

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ Π ΤΩΝ
ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΥΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΥΔΡΟΫΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

ΨΥΛΙΝΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2001

Εξεταστική Επιτροπή

Δημήτριος Γανωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Επιβλέπων Καθηγητής

Κωνσταντίνος Βαρώτσος

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Μιχαήλ Κοκκινίδης

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Αθανάσιος Κουτσολέλος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Μιχαήλ Ορφανόπουλος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Γεώργιος Τσιώτης

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Νικόλαος Χανιωτάκης

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Στην οικογένεια μου

Βιογραφικό Σημείωμα
Ψυλινάκης Εμμανουήλ

Ημερομηνία γέννησης: 4 Δεκεμβρίου 1972

Τόπος γέννησης: Άγιος Νικόλαος, Κρήτη

Εκπαίδευση: **Διδακτορική Διατριβή**, 1995-Φεβρουάριος 2001
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τίτλος Διατριβής: *«Δομική μελέτη του Φωτοσυστήματος
II των ανωτέρων φυτών και φασματοσκοπικός
χαρακτηρισμός της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των
λιπαρών οξέων»*

Επιβλέπων καθηγητής: Γανωτάκης Δημήτριος,
Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Πτυχίο Χημείας, 1995

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Διπλωματική Εργασία, 1994

Τμήμα Χημείας,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Τίτλος εργασίας: *«Μελέτη μιας κινάσης που
φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα της Λαμίνης Β»*

Επιβλέπων καθηγητής: Γιαννακούρος Θωμάς,
Επίκουρος Καθηγητής

Ξένες Γλώσσες: Αγγλικά

Διδακτική Εμπειρία:

- 1995-1996: Βοηθός εκπαιδευτής στα Εργαστήρια Ανόργανης Χημείας I και II.
- 1996-1997: Βοηθός εκπαιδευτής στα Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας I και II.
- 1997-1998: Βοηθός εκπαιδευτής στα Εργαστήρια Γενικής Χημείας I και II

Συμμετοχή σε Συνέδρια

- European Research Network Meeting. “Structural and Functional Analysis of the Oxygen Evolving Complex”. 6-9 November 1996, Gif-sur Yvettes, France.
- German-Greek Minisymposium on Photosystem II. “Isolation and Characterization of Photosystem II Reaction Center”. 12-15 May 1997, Heidelberg, Germany.
- ESF Summer School. “Pigment-protein complexes of Thylakoids from Oxygenic organisms: Isolation, Purification, Structural and Functional Analysis”. 27 September-8 November 1999, Berlin, Germany.

Δημοσιεύσεις

- Investigation of the structure of spinach photosystem II reaction center complex. Tsiotis, G., **Psylinakis, M.**, Woplensinger, B., Lusting, A., Engel, A. and Ghanotakis, D. (1998) *Eur. J. Biochem.* 259, 1-6.
- Analysis of the photosystem II reaction centers using scanning transmission electron microscopy. Tsiotis, G., **Psylinakis, M.**, Woplensinger, B., Engel, A. and Ghanotakis, D. (1998). In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (G. Garab, ed), Vol. II, 949-952.
- Spectroscopic studies on fatty acid hydroperoxide lyase. **Psylinakis, M.**, Davoras V. and Ghanotakis, D. *In preparation.*

Curriculum Vitae

Psylinakis Manolis

Date of Birth: December 4, 1972

Place of Birth: Agios Nikolaos, Crete

Education: **Ph.D.**, 1995-February 2001

Chemistry Department, University of Crete.

Thesis: “*Structural study of Photosystem II from higher plants and spectroscopic characterization of fatty acid hydroperoxide lyase*”

Thesis advisor: Ghanotakis Demetrios

B.Sc. Chemistry, 1995

University of Thessaloniki

Dissertation for B.Sc. Diploma, 1994

Chemistry Department, University of Thessaloniki

Thesis: “*Study of a kinase which phosphorylates the Lamine B receptor*”

Thesis advisor: Giannakouros Thomas, Assistant Professor

Languages: English

Teaching Experience:

- 1995-1996: Teaching assistant in Inorganic Chemistry I and II laboratory practical undergraduate classes
- 1996-1997: Teaching assistant in Analytical Chemistry I and II laboratory practical undergraduate classes
- 1997-1998: Teaching assistant in General Chemistry I and II laboratory practical undergraduate classes

Participation in Symposium:

- European Research Network Meeting. “Structural and Functional Analysis of the Oxygen Evolving Complex”. 6-9 November 1996, Gif-sur Yvettes, France.
- German-Greek Minisymposium on Photosystem II. “Isolation and Characterization of Photosystem II Reaction Center”. 12-15 May 1997, Heidelberg, Germany.
- ESF Summer School. “Pigment-protein complexes of Thylakoids from Oxygenic organisms: Isolation, Purification, Structural and Functional Analysis”. 27 September-8 November 1999, Berlin, Germany.

Publications:

- Investigation of the structure of spinach photosystem II reaction center complex. Tsiotis, G., **Psylinakis, M.**, Woplensinger, B., Lusting, A., Engel, A. and Ghanotakis, D. (1998) *Eur. J. Biochem.* 259, 1-6.
- Analysis of the photosystem II reaction centers using scanning transmission electron microscopy. Tsiotis, G., **Psylinakis, M.**, Woplensinger, B., Engel, A. and Ghanotakis, D. (1998). In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (G. Garab, ed), Vol. II, 949-952.
- Spectroscopic studies on fatty acid hydroperoxide lyase. **Psylinakis, M.**, Davoras V. and Ghanotakis, D. *In preparation.*

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γανωτάκη Δημήτριου, τον οποίο ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο αντικείμενο της βιοχημείας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ακόμη για την επιστημονική και ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου.

Ευχαριστώ το Τμήμα Χημείας για την δυνατότητα που μου παρείχε να πραγματοποιήσω την διατριβή μου στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος και για την χορήγηση υποτροφίας για ορισμένο χρονικό διάστημα των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ τους καθηγητές κκ. Βαρώτση Κωνσταντίνο, Κοκκινίδη Μιχαήλ, Κουτσολέλο Αθανάσιο, Ορφανόπουλο Μιχαήλ, Τσιώτη Γεώργιο και Χανιωτάκη Νικόλαο, οι οποίοι δέχθηκαν να συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή του διδακτορικού μου διπλώματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω μια σειρά από συνεργάτες που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της διατριβής μου:

τον καθηγητή Hartmut Michel για την δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ στο Ινστιτούτο Max-Planck της Φρανκφούρτης και τον Dr. G. Fritsch για την βοήθεια του στη πραγματοποίηση των πρώτων πειραμάτων περίθλασης ακτίνων-X,

τον καθηγητή Κοκκινίδη Μιχαήλ για την συνεργασία του και τον Dr Νικόλαο Γλυκό για τη συμβολή του στα πειράματα περίθλασης ακτίνων-X που πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιολογίας,

τον καθηγητή Engel A. στο Biozentrum της Ελβετίας, όπου πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και τον καθηγητή Τσιώτη Γεώργιο, για την συνεργασία του στη δομική μελέτη του PS II,

τον Dr Πετρουλέα Βασίλειο στο Δημόκριτο της Αθήνας για τη διεξαγωγή των πειραμάτων EPR σε θερμοκρασία ηλίου, υπό την επίβλεψη του Dr Νίκου Ιωαννίδη

τον Dr Matsui K. για την συνεργασία του στο πρόγραμμα της λυάσης.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους μεταπτυχιακούς του Τμήματος Χημείας για την βοήθεια και συναδελφικότητα τους και ειδικότερα τους Βασίλη Γαβαλά, Γιώργο Κουβαράκη και Κώστα Τσιγαρίδη που συνέβαλαν στη συγγραφή της παρούσας διατριβής. Ιδιαίτερος θέλω να ευχαριστήσω τους συναδέλφους Dr Ματούλα

Χρόνη, Dr Έλενα Κουϊμτζόγλου και Dr Ασπασία Σπυριδάκη για τις συζητήσεις και τη φιλική τους συμπαράσταση. Ευχαρίστω τους φίλους μου Βαγγέλη Δαβόρα, Γιάννη Τσαγκατάκη και Γιάννη Φαρσάρη οι οποίοι με τις συμβουλές τους συνέβαλλαν ουσιαστικά στην περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες-Συμβολισμοί.....	1
Περίληψη.....	4
Abstract.....	7

1 ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1.1 Μεμβρανικές πρωτεΐνες.	9
1.2 Δομική ανάλυση μεμβρανικών πρωτεϊνών.	11
1.3 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.	12
1.4 Διαλυτοποίηση και κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών.	14

2 ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ

2.1 Εισαγωγή στη φωτοσύνθεση.....	18
2.2 Απορρόφηση και παγίδευση της ηλιακής ενέργειας.	19
2.3 Οι φωτεινές αντιδράσεις στη φωτοσύνθεση.....	22
2.4 Ηλεκτρονιακή ροή στα φυτά.....	22

3 ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ II

3.1 Εισαγωγή στο φωτοσύστημα II.....	25
3.2 Δομική μελέτη του φωτοσυστήματος II.....	26
3.3 Οι πρωτεΐνες του φωτοσυστήματος II	27
3.3.1 Το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου (Reaction Center)	27
3.3.2 Οι πρωτεΐνες CP 47 και CP 43.....	31
3.3.3 Οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17, 23, 33 kDa του PS II.	33
3.4 Το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου	34
3.5 Φωτοαναστολή	35

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	36
--------------------------------------	----

4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΤΗΣ CP 47

4.1 Εισαγωγή.....	39
-------------------	----

4.2	Υλικά και μέθοδοι	41
4.2.1	Διαλύματα	41
4.2.2	Μέθοδοι	41
4.3	Αποτελέσματα	47
4.3.1	Πρωτόκολλο απομόνωσης	47
4.3.2	Απομάκρυνση του συμπλόκου συλλογής φωτός (LHC) από το PS II.	48
4.3.3	Απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών από το πυρήνα του PS II.	48
4.3.4	Διαλυτοποίηση και διαχωρισμός του πυρήνα από της CPs και την CP43.	49
4.3.5	Διάσπαση του συμπλόκου CP 47-D1-D2-Cyt b559, διαχωρισμός και απομόνωση της CP 47 και του συμπλόκου του ενεργού κέντρου D1-D2-Cyt b559.	53
4.3.6	Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών του PS II με φασματοσκοπία ορατού και αποδιατακτική ηλεκτροφορηση.	54
4.3.7	Κρυστάλλωση της CP 47.	58
4.3.8	Επίδραση του pH στην κρυστάλλωση της CP 47.	59
4.3.9	Επίδραση της θερμοκρασίας στην κρυστάλλωση της CP 47.	60
4.3.10	Επίδραση του αντιδραστηρίου καταβύθισης στην κρυστάλλωση της CP 47.....	61
4.3.11	Επίδραση της ιονικής ισχύος στη κρυστάλλωση της CP 47.....	63
4.3.12	Επίδραση του απορρυπαντικού στην ποιότητα των κρυστάλλων.	65
4.3.13	Μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν τη σταθερότητα της CP 47	68
4.3.14	Δομική μελέτη της CP 47 με επιλεκτική πρωτεόλυση.	72
4.3.15	Μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν τη σταθερότητα των υποσυμπλόκων του PSII	73
4.4	Συζήτηση.	76

5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΤΟΥ PS II ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΦΥΤΩΝ.

5.1	Εισαγωγή.	80
5.2	Υλικά και μέθοδοι	81
5.2.1	Αναλυτικές Μέθοδοι	81
5.2.2	Αναλυτική υπερφυγοκέντρωση.	82
5.2.3	Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM)	82
5.3	Αποτελέσματα	82

5.3.1	Χαρακτηρισμός του απομονωμένου ενεργού κέντρου με SDS-ηλεκτροφόρηση και φασματοσκοπία απορρόφησης.	83
5.3.2	Χαρακτηρισμός του απομονωμένου ενεργού κέντρου με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και αναλυτική υπερφυγοκέντρωση.	84
5.3.3	Υπολογισμός της μάζας του συμπλόκου του ενεργού κέντρου με αναλυτική υπερφυγοκέντρωση και STEM	85
5.3.4	Δομική ανάλυση του συμπλόκου με STEM	85
5.4	Συζήτηση.	87

6 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΥΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΔΡΟΪΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

6.1	Εισαγωγή	90
6.2	Υλικά και Μέθοδοι	93
6.2.1	Διαλύματα	93
6.2.2	Καλλιέργεια βακτηρίων E. coli.	93
6.2.3	Απομόνωση της HPO lyase.	94
6.2.4	Παρασκευή του υποστρώματος.	94
6.2.5	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της HPO lyase.	95
6.2.6	Ηλεκτροφόρηση.	95
6.2.7	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της HPO lyase.	95
6.3	Αποτελέσματα	96
6.3.1	Απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός της HPO lyase.	96
6.3.2	Μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας της HPO lyase.	98
6.3.3	Μελέτη του μεταλλικού κέντρου της HPO lyase με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis).	100
6.3.4	Μελέτη του μεταλλικού κέντρου της HPO lyase με φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (X-band EPR).	105
6.4	Συζήτηση	112
	Αναφορές	115

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ

Å:	Angstroem
Ala:	αλανίνη
AOS:	allene oxide synthase
AsCH:	ασκορβικό οξύ
ATP:	αδενοσινιο-5-τριφωσφορικός εστέρας
Bis-Tris:	δισ (2-υδροξυαιθυλο)-αμινο-τρις (υδροξυμεθυλο)-μεθάνιο
BSA:	bovine serum albumin
CcP:	υπεροξειδάση του κυτοχρώματος C
Chl:	χλωροφύλλη
CMC:	κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων
CP:	πρωτεΐνη που δεσμεύει χλωροφύλλη
CPO:	χλωροπεροξειδάση
Cyt:	κυτόχρωμα
DCBQ:	2,6-διχλωρο-π-βενζοκινόνη
DCMU:	3-(3,4-διχλωροφαινυλο)-1,1-διμεθυλουρία
DM:	δεκυλο-β-D-μαλτοζίτης
DMPC:	διμυριστοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη
E. coli:	βακτήριο Escherichia coli
EDC:	1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλοαμινοπροπυλο)καρβοδιιμίδιο
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
HPOD:	13-S-υδροϋπεροξειδίο-9-Z, 11-E-οκταδεκαδιενοϊκό οξύ
HPO lyase:	λυάση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων
HPT:	1,2,3-επτανετριόλη
HRP:	horseradish peroxidase
HXT:	1,2,3-εξανετριόλη
IPTG:	ισοπρόπυλ-θείο-γαλακτοπυρανοζίτης
kDa:	kilodalton
LHC:	σύμπλοκο συλλογής φωτός

LM:	δωδεκυλο-β-D-μαλτοζιτης
LOX:	λιποξυγενάση
Lys:	λυσίνη
Mb:	μυογλοβίνη
Mes:	2-μορφολινο-αιθανοσουλφονικό οξύ
NADP:	νικοτιδαμινο-αδενινο-δινουκλεοτιδο-φωσφορικός εστέρας
NHS-biotin:	N-hydroxysuccinimidobiotin
NM	νόνυλο-β-D-μαλτοζιτης
OEC:	σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου
OGP:	οκτυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτης
OTG:	οκτυλο-β-D-θειογλυκοπυρανοζίτης
P450:	οικογένεια κυτοχρωμάτων
P680:	πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης του φωτοσυστήματος II
P700:	πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης του φωτοσυστήματος I
PC:	πλαστοκυανίνη
PEG:	πολυαιθυλενογλυκόλη
Phe:	φαινυλαλανίνη
Pheo:	φαιοφυτίνη
PMSF:	φαινυλ-μεθυλ-σουλφονικό φθόριο
PQ:	πλαστοκινόνη
Pro:	προλίνη
PSI:	φωτοσύστημα I
PSII:	φωτοσύστημα II
PSII-core:	πυρήνας του φωτοσυστήματος II
QA:	πρωτοταγής ηλεκτρονιοδέκτης του PSII και του βακτηριακού κέντρου αντίδρασης
QB:	δευτεροταγής ηλεκτρονιοδέκτης του PSII και του βακτηριακού κέντρου αντίδρασης
RC:	ενεργό κέντρο
SDS:	δωδεκυλοθειικό νάτριο
SDS-PAGE:	πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου
Ser:	σερίνη
STEM	scanning transmission electron microscopy
Thyl:	θυλακοειδή

TMBZ:	3,3', 5,5'-τεταμέθυλοβενζιδίνη
Tri-DM:	τριδεκυλο-μαλτοζίτης
Tris-PSII-core:	PSII-core κατεργασμένο με Tris
Tyr:	τυροσίνη
Tris:	τρις-υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο
UM:	ενδεκυλο-β-D-μαλτοζίτης
UV-Vis:	φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το Φωτοσύστημα II είναι ένα μεμβρανικό πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο καταλύει την διάσπαση του νερού, μέσω ενός μοναδικού μηχανισμού. Οι σημαντικές λειτουργικές ιδιότητες του συμπλόκου αυτού αποδίδονται στα μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά του. Η δομική μελέτη του PS II ξεκινά από το επίπεδο της τοπολογίας των πρωτεϊνών στο σύμπλοκο και καταλήγει στο επίπεδο της μοριακής δομής. Από έμμεσες βιοχημικές μελέτες έχουν προκύψει μοντέλα για τη σχετική θέση και οργάνωση των υπομονάδων του PS II. Τα τελευταία χρόνια μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν δώσει μια εικόνα για την τοπολογία του συμπλόκου στο χώρο. Οι μόνες πληροφορίες για την δομή του PS II σε μοριακό επίπεδο προέρχονται από τα φωτοσυνθετικά μωβ βακτήρια η δομή των οποίων έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Μέχρι σήμερα απουσιάζει το τρισδιάστατο μοντέλο που θα απεκάλυπτε τα μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά του PS II σε ατομικό επίπεδο.

Στη παρούσα εργασία στόχος ήταν η δομική μελέτη του PS II σε μοριακό επίπεδο και στο επίπεδο της οργάνωσης των πρωτεϊνών στο σύμπλοκο. Η μελέτη της μοριακής δομής του PS II στηρίχθηκε στην ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων και ανάλυση της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Η ανάλυση της τεταρτοταγούς δομής του PS II βασίστηκε στη μελέτη του συμπλόκου του ενεργού κέντρου με ηλεκτρονική μικροσκοπία.

Στα πλαίσια της κρυστάλλωσης του PS II αναπτύχθηκε ένα νέο πρωτόκολλο απομόνωσης, το οποίο εξασφαλίζει την ποσοτική απομόνωση της CP 47 και του συμπλόκου του ενεργού κέντρου σε σταθερή κατάσταση. Το πρωτόκολλο βασίζεται στην επιλεκτική αποδέσμευση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με κατάλληλο συνδυασμό απορρυπαντικών και εμπλουτισμό των υποσυμπλόκων με υπερφυγοκέντρωση σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης.

Για πρώτη φορά επιτεύχθηκε η κρυστάλλωση μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης του PS II. Για την βελτίωση των κρυστάλλων της CP 47 πραγματοποιήθηκε συστηματική μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Η χαμηλή ικανότητα περίθλασης των κρυστάλλων αποδόθηκε στη διάσπαση της CP 47. Η διάσπαση της CP 47 ξεκινά αμέσως μετά την αποδέσμευση της από το υπόλοιπο σύμπλοκο και συνεχίζεται στο

σκοτάδι. Η ευαισθησία της CP 47 αποδίδεται σε αλλαγή της δομής που οφείλεται στην αποδέσμευση της πρωτεΐνης από το πυρήνα.

Από τη δομική μελέτη του συμπλόκου του ενεργού κέντρου του PS II προέκυψαν πληροφορίες για την κατάσταση ολιγομερισμού του και την θέση των μεμβρανικών πρωτεϊνών στον πυρήνα του PS II. Το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου απομονώθηκε σε μονομερή μορφή και το μοριακό του βάρος προσδιορίστηκε με συνδυασμό δύο ανεξάρτητων τεχνικών. Από την ανάλυση των εικόνων που ελήφθησαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο προέκυψε ο χάρτης κατανομής της πρωτεϊνικής πυκνότητας των υπομονάδων D1 και D2. Από την σύγκριση του χάρτη του συμπλόκου του ενεργού κέντρου με το χάρτη ολόκληρου του πυρήνα αποκαλύφθηκε η σχετική θέση των κυριότερων μεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες D1 και D2 εντοπίζονται στο κέντρο, ενώ οι CP 47 και CP 43 στην περιφέρεια του συμπλόκου, προσδίδοντας στο πυρήνα του PS II ψευδοσυμμετρία δευτέρας τάξης.

Επίσης στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε η μελέτη της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων (HPO lyase). Το ένζυμο αυτό είναι ευρύτατα διαδεδομένο στο φυτικό βασίλειο και τα προϊόντα της δράσης του εμπλέκονται στον αμυντικό μηχανισμό των φυτών. Η HPO lyase ανήκει σε μία νέα κατηγορία ενζύμων (CYP 74), τα οποία προτείνεται ότι ανήκουν στην οικογένεια των κυτοχρωμάτων P450. Τα ένζυμα της κατηγορίας CYP74 εμφανίζουν μοναδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά, αφού δεν χρειάζονται αναγωγικό και οξυγόνο για την δράση τους και επιδεικνύουν υψηλούς ρυθμούς ανακύκλησης σε αντίθεση με τα P450.

Στην παρούσα εργασία η HPO lyase απομονώθηκε από βακτήρια *E. coli*, τα οποία περιέχουν το ανασυνδιασμένο DNA του ενζύμου από πιπεριά. Από τα βακτήρια η HPO lyase εκφράστηκε σε ικανοποιητική ποσότητα, που επέτρεψε τον βιοχημικό και φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό του ενζύμου. Η εργασία επικεντρώθηκε στη δομική μελέτη του περιβάλλοντος της αίμης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR). Η φασματοσκοπική μελέτη του ενζύμου στηρίχτηκε στη δέσμευση εξωγενών ligands στο σίδηρο της αίμης του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου και στην σύγκριση των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών, με εκείνα πρωτεϊνών με γνωστή δομή. Από τις μελέτες αυτές αποκαλύφθηκε ότι ο αιμικός σίδηρος είναι πεντασυναρμοσμένος και βρίσκεται σε κατάσταση υψηλού spin. Από την εργασία αυτή ελήφθησαν για πρώτη

φορά φασματοσκοπικά δεδομένα, τα οποία στηρίζουν την υπόθεση ότι στη πέμπτη θέση συναρμογής της αίμης υπάρχει κυστεΐνη και κατά συνέπεια η HPO lyase είναι ένα κυτόχρωμα P450.

