- <sup>17</sup> Debus, R.G. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 269-352.
- <sup>18</sup> Cheniae, G.M. (1980) *Methods Enzymol.* 69, 349-363.
- <sup>19</sup> Amesz, J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 726, 1-12.
- <sup>20</sup> Brudwig, G. W. and de Paula, J.C. (1987) In: *Progress in Photosynthesis Research* (Biggins, J. ed.) Vol. I, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- <sup>21</sup> Kok, B. Forbush, B. and McGloin, M. (1970) *Photochem. Photobiol.* 11, 457-475.

- 
- <sup>22</sup> Velthuys, B.R. and Visser, J.W.M. (1975) FEBS Lett. 55, 109-112.
- <sup>23</sup> Miller, A.-F. and Brudvig, G.W. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1056, 1-18.
- <sup>24</sup> Rutherford, A.W. (1989) Trends Biochem. Sci. 14, 227-232.
- <sup>25</sup> Kuehlbrandt, W. (1994) Curr. Opin. Struct. Biol. 4, 519-528.
- <sup>26</sup> Allen, J.F. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1098, 275-335.
- <sup>27</sup> Nicholss, D.G. and Ferguson, S.J. (1992) In: Bioenergetics 2, Academic Press Inc., San Diego.
- <sup>28</sup> Eijkelhoff, C. (1996) Ph.D. Thesis.
- <sup>29</sup> Haag, E., Irrgang, K.D., Boekema, E.J. and Renger, G. (1990) Eur. J. Biochem. 189, 47-53.
- <sup>30</sup> Ikeuchi, M., Yuasa, M. and Inoue, Y. (1985) FEBS Lett. 185, 316-322.
- <sup>31</sup> Ghanotakis, D.F. and Yocum, C.F. (1987) Biochim. Biophys. Acta 891, 15-21.
- <sup>32</sup> Rutherford, A.W., Zimmermann, J.-L. and Boussac, A. (1992) In: The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology (Barber, J. ed.) Elsevier Science Publishers B.A., Amsterdam, 179-229.
- <sup>33</sup> Ljungberg, U., Akerlund, H.-E., Larsson, C. and Andersson, B. (1984) Biochim. Biophys. Acta 767, 145-152.
- <sup>34</sup> Ljungberg, U., Akerlund, H.-E. and Andersson, B. (1986) Eur. J. Biochem. 158, 477-482.
- <sup>35</sup> Lautner, A., Klein, R., Ljungberg, U., Reilander, H. Bartling, D. Andersson, B., Reinke, H., Beyreuther, K. and Herrmann, R.G. (1988) j. Biol. Chem. 263, 10077-10081.
- <sup>36</sup> Schroder, W.P., Henrysson, T. and Akerlund, H.-E. (1988) FEBS Lett. 235, 289-292.
- <sup>37</sup> Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1988) Plant Cell Physiol. 29, 1233-1239.
- <sup>38</sup> Murata, N., Miyao, M. Hayashida, N. Hidaka, T. and Sugiura, M. (1988) FEBS Lett. 235, 283-288.
- <sup>39</sup> Shen, J.-R. and Inoue, Y. (1993) Biochemistry 32, 1825-1832.
- <sup>40</sup> Waggoner, C.M. and Yocum, C.F. (1987) In: Progress in Photosynthesis Research. Biggins J. ed. Vol. I 685-688, Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- <sup>41</sup> Miyao, M. and Murata, N. (1989) Biochim. Biophys. Acta 977, 315-321.
- <sup>42</sup> Kavelaki, K. and Ghanotakis, D.F. (1991) Photosynth. Res. 29, 149-155.
- <sup>43</sup> Bricker, T.M. (1992) Biochemistry 31, 4623-4628.

- 
- <sup>44</sup> Miyao, M. and Murata, N. (1984) FEBS Lett. 168, 281-286.
- <sup>45</sup> Miyao, M. and Murata, N. (1984) Biochim. Biophys. Acta 765, 253-257.
- <sup>46</sup> Kuwabara, T., Miyao, M., Murata, T. and Murata, N. (1985) Biochim. Biophys. Acta 806, 283-289.
- <sup>47</sup> Vermaas, W.F.J., Williams, J.G.K. and Arntzen, C.J. (1987) Plant Mol. Biol. 8, 317-326.
- <sup>48</sup> Rock, C.D., Barkan, A. and Taylor, W.C. (1987) Curr. Genet. 12, 69-77.
- <sup>49</sup> Bricker, T.M. (1990) Photosynth. Res. 24, 1-3.