ABSTRACT

Photosystem II is a membrane multiprotein complex, which catalyzes water splitting, via a unique mechanism. The significant functional properties of this complex are attributed to its unique structural characteristics. Indirect biochemical studies have yielded information on the location of the PSII proteins. Recently, electron microscopy studies have led to models concerning the relative assembly and subunit topology in PSII. However, the only available information on the PSII structure on a molecular level derive from purple photosynthetic bacteria, whose structure has been determined by X-ray crystallography. To date, a three-dimensional model, which would reveal the unique functional properties of PSII, is absent.

In the present work the aim has been the structural study of PSII on a molecular level, as well as the level of PSII assembly. The study of the molecular structure of PSII was based on the production of three dimensional crystals and the analysis of the structure with X-ray crystallography. The analysis of the tertiary structure of PSII was based on electron microscopy studies of the reaction center.

Concerning the crystallization of PSII, a new purification protocol was established, which enabled quantitative isolation of CP 47 and the reaction center complex, in a stable state. This protocol is based on the selective extraction of membrane proteins, using the appropriate combination of detergents and the enrichment of the subcomplexes with ultracentrifugation, using a linear sucrose gradient.

The crystallization of a PSII membrane protein was accomplished for the first time. In order to improve the CP 47 crystals a thorough screening of the parameters, which influence membrane protein crystallization, was carried out. The low resolution of the crystals was attributed to a degradation of the CP 47 protein. This degradation takes place after the protein's dissociation from the rest of the complex and continues in the dark. This sensitivity of the protein could be the consequence of structural changes, induced by its dissociation from the core complex.

The structural study of the PSII reaction center complex yielded information on the oligomerization state and the location of the membrane proteins in the PSII-core. The reaction center complex was isolated in a monomeric form and its molecular weight was estimated by a combination of two independent techniques. Analysis of the images, which were obtained by electron microscopy, led to a protein

density map of the D1 and D2 subunits. A comparison of the reaction center map to the map of the whole PSII-core complex revealed the relative positions of the major membrane proteins. These results supported a central location for the D1/D2 heterodimer and a peripheral location for CP 47 and CP 43, giving the complex a pseudo twofold symmetry.

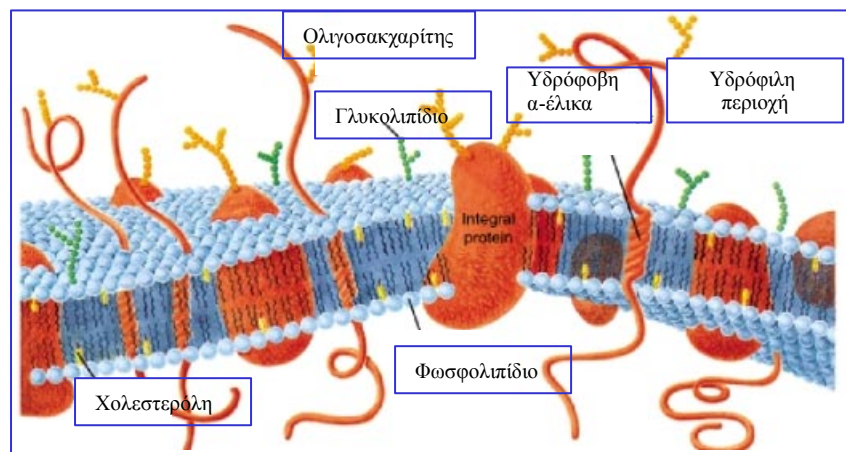
In addition, in the present thesis a study on HPO lyase was carried out. This enzyme is widely spread in plants and its products are involved in plant defense. HPO lyase belongs to a new category of enzymes (CYP 74), which are considered to be a subclass of the cytochrome P450 family. CYP 74 enzymes have unique functional features, since they do not need a reductant and oxygen for their function and exhibit an extremely high turnover rate, in contrast to P450.

In the present study HPO lyase was purified from *E. coli*, which contained the enzyme's recombinant DNA from green bell pepper. *E. coli* expression of HPO lyase yielded sufficient amounts of enzyme, which enabled its biochemical and spectroscopical characterization. This work has focused on the structural study of the heme environment of the metal center using UV-Vis spectroscopy and EPR. The spectroscopic study of the enzyme was based on the interaction of exogenous ligands with the heme iron and the comparison of the resulted spectroscopical characteristics to the ones of heme proteins with a known structure. These studies revealed that the heme iron is five-coordinated and that it exists in a high spin state. For the first time, spectroscopic data were obtained which supported that the proximal site is occupied by cystein and that HPO lyase is indeed a cytochrome P450.

1. ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ MEMBRANΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1.1 Μεμβρανικές πρωτεΐνες.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι σχεδιασμένες να λειτουργούν μέσα στις βιολογικές μεμβράνες, οι οποίες αποτελούνται από μια λεπτή διπλοστοιβάδα λιπιδίων (4.5 nm). Τα λιπίδια έχουν αμφίφιλο χαρακτήρα και προσανατολίζονται μέσα στη διπλοστοιβάδα κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το υδρόφοβο μέρος τους να είναι κρυμμένο στο εσωτερικό της μεμβράνης, ενώ οι υδρόφιλες ομάδες είναι εκτεθειμένες στο υδατικό περιβάλλον.

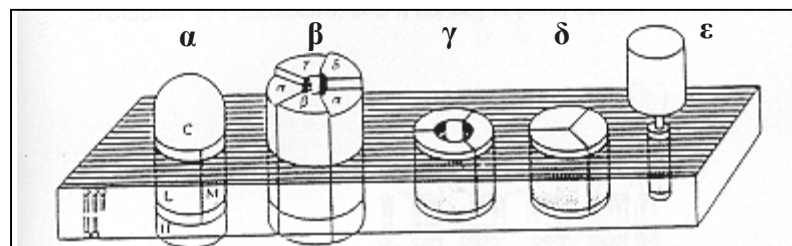


Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση της αναδίπλωσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών στην λιπιδική διπλοστοιβάδα.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, στην πιο απλή περίπτωση διαπερνούν τις βιολογικές μεμβράνες μία φορά και αποτελούνται από μία διαμεμβρανική περιοχή και δύο υδρόφιλα τμήματα εκατέρωθεν της μεμβράνης (σχήμα 1). Συνήθως στις πρωτεΐνες αυτού του τύπου διακρίνονται μια υδρόφιλη σφαιρική (globular) περιοχή, λειτουργικά αυτοτελή, και το διαμεμβρανικό τμήμα. Η υδρόφιλη περιοχή είναι λειτουργικά αυτοτελής, και αγκυροβολεί στη μεμβράνη μέσω του διαμεμβρανικού τμήματος. Σε τέτοιες πρωτεΐνες, όπως οι G-πρωτεΐνες και οι υποδοχείς, είναι δυνατό με πρωτεόλυση να απελευθερωθεί η λειτουργική περιοχή τους (domain) και να μελετηθούν ως υδρόφιλες πρωτεΐνες.

Σε άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες η πολυπεπτιδική αλυσίδα διαπερνά τη μεμβράνη περισσότερες φορές σχηματίζοντας α-έλικες ή β-πτυχωτές επιφάνειες, οι οποίες συνδέονται μέσω υδρόφιλων περιοχών (loop).

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες συμμετέχουν σε μια σειρά από σημαντικές λειτουργίες της ζωής. Καταλύουν την βιολογική μετατροπή της ενέργειας, όπως την απορρόφηση και μετατροπή της ηλιακής σε χημική και ηλεκτρική ενέργεια κατά τη φωτοσύνθεση. Στις ενεργειακές μετατροπές συμμετέχουν σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από μεμβρανικές και υδρόφιλες πρωτεΐνες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (σχήμα 2). Το ενεργό κέντρο από το *R. viridis* αποτελείται από δύο μεμβρανικές πρωτεΐνες (L και M) πάνω στις οποίες δεσμεύεται κυτόχρωμα C το οποίο είναι μια υδρόφιλη πρωτεΐνη [1-3]. Πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας και λειτουργούν σαν κεραία για τα φωτοσυστήματα, είναι συνήθως ολιγομερή παρόμοιων υπομονάδων όπως το LHC και η βακτηριακή ροδοψίνη [4].



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής πέντε μεμβρανικών πρωτεϊνών. α) Το ενεργό κέντρο των φωτοσυνθετικών βακτηρίων *R. viridis*. β) Ο υποδοχέας της ακετυλοχολίνης. γ) Η βακτηριακή πορίνη από *E. coli*. δ) Η βακτηριακή ροδοψίνη από το *Halobacterium halobium*. ε) Αιμαγλουτίνη

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ακόμη καταλύουν την μεταφορά ειδικών μεταβολιτών και ιόντων διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών. Στη λειτουργία αυτή συνήθως εμπλέκονται πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα της ίδιας ή παρόμοιας υπομονάδας όπως ο υποδοχέας της ακετυλοχολίνης που είναι πενταμερές ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) τεσσάρων παρόμοιων υπομονάδων [5]. Οι πρωτεΐνες διαπερνούν την μεμβράνη ώστε να εκτείνονται και από τις δύο πλευρές της δημιουργώντας ένα κανάλι. Η βακτηριακή πορίνη είναι τριμερές μίας υπομονάδας και σχηματίζει πόρους κατά μήκος της μεμβράνης για την παθητική μεταφορά μικρών μορίων [6].

Μια άλλη πολύ σημαντική λειτουργία των μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι η δράση τους ως υποδοχείς και μεταφορείς μηνυμάτων κατά μήκος της μεμβράνης. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούν σημεία αναγνώρισης χημικών σημάτων όπως οι ορμόνες και εμπλέκονται στην κυτταρική αναγνώριση.

Απ' όλα τα παραπάνω γίνεται φανερός ο άμεσος συσχετισμός της δομής με τη λειτουργία, γεγονός που επιβάλλει τη γνώση των δομικών χαρακτηριστικών για την εξιχνίαση του ρόλου των μεμβρανικών πρωτεϊνών.

1.2 Δομική ανάλυση μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Η ανάλυση της δομής των μεμβρανικών πρωτεϊνών επεκτείνεται σε διάφορα επίπεδα ξεκινώντας από την πρωτοταγή έως την τεταρτοταγή δομή. Ο συνδυασμός διαφόρων τεχνικών παρέχει συμπληρωματικές πληροφορίες για τα διαφορά δομικά επίπεδα και οδηγεί στην αποκάλυψη της δομής.

Η δομική ανάλυση ξεκινάει από το προσδιορισμό της αμινοξικής αλληλουχίας με βιοχημικές τεχνικές. Από το συσχετισμό της πρωτοταγούς με την δευτεροταγή δομή μπορεί να γίνει πρόβλεψη για την τοπολογία της μεμβρανικής πρωτεΐνης. Από τα διαγράμματα υδροπαθητικότητας (Hydrophathy plot analysis) λαμβάνονται πληροφορίες για τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής και γίνεται πρόβλεψη για πιθανές διαμεμβρανικές περιοχές.

Η τεταρτοταγής δομή ενός μεμβρανικού πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου μπορεί να μελετηθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Γενικά αυτή η μέθοδος παρέχει πληροφορίες σε χαμηλή διακριτική ικανότητα που αφορούν το συσχετισμό των υπομονάδων ενός συμπλόκου στο χώρο. Τα τελευταία χρόνια η εφαρμογή της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε δυσδιάστατους κρυστάλλους μεμβρανικών πρωτεϊνών οδήγησε στην αύξηση της διακριτικής ικανότητας της μεθόδου (ηλεκτρονική κρυσταλλογραφία).

Παρά την εξέλιξη και εφαρμογή νέων τεχνικών (NMR) στη δομική ανάλυση μεμβρανικών πρωτεϊνών, η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X παραμένει η κυριότερη μέθοδος για την αποκάλυψη της δομής σε μοριακό επίπεδο.

Μέχρι σήμερα η τρισδιάστατη δομή 8.000 βιολογικών μακρομορίων έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Τα στάδια που ακολουθούνται για το προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής μιας πρωτεΐνης είναι η απομόνωση και

κρυστάλλωσή της, η συλλογή δεδομένων περίθλασης και η κρυσταλλογραφική ανάλυσή τους.

1.3 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.

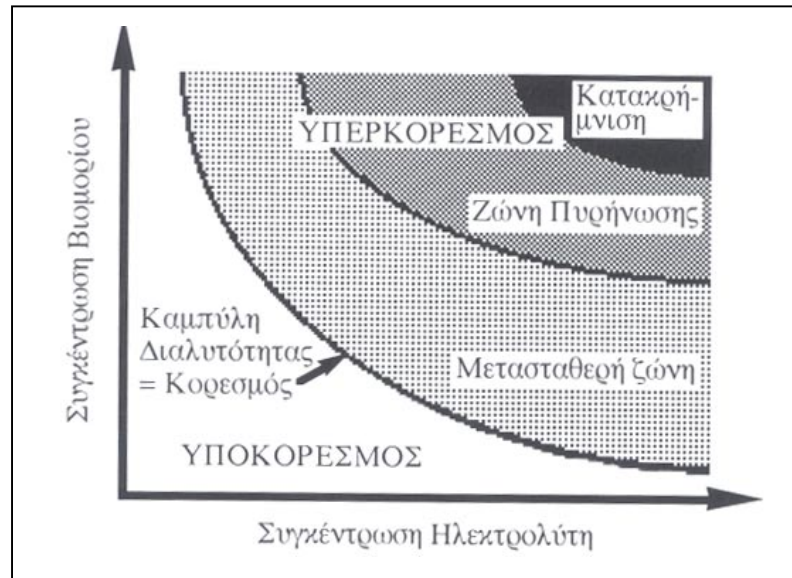
Ο κρύσταλλος χαρακτηρίζεται από περιοδική διευθέτηση των μορίων που τον αποτελούν στο χώρο. Αυτή η συναρμολόγηση των μορίων σε ένα αυστηρό πλέγμα μειώνει την εντροπία του συστήματος. Οι αλληλεπιδράσεις, που κρατούν τα μόρια στο κρυσταλλικό πλέγμα, ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε 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 της κρυστάλλωσης.

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 που ακολουθεί, δείχνει τη μεταβολή των ορίων κορεσμού σε σχέση με τις συνθήκες και τις περιοχές όπου δημιουργούνται και μεγαλώνουν σταθεροί πυρήνες (σχήμα 3). Όπως φαίνεται από το διάγραμμα φάσεων, υπάρχουν δύο περιοχές υπεркоρεσμού, η ζώνη πυρήνωσης και η μετασταθής. Ζώνη πυρήνωσης ονομάζεται η περιοχή όπου δημιουργούνται οι πυρήνες των κρυστάλλων ενώ 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.



Σχήμα 3. Διάγραμμα φάσεων, στο οποίο απεικονίζεται η μεταβολή της διαλυτότητας μιας πρωτεΐνης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιδραστηρίου καταβύθισης.

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 ικανοποιητικού μεγέθους.

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. Οι δυσκολίες που παρουσιάζονται στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών, πηγάζουν από τη πολυπλοκότητα, την αστάθεια και τις δυναμικές ιδιότητες των μακρομορίων. 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, μέσω 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.

1.4 Διαλυτοποίηση και Κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Μέχρι σήμερα από τις 6.500 πρωτεΐνες, των οποίων οι τρισδιάστατη δομή έχει προσδιοριστεί σε μοριακό επίπεδο, μόνο 14 είναι μεμβρανικές. Επιπλέον το 40% των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα της μαγιάς (Baker's yeast) αναμένεται να είναι μεμβρανικές. Αυτές οι αναλογίες τονίζουν όχι μόνο τη σημασία των μεμβρανικών πρωτεϊνών αλλά και τη δυσκολία όσον αφορά τη δομική μελέτη τους.

Το πρόβλημα είναι ο αμφίφιλος χαρακτήρας των μεμβρανικών πρωτεϊνών, ο οποίος καθιστά δύσκολη την διαλυτοποίηση και κρυστάλλωση τους. Οι υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης είναι καλυμμένες στο λιπόφιλο εσωτερικό της μεμβράνης, ενώ τα υδρόφιλα τμήματα εκτίθενται στο υδρόφιλο περιβάλλον. Τέτοιες αμφίφιλες πρωτεΐνες, σε αντίθεση με τις υδρόφιλες, είναι αδιάλυτες σε υδατικά διαλύματα, αφού η αφαίρεση της μεμβράνης οδηγεί σε συσσωμάτωση και καθίζηση τους.

Πίνακας 1: *Μεμβρανικές πρωτεΐνες με δομή γνωστή σε μοριακό επίπεδο.*

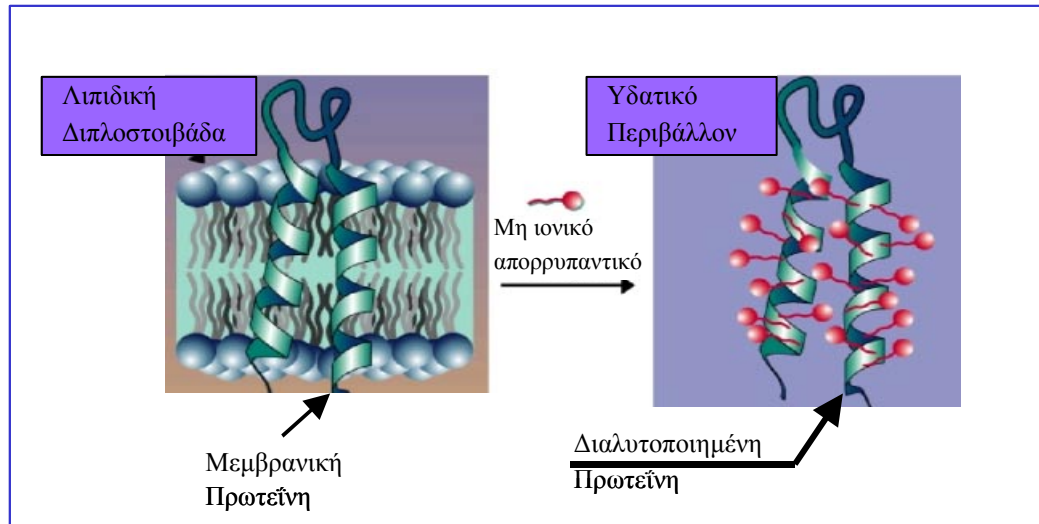
Πρωτεΐνες	Χρονιά	Διακριτική Ικανότητα (Å)	Αναφορές
Bacteriorhodopsin	1990	2.3	[7-10]
Bacterial Photoreaction Centers	1984	2.2	[1-3]
Light Harvesting Complexes	1994	2.4	[11-13]
Photosystem I	1996	4.0	[14]
Porins	1990	1.8	[15-17]
Ferric Enterobactin Receptor	1998		[18-19]
Alpha-Hemolysin	1996	1.9	[20]
Potassium Channel KcsA	1998	3.2	[21]
Mechanosensitive Channel MSCL	1998		
Prostaglandin Synthase-I	1993	3.4	[22, 23]
Prostaglandin Synthase-II	1996	3.0	[24, 25]
Squalene-hopene cyclase	1997	2.8	[26]
Cytochrome Oxidase	1995	2.7	[27-29]
Cytochrome bc ₁ Complex	1996	2.9	[30-32]

Για τη διαλυτοποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών απαιτείται η χρήση απορρυπαντικού (detergent). Τα απορρυπαντικά είναι επιφανειοδραστικά μόρια με αμφίφιλο χαρακτήρα, όπως τα λιπίδια.. Η ουσίες αυτές έχουν την ικανότητα να φτιάχνουν μικκύλια όταν η συγκέντρωσή τους ξεπεράσει μία ορισμένη τιμή, γνωστή ως CMC (Critical Micelle Concentration) [33-35].

Τα απορρυπαντικά διαλυτοποιούν τις βιολογικές μεμβράνες και οι πρωτεΐνες ενσωματώνονται στα μικκύλια κατά τέτοιο τρόπο, ώστε η διαμεμβρανική περιοχή να είναι καλυμμένη στο εσωτερικό του μικκυλίου, ενώ τα υδρόφιλα τμήματα είναι σε επαφή με το υδατικό περιβάλλον (σχήμα 4). Τα μικκύλια μιμούνται κατά κάποιον τρόπο το μεμβρανικό περιβάλλον και καθιστούν τις μεμβρανικές πρωτεΐνες υδατοδιαλυτές.

Η επιλογή του απορρυπαντικού είναι πολύ σημαντική, διότι η διαλυτοποιημένη πρωτεΐνη πρέπει να διατηρεί την λειτουργική δομή της. Απορρυπαντικά με φορτισμένες πολικές ομάδες συνήθως αλλάζουν την διαμόρφωση της πρωτεΐνης προκαλώντας μετουσίωση. Για την διαλυτοποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται κυρίως μη ιονικά απορρυπαντικά με πολική υδρόφιλη

ομάδα. Τα απορρυπαντικά αυτά προκαλούν ήπια διαλυτοποίηση και η ικανότητα τους να διαλυτοποιούν τις βιολογικές μεμβράνες εξαρτάται από το μέγεθος του υδρόφιλου και υδρόφοβου τμήματος.



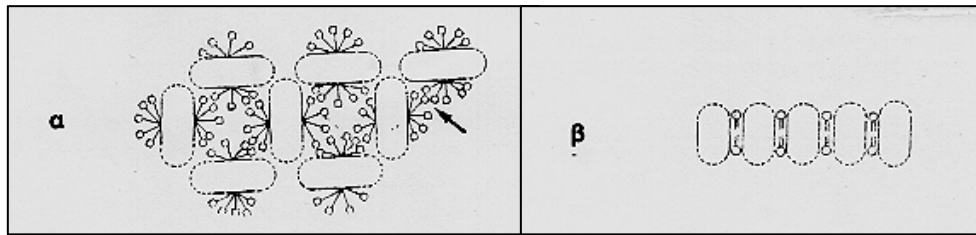
Σχήμα 4. Αναπαράσταση της διαλυτοποίησης των μεμβρανικών πρωτεϊνών από τη μεμβράνη με απορρυπαντικά.