- <sup>50</sup> Akabori, K., Tsukamoto, H., Tsukihara, J., Nagatsuka, T., Motokawa, O. and Toyoshima, Y. (1988) Biochim. Biophys. Acta 932, 345-357.
- <sup>51</sup> Yamaguchi, N., Takahashi, Y. and Satoh, K. (1988) Plant Cell Physiol. 29, 123-129.
- <sup>52</sup> Ghanotakis, D.F., de Paula, J.C., Demetriou, D.M., Bowlby, N.R., Peterson, J., Babcock, G.T. and Yocum, C.F. (1989) Biochim. Biophys. Acta 974, 44-53.
- <sup>53</sup> Roegner, M., Chisholm, D.A. and Diner, B. (1991) Biochemistry 30, 5387-5395.
- <sup>54</sup> Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. and Ozeki, H. (1986) Nature 322, 572-574.
- <sup>55</sup> Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Dean, H., Kamagishara, T., Yamada, K., Kasuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdo, N., Shimada, H. and Sugiura, M. (1986) EMBO J. 5, 2043-2049.
- <sup>56</sup> Cramer, W.A., Tae, G.-S., Furbacher, P.N. and Bottger, M. (1993) Physiol. Plant 88, 705-711.
- <sup>57</sup> Tang, X.-S., Fushimi, K. and Satoh, K. (1990) FEBS Lett. 273, 257-260.
- <sup>58</sup> Svensson, B., Vass, I. and Styring, S. (1991) Z. Naturforsch. 46c, 765-776.
- <sup>59</sup> Nugent, J.H.A. (1996) Eur. J. Biochem. 237, 519-531.
- <sup>60</sup> Mathis, P. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1018, 163-167.
- <sup>61</sup> Rutherford, A.W. (1986) Biochem. Soc. Trans. 14, 15-17.
- <sup>62</sup> Trebst, A. (1986) Z. Naturforsch. 41C, 240-245.

- 
- <sup>63</sup> Michel, H. and Deisenhofer, J. (1986) In: Encyclopedia of Plant Physiology (Staehelein L.A. and Arntzen, C.J. eds.) New Series, Vol. 19, Springer-Verlag, Berlin, 371-381.
- <sup>64</sup> Michel, H. Weyer, K.A., Gruenberg, H., Dunger, I., Oesterhelt, D. and Lottspeich, F. (1986) EMBO J. 5, 2445-2451.
- <sup>65</sup> Michel, H. and Deisenhofer, J. (1988) Biochemistry 27, 1-7.
- <sup>66</sup> Lancaster, R.D. and Michel, H. (1997) Structure 5, 1339-1359.
- <sup>67</sup> Ermler, U., Fritsch, G., Buchanan, S.K. and Michel, H. (1994) Structure 2, 925-936.
- <sup>68</sup> Nanba, O. and Satoh, K. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 109-112.
- <sup>69</sup> Fotinou, C. and Ghanotakis, D.F. (1990) Photosynth. Res. 37, 41-48.
- <sup>70</sup> Fotinou, K. (1993) Ph.D. Thesis.
- <sup>71</sup> Lancaster, R.D. and Michel, H. (1996) Photosynth. Res. 65-74.
- <sup>72</sup> Rhee, K.-H., Morris, E.P., Barber, J. and Kuehlbrandt, W. (1998) Nature, 396, 283-286.
- <sup>73</sup> Barber, J. Trends Biochem. Sci. (1987) 12, 321-326.
- <sup>74</sup> Stein, R.R., Castellvi, A.L., Bogacz, J.P. and Wraight, C.A. (1984) Journal of Cellular Biochemistry 24, 243-259.
- <sup>75</sup> Tischer, W. and Strotmann, H. (1977). Biochim. Biophys. Acta 460, 113-125.
- <sup>76</sup> Bower, J.R, Camiller, P and Vermaas W.F.J. (1991) In: Topics in Photosynthesis Vol. 10, Herbicides (Baker NA ed.) 26-85, Elsevier.
- <sup>77</sup> Lancaster, R.D. and Michel, H. (1999) J. Mol.Biol. 286, 883-898.
- <sup>78</sup> Sinning, I. (1992) Trends Biochem. Sci. 17, 150-154.
- <sup>79</sup> Trebst, A. (1986) Z. Naturforsch 41c, 240-245.
- <sup>80</sup> Trebst, A. and Draber, W. (1986) Photosynth. Res. 10, 381-392.