Η κρυστάλλωση των διαλυτοποιημένων μεμβρανικών πρωτεϊνών παρουσιάζει ιδιαίτερη δυσκολία, διότι η πρωτεΐνη περιβάλλεται από το μικκύλιο του απορρυπαντικού, το οποίο αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για το σχηματισμό του κρυσταλλικού πλέγματος [36, 37].

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να σχηματίσουν δύο κυρίως τύπους κρυστάλλων που διακρίνονται από τη φύση των δυνάμεων που συγκρατούν το κρυσταλλικό πλέγμα (σχήμα 5). Στους δυσδιάστατους κρυστάλλους, τα μόρια της πρωτεΐνης ενσωματώνονται μέσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δυνάμεις υδροφοβικού χαρακτήρα. Στους τρισδιάστατους κρυστάλλους το κρυσταλλικό πλέγμα συγκρατείται από πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφιλων περιοχών της μεμβρανικής πρωτεΐνης.

Για την κρυστάλλωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι απαραίτητη η παρουσία υδρόφιλων περιοχών, οι οποίες παρέχουν και τα σημεία επαφής στους κρυστάλλους. Το μικκύλιο ενσωματώνεται στο κρυσταλλικό πλέγμα παρεμποδίζοντας με το μέγεθος του το πακετάρισμα της πρωτεΐνης.

Επιπλέον το μεγάλο μικκύλιο είναι πιθανό να αποκρύπτει πολικές περιοχές της πρωτεΐνης απαραίτητες για το σχηματισμό του κρυσταλλικού πλέγματος.



Σχήμα 5. Τύποι κρυστάλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών: α) Τρισδιάστατοι κρύσταλλοι.
β) Δισδιάστατοι κρύσταλλοι.

Ακόμη το απορρυπαντικό έχει ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες οι οποίες επηρεάζουν την κρυστάλλωση. Ένα από τα πιο συνήθη φαινόμενα είναι ο διαχωρισμός φάσης (Phase Out), ο οποίος αποδίδεται σε συσσωμάτωση των μικκυλίων παρασύροντας και την πρωτεΐνη εκτός διαλύματος. Σε πολλές περιπτώσεις οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικκυλίων είναι ευνοϊκές για το σχηματισμό του κρυσταλλικού πλέγματος [38, 39].

2. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ

2.1 Εισαγωγή στη φωτοσύνθεση.

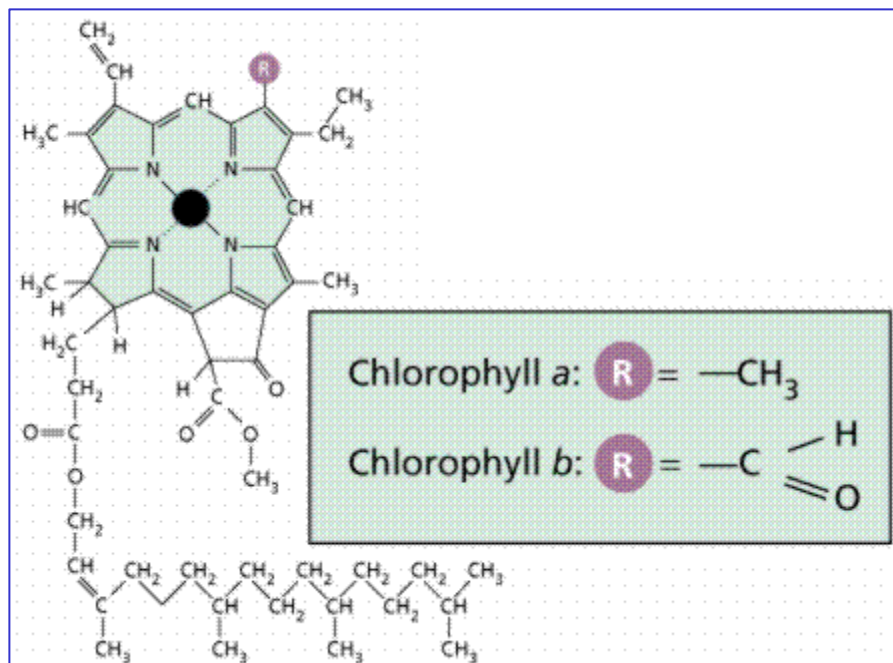
Όλη η ενέργεια που καταναλώνεται στα βιολογικά συστήματα προέρχεται από τη φωτοσύνθεση, η οποία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα φαινόμενα της ζωής. Η φωτοσύνθεση μπορεί να οριστεί ως μια σειρά διεργασιών που καταλήγουν στη μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική.

Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν ως πηγή την ηλιακή ενέργεια και να συνθέτουν μεταβολικά χρήσιμους υδατάνθρακες που αποτελούν την βάση της διατροφής για όλους τους ετερότροφους οργανισμούς στη γη. Τα φυτά, τα φύκη και ορισμένα βακτήρια (κυανοβακτήρια, μωβ βακτήρια και πράσινα βακτήρια) έχουν την ικανότητα να φωτοσυνθέτουν. Μάλιστα οι οξυγονικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για να οξειδώσουν το H_2O και αποβάλλουν ως παραπροϊόν οξυγόνο. Το οξυγόνο αποτελεί πολύτιμο στοιχείο για τη λειτουργία της αναπνοής. Γενικότερα η χημεία του οξυγόνου είναι πολύ σημαντική για τη ζωή στο πλανήτη μας. Θεωρείται ότι η απελευθέρωση του O_2 από τα κυανοβακτήρια οδήγησε στη μετατροπή του αναγωγικού περιβάλλοντος σε οξειδωτικό. Ακόμη το O_2 είναι υπεύθυνο για πολλές ορυκτολογικές και ατμοσφαιρικές αλλαγές που διαμόρφωσαν τη ζωή στο πλανήτη μας. Τέλος, ένα πολύ σημαντικό αποτέλεσμα της χημείας του οξυγόνου είναι το στρώμα του όζοντος (O_3) στην ατμόσφαιρα, που απορροφά την βλαβερή UV ηλιακή ακτινοβολία επιτρέποντας την ανάπτυξη ζωής στη γη.

Ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης αποτελεί αντικείμενο μελέτης σε πολλά εργαστήρια ανά τον κόσμο. Η έρευνα η οποία συντελείται εδώ και πολλά χρόνια έχει δώσει σημαντικές πληροφορίες ως προς την εξιχνίαση του μοναδικού αυτού φαινομένου. Πολλά όμως από τα μυστικά της φωτοσύνθεσης παραμένουν άγνωστα και η αποκάλυψη του μηχανισμού της, σε μοριακό επίπεδο, αποτελεί μία από της πιο σημαντικές ερευνητικές προκλήσεις.

2.2 Απορρόφηση και παγίδευση της ηλιακής ενέργειας.

Η απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας είναι το πρώτο στάδιο του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αυτό πραγματοποιείται στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς με τη χρήση φωτοαπορροφητικών μορίων, όπως οι χρωστικές χλωροφύλλες (Σχήμα 6). Η χλωροφύλλη είναι ένα υποκατεστημένο τετραπυρρόλιο, στο οποίο τα τέσσερα άτομα αζώτου είναι ενωμένα με ένα κεντρικό άτομο μαγνησίου. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των χλωροφυλλών είναι η παρουσία της φυτόλης, μιας πολύ υδρόφοβης αλκοόλης με είκοσι άτομα άνθρακα, η οποία εστεροποιείται με την πλευρική αλυσίδα ενός οξέος.

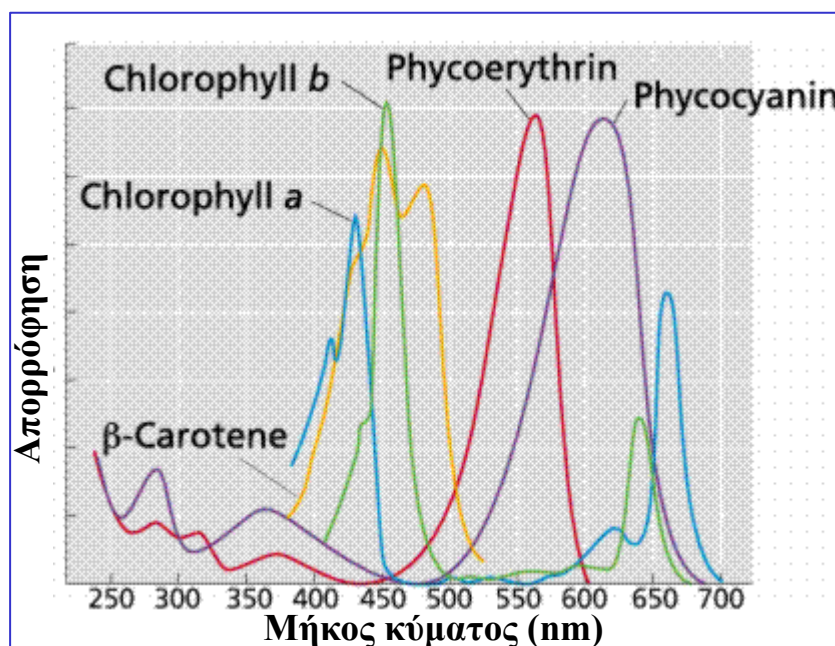


Σχήμα 6. Δομή του μορίου των χλωροφυλλών.

Οι χλωροφύλλες διακρίνονται σε χλωροφύλλη α και β, (Chl a, Chl b). Η διαφορά τους είναι ότι η χλωροφύλλη β έχει μία φορμυλομάδα αντί μιας μεθυλομάδας, που υπάρχει σε αντίστοιχη θέση στο μόριο της χλωροφυλλής α. Τα φάσματα απορρόφησης των χλωροφυλλών α και β είναι συμπληρωματικά, ώστε φως μήκους κύματος που δεν απορροφάται από την Chl a, να απορροφάται από την Chl b. Με τον τρόπο αυτό διευρύνεται το φάσμα της ηλιακής ενέργειας που αξιοποιείται στη φωτοσύνθεση. Οι χλωροφύλλες είναι γενικά πολύ αποτελεσματικοί φωτοϋποδοχείς, επειδή περιέχουν συζηγιακά συστήματα εναλλασσόμενων διπλών και απλών δεσμών.

Τα συστήματα αυτά εμφανίζουν ισχυρές ζώνες απορρόφησης στην περιοχή του ορατού και απορροφούν τόσο στην μπλε (424-491 nm) όσο και στην κόκκινη περιοχή του φάσματος (647-700 nm).

Εκτός των χλωροφυλλών, στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς υπάρχουν και άλλες χρωστικές όπως τα καροτενοειδή και οι φυκομπιλίνες. Τα καροτενοειδή, που διακρίνονται σε καροτένια και ξανθοφύλλες, βρίσκονται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, ενώ οι φυκομπιλίνες, που διακρίνονται σε φυκοερυθρίνες και φυκοκυανίνες, συναντώνται σε ορισμένα φύκη και κυανοβακτήρια.

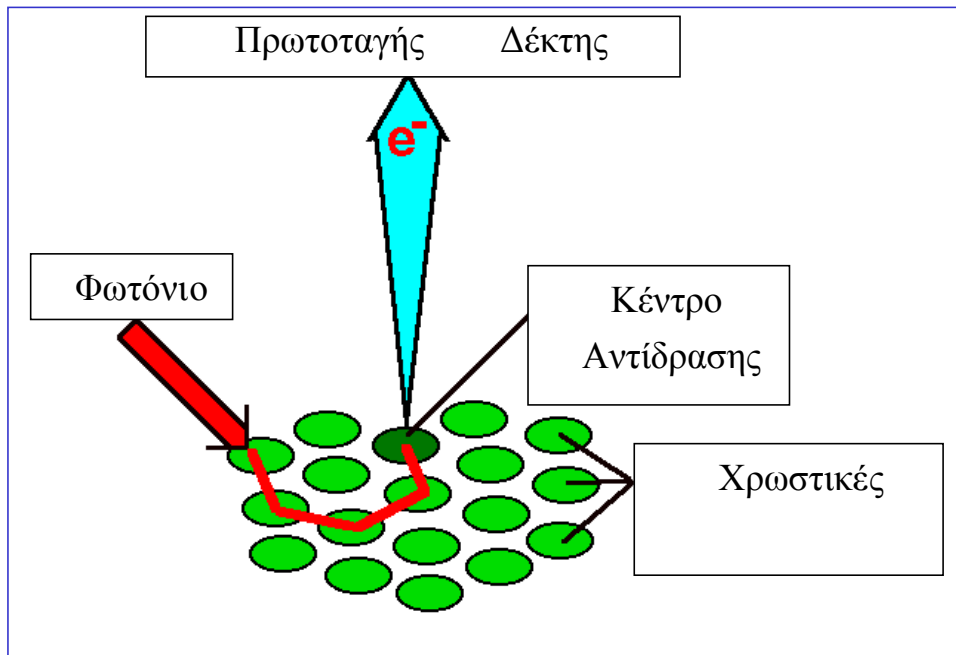


Σχήμα 7. Φάσμα απορρόφησης των κυριότερων χρωστικών των φωτοσυνθετικών οργανισμών.

Οι χρωστικές αυτές οργανώνονται μέσα σε πρωτεϊνικές λειτουργικές μονάδες, τα φωτοσυστήματα. Το φωτοσύστημα αποτελείται από το ενεργό κέντρο και την κεραία συλλογής φωτός. Το **σύμπλοκο συλλογής φωτός** (Light Harvesting Complex, LHC) αποτελείται από ένα σύστημα πρωτεϊνών που δεσμεύουν το μεγαλύτερο μέρος των χρωστικών και είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το ενεργό κέντρο [40]. Στο **ενεργό κέντρο** (Reaction Center, RC) του φωτοσυστήματος υπάρχουν μόρια που μετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων και ειδικά μόρια χλωροφύλλης, γνωστά ως «χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου» [41]. Όλες οι

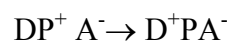
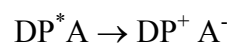
χλωροφύλλες έχουν την ικανότητα να απορροφούν το φως αλλά μόνο οι χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου συμμετέχουν στη μετατροπή της φωτοχημικής σε ηλεκτροχημική ενέργεια.

Οι χρωστικές της κεραίας απορροφούν και μεταφέρουν την ηλιακή ενέργεια στις χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου (Σχήμα 8). Η μεταφορά της ενέργειας διέγερσης γίνεται με το μηχανισμό του συντονισμού [41]



Σχήμα 8. Σχηματική απεικόνιση της φωτοσυνθετικής μονάδας.

Η απορρόφηση ενός φωτονίου από μια χρωστική, έχει ως συνέπεια την μετάβαση ενός ηλεκτρονίου σε μια διεγερμένη κατάσταση. Η διέγερση μπορεί να μεταδοθεί από τη μία χλωροφύλλη στην άλλη και να μεταφερθεί από τις περιφερειακές στις χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου (P). Όταν οι χλωροφύλλες αυτές διεγείρονται δημιουργείται ένα ισχυρό και ασταθές αναγωγικό (P^{*}) το οποίο ανάγει τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδέκτη (A). Το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται σε ένα δευτεροταγή ηλεκτρονιοδέκτη ενώ το (P^{*}) ανάγεται από ένα ηλεκτρονιοδέκτη (D) και έτσι σταθεροποιείται ο διαχωρισμός φορτίου:



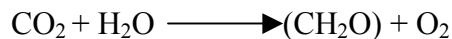
Με τον τρόπο αυτό η φωτεινή ενέργεια προκαλεί την έναρξη αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων και παγιδεύεται από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς.

2.3 Οι φωτεινές αντιδράσεις στη φωτοσύνθεση.

Η φωτοσύνθεση περιλαμβάνει τη δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα και την αναγωγή του σε υδατάνθρακες, που αξιοποιούνται στο μεταβολισμό των ετερότροφων οργανισμών. Η ολική αντίδραση της φωτοσύνθεσης μπορεί να γραφεί ως εξής:

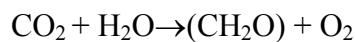
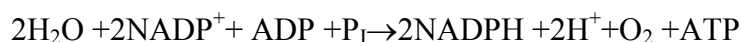


Το H_2A είναι ένα αναγωγικό που ποικίλει ανάλογα με το είδος του φωτοσυνθετικού οργανισμού και το CH_2O συμβολίζει τον υδατάνθρακα που προκύπτει. Τα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια χρησιμοποιούν ως αναγωγικό το H_2O και η ολική αντίδραση για τους οργανισμούς αυτούς είναι:



Το γεγονός ότι το αρχικό αναγωγικό δεν είναι κατάλληλο για να ανάγει άμεσα το CO_2 υπερνικάται με τη φωτοχημική παραγωγή ενός ισχυρότερου αναγωγικού του NADPH.

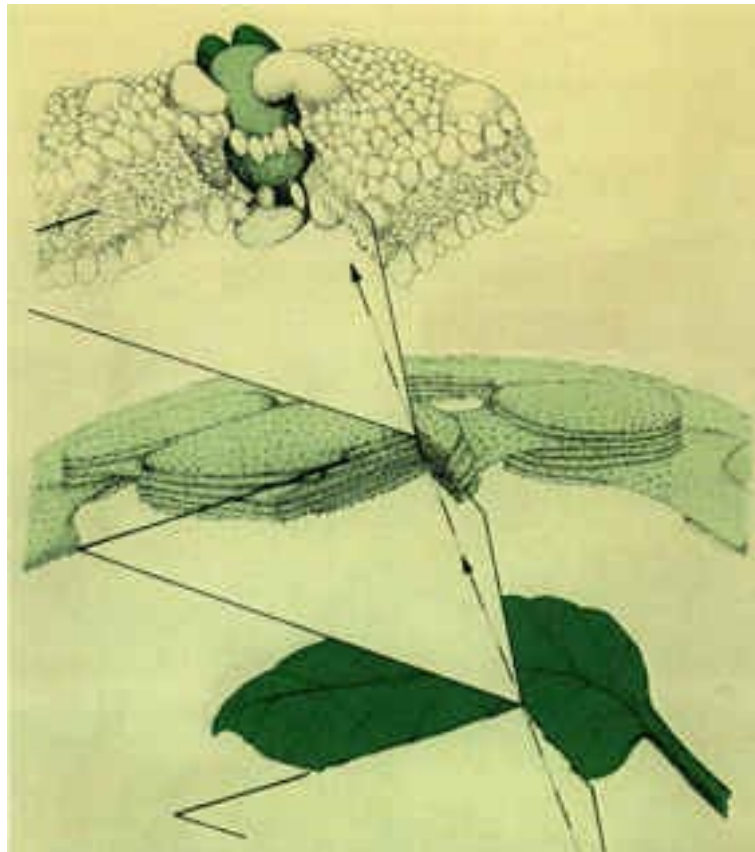
Η πορεία της φωτοσύνθεσης περιλαμβάνει δύο είδη αντιδράσεων, τις φωτεινές και τις σκοτεινές. Στις φωτεινές αντιδράσεις, με τη βοήθεια της ηλιακής ενέργειας, παράγεται το NADPH και μια ηλεκτροχημική διαβάθμιση που διατίθεται για την παραγωγή του ATP. Τα δύο αυτά μόρια αξιοποιούνται ως πηγές ενέργειας στο στάδιο των σκοτεινών αντιδράσεων:



2.4 Ηλεκτρονιακή ροή στα φυτά.

Η φωτοσύνθεση στα ανώτερα φυτά, λαμβάνει χώρα μέσα σε υποκυτταρικά σωματίδια, τους χλωροπλάστες των πράσινων φύλλων (Σχήμα 9). Ο χλωροπλάστης περιβάλλεται από μία διπλή μεμβράνη και ο χώρος ανάμεσα στις δύο μεμβράνες είναι γνωστός ως διαμεμβρανικός. Η υδατική περιοχή που περικλείεται από την εσωτερική

μεμβράνη είναι γνωστή ως στρώμα. Στο στρώμα υπάρχουν τα ένζυμα που καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Στη περιοχή του στρώματος υπάρχει ένα σύστημα εσωτερικών μεμβρανών, τα θυλακοειδή. Τα θυλακοειδή διαπλατώνονται και στοιβάζονται σε μορφώματα γνωστά ως grana. Τα grana ενώνονται μεταξύ τους με συνεχείς μεμβρανικές περιοχές που ονομάζονται θυλακοειδή του στρώματος (stroma lamellae). Ο χώρος στο εσωτερικό των θυλακοειδών ονομάζεται lumen.

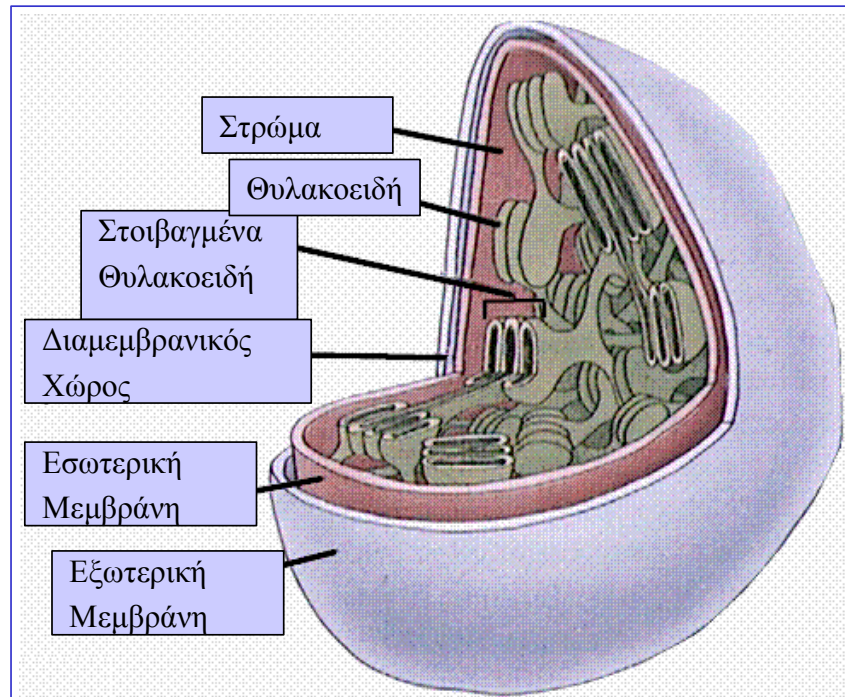


Σχήμα 9. Από το φύλλο στο χλωροπλάστη και τις θυλακοειδής μεμβράνες.

Στα θυλακοειδή των φυτών υπάρχουν δύο είδη φωτοσυστημάτων: Το **φωτοσύστημα I (PS I)** και το **φωτοσύστημα II (PS II)**. Το PS I είναι ένα πολυπρωτεϊνικό μεμβρανικό σύμπλοκο το οποίο εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στις αστοίβακτες περιοχές των θυλακοειδών. Στο ενεργό κέντρο του PS I το ειδικό μόριο Chl παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 700 nm και συμβολίζεται ως P700.

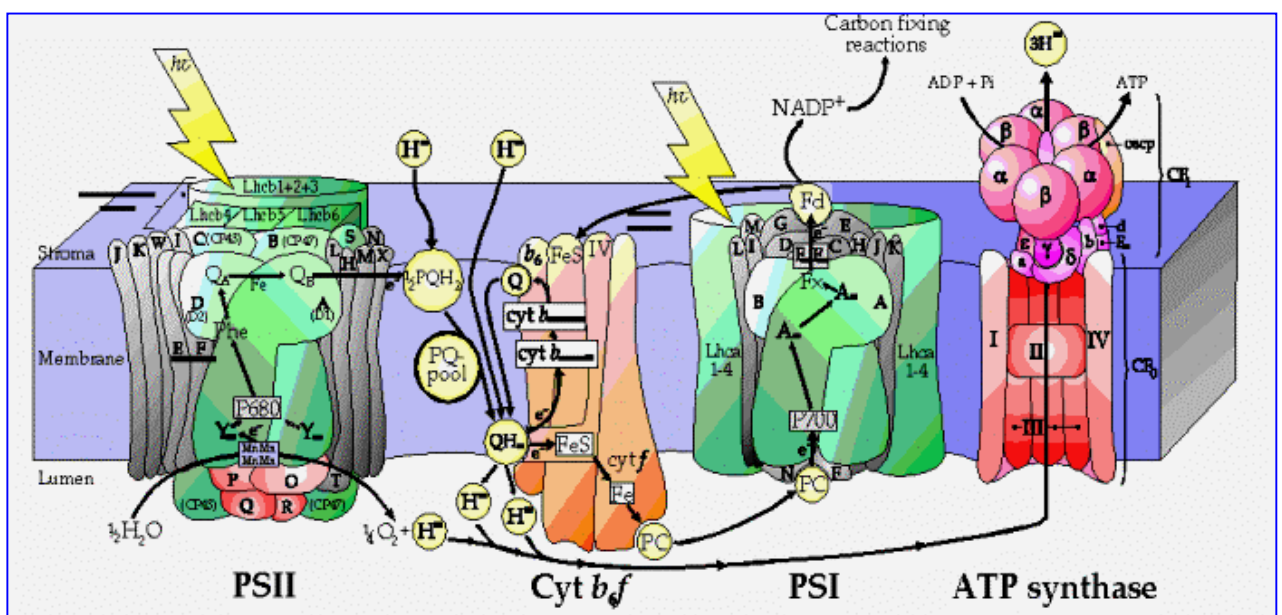
Το PS II είναι επίσης ένα πολυπρωτεϊνικό μεμβρανικό σύμπλοκο το οποίο εντοπίζεται στις περιοχές των grana. Στο ενεργό κέντρο το ειδικό μόριο χλωροφύλλης εμφανίζει το μέγιστο της απορρόφησης στα 680 nm και ονομάζεται

P680. Ακόμη στα θυλακοειδή υπάρχουν δύο μεμβρανικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα, το κυτόχρωμα bf και η συνθετάση του ATP. Το κυτόχρωμα bf είναι σχεδόν ομοιόμορφα κατανομημένο στα θυλακοειδή του στρώματος και τα grana, ενώ η συνθετάση του ATP εντοπίζεται κυρίως στα θυλακοειδή του στρώματος.



Σχήμα 10. Σχηματική απεικόνιση του χλωροπλάστη.

Τα ηλεκτρόνια από το PS II μεταφέρονται διαμέσου του κυτοχρώματος bf και με τη μεσολάβηση ευκίνητων μορίων (πλαστοκινόνη, πλαστοκυανίνη) στο PS I και καταλήγουν στο NADP^+ .

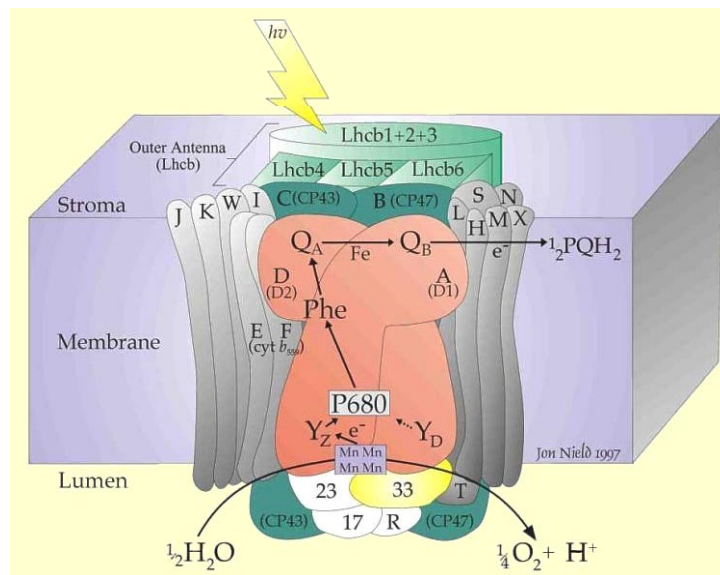


Σχήμα 11. Ηλεκτρονιακή ροή στα φυτά.

3. ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ II

3.1 Εισαγωγή στο Φωτοσύστημα II.

Το φωτοσύστημα II (PS II) είναι ένα μεμβρανικό πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο καταλύει μία από τις πιο σημαντικές και ενδιαφέρουσες βιοχημικές αντιδράσεις, την οξείδωση του H_2O σε μοριακό O_2 . Η σημασία της αντίδρασης αυτής είναι εμφανής αφού με τον τρόπο αυτό παράγεται όλο το οξυγόνο στο πλανήτη μας. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι η αντίδραση αυτή που απαιτεί τεράστια ενέργεια, λαμβάνει χώρα μέσω ενός μοναδικού μηχανισμού στο PS II (σχήμα 12).



Σχήμα 12. Σχηματική απεικόνιση του Φωτοσυστήματος II.

Το PS II το οποίο λειτουργεί ως φωτοεπαγόμενη οξειδοοδονκτάση αποτελείται από τρία μέρη [42]. Η ηλιακή ενέργεια απορροφάται από το **σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHC II)**, το οποίο αποτελεί την κεραία του φωτοσυστήματος και περιέχει και το μεγαλύτερο μέρος Chl a και Chl b. Η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται από την κεραία αυτή **στον πυρήνα του PS II** όπου λαμβάνουν χώρα οι φωτοχημικές αντιδράσεις [43]. Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν στη συσσώρευση οξειδωτικών ισοδυνάμων [44] στο **σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (Oxygen Evolving Complex)**, τα οποία διατίθενται για την οξείδωση δύο μορίων H_2O σε O_2 .

Στα φυτά, τα άλγη και τα κυανοβακτήρια η ενέργεια του φωτός που απορροφάται, μεταφέρεται από το LHC στο ενεργό κέντρο του PS II. Στο ενεργό κέντρο η ενέργεια παγιδεύεται από το ειδικό μόριο P680 το οποίο διεγείρεται και δίνει ένα ηλεκτρόνιο στον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδέκτη (Pheo), που είναι μια φαιοφυτίνη [45]. Αυτός ο διαχωρισμός φορτίου σταθεροποιείται με τη μεταφορά του ηλεκτρονίου από τη Pheo στο δευτεροταγή ηλεκτρονιοδέκτη (Q_A) και στη συνέχεια σε μία δεύτερη πλαστοκινόνη (Q_B). Η κινόνη Q_A μπορεί να δεχτεί μόνο ένα ηλεκτρόνιο ενώ η Q_B μπορεί να δεχτεί δύο ηλεκτρόνια και να αποσπαστεί από το PS II. Από την οξειδωτική πλευρά, το $P680^+$ αποτελεί ένα ισχυρότατο οξειδωτικό, το οποίο ανάγεται από μία οξειδοαναγωγικά ενεργή τυροσίνη, την Tyr Z [46, 47]. Η Tyr Z αποσπά ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο του μαγγανίου, στο οποίο συσσωρεύονται τα τέσσερα οξειδωτικά ισοδύναμα μέσα από τον κύκλο των S-καταστάσεων [48, 49] που καταλήγει στην απελευθέρωση O_2 .

3.2 Δομική μελέτη του φωτοσυστήματος II.

Το φωτοσύστημα II είναι μια από τις τελειότερες μηχανές της φύσης αφού καταλύει μία μη ενεργειακά ευνοούμενη αντίδραση μέσω ενός μοναδικού μηχανισμού. Οι λειτουργικές ιδιότητες του PS II αποδίδονται στην αιγιματική δομή του ενζύμου αυτού. Το πρωτεϊνικό περιβάλλον παρέχει το σκελετό πάνω στον οποίο τοποθετούνται οι προσθετικές ομάδες με τη βέλτιστη απόσταση και προσανατολισμό, ώστε να διασφαλίζεται ταχύτατη και αποτελεσματική απορρόφηση και παγίδευση της ηλιακής ενέργειας.

Η δομική μελέτη ενός μεμβρανικού πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου όπως το PS II επεκτείνεται σε διάφορα επίπεδα με στόχο την κατασκευή ενός δομικού και λειτουργικού μοντέλου. Στο επίπεδο της τοπολογίας και του τρόπου με τον οποίο οι διάφορες πρωτεΐνες συνδέονται μέσα στο σύμπλοκο, σημαντικές πληροφορίες έχουν προκύψει από βιοχημικές μελέτες. Η απομόνωση μεμβρανών PS II, οι οποίες έχουν την ικανότητα να εκλύουν οξυγόνο αποτέλεσε σταθμό για τη δομική και λειτουργική μελέτη του φωτοσυστήματος II. Η απομόνωση αυτή βασίζεται στην εκλεκτική διαλυτοποίηση των θυλακοειδών μεμβρανών από το απορρυπαντικό Triton X-100 [50, 51]. Οι μεμβράνες αυτές, είναι εμπλουτισμένες σε PS II και σχεδόν απαλλαγμένες από τα υπόλοιπα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία παρεμποδίζουν την

επιλεκτική μελέτη του PS II, και αποτελούν αρχικό υλικό για μια σειρά από βιοχημικές και φασματοσκοπικές μελέτες. Η βιοχημική βελτίωση της απομόνωσης των μεμβρανών του PS II οδήγησε στην απομόνωση υποσυμπλόκων με επιλεκτική αφαίρεση πρωτεϊνών και ο χαρακτηρισμός τους έδωσε πληροφορίες για το δομικό και λειτουργικό ρόλο των πρωτεϊνών του PS II [52, 53]. Οι βιοχημικές μελέτες επικεντρώθηκαν στην απομόνωση ενός υποσυμπλόκου του PS II, το οποίο είναι ικανό να σταθεροποιεί τον πρωτοταγή διαχωρισμό φορτίου στο ενεργό κέντρο και να εκλύει οξυγόνο. Το μικρότερο υποσύμπλοκο το οποίο φέρει τα παραπάνω χαρακτηριστικά, περιέχει τις πρωτεΐνες CP 47, CP 43, D2, D1, το κυτόχρωμα b559, την εξωτερική πρωτεΐνη 33 kDa και άλλες τρεις μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες [42]. Με τις μελέτες αυτές αποκαλύφθηκε ότι από τις 20-25 πρωτεΐνες του PS II μόνο ένας μικρός αριθμός πρωτεϊνών συνιστούν το λειτουργικό πυρήνα του PS II και σχεδιάστηκε το πρώτο σχηματικό μοντέλο του φωτοσυστήματος II.

3.3 Οι πρωτεΐνες του Φωτοσυστήματος II.

3.3.1 Το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου (Reaction Center).

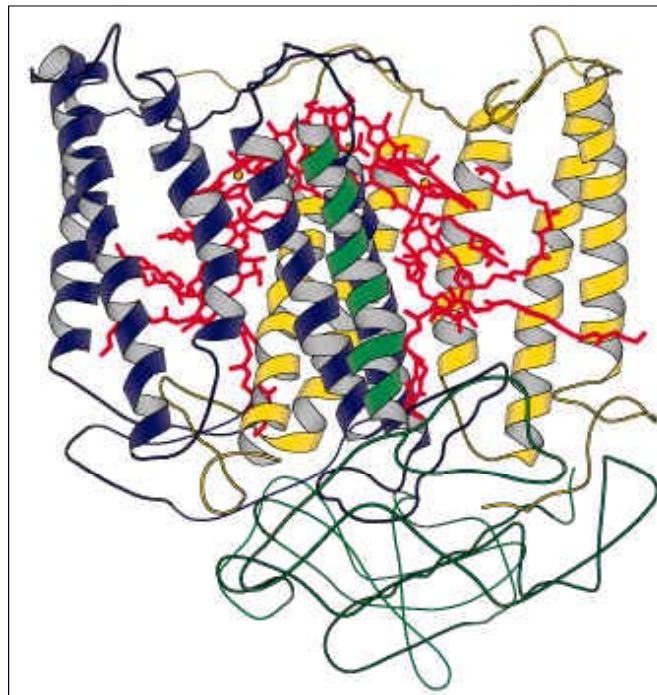
Σημαντικές πληροφορίες για το ενεργό κέντρο του PS II προέκυψαν από τη δομή του ενεργού κέντρου των μωβ μη θειούχων βακτηρίων (*R. Viridis*) προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X [54]. Η σύγκριση των ενεργών κέντρων αποκάλυψε σημαντικές ομοιότητες, όχι μόνο στην τοπολογία, αλλά και σε μοριακό επίπεδο [55-57].

Το ενεργό κέντρο των βακτηρίων αποτελείται από δύο υπομονάδες, την L (Light) και M (Medium), οι οποίες έχουν πέντε διαμεμβρανικές έλικες οι οποίες αναδιπλώνονται και σχηματίζουν ετεροδιμερές με ψευδοσυμμετρία δευτέρας τάξεως (σχήμα 13). Οι υπομονάδες L και M εμφανίζουν σημαντική ομολογία με τις πρωτεΐνες D1 και D2 αντίστοιχα του PS II, σε αμινοξέα τα οποία συμμετέχουν στη δέσμευση προσθετικών ομάδων, που είναι απαραίτητες για να λάβει χώρα η φωτοχημεία στο ενεργό κέντρο.

Η αντιστοιχία που υπάρχει στις ιστιδίνες L-173 και M-200, οι οποίες συναρμόζονται με το ειδικό ζεύγος Chl a (special pair) με τις ιστιδίνες D1-198, D2-

198, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα δύο αυτά αμινοξέα συνδέονται με το P 680 στο PS II.

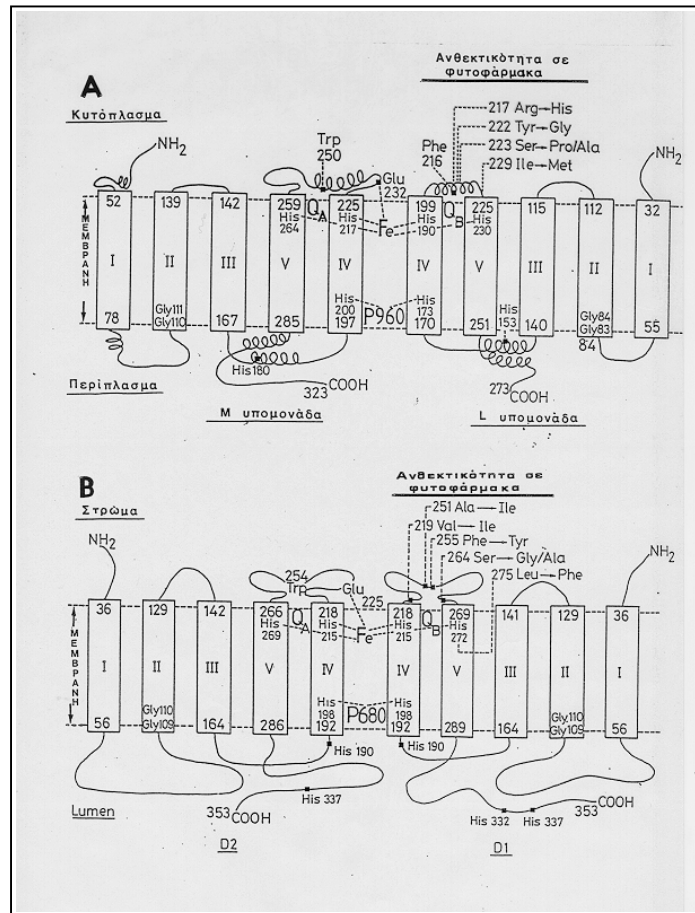
Επίσης διατηρούνται οι ιστιδίνες που συναρμόζονται με τον μη αιμικό σίδηρο (L-190, L-230, M217, M264, D1-215, D1-272, D2-215, D2-269). Επιπλέον η τρυπτοφάνη D2-254 αντιστοιχεί στην τρυπτοφάνη M-250, όπως επίσης και η αλανίνη D2-261 στην αλανίνη M-258. Αυτές οι ομοιότητες ορίζουν την θέση δέσμησης της Q_A στη πρωτεΐνη D2 του PS II. Αντιστοιχία υπάρχει και στα αμινοξέα που εμπλέκονται στη δέσμηση της Q_B , φαινυλαλανίνη και σερίνη, στις θέσεις 255 και 264 πάνω στην D1 του PS II (σχήμα 14). Η θέση της Q_B εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού αποτελεί και στόχο πολλών ζιζανιοκτόνων [58].



Σχήμα 13. Δομή του βακτηριακού ενεργού κέντρου.

Όλες οι παραπάνω ομοιότητες σε συνδυασμό με τα διαγράμματα υδροπαθητικότητας, τα οποία προβλέπουν πέντε έλικες για τις D1 και D2 οδήγησαν στην πρόταση ότι, οι δύο αυτές πρωτεΐνες αποτελούν το ενεργό κέντρο του PS II [59]. Η πειραματική επιβεβαίωση έγινε με την απομόνωση των D1 και D2 σε σύμπλοκο με το Cyt b559, στο οποίο λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός φορτίου χωρίς όμως να σταθεροποιείται, λόγω έλλειψης της Q_A και Q_B [60].

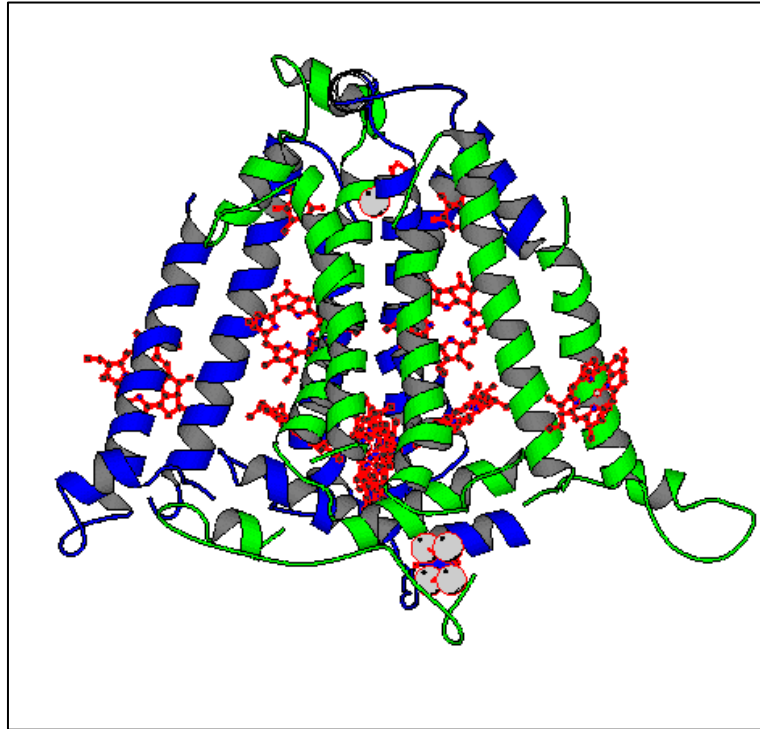
Ο συνδυασμός των πληροφοριών που προέκυψαν από τις ομοιότητες με τα φωτοσυνθετικά βακτήρια και τις βιοχημικές μελέτες στο PS II οδήγησε στη κατασκευή ενός τρισδιάστατου μοντέλου για το ενεργό κέντρο του.



Σχήμα 14. Τοπολογικό διάγραμμα των L και M υπομονάδων του RC από *Rps. Viridis* (A) και των D1 και D2 πρωτεϊνών του RC από το PS II (B).

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το ενεργό κέντρο του PS II περιέχει όχι μόνο τους απαραίτητους συμπράγοντες για την πρωτοταγή φωτοχημεία, αλλά και το σύμπλοκο του μαγγανίου, το οποίο είναι απαραίτητο για την έκλυση οξυγόνου. Όπως φαίνεται στο σχήμα 15, η πρωτεΐνη D1 παρέχει τις θέσεις δέσμησης των τεσσάρων ιόντων μαγγανίου.

Μέχρι σήμερα το μοντέλο αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά, αφού το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου (D1-D2-Cyt b559) το οποίο έχει απομονωθεί, δεν έχει την ικανότητα να εκλύει οξυγόνο.