- <sup>81</sup> Trebst, A. (1987). Z. Naturforsch. 42c, 742-750.
- <sup>82</sup> Mackay, S.P. and O'Malley, P.J. (1992) Z. Naturforsch. 48c, 191-198.
- <sup>83</sup> Xiong, J., Subramaniam, S. and Govindjee (1996) Protein Science 5, 2054-2073.
- <sup>84</sup> Deisenhofer, J. and Michel, H. (1989) EMBO J. 8, 2149-2170.
- <sup>85</sup> Sobolev, V. and Edelman, M. (1995) Proteins 21, 214-225.
- <sup>86</sup> Oettmeier W. (1992) In: The Photosystems: Structure, Function, and Molecular Biology Barber, J. ed.) 350-409, Elsevier Science Publishers B.V..
- <sup>87</sup> Moreland, D.E. (1990) Ann. Rev. Plant Physiol. 31, 597-638.

- 
- <sup>88</sup> Draber, W . Tietjen, K. Kluth, J.F. and Trebst, A. (1991) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, 1621-1633.
- <sup>89</sup> Mattoo, A.K., Pick, U., Hoffmann-Falk, H. and Edelman, M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (3), 1572-1576.
- <sup>90</sup> Andersson, B., Salter, A.H., Virgin, I., Vass, I. And Styring, S. (1992) *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 15, 15-31.
- <sup>91</sup> McPherson, A. (1990) *Eur. J. Biochem.* 189, 1-23.
- <sup>92</sup> Garavito, R.M., Picot, D. and Loll, P.J. (1996) *J. Bioenerg. Biomem.* 28(1), 13-27.
- <sup>93</sup> Michel, H. (1991) In: *Crystallization of Membrane Proteins* (Michel, H eds) CRC Press 73-88.
- <sup>94</sup> Garavito, M. and Rosenbusch, J.P. (1980) *J. Cell. Biol.* 86, 327-329.
- <sup>95</sup> Michel, H. and Oesterhelt, D. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1283-1285.
- <sup>96</sup> Ostermeier, C. and Michel, H. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 697-701.
- <sup>97</sup> Walker, J.E. and Saraste, M. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 457-459.
- <sup>98</sup> Tanford, C. and Reynolds, J.A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 457, 133-170.
- <sup>99</sup> Helenius, A. McCaslin, D.R., Fries, E. and Tanford, C. (1981) In: *Methods in Enzymology* 56, 734-749.
- <sup>100</sup> Zulauf, M. (1990) In: *Crystallization of Membrane Proteins* (Michel, H. eds) CRC Press 53-72.
- <sup>101</sup> Garavito, M.R., Markovic-Housley, Z. and Jenkins, J.A. (1986) *J. Cryst. Growth* 76, 701-109.
- <sup>102</sup> Michel, H (1983) *Trends Biochem. Sci.* 8, 56-59.
- <sup>103</sup> Drenth, J. *Principles of Protein X-ray Crystallography.*
- <sup>104</sup> Adir, N .Okamura, Y. and Feher, G. (1992) *Biophys. J.* 61, 101-103.
- <sup>105</sup> Fotinou, C., Kokkinidis, M. Fritsch, G. Haase, W. Michel, H. and Ghanotakis, D.F. (1993) *Photosynth. Res.* 37, 41-48.
- <sup>106</sup> Robinson, H.H., Sharp, R.R. and Yocum, C.F. (1981) *Archiv. Biochem. Bioph.* 207, 1-8.
- <sup>107</sup> Ghanotakis, D.F., Babcock, G. and Yocum, C.F. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 765, 388-398.
- <sup>108</sup> Mishra, K.R. and Ghanotakis, D.F. (1994) *Photosynth. Res.* 42, 37-42.

- 
- <sup>109</sup> Kouimtjoglou, E., Mishra, R. and Ghanotakis, D.F. (1995) In: *Photosynthesis: from Light to Biosphere* (P. Mathis ed) Vol. II. 305-308 Kluwer Academic Publishers.
- <sup>110</sup> Kuwabara, T. and Murata, N. (1982) *Pl. Cell Physiol.* 24, 741-747.
- <sup>111</sup> Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- <sup>112</sup> Arnon, D. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1-15.
- <sup>113</sup> Mori, H. and Yamamoto, Y. (1992) In: *Research in Photosynthesis* (N. Murata ed.) Kluwer Academic Publishers Vol. IV, 513-516.
- <sup>114</sup> Mishra, N. and Ghanotakis, D.F. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 296-300.