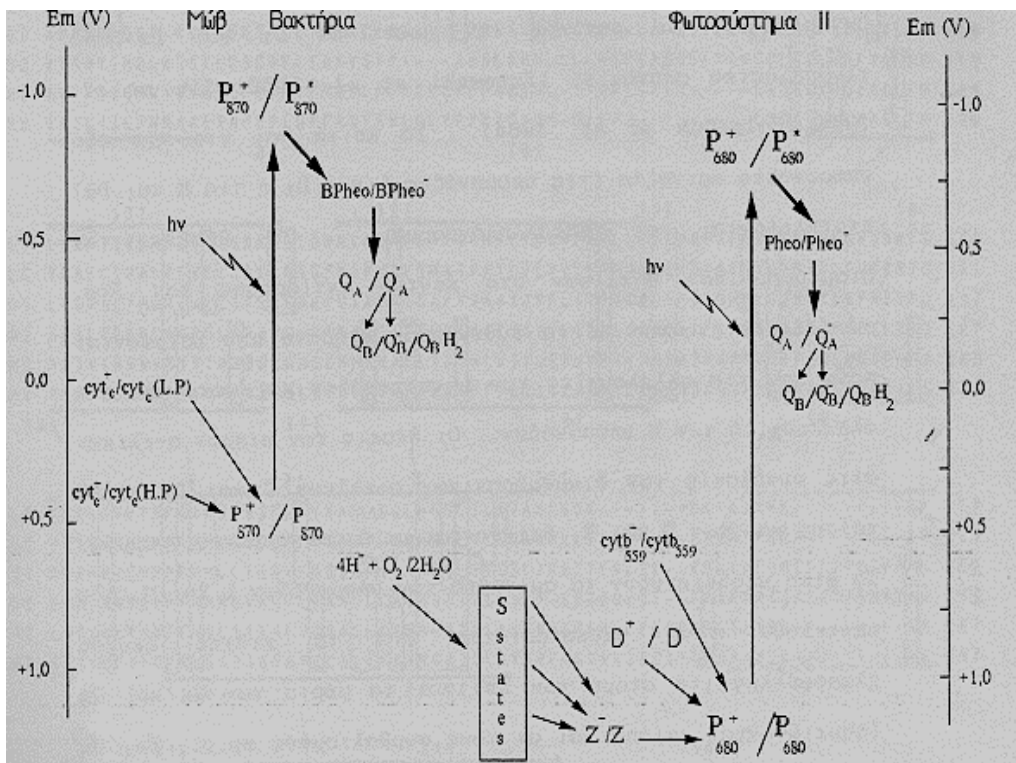


Σχήμα 15. Τρισδιάστατο μοντέλο του ενεργού κέντρου του PS II το οποίο βασίζεται στις ομοιότητες με το ενεργό κέντρο των βακτηρίων και σε βιοχημικές μελέτες στο PS II.

Οι ομοιότητες μεταξύ των δύο συστημάτων περιορίζονται στην αναγωγική πλευρά, αφού τα βακτήρια δεν εκλύουν οξυγόνο και κατά συνέπεια απουσιάζει το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου το οποίο αποτελεί μοναδική δομική και λειτουργική περιοχή του φωτοσυστήματος II. Επιπλέον το P680 στο PS II αποτελεί το πιο ισχυρό οξειδωτικό στη φύση με δυναμικό 0.6-0.8 eV, θετικότερο από αυτό του ειδικού ζεύγους στα βακτήρια (σχήμα 16).

Ακόμη προτείνεται ότι υπάρχουν διαφορές στην οργάνωση των βοηθητικών χλωροφυλλών στο ενεργό κέντρο του PS II και των φωτοσυνθετικών βακτηρίων. Στο ενεργό κέντρο του PS II υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός χλωροφυλλών από ότι στα βακτήρια, τα οποία έχουν τέσσερις βοηθητικές χλωροφύλλες στο ενεργό κέντρο τους [61-63].

Άγνωστος όμως παραμένει ο τρόπος αλληλεπίδρασης των D1 και D2, που αποτελούν την καρδιά του συμπλόκου, με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του PS II. Πιστεύεται ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες εκτός από λειτουργικό έχουν και δομικό ρόλο, παρέχοντας θέσεις για τη δέσμευση των εξωτερικών πρωτεϊνών και των ανόργανων συμπαραγόντων [64, 65].



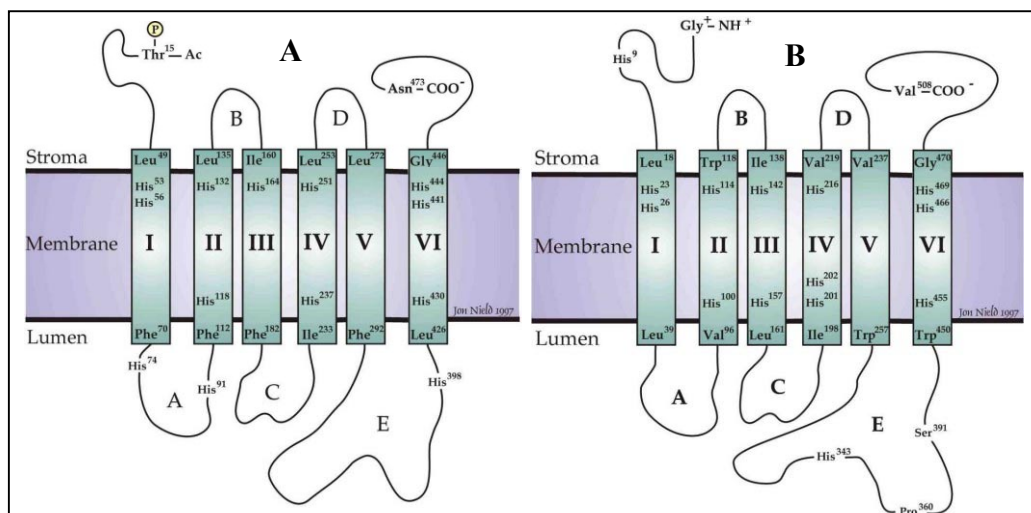
Σχήμα 16. Σύγκριση της ηλεκτρονιακής ροής στα ενεργά κέντρα των μωβ βακτηρίων και του φωτοσυστήματος II.

3.3.2 Οι πρωτεΐνες CP 47 και CP 43.

Οι δύο αυτές πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 47 και 43 kDa αποτελούν την εσωτερική κεραία του PS II, αφού δεσμεύουν το μεγαλύτερο αριθμό χλωροφύλλης α (Chlorophyll Protein) και μεσολαβούν στη μεταφορά ενέργειας από το LHC στο ενεργό κέντρο του PS II [66]. Δομικά εμφανίζουν ομοιότητες και πιστεύεται ότι αποτελούνται από έξι διαμεμβρανικές έλικες η κάθε μία και έχουν μία μεγάλη υδρόφιλη περιοχή (loop) από τη πλευρά του Lumen [67, 68].

Ένα άλλο κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η κατανομή των διατηρημένων ιστιδινών κατά μήκος των διαμεμβρανικών περιοχών. Οι 12 ιστιδίνες της CP47

καθώς και οι 8 ιστιδίνες της CP 43 εντοπίζονται κοντά στην επιφάνεια της μεμβράνης τόσο από τη πλευρά του Lumen όσο και από την πλευρά του στρώματος [69]. Η κατανομή αυτή ομοιάζει με την τοποθέτηση των ιστιδινών που είναι ligands των χλωροφυλλών στις πρωτεΐνες του LHC. Ο αριθμός των χλωροφυλλών που υπάρχουν στη CP 47, δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια και υπολογίζεται μεταξύ 20-25 είτε 10-12 [70-73]. Εκτός από τις ιστιδίνες, έχουν προταθεί και άλλα αμινοξέα ως πιθανά ligands των χλωροφυλλών όπως ασπαρτικά, γλουταμικά και μόρια νερού, αυξάνοντας τον προτεινόμενο αριθμό των χλωροφυλλών [74].



Σχήμα 17. Διαγράμματα τοπολογίας των πρωτεϊνών CP 43 (A) και της CP 47 (B).

Ο κύριος ρόλος των πρωτεϊνών αυτών είναι η συλλογή και μεταφορά της ενέργειας στις χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου. Πιστεύεται ότι οι CP 47 και CP 43 αλληλεπιδρούν απευθείας με τις πρωτεΐνες του ενεργού κέντρου και με το LHC, μέσω μικρότερων CP πρωτεϊνών (CP29, CP24, CP26) [75]. Από βιοχημικές μελέτες προκύπτει ότι η CP 43 μπορεί να απομακρυνθεί από το πυρήνα του PS II ευκολότερα από την CP 47, με διάφορα απορρυπαντικά ή χαστροπικά μέσα [76, 77]. Το σύμπλοκο CP 47-D1-D2-Cyt b559 είναι φωτοχημικά ενεργό και η απουσία της CP43 δεν επηρεάζει της ιδιότητες του συστήματος [78].

Μια σειρά από μελέτες επιβεβαιώνουν την στενή σύνδεση της CP 47 με το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα αναγνωρίζει τον επίτοπο του στη CP 47, μόνο απουσία της 33 kDa πρωτεΐνης και του συμπλόκου του μαγγανίου [79]. Ο επίτοπος του αντισώματος εντοπίζεται ανάμεσα στα αμινοξέα

360Pro-391Ser, του υδρόφιλου loop της CP 47 [80]. Ακόμη η 33 kDa πρωτεΐνη προστατεύει τις λυσίνες (389Lys-419Lys) στο loop της CP 47 από επισήμανση με το αντιδραστήριο NHS-biotin [81, 82]. Πρωτεολυτικά πειράματα με τρυψίνη έδειξαν ότι η 33 kDa πρωτεΐνη αλληλεπιδρά και προστατεύει την CP 47 από πρωτεόλυση [83]. Η σύνδεση των δύο αυτών πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με την χρήση του EDC [84], ενός cross-linker το οποίο συνδέει ομοιοπολικά αμινοξέα τα οποία βρίσκονται σε Van der waals επαφή [85]. Από τις μελέτες αυτές προκύπτει ότι το loop της CP47 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου, τονίζοντας τη σημασία της πρωτεΐνης αυτής στη δομική και λειτουργική οργάνωση του PS II [86].

3.3.3 Οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17, 23, 33 kDa του PS II.

Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες μαζί με το σύμπλοκο του μαγγανίου και τα ιόντα Cl και Ca συνιστούν μια διακριτή λειτουργική μονάδα του PS II, το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (O.E.C). Πληροφορίες για τη λειτουργία των υδρόφιλων πρωτεϊνών προέκυψαν από βιοχημικές μελέτες οι οποίες στηρίχτηκαν στην απομάκρυνση και επαναδέσμευση αυτών στον μεμβρανικό πυρήνα του PS II.

Από τις τρεις αυτές πρωτεΐνες, η 33 kDa έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου [87]. Η απομάκρυνση της 33 kDa οδηγεί σε ελάττωση της ταχύτητας έκλυσης οξυγόνου, που αποδίδεται σε αποσταθεροποίηση του συμπλόκου του μαγγανίου [88]. Το σύμπλοκο αυτό σταθεροποιείται μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων χλωρίου, αλλά το σύστημα δεν ανακτά την φυσιολογική του δραστηριότητα [89]. Ακόμη, όταν η 33 kDa απομακρύνεται από τον πυρήνα του PS II απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} , ώστε το σύστημα να ανακτήσει τη βέλτιστη ενεργότητα. Με τα πειράματα αυτά αποκαλύφθηκε η άμεση σχέση της πρωτεΐνης με το ασβέστιο και πιστεύεται ότι η 33 kDa μπορεί να δεσμεύει απευθείας ή να συγκεντρώνει το Ca^{2+} .

Η απομάκρυνση της 23 kDa από το πυρήνα του PS II, αυξάνει την απαίτηση του συστήματος σε ασβέστιο [90], ενώ η 17 kDa σχετίζεται περισσότερο με τα ιόντα χλωρίου που απαιτούνται για να λάβει χώρα η αντίδραση [91]. Ο ακριβής συσχετισμός των πρωτεϊνών με τα ανόργανα ιόντα, δεν έχει αποσαφηνισθεί και πιστεύεται ότι η παρουσία των 17 και 23 kDa οδηγεί σε μια διαμόρφωση με υψηλή

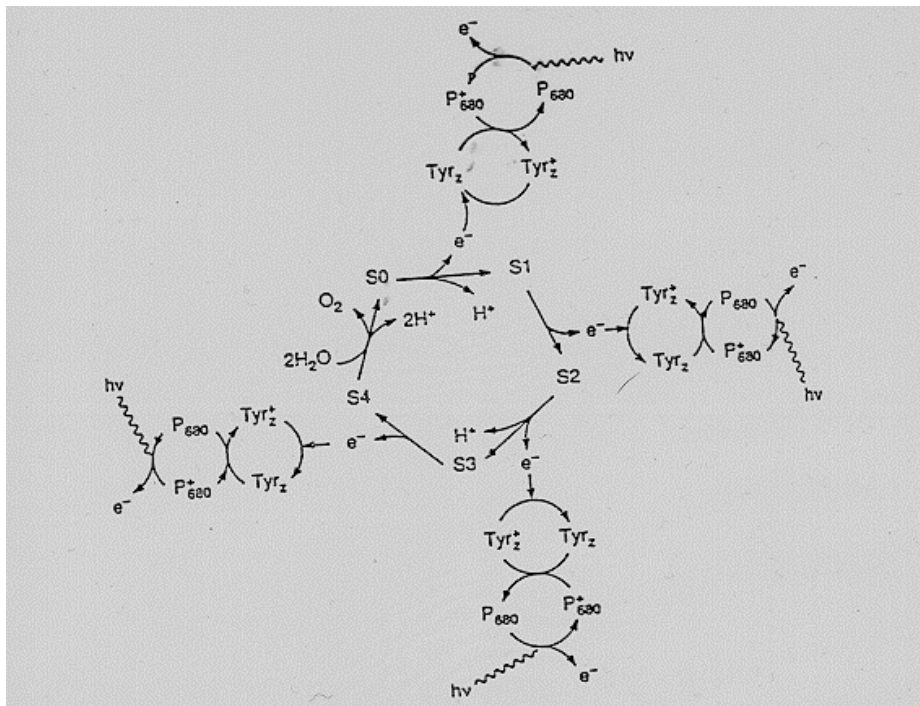
συγγένεια για τα ιόντα αυτά. Επιπλέον η 23 kDa προστατεύει το σύμπλοκο του μαγγανίου από ογκώδη αναγωγικά τα οποία προκαλούν τη καταστροφή του [92].

Οι τρεις υδρόφιλες πρωτεΐνες του PS II συνδέονται με τον μεμβρανικό πυρήνα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, χωρίς όμως να είναι γνωστές οι ακριβείς θέσεις επαφής. Η 33 kDa έρχεται σε άμεση επαφή με την CP 47 και η παρουσία της είναι απαραίτητη για την δέσμευση της 23 kDa που με τη σειρά της απαιτείται για την δέσμευση της 17 kDa στο πυρήνα [93, 94]. Δεν είναι γνωστό εάν οι πρωτεΐνες έρχονται σε απευθείας επαφή ή εάν η δέσμευση της πρώτης προκαλεί την κατάλληλη διαμόρφωση για τη δέσμευση της δεύτερης.

3.4 Το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου.

Η οξείδωση του νερού λαμβάνει χώρα στο σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου στο οποίο εμπλέκεται ένας αριθμός ανόργανων συμπαραγόντων [95] καθώς επίσης και οξειδοαναγωγικά ενεργά αμινοξέα.

Το σύμπλοκο του μαγγανίου παρέχει τη θέση δέσμευσης και οξείδωσης του νερού. Στο σύμπλοκο του μαγγανίου λαμβάνει χώρα η συσσώρευση τεσσάρων οξειδωτικών ισοδυνάμων, τα οποία διατίθενται για την οξείδωση του νερού [96-98].



Σχήμα 18. Κύκλος των S-καταστάσεων.

Κάθε διαχωρισμός φορτίου στο PS II οδηγεί στην οξειδωση του OEC από τον οξειδωμένο πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη P_{680}^+ μέσω της Tyr Z και το σύμπλοκο ανακυκλώνεται, σύμφωνα με το μοντέλο του Kok [99], περνώντας διαδοχικά από πέντε διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις, τις S_0, S_1, S_2, S_3, S_4 (σχήμα 4).

3.5 Φωτοαναστολή

Έκθεση των φωτοσυνθετικών μεμβρανών σε συνθήκες έντονης ακτινοβολίας, περισσότερης από εκείνης που μπορεί να μετατραπεί σε χημική ενέργεια, οδηγεί σε απώλεια της φωτοσυνθετικής ικανότητας. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φωτοαναστολή και αποδίδεται στην καταστροφή του PS II, με συνέπεια τη διακοπή της ηλεκτρονιακής μεταφοράς και την απώλεια της ικανότητας έκλυσης οξυγόνου [100]. Η απώλεια της ενεργότητας του PS II κατά τη φωτοαναστολή προκαλείται από την αποικοδόμηση της D1 πρωτεΐνης του ενεργού κέντρου [101, 102].

Υπάρχουν δύο μοντέλα σχετικά με το μοριακό μηχανισμό που οδηγεί στην αναστολή της ηλεκτρονιακής ροής και τελικά στην απώλεια της ενεργότητας. Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο, η αναστολή ξεκινά από την αναγωγική πλευρά του PS II αναστέλλοντας την ροή ηλεκτρονίων, ενώ παράλληλα λαμβάνει χώρα κανονικά ο διαχωρισμός φορτίου [103]. Συγκεκριμένα έντονες συνθήκες φωτισμού προκαλούν διπλή αναγωγή της Q_A με αποτέλεσμα τον ανασυνδυασμό φορτίου μεταξύ της Pheo και του P_{680} που οδηγεί στην τριπλή κατάσταση του P_{680} [104-106]. Το P_{680} στην κατάσταση αυτή αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο, παράγοντας οξυγόνο απλής κατάστασης, το οποίο μπορεί να οξειδώσει χρωστικές και να προκαλέσει την καταστροφή των πρωτεϊνών [107-110].

Το δεύτερο μοντέλο της φωτοαναστολής προτείνει ότι η απενεργοποίηση ξεκινά από την οξειδωτική πλευρά του PS II. Η καταστροφή της οξειδωτικής πλευράς προκαλεί την σταθεροποίηση ισχυρά οξειδωτικών ριζών όπως το P_{680}^+ και η Tyr Z. Οι ρίζες αυτές μπορούν στη συνέχεια να οξειδώσουν χρωστικές και αμινοξέα, προκαλώντας αναστολή της ηλεκτρονιακής ροής [111, 112].

Η D1 πρωτεΐνη αποτελεί το στόχο της φωτοαναστολής και είναι η πρωτεΐνη εκείνη που καταστρέφεται και ανακυκλίζεται πιο γρήγορα από όλες τις άλλες του PS II [113, 114]. Η αποικοδόμηση της D1 πρωτεΐνης μπορεί να προκαλείται απευθείας από ενεργές μορφές οξυγόνου είτε από πρωτεάσες [115-117].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η δομική μελέτη του **Φωτοσυστήματος II** των ανωτέρων φυτών και της **λυάσης του υδροϋπροξειδίου των λιπαρών οξέων**. Τα δύο αυτά ένζυμα είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, ευρύτατα διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, οι οποίες συμμετέχουν σε πολύ σημαντικές λειτουργίες των φυτών.

Δομική μελέτη του PS II

Το **Φωτοσύστημα II** παραμένει μέχρι σήμερα από τα πιο αινιγματικά σημεία του φαινομένου της φωτοσύνθεσης. Παρά την αξιόλογη πρόοδο στις γνώσεις μας γύρω από τη δομή και τη λειτουργία του PS II, τα μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά αυτού του συμπλόκου παραμένουν άγνωστα. Ο προσδιορισμός της δομής του φωτοσυστήματος II είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση του φαινομένου της φωτοσύνθεσης. Επιπλέον η αποκάλυψη των μοναδικών λειτουργικών χαρακτηριστικών του PS II θα συμβάλει στην ανάπτυξη βιοτεχνολογικών εφαρμογών για την εκμετάλευση της ηλιακής ενέργειας και τη βελτίωση της αγροτικής παραγωγής.

Με την παρούσα εργασία επιχειρείται η δομική μελέτη του PS II σε **μοριακό επίπεδο** και στο **επίπεδο της οργάνωσης των πρωτεϊνών στο σύμπλοκο**.

Η μελέτη του PS II σε μοριακό επίπεδο στηρίζεται στην απομόνωση και κρυστάλλωση επιλεγμένων πρωτεϊνών και υποσυμπλόκων του. Οι εντατικές προσπάθειες σε παγκόσμιο επίπεδο για τον προσδιορισμό της ατομικής δομής στηρίζονται στην ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων για δομική ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Οι προσπάθειες αυτές έχουν παρεμποδιστεί από την από την έλλειψη κρυστάλλων που θα επέτρεπαν την δομική μελέτη του PS II. Το πρόβλημα στην κρυστάλλωση του PS II είναι οι ιδιομορφίες του, οι οποίες καθιστούν την κρυστάλλωση του ιδιαίτερα δύσκολη. Η απομόνωση και κρυστάλλωση των υποσυμπλόκων του PS II, αποτελεί αντικείμενο μελέτης του εργαστηρίου μας τα τελευταία δέκα χρόνια [118, 119]. Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στην αποκάλυψη σημαντικών χαρακτηριστικών του PS II, τα οποία επηρεάζουν την ποιότητα των κρυστάλλων. Ο πυρήνας του PS II συνίσταται από μεμβρανικές πρωτεΐνες, που συνδέονται μεταξύ τους με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και υδρόφιλες πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύονται στον πυρήνα με πολικούς δεσμούς. Κατά την απομόνωση

μικρότερων και σταθερότερων συμπλόκων, οι εξωτερικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την κρυστάλλωση, αποδεσμεύονται από το σύμπλοκο. Επιπλέον κατά την κρυστάλλωση συμπλοκών με τις εξωτερικές πρωτεΐνες, η αύξηση της ιονικής ισχύος και του απορρυπαντικού προκαλεί την αποδέσμευση των υδρόφιλων πρωτεϊνών. Αυτές οι βιοχημικές ιδιαιτερότητες του PS II, δημιουργούν σημαντικές δυσκολίες στην απομόνωση και κρυστάλλωση ομοιογενών υποσυμπλόκων του PS II. Λόγω των παραπάνω προβλημάτων, καθίσταται αδύνατη η κρυστάλλωση ολόκληρου του πυρήνα του PS II. Για το λόγο αυτό στην παρούσα εργασία επιλέγεται η απομόνωση πρωτεϊνών και σταθερών υποσυμπλόκων του PS II που δεν παρουσιάζουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα επιχειρείται η κρυστάλλωση μίας απομονωμένης πρωτεΐνης (CP 47) και του συμπλόκου του ενεργού κέντρου (D1-D2-Cyt b559) του PS II. Η CP 47 είναι μεμβρανική πρωτεΐνη και συνδέεται πολύ στενά με το ενεργό κέντρο του PS II, αλλά έχει μία μεγάλη υδρόφιλη περιοχή που θα μπορούσε να συμμετάσχει στη σταθεροποίηση του κρυσταλλικού πλέγματος. Το ενεργό κέντρο του PS II είναι το μικρότερο υποσύμπλοκο που έχει απομονωθεί και οι πρωτεΐνες του συνδέονται με ισχυρές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν την CP 47 και το σύμπλοκο D1-D2-Cyt b559 κατάλληλα για την ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων.

Η ανάλυση της οργάνωσης των πρωτεϊνών του PS II, στο επίπεδο της τεταρτοταγούς δομής, στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται, με μελέτη του συμπλόκου του ενεργού κέντρου με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι μία τεχνική που παρέχει πληροφορίες για την δομή των μακρομορίων σε μέτρια διακριτική ικανότητα (15-25 Å). Οι μελέτη των πρωτεϊνών με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρουσιάζει δυσκολίες που αποδίδονται στον υψηλό θόρυβο και την καταστροφή του βιολογικού υλικού. Στην παρούσα εργασία το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου ακινητοποιείται σε φιλμ άνθρακα και πραγματοποιείται αρνητική χρώση με άλατα που περιέχουν βαριά μέταλλα. Αυτή η τεχνική βελτιώνει την ποιότητα των εικόνων από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και επιτρέπει την στατιστική ανάλυση των σωματιδίων για την αύξηση της διακριτικής ικανότητας της μεθόδου.

Δομική μελέτη της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων

Η λυάση ανήκει σε μία νέα ομάδα ενζύμων (CYP 74) τα οποία κατατάσσονται στη οικογένεια των κυτοχρωμάτων P450. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν πρωτοφανή λειτουργικά χαρακτηριστικά, τα οποία αποδίδονται σε δομικές ιδιαιτερότητες του μεταλλικού κέντρου. Η δομική ανάλυση μεταλλοενζύμων, όπως η λυάση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων διακρίνεται στο δομικό χαρακτηρισμό της αποπρωτεΐνης και του μεταλλικού κέντρου. Στη παρούσα εργασία η δομική ανάλυση της λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων εστιάζεται στην μελέτη του περιβάλλοντος του μεταλλικού κέντρου του ενζύμου.

Η παρούσα μελέτη στηρίχθηκε στη δέσμευση εξωγενών υποκαταστατών (ligands) στο σίδηρο της αίμης και το χαρακτηρισμό των συμπλόκων με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και ηλεκτρονιακού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR). Ο συνδιασμός των φασματοσκοπικών τεχνικών οδήγησε σε πληροφορίες σχετικά με την ηλεκτρονική δομή, τη γεωμετρία συναρμογής και τη φύση του proximal ligand του αιμικού σιδήρου.

4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΤΗΣ CP 47

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Η απομόνωση των μεμβρανών του PS II αποτέλεσε την αφετηρία για μια σειρά από βιοχημικές και φασματοσκοπικές μελέτες, οι οποίες οδήγησαν σε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία και την τοπολογία των πρωτεϊνών [50]. Αρχικά η δομική μελέτη επικεντρώθηκε στην απομόνωση υποσυμπλόκων, τα οποία έχουν την ικανότητα να εκλύουν οξυγόνο [52, 53]. Οι μελέτες αυτές περιόρισαν σημαντικά τον αριθμό των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την λειτουργία του συστήματος εστιάζοντας την μελέτη σε υποσύμπλοκα με μικρό αριθμό πρωτεϊνών [42]. Βιοχημικές μελέτες, με επιλεκτική απομάκρυνση και επαναδέσμευση πρωτεϊνών πάνω στο πυρήνα, οδήγησαν σε προτεινόμενα δομικά μοντέλα του PS II. Τα μοντέλα αυτά παρουσιάζουν το συσχετισμό των υπομονάδων του PS II, αλλά δε παρέχουν πληροφορίες για τον ακριβή τρόπο σύνδεσης των πρωτεϊνών και την διάταξη τους στο χώρο.

Η αποκάλυψη της δομής των φωτοσυνθετικών βακτηρίων με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X αποτέλεσε σταθμό στη δομική μελέτη του PS II [1-3]. Ο συσχετισμός των κέντρων αποκάλυψε πολλές πληροφορίες σχετικά με την αναγωγική πλευρά του PS II. Η μοναδική ικανότητα του συστήματος να οξειδώνει το νερό, αποδίδεται στην οξειδωτική πλευρά του PS II, της οποίας η δομή παραμένει άγνωστη. Από φασματοσκοπικές μελέτες είναι γνωστό ότι το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου αποτελείται από το σύμπλοκο του μαγγανίου, τα ιόντα Cl και Ca, και από τις εξωτερικές πρωτεΐνες και αμινοξέα, τα οποία οργανώνονται σε μια λειτουργική μονάδα που καταλύει την διάσπαση του νερού. Οι δομικές λεπτομέρειες του συμπλόκου καθώς και η οργάνωση των χλωροφυλλών του ενεργού κέντρου παραμένουν άγνωστα.

Η κρυστάλλωση, για πρώτη φορά, μεμβρανικών πρωτεϊνών αποτέλεσε το έναυσμα για μια προσπάθεια σε παγκόσμιο επίπεδο, με στόχο την κρυστάλλωση του PS II από ανώτερα φυτά, και την αποκάλυψη της δομής σε μοριακό επίπεδο. Παρά το μεγάλο αριθμό των εργαστηρίων που ασχολούνται με την κρυστάλλωση του PS II

από ανώτερα φυτά, μόνο δύο είναι οι δημοσιευμένες εργασίες που αφορούν την ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων [120, 121].

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε για πρώτη φορά η κρυστάλλωση μίας απομονωμένης πρωτεΐνης (CP 47) και του συμπλόκου του ενεργού κέντρου (D1-D2-Cyt b559) του PS II. Η CP 47 είναι μεμβρανική πρωτεΐνη και συνδέεται πολύ στενά με το ενεργό κέντρο του PS II, χωρίς να συμμετεχει άμεσα στην ηλεκτρονιακή ροή. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ιδιαίτερα σταθερή σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες του PS II που υφίστανται διάσπαση σε συνθήκες ήπιου φωτισμού. Επιπλέον η CP 47 διαθέτει μία μεγάλη υδρόφιλη περιοχή που είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη πολικών αλληλεπιδράσεων στους τρισδιάστατους κρυστάλλους. Το ενεργό κέντρο του PS II είναι το μικρότερο υποσύμπλοκο που έχει απομονωθεί και οι πρωτεΐνες του συνδέονται με ισχυρές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν την CP 47 και το σύμπλοκο D1-D2-Cyt b559 κατάλληλα για την ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων.

Τα στάδια τα οποία ακολουθήθηκαν για την επίτευξη του στόχου μας είναι:

Απομόνωση και χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών του PS II.

Για την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών αναπτύχθηκε μία νέα μέθοδος απομόνωσης, η οποία διασφαλίζει την σταθερότητα και ομοιογένεια των πρωτεϊνών και υποσυμπλόκων του PS II. Η σταθερότητα των απομονωμένων πρωτεϊνών εξετάστηκε με φασματοσκοπικές και βιοχημικές τεχνικές.

Ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων.

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε συστηματική μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών του PS II. Αρχικά, η μελέτη επικεντρώθηκε στην εύρεση συνθηκών για την επαναλήψιμη παραγωγή κρυστάλλων κατάλληλου μεγέθους για πειράματα περίθλασης ακτίνων-X, και στη συνέχεια έγινε προσπάθεια για την βελτίωση της ποιότητάς τους. Δοκιμάστηκαν διάφορα απορρυπαντικά τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην κρυστάλλωση. Τέλος, διερευνήθηκαν τα αίτια που προκαλούν την διάσπαση των πρωτεϊνών του PS II, και έγινε προσπάθεια για την αναστολή της.

4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Διαλύματα.

Διάλυμα αλέσεως (grinding buffer): 0.4 M NaCl, 20 mM HEPES (pH=7.5), 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA και 0.2 % w/v BSA

1^ο διάλυμα επαναιώρησης: (1st resuspension buffer): 0.15 mM NaCl, 4 mM MgCl₂ και 25 mM MES (pH=6)

2^ο διάλυμα επαναιώρησης: (2nd resuspension buffer): 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 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^ο διάλυμα επαναιώρησης

Διάλυμα Tris: 0.8 mM Tris (pH=8.2)

Διάλυμα ακετόνης: 80% v/v ακετόνη σε H₂O

Διάλυμα PEG 6000: 20% w/v PEG 6000 και 25 mM MES

Διάλυμα εξισορρόπησης : Bis-Tris pH 6.0 0.04 % LM

Διάλυμα έκλουσης : Bis-Tris pH 6.00.04% w/v LM, 200mM LiClO₄.

Διάλυμα 18 % σουκρόζης: 18 % σουκρόζη, 25mM MES pH 6.0, 10mM NaCl, 0.04% LM

Διάλυμα 35 % σουκρόζης: 18 % σουκρόζη, 25mM MES pH 6.0, 10mM NaCl, 0.04% LM

4.2.2 Μέθοδοι.

Η απομόνωση των διαφόρων φωτοσυνθετικών πρωτεϊνικών συμπλόκων βασίστηκε σε μεθόδους επιλεκτικής διαλυτοποίησης, σε συνδυασμό με βιοχημικές τεχνικές όπως φυγοκέντρηση, ιονανταλλακτική χρωματογραφία, και υπερφυγοκέντρηση σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης. Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδιου και φασματοσκοπίας απορρόφησης.

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.

Υπερφυγοκέντρωση σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του PS II, με υπερφυγοκέντρωση σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης, περιλαμβάνει τα εξής τα στάδια:

Αρχικά δημιουργείται μια βαθμίδωση πυκνότητας σε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα με την ανάμιξη ενός διαλύματος χαμηλής πυκνότητας (18 % σουκρόζης) και ενός διαλύματος υψηλής πυκνότητας (35 % σουκρόζη) σε ειδική συσκευή.

Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται στην επιφάνεια της βαθμίδωσης πυκνότητας και υπερφυγοκεντρείται σε ειδική κεφαλή φυγοκέντρου για 16 ώρες σε 35000 rpm.

Τέλος οι ζώνες που έχουν σχηματιστεί συλλέγονται χωριστά και χαρακτηρίζονται με ηλεκτροφόρηση και φασματοσκοπία ορατού.

Ιονανταλλακτική χρωματογραφία.

Η ιονανταλλακτική 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 Fast-Flow. Όλα τα διαλύματα είχαν απαερωθεί και διηθηθεί με φίλτρα μεγέθους πόρων 0.45μm.

Απομόνωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων.**A) Θυλακοειδή**

Οι θυλακοειδείς μεμβράνες απομονώνονται από τα φύλλα των διαφόρων φυτών ως εξής [¹²²]

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 μίγμα διηθείται με γάζα. Το διήθημα φυγοκεντρείται στα 7500xg για 15 min, ώστε να καταβυθιστούν οι χλωροπλάστες, ενώ στο υπερκείμενο παραμένουν τα υπόλοιπα κυτταρικά οργανίδια. υψηλής ιονικής ισχύος, έτσι ώστε να σπάσει η εξωτερική μεμβράνη των χλωροπλαστών. Στη συνέχεια το επαναιώρημα φυγοκεντρείται στα 7500xg για 10 min για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών του στρώματος. Το ίζημα που λαμβάνεται περιέχει τις θυλακοειδείς μεμβράνες, και επαναιωρείται σε διάλυμα SMN, ομογενοποιείται και αποθηκεύεται στους -40°C.

B) Φωτοσύστημα II

Για την απομόνωση του PS II [123] 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 PS II 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 (PS II-core)

Μεμβράνες του PS II διαλυτοποιημένες σε SMN με συγκέντρωση χλωροφύλλης 0.75 mg/ml αναμιγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος SMN, το οποίο περιέχει 60 mM HM και το μίγμα επωάζεται για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρωση στα 40000xg για τριάντα λεπτά. Το υπερκείμενο αναμιγνύεται με μισό όγκο διαλύματος SMN και προστίθεται 10 mM MgCl₂. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση στα 40000xg για είκοσι λεπτά. Το υπερκείμενο, που περιέχει το PS II-

core, αναμιγνύεται με ίσο όγκο διαλύματος 40% PEG 6000 και συλλέγεται το PS II-core κατόπιν καταβύθισης του με φυγοκέντρηση στα 40000xg για τριάντα λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται μια έκπλυση του PS II-core με SMN.

Δ) Tris-PS II-core

Το Tris-PS II-core [124] είναι ο υδρόφοβος πυρήνας του PS II, χωρίς τις εξωτερικές πρωτεΐνες (33kDa, 23kDa, 17kDa) και το μαγγάνιο. Για την απομόνωση του συμπλόκου, ίζημα PS II-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.

Ε) Υποσύμπλοκα του Tris-PS II-core

Η απομόνωση των υποσυμπλόκων του PS II-core πραγματοποιείται με διαλυτοποίηση του PS II-core με απορρυπαντικό LM ή OTG. Ακολουθεί διαχωρισμός με υπερφυγοκέντρηση σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης και καθαρισμός των πρωτεϊνών με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής (Q sepharose).

Ηλεκτρόφορηση.

Η πολυπεπτιδική σύνθεση των συμπλόκων αναλύεται με ηλεκτρόφορηση σε σύστημα ασυνεχούς πηκτώματος (gel) SDS/ουρίας/πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli [125]. Κατόπιν αποδιάταξης των πρωτεϊνών με το απορρυπαντικό SDS, οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται αρχικά μέσω ενός πηκτώματος συσσώρευσης (stacking gel) και στη συνέχεια μέσω ενός πηκτώματος 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% CH₃COOH και η χρώση με διάλυμα Coomassie Blue R-250.

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.

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).

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 καθημερινής σταγόνας. Σε κάθε κοιλότητα της γέφυρας προστίθεται 10-50 ml δείγματος του πρωτεϊνικού διαλύματος που περιέχει το αντιδραστήριο καταβύθισης, το πρόσθετο και NaN₃, 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.

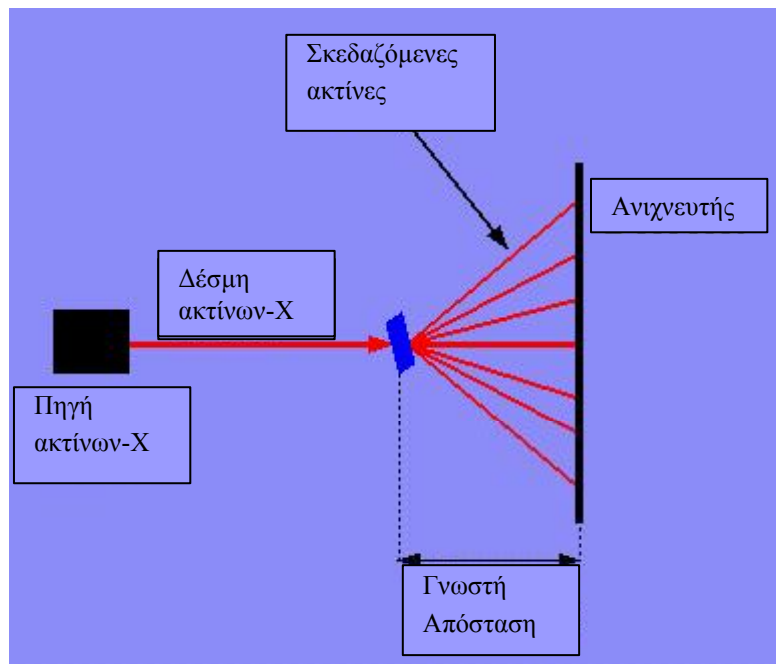
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χλωροφύλλης.

Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης προσδιορίζεται φασματοσκοπικά, σύμφωνα με τη μέθοδο Arnon [126]. Αρχικά, γίνεται εκχύλιση της χλωροφύλλης με υδατικό διάλυμα ακετόνης 80%. Το αιώρημα φυγοκεντρείται στις 15000 rpm 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.

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 λ . 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.



Σχήμα 19. Σχηματικό διάγραμμα της περίθλασης ακτίνων-X.

Μεταξύ ακτίνων που σκεδάζονται από διαδοχικά επίπεδα υπάρχει διαφορά δρόμου ίση με $2d_{hkl}\sin\theta$, όπου d_{hkl} η κάθετη απόσταση μεταξύ των επιπέδων (hkl) και θ 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 [127]: $d_{\min} = \lambda / 2\eta\mu\theta_{\max}$.

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.

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης.

Το πρωτόκολλο απομόνωσης στηρίζεται στην επιλεκτική απομάκρυνση πρωτεϊνών από το σύμπλοκο του PS II και στο σταδιακό εμπλουτισμό των υποσυμπλόκων που αποτελούνται από τις πρωτεΐνες CP 47 και D1-D2-Cyt b559. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με κατάλληλο συνδυασμό βιοχημικών επεξεργασιών και τεχνικών για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών και υποσυμπλόκων που προκύπτουν από τις επεξεργασίες. Τα στάδια τα οποία ακολουθήθηκαν με σκοπό την απομόνωση της CP 47 και του συμπλόκου του ενεργού κέντρου είναι τα εξής:

- Απομάκρυνση του συμπλόκου συλλογής φωτός (LHC) από το πυρήνα του PS II.
- Απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών από το πυρήνα του PS II.
- Διαλυτοποίηση και διαχωρισμός του πυρήνα από τις CPs (CP 28, CP 26, CP 24) και την CP 43.
- Διάσπαση του συμπλόκου CP 47-D1-D2-Cyt b559, διαχωρισμός και απομόνωση της CP 47 και του συμπλόκου του ενεργού κέντρου D1-D2-Cyt b559.

4.3.2 Απομάκρυνση του συμπλόκου συλλογής φωτός (LHC) από το PS II.

Το σύμπλοκο συλλογής φωτός αποτελεί την εξωτερική κεραία του PS II και αποτελείται από πολυπεπίδια με μοριακό βάρος 20-30 kDa τα οποία δεσμεύουν το μεγαλύτερο μέρος Chl b στις μεμβράνες του PS II. Η σύσταση του σε πρωτεΐνες είναι ετερογενής, διότι ρυθμίζεται από συνθήκες φωτισμού και μηχανισμούς φωσφορλίωσης. Η απομάκρυνση του είναι απαραίτητη για τον παραπέρα εμπλουτισμό των πρωτεϊνών του πυρήνα .

Η απομάκρυνση του LHC στηρίζεται στη διαλυτοποίηση των μεμβρανών του PS II με το απορρυπαντικό HECAMEG [128]. Επειδή το LHC είναι συνδεδεμένο στη περιφέρεια του πυρήνα, αποσπάται από το υπόλοιπο σύμπλοκο και διαχωρίζεται με επιλεκτική καταβύθιση. Η καταβύθιση πραγματοποιείται με προσθήκη ιόντων Mg^{2+} τα οποία προκαλούν τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών του LHC. Η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει γρήγορο και ποσοτικό εμπλουτισμό του πυρήνα (PS II-core), που αποτελεί το αρχικό υλικό για το δεύτερο στάδιο του πρωτοκόλλου.

4.3.3 Απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών από το πυρήνα του PS II.

Οι εξωτερικές πρωτεΐνες του PS II (17, 23, 33 kDa) είναι υδρόφιλες και συνδέονται με τον υδρόφοβο πυρήνα μέσω πολικών αλληλεπιδράσεων. Η απομάκρυνση τους βασίζεται σε επεξεργασίες που διασπών τις πολικές αλληλεπιδράσεις και απελευθερώνουν τις εξωτερικές πρωτεΐνες στο διάλυμα. Έκθεση του PS II-core σε συνθήκες υψηλής ιονικής ισχύος ή αλκαλικού pH οδηγεί στην απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών.

Επιλέχθηκε η κατεργασία του PS II-core με Tris-pH 8.0 διότι, εκτός από την αποσύνδεση των εξωτερικών πρωτεϊνών προκαλεί και την καταστροφή του συμπλόκου του μαγγανίου. Η καταστροφή του συμπλόκου συμβάλλει στην ευκολότερη απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών οδηγώντας σε ένα ομογενές σύμπλοκο γνωστό ως Tris-PS II-core.

4.3.4 Διαλυτοποίηση του συμπλόκου Tris-PS II-core και διαχωρισμός του πυρήνα από τις CPs (CP 28, CP 26, CP 24) και την CP 43.

Το στάδιο αυτό έχει μεγάλη σημασία για τη συνολική πορεία του καθαρισμού αφού πραγματοποιείται διαλυτοποίηση και απομάκρυνση τεσσάρων μεμβρανικών πρωτεϊνών από το υπόλοιπο υποσύμπλοκο. Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στην επιλογή του απορρυπαντικού το οποίο διαλυτοποιεί και αποχωρίζει τις επιμέρους πρωτεΐνες από το σύμπλοκο. Τα απορρυπαντικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι το LM και το OTG τα οποία είναι πολύ αποτελεσματικά στη διαλυτοποίηση και διατηρούν τις πρωτεΐνες στη φυσική τους κατάσταση. Επίσης είναι γνωστό ότι τα απορρυπαντικά αυτά είναι κατάλληλα για κρυστάλλωση λόγω μικρού μεγέθους μικκυλίου και είναι ομογενείς ουσίες σε αντίθεση με το Triton-X 100 το οποίο είναι μίγμα από ισομερή μόρια.

Στη βιοχημεία των μεμβρανικών πρωτεϊνών τα απορρυπαντικά χρησιμοποιούνται για την διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών από τις βιολογικές μεμβράνες. Σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα μεμβρανικών πρωτεϊνών όπως το PS II, τα απορρυπαντικά αρχικά διαλυτοποιούν και στη συνέχεια παρεμβάλλονται στις υδρόφοβες επαφές μεταξύ των πρωτεϊνών προκαλώντας το διαχωρισμό τους.

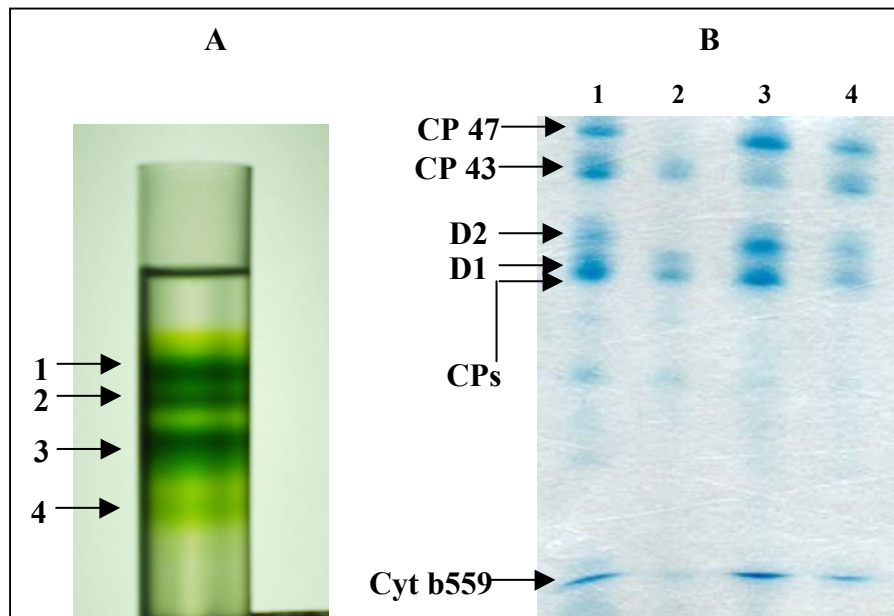
Ο διαχωρισμός των συμπλόκων, που προκύπτουν από τις επεξεργασίες, πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική της υπερφυγοκέντρωσης σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης. Επιπλέον η τεχνική αυτή μας επέτρεψε να μελετήσουμε την σχετική αλληλεπίδραση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου.

Το σύμπλοκο Tris-PS II-core (CPs-CP 43-CP 47-D1-D2-Cyt b559) εκτός από την CP 47 και το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου περιέχει και τέσσερις επιπλέον μεμβρανικές πρωτεΐνες (CP 43, CP 28, CP 26, CP 24). Οι CPs (CP 28, CP 26, CP 24) είναι συνδεδεμένες στη περιφέρεια του συμπλόκου και απομακρύνονται με επεξεργασία του συμπλόκου με χαμηλή συγκεντρώση απορρυπαντικού LM. Αντίθετα η CP 43 είναι πιο ισχυρά δεσμευμένη στο πυρήνα και δεν απομακρύνεται μαζί με τις CPs πρωτεΐνες.

Στο σημείο αυτό, επιχειρήθηκε η έρευνα συνθηκών για την απομάκρυνση της CP 43 και των CPs, σε ένα στάδιο. Αυτό θα επέτρεπε τον ταχύτατο και ποσοτικό εμπλουτισμό του συμπλόκου CP 47-RC. Η κλασμάτωση του Tris-PS II-core εξαρτάται από την συγκέντρωση και τον τύπο του απορρυπαντικού, την συγκέντρωση πρωτεΐνης και το χρόνο επώασης. Για την ποσοτική απομάκρυνση της

CP 43 και τον εμπλουτισμό του συμπλόκου CP 47-D1-D2-Cyt b559, αρχικά δοκιμάστηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις LM (0.5-3%) σε συνδιασμό με διάφορους χρόνους επώασης και συγκένρωση πρωτεΐνης.

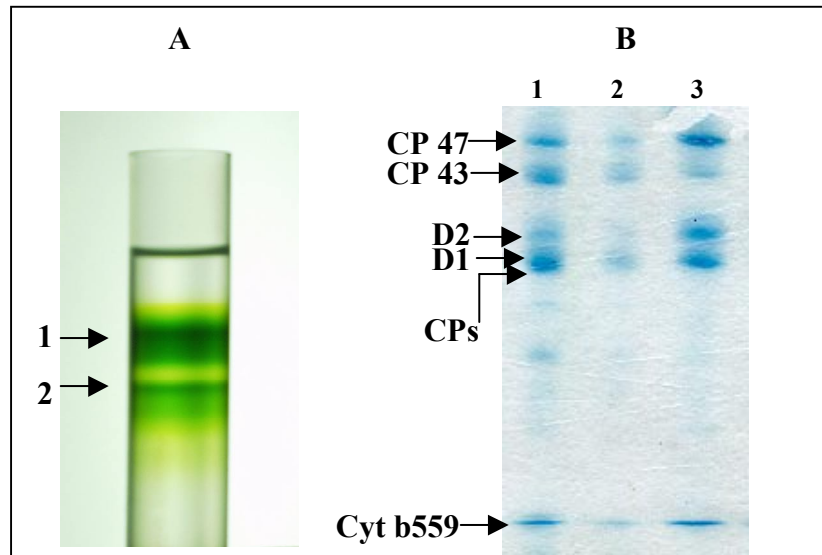
Το σύμπλοκο Tris-PS II-core επεξεργάστηκε με απορυπαντικό LM και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε υπερφυγοκέντρηση γραμμικής διαβάθμισης σουκρόζης.



Σχήμα 20. (A) Κλασμάτωση του συμπλόκου Tris-PS II-core με υπερφυγοκέντρηση σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης μετά από διαλυτοποίηση για 30 λεπτά με 1% LM. (B) Ηλεκτροφόρηση: 1) Tris-PS II-core 2) πρώτη ζώνη 3) δεύτερη ζώνη 4) τρίτη ζώνη.

Το σύμπλοκο Tris-PS II-core διασπάται και προκύπτουν τέσσερις ζώνες. Η ανάλυση της πολυπεπτιδικής σύστασης των ζωνών πραγματοποιήθηκε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (σχήμα 20). Η πρώτη ζώνη αποτελείται από τις CPs (CP 28, CP 26, CP 24) και ένα μέρος της CP 43. Η δεύτερη ζώνη περιέχει το σύμπλοκο CP 47-D1-D2-Cyt b559 το οποίο προκύπτει από την απομάκρυνση μέρους της CP 43. Η τρίτη ζώνη είναι το σύμπλοκο το οποίο προέρχεται από το Tris-PS II-core με απομάκρυνση των CPs. Από τις μελέτες αυτές προέκυψε ότι η CP 43 δεν απομακρύνεται πλήρως ακόμη και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις LM. Για το λόγο αυτό η ίδια μελέτη πραγματοποιήθηκε για το απορυπαντικό OTG και αξιολογήθηκε η ικανότητα του στη κλάσμάτωση του συμπλόκου Tris-PS II-core.

Επεξεργασία του Tris-PS II-core με το απορρυπαντικό OTG και υπερφυγοκέντρωση σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης οδήγησε στο διαχωρισμό δύο πράσινων ζωνών (σχήμα 21).

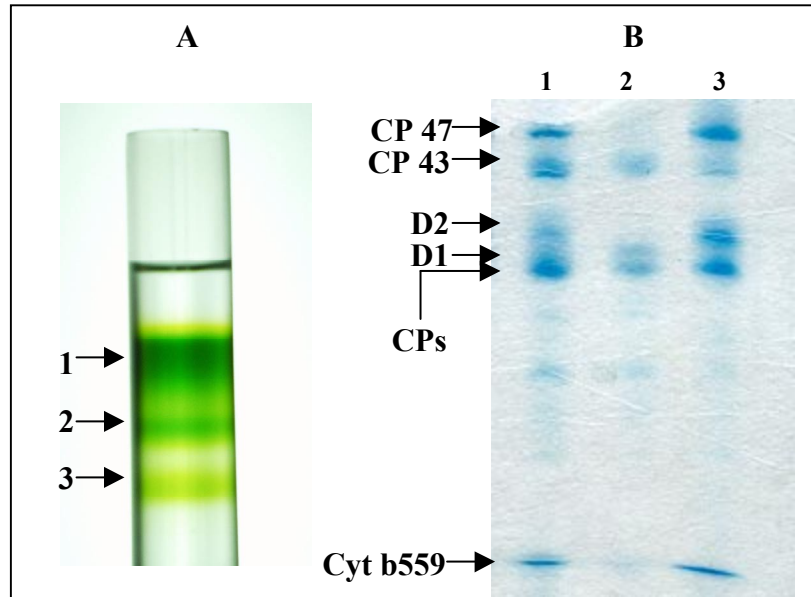


Σχήμα 21. (Α) Υπερφυγοκέντρωση σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης του συμπλόκου Tris-PS II-core μετά από επεξεργασία για 30 λεπτά με 1% OTG. (Β) Ηλεκτροφόρηση: 1) Tris-PS II-core, 2) πρώτη ζώνη, 2) δεύτερη ζώνη.

Από την πολυπεπτιδική ανάλυση των ζωνών με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι το απορρυπαντικό OTG απομακρύνει ποσοτικά την CP 43 η οποία βρίσκεται στην πρώτη ζώνη με τις CPs. Ωστόσο ένα μέρος της CP 47 αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο και ανακτάται στην πρώτη ζώνη. Επιπλέον η παρατήρηση κόκκινου ιζήματος αμέσως μετά την διαλυτοποίηση, ενδεικτικό της μετουσίωσης των πρωτεϊνών, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το OTG είναι πολύ δραστικό απορρυπαντικό προκαλώντας υπερδιαλυτοποίηση του συμπλόκου.

Από τις παραπάνω δοκιμές εκτιμήσαμε την ικανότητα διαφόρων συγκεντρώσεων των απορρυπαντικών LM και OTG να διαλυτοποιούν και να διασπών το σύμπλοκο Tris-PS II-core. Το LM προκαλούσε ήπια διαλυτοποίηση χωρίς όμως να είναι ικανό να αποδεσμεύσει ποσοτικά την CP 43 ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Το OTG είναι πιο δραστικό όσον αφορά τη διαλυτοποίηση, αφού απομακρύνει από το σύμπλοκο και μέρος της CP 47, η οποία είναι γνωστό ότι δεσμεύεται πολύ ισχυρά με το ενεργό κέντρο του PS II.

Δοκιμάστηκε η ανάμιξη των δύο απορρυπαντικών σε διάφορες αναλογίες, με στόχο την ποσοτική απομάκρυνση των CPs και της CP 43 και τον εμπλουτισμό του συμπλόκου CP 47-D1-D2-Cyt b559. Επεξεργασία του Tris-PS II-core σε μίγμα LM και OTG σε αναλογία 2/1, οδήγησε στο επιθυμητό αποτέλεσμα

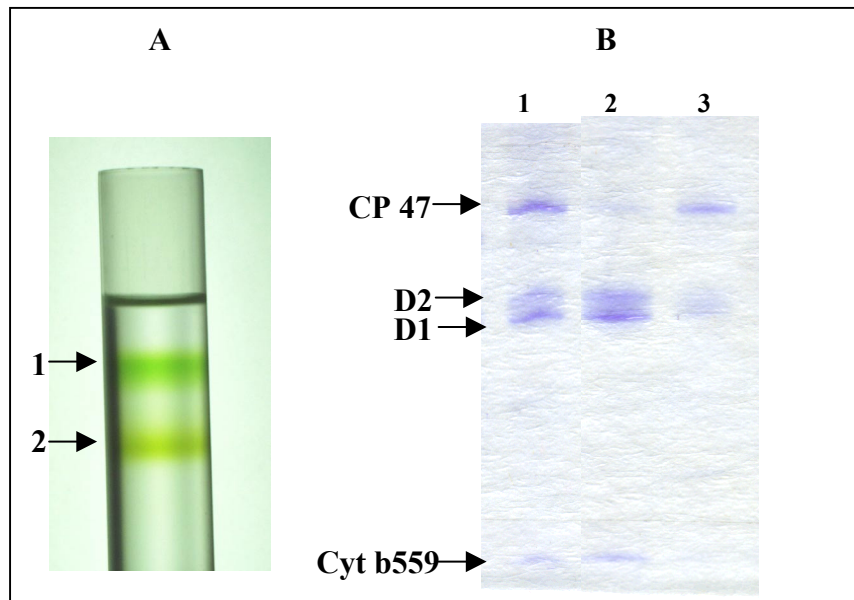


Σχήμα 22. (A) Υπερφυγοκέντρηση σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης του συμπλόκου Tris-PS II-core μετά από διαλυτοποίηση με μίγμα 1% OTG / 2% LM B) Ηλεκτροφόρηση: 1) Tris-PS II-core, 2) πρώτη ζώνη, 3) δεύτερη ζώνη.

Μετά την επεξεργασία με το μίγμα των απορρυπαντικών, το διαλυτοποιημένο σύμπλοκο υποβάλλεται σε υπερφυγοκέντρηση γραμμικής διαβάθμισης σουκρόζης (σχήμα 22). Από την επεξεργασία σχηματίστηκαν δύο έντονα πράσινες ζώνες, η σύσταση των οποίων μελετήθηκε με ηλεκτροφόρηση. Από την πολυπεπτιδική ανάλυση φάνηκε ότι η δεύτερη ζώνη είναι εμπλουτισμένη στο σύμπλοκο CP 47-D1-D2-Cyt b559. Η πρώτη περιέχει τις CPs και το μεγαλύτερο μέρος της CP 43, ενώ δεν υπάρχει σχεδόν καθόλου CP 47. Η ανάμιξη των δύο απορρυπαντικών οδήγησε στο σχηματισμό μικτών μικκυλίων, μετριάζοντας την δράση του OTG επιτυγχάνοντας έτσι επιλεκτική απομάκρυνση των CPs και της CP 43. Στο στάδιο αυτό απομονώθηκε το σύμπλοκο CP 47-D1-D2-Cyt b559 από το οποίο στη συνέχεια απομονώνεται η CP 47 και το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου.

4.3.5 Διάσπαση του συμπλόκου CP 47-D1-D2-Cyt b559, διαχωρισμός και απομόνωση της CP 47 και του συμπλόκου του ενεργού κέντρου D1-D2-Cyt b559.

Η CP 47 δεσμεύεται πολύ στενά στο σύμπλοκο του ενεργού κέντρου και είναι αδύνατη η πλήρης απομάκρυνση της με επεξεργασία του συμπλόκου με απορρυπαντικά. Τα χαοτροπικά άλατα χρησιμοποιούνται στη βιοχημεία των μεμβρανικών πρωτεϊνών διότι έχουν την ιδιότητα να εξασθενούν τους υδρόφοβους δέσμους. Τα άλατα αυτά διασπών το πυκνό δίκτυο δεσμών υδρογόνου του νερού, προκαλώντας την εξασθένηση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και κατά συνεπεία την αποδέσμευση των μεμβρανικών πρωτεϊνών.



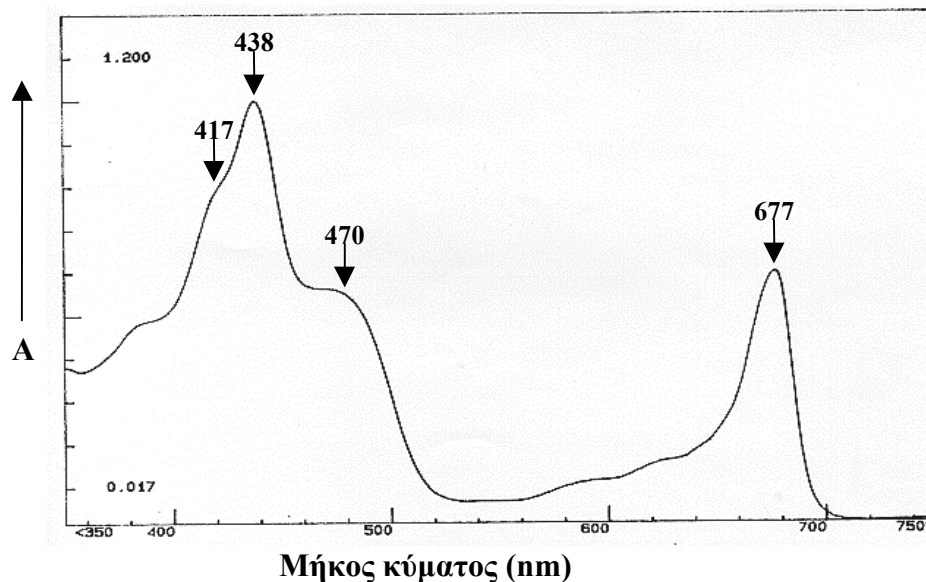
Σχήμα 23. (A) Κλασμάτωση του συμπλόκου CP 47-D1-D2-Cyt b559. (B) Ηλεκτροφόρηση: 1) CP47-D1-D2-Cyt b559, 2) δεύτερη ζώνη, 3) πρώτη ζώνη.

Το σύμπλοκο CP 47-D1-D2-Cyt b559 επεξεργάστηκε με υψηλή συγκέντρωση απορρυπαντικού (2% LM) παρουσία χαοτροπικού μέσου (2M LiClO₄). Ο συνδυασμός αυτός οδήγησε στην διάσπαση του συμπλόκου CP 47-D1-D2-Cyt b559 σε δύο πληθυσμούς, που διαχωρίστηκαν με υπερφυγοκέντρωση σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης (σχήμα 23). Η πολυπεπτιδική ανάλυση έδειξε ότι η πρώτη ζώνη με το έντονο πράσινο χρώμα είναι εμπλουτισμένη με CP 47, ενώ η φαιοπράσινη

ζώνη με το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου. Οι ζώνες συλλέχθηκαν χωριστά και ακολούθησε καθαρισμός με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής

4.3.6 Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών του PS II με φασματοσκοπία ορατού και αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

Οι πρωτεΐνες του PS II δεσμεύουν επιλεκτικά χρωστικές και έτσι καθίσταται δυνατός ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών που απομακρύνονται και των υποσυμπλόκων που απομονώνονται από τις φασματοσκοπικές αλλαγές στην περιοχή του ορατού.

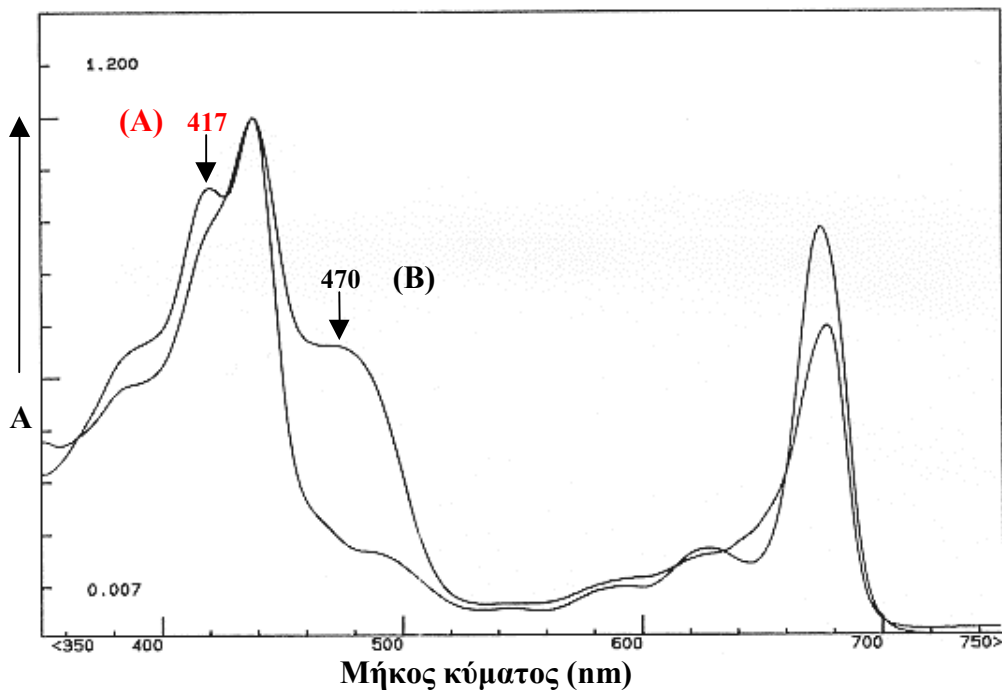


Σχήμα 24. Φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου PS II-core.

Το περιφερειακό σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHC) και οι μικρές CPs (CP 28, CP26, CP 24) δεσμεύουν όλες τις χλωροφύλλες β που απορροφούν στα 470 nm. Αντίθετα οι CP 47 και CP 43 περιέχουν μόνο χλωροφύλλη α που χαρακτηρίζεται από τις κορυφές στα 438 και 677 nm. Η απορρόφηση της φαιοφυτίνης και του Cyt b559 στα 417 nm, αποδίδεται στο σύμπλοκο του ενεργού κέντρου (D1-D2-Cyt b559) του PS II (σχήμα 24).

Τα υποσύμπλοκα και οι πρωτεΐνες που απομονώνονται στα διάφορα στάδια του καθαρισμού χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία ορατού σε θερμοκρασία

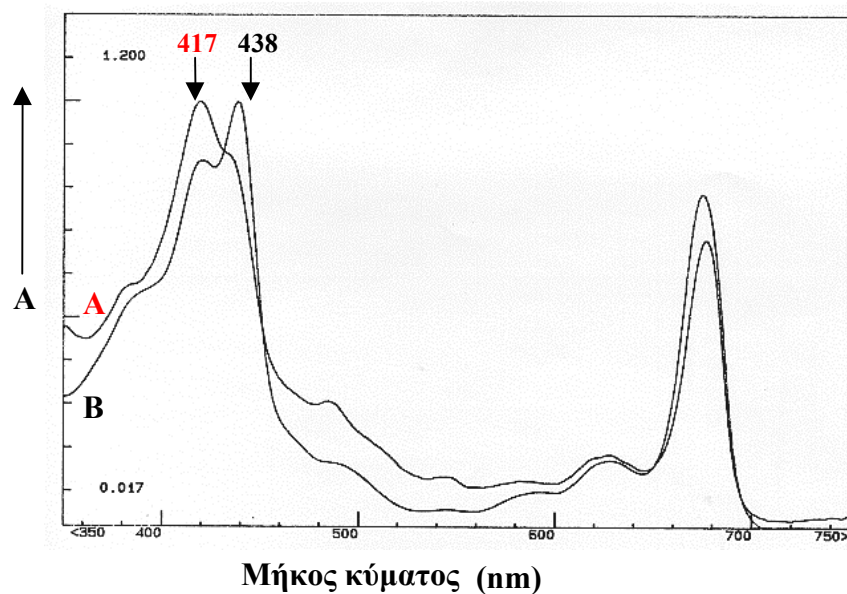
δωματίου. Η απομάκρυνση των CPs και της CP 43 συνοδεύεται από αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου. Από το φάσμα (A) που αντιστοιχεί στο υποσύμπλοκο CP 47-D1-D2-Cyt b559 επιβεβαιώνεται η απομάκρυνση των CPs, από την ελάττωση της απορρόφησης στα 470 nm (σχήμα 25). Στο ίδιο στάδιο της απομόνωσης μαζί με τις CPs απομακρύνεται και η CP 43 πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του συμπλόκου (CP 47-D1-D2-Cyt b559) στις πρωτεΐνες του ενεργού κέντρου, όπως φαίνεται από την αύξηση της απορρόφησης στα 421 nm.



Σχήμα 25. Φάσμα απορρόφησης των συμπλόκων: (A) CP 47-D1-D2-Cyt b559, (B) PS II-core.

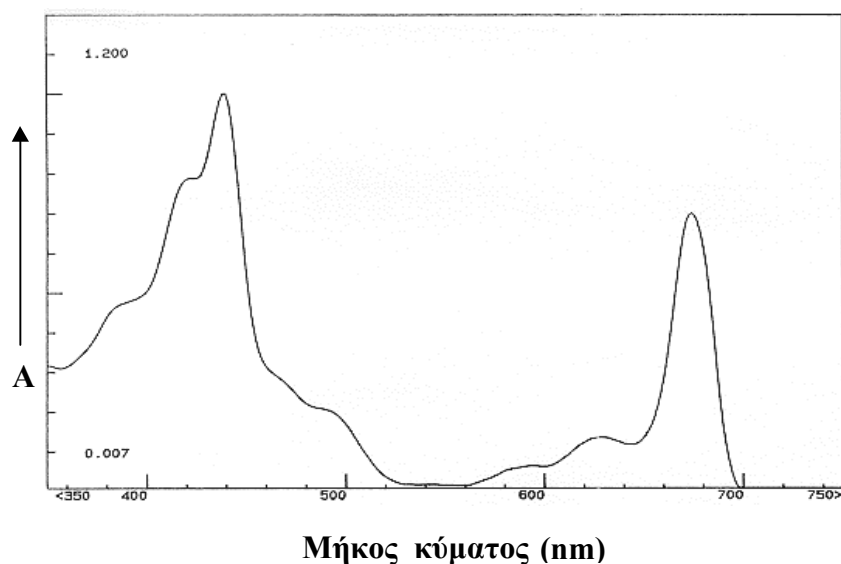
Στο τελευταίο στάδιο του πρωτοκόλλου πραγματοποιήθηκε η αποδέσμευση της CP 47 από το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου. Η απορρόφηση στα 417 nm που αποδίδεται στη Pheo και το οξειδωμένο Cyt b559 υπερτερεί της κορυφής της Chl a, που εμφανίζεται ως ώμος στο 438 nm (σχήμα 26).

Ο λόγος των απορροφήσεων στα 417 και 438 nm επιβεβαιώνει την απομόνωση εξαιρετικής καθαρότητας ενεργού κέντρου. Στο σχήμα 26 γίνεται σύγκριση των φασμάτων απορρόφησης του συμπλόκου CP 47-D1-D2-Cyt b559 και του D1-D2-Cyt b559.



Σχήμα 26. Φάσμα απορρόφησης των συμπλόκων: (A) ενεργό κέντρο (D1-D2-Cyt b559), (B) CP47-D1-D2-Cyt b559.

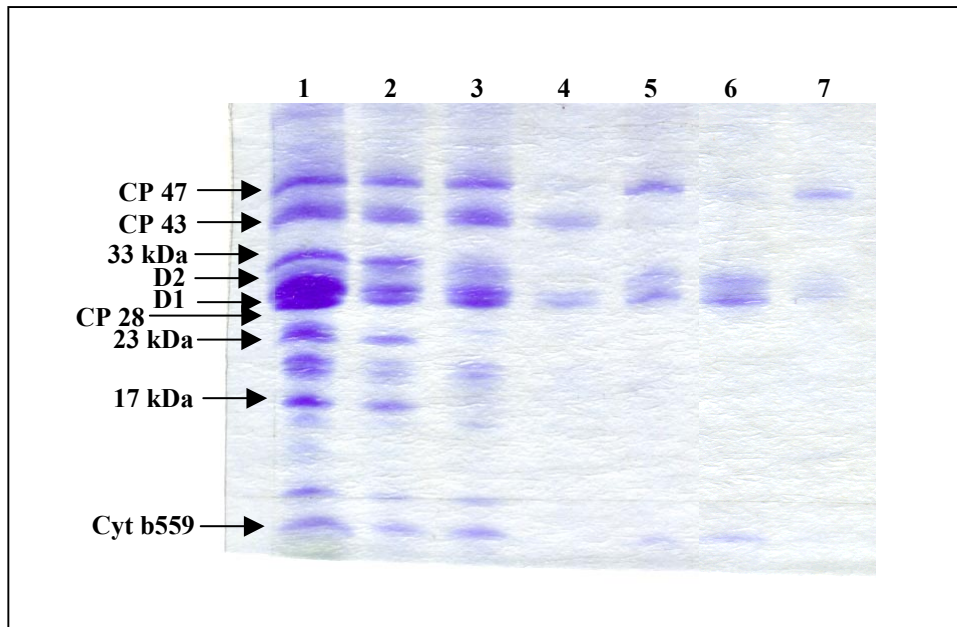
Από το φάσμα 27 φαίνεται ότι η απομονωμένη CP 47, η οποία αποτελεί την εσωτερική κεραία του PS II, δεσμεύει μόνο χλωροφύλλη α και καροτενοειδή, όπως ακριβώς και όταν είναι στη φυσιολογική της μορφή μέσα στο σύμπλοκο του πυρήνα.



Σχήμα 27. Φάσμα απορρόφησης της CP 47.

Το φάσμα αυτό επιβεβαιώνει την απομόνωση της CP 47 σε σταθερή κατάσταση που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την κρυστάλλωση της.

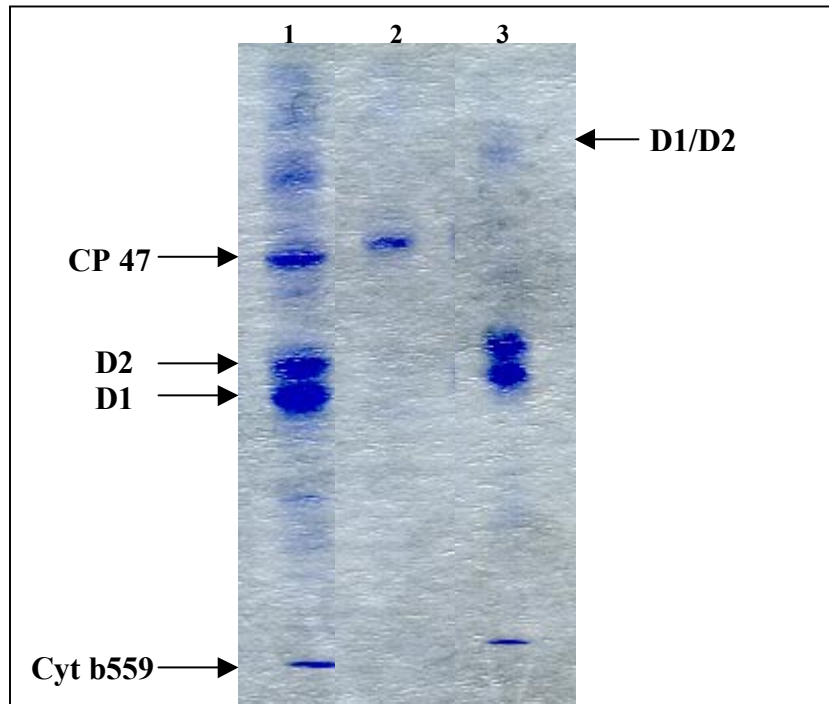
Η πολυπεπτιδική σύσταση των πρωτεϊνών και υποσυμπλόκων, που εμπλουτίζονται με υπερφυγοκέντρωση σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης αναλύθηκε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.



Σχήμα 28. Ηλεκτροφόρηση: 1) PS II, 2) PS II-core, 3) Tris-PS II-core, 4) CPs και CP 43,5) CP 47-D1-D2-Cyt b559, 6) D1-D2-Cyt b559, 7) CP 47

Στην παραπάνω ηλεκτροφόρηση δείχνεται η συνολική πορεία της απομόνωσης με την απομάκρυνση των περιφερειακών πρωτεϊνών και τον εμπλουτισμό των υποσυμπλόκων. Όπως φαίνεται η CP 47 και το σύμπλοκο D1-D2-Cyt b559, που λαμβάνονται από τις ζώνες της υπερφυγοκέντρωσης σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης, περιέχουν ίχνη προσμίξεων. Ο καθαρισμός της CP 47 και του συμπλόκου του ενεργού κέντρου πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής. Η CP 47 εκλούεται από την χρωματογραφική κολώνα με 85 mM LiClO₄, ενώ το σύμπλοκο D1-D2-Cyt b559 δεσμεύεται πιο ισχυρά και εκλούεται στα 200 mM LiClO₄. Έτσι επιτυγχάνεται ο πλήρης καθαρισμός της CP 47, που αποτελεί βασική προϋπόθεση για την κρυστάλλωση της.

Η καθαρότητα της CP 47 και του συμπλόκου D1-D2-Cyt b559, όπως απομονώθηκαν από την χρωματογραφική στήλη, επιβεβαιώνεται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (σχήμα 29).



Σχήμα 29. Ηλεκτροφόρηση: 1) CP 47-D1-D2-Cyt b559, 2) CP 47, 3) D1-D2-Cyt b559.

Όπως φαίνεται από την ηλεκτροφόρηση τόσο το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου όσο και η CP 47 έχουν απομονωθεί με εξαιρετική καθαρότητα.

4.3.7 Κρυστάλλωση της CP 47.

Η κρυστάλλωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών επηρεάζεται από μεγάλο αριθμό παραμέτρων, οι οποίες σχετίζονται με την σταθερότητα της πρωτεΐνης και την πορεία της κρυστάλλωσης (πίνακας 2).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε συστηματική μελέτη των κυριότερων παραμέτρων, που επηρεάζουν την κρυστάλλωση, με στόχο την εύρεση συνθηκών που θα οδηγούσαν στην παραγωγή τρισδιάστατων κρυστάλλων που θα επέτρεπαν την μελέτη της δομής της CP 47 με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X.

Αρχικά η μελέτη επικεντρώθηκε σε παραμέτρους που επηρεάζουν την κρυστάλλωση γενικά των πρωτεϊνών (pH, ιονική ισχύς, αντιδραστήριο καταβύθισης) ώστε να επιτευχθούν συνθήκες για την επαναλήψιμη ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων κατάλληλου μεγέθους για πειράματα περίθλασης ακτίνων-X. Η

εκτίμηση της επίδρασης των διαφόρων παραμέτρων στηρίχθηκε σε παρατηρήσεις που αφορούσαν το χρώμα, το σχήμα, τον αριθμό και το μέγεθος των κρυστάλλων.

Πίνακας 2: <u>Παράγοντες που επηρεάζουν τη κρυστάλλωση</u>
pH
Θερμοκρασία
Ιονική ισχύς
Αντιδραστήριο καταβύθισης
Συγκέντρωση πρωτεΐνης
Απορρυπαντικά
Μικρά αμφίφιλα μόρια
Ομοιογένεια
Διάλυμα δεξαμενής

Στη συνέχεια μελετήσαμε τις παραμέτρους που επηρεάζουν την κρυστάλλωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών (απορρυπαντικά, αμφίφιλα μόρια) με στόχο την βελτίωση της ποιότητας στον κρυστάλλων. Η επαναλήψιμη ανάπτυξη κρυστάλλων παρείχε την δυνατότητα συστηματικής μελέτης της επίδρασης του απορρυπαντικού στην ικανότητα περίθλασης των κρυστάλλων.

4.3.8 Επίδραση του pH στην κρυστάλλωση της CP 47.

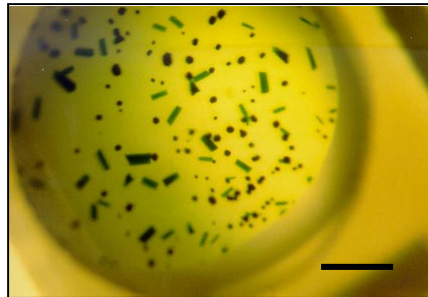
Το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος αποτελεί βασική παράμετρο για την κρυστάλλωση του μακρομορίου, αφού επηρεάζει την σταθερότητα και το επιφανειακό του φορτίο. Οι περισσότερες πρωτεΐνες παραμένουν σταθερές σε μια περιορισμένη κλίμακα pH και κρυσταλλώνουν κοντά στο ισοηλεκτρικό τους σημείο.

Η επίδραση του pH στην κρυστάλλωση της CP 47 αξιολογήθηκε με παρατηρήσεις που αφορούσαν την κατάσταση της πρωτεϊνικής σταγόνας κατά την κρυστάλλωση. Οι μεγαλύτεροι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν σε pH 6.0, ενώ σε ακραίες τιμές η πρωτεΐνη μετουσιωνόταν ή έδινε άμορφο ίζημα.

Πίνακας 3: *Επίδραση του pH στην κρυστάλλωση της CP 47*

pH	Παρατηρήσεις
5.0	Μετουσίωση
6.0	Κρυστάλλωση
7.0	Μικροκρύσταλλοι
8.0	Ίζημα

Στην παρακάτω εικόνα δίνονται οι πρώτοι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν σε pH 6.0 (σχήμα 30).



Σχήμα 30. Κρύσταλλοι της CP 47 με σχήμα ραβδόμορφο και εξαγωνικό. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 1 mm

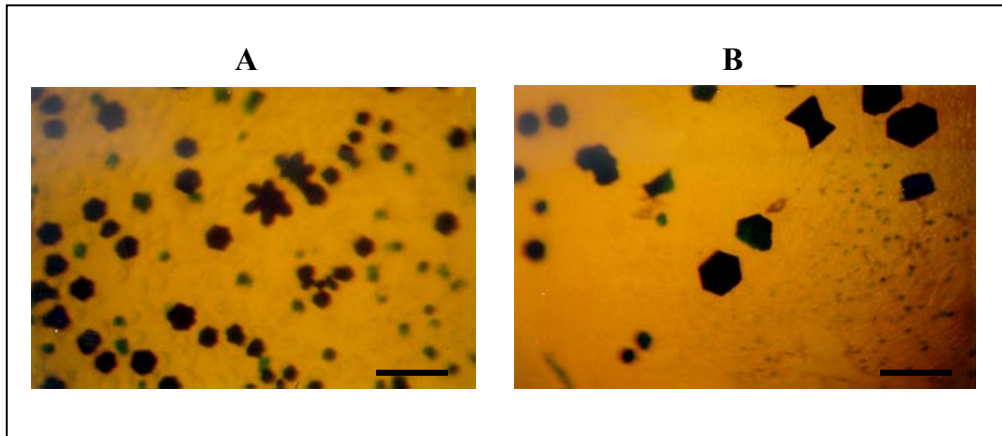
Οι πρώτοι κρύσταλλοι είχαν σχήμα εξαγωνικό και χαρακτηριστικό ήταν η ανάπτυξη μεγάλου αριθμού μικροκρυστάλλων.

4.3.9 Επίδραση της θερμοκρασίας στην κρυστάλλωση της CP 47.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην κρυστάλλωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών αφορά κυρίως την σταθερότητα της πρωτεΐνης και συνήθως οι θερμοκρασίες κρυστάλλωσης είναι από 4-25 °C. Η θερμοκρασία επίσης ρυθμίζει και την ταχύτητα της κρυστάλλωσης, αφού σε υψηλότερες θερμοκρασίες η διάχυση των ατμών λαμβάνει χώρα ταχύτερα, καταλήγοντας σε ανάπτυξη κακοσχηματισμένων μικροκρυστάλλων.

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας με πειράματα κρυστάλλωσης σε θερμοκρασίες από 8 έως 18 °C. Οι κρυσταλλώσεις στους 18 °C οδήγησαν στη ανάπτυξη μικρών κρυστάλλων μέσα σε τρεις μέρες με

στρογγυλεμένες ακμές. Στην παρακάτω εικόνα δείχνονται κρύσταλλοι οι οποίοι αναπτύχθηκαν στους 18 °C και 8 °C (σχήμα 31 A και B αντίστοιχα).



Σχήμα 31. Κρύσταλλοι της CP 47 οι οποίοι αναπτύχθηκαν σε, 25 mM Bis-Tris pH 6.0, 5% PEG 2000, 50 mM NaCl, 0.04% LM, διάλυμα δεξαμενής 300 mM NaCl και θερμοκρασία: 18°C (A), 8°C (B). Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.2 mm

Η ελάττωση της θερμοκρασίας στους 8 °C οδήγησε στην αύξηση του χρόνου κρυστάλλωσης και στην ανάπτυξη καλύτερου σχήματος κρυστάλλων. Η χαμηλή θερμοκρασία συνετέλεσε στην ελεγχόμενη ταχύτητα εξισορρόπησης, η οποία είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη καλύτερων κρυστάλλων. Στις ενδιάμεσες θερμοκρασίες δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην κρυστάλλωση, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες υπήρξε πρόβλημα στην συμπεριφορά του απορρυπαντικού.

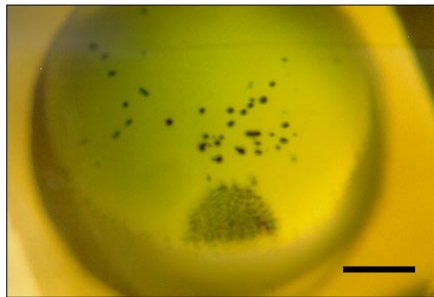
4.3.10 Επίδραση του αντιδραστηρίου καταβύθισης στην κρυστάλλωση της CP 47.

Η παρουσία του καταβυθιστικού είναι απαραίτητη στις κρυσταλλώσεις των μεμβρανικών πρωτεϊνών, αφού ο μικρός αριθμός πολικών περιοχών απαιτεί υψηλό βαθμό υπερκορεσμού για να λάβει χώρα η κρυστάλλωση. Ως αντιδραστήρια καταβύθισης στην κρυστάλλωση χρησιμοποιούνται άλατα, οργανικοί διαλύτες και διάφορα ευδιάλυτα πολυμερή.

Από τα παραπάνω καταβυθιστικά, οι PEG με διάφορα μοριακά βάρη έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχημένα για την ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων υποσυμπλόκων του PS II. Η PEG προκαλεί ήπια καταβύθιση χωρίς να μετουσιώνει

τις πρωτεΐνες του PS II διατηρώντας την φυσιολογική τους μορφή. Δοκιμάστηκαν PEG με μοριακά βάρη 6000, 4000, 3350, 2000 και αξιολογήθηκε η επίδραση τους στην πορεία της κρυστάλλωσης.

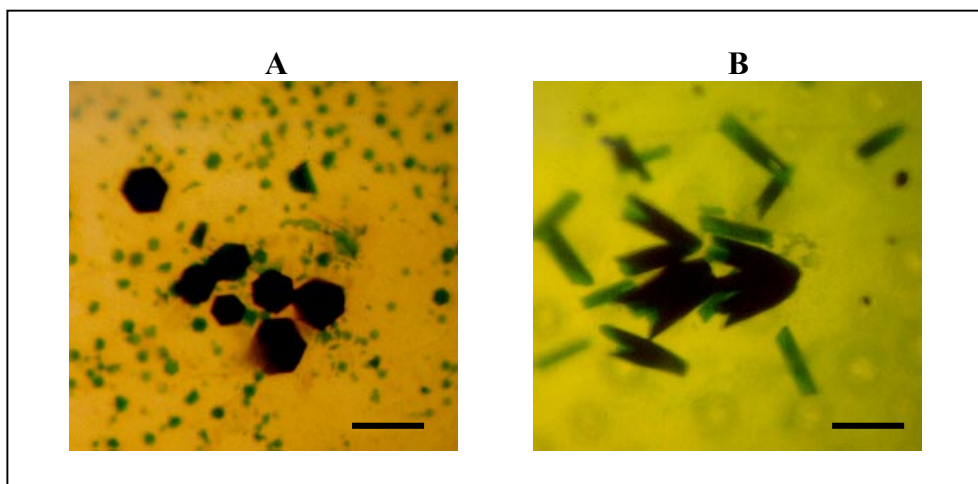
Οι πρώτοι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν με PEG 6000 είχαν μικρό μέγεθος και υπήρχε έντονος διαχωρισμός φάσης στο πρωτεϊνικό διάλυμα



Σχήμα 32. Κρύσταλλοι της CP 47 οι οποίοι αναπτύχθηκαν σε 25 mM Bis-Tris pH 6.0, PEG 6000, 50 mM NaCl, 0.04% LM, διάλυμα δεξαμενής 300 mM NaCl, 8 °C. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 1 mm.

Όπως φαίνεται στη παραπάνω εικόνα (σχήμα 32) ο διαχωρισμός φάσης οδήγησε στο σχηματισμό μιας φάσης πλούσιας σε