- <sup>115</sup> Casano, L.M. and Trippi, V.S. (1992) *Plant Cell Physiol.* 33(3), 329-332.
- <sup>116</sup> Macpherson, A.N., Telfer, A. Barber, J. and Truscott, T.G. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 301-309.
- <sup>117</sup> Mishra, N., Francke, C., van Gorkom, H.J. and Ghanotakis, D.F. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1186, 81-90.
- <sup>118</sup> Hideg, E. Spetea, C. and Vass, I. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1186, 143-152.
- <sup>119</sup> Matheson, B.C., Etheridge, R.D. Kratowich, N.R. and Lee, J. (1975) *Photochem. Photobiol.* 21, 165-171.
- <sup>120</sup> Krasnovskii, A.A. (1994) 39, 197-211.
- <sup>121</sup> Dekker, J.P., Betts, S.D., Yocum, C.F. and Boekema, E.J. (1990) *Biochemistry* 29, 3220-3225.
- <sup>122</sup> Holzenburg, A. Bewley, M.C., Wilson, F.H., Nicholson, W.V. and Ford, R.C. (1993) *Nature* 363, 470-472.
- <sup>123</sup> Ford, R.C., Rosenberg, M.F., Shepherd, F.H., McPhie, P. and Holzenburg, A. (1995) *Micron*, 26, 133-140.
- <sup>124</sup> Tsiotis, G., Walz, T., Spyridaki, A., Lustig, A. Engel, A. and Ghanotakis, D. (1996) *J. Mol. Biol.* 259, 241-248.
- <sup>125</sup> Hasler, L., Ghanotakis, D., Fedtke, B., Spyridaki, A., Miller, M., Mueller, S.A., Engel, A. and Tsiotis, G. (1997) *J. Struct. Biol.* 119, 273-283.
- <sup>126</sup> Lyon, M.K., Marr, K.M. and Furcinitti, P.S. (1993) *J. Struct. Biol.* 110, 133-140.
- <sup>127</sup> Santini, C., Tidu, V., Tognon, G., Ghiretti Magaldi, A. and Bassi, R. (1994) *Eur. J. Biochem.* 221, 307-315.

- 
- <sup>128</sup> Boekema, E.J., Hankamer, B., Bald, D., Kruij, J., Nield, J., Boonstra, A.F., Barber, J. and Roegner, M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 175-179.
- <sup>129</sup> Nakazato, K., Toyoshima, C., Enami, I. and Inoue, Y. (1996) 257, 225-232.
- <sup>130</sup> Roegner, M., Dekker, J.P., Boekema, E.J., and Witt, H.T. (1987) *FEBS Lett.* 219, 207-211.
- <sup>131</sup> Holzenburg, A., Shepherd, F.H. and Ford, R.C. (1994) *Micron*, 25, 447-451.
- <sup>132</sup> Frankel, L.K. and Bricker, T.M. (1992) *Biochemistry* 31, 11059-11064.
- <sup>133</sup> Satoh, K. (1985) *Photochem. Photobiol.* 42, 845-853.
- <sup>134</sup> Tsiotis, G., Psylinakis, M., Woplensinger, B., Lustig, A., Engel, A. and Ghanotakis, D. (1999) *Eur. J. Biochem.* 259, 320-324.
- <sup>135</sup> Shimomura, Y., Kawada, T. and Suzuki, M. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 270, 2, 573-577.
- <sup>136</sup> Yagi, T. (1990). *Arch. Biochem. Biophys.* 281(2), 305-311.
- <sup>137</sup> Morre, D. J., Chueh, P.-J. and Morre, D. M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1831-1835.
- <sup>138</sup> Sakamoto, K., Miyoshi, H., Matsushita, K., Nakagawa, M., Ikeda, J., Ohshima, M., Adachi, O., Akagi, T. and Iwamura, H. (1996). *Eur. J. Biochem.* 237, 128-135.
- <sup>139</sup> Satoh, T., Miyoshi, H., Sakamoto, K. and Iwamura, H. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1273, 21-30.
- <sup>140</sup> Buchanan, S. K., Fritsch, G., Ermler, U. and Michel, H. (1993) *J. Mol. Biol.* 230, 1311-1314.
- <sup>141</sup> Strasser, B.J. and Strasser, R.J. (1995) In: *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, (P. Mathis ed.) Vol. V, 977-980 Kluwer Academic Publishers. Printed in Netherlands.
- <sup>142</sup> Fritsch, G., Kampmann, L., Kapaun, G. and Michel, H. (1998) *Photosynth. Res.* 55, 127-132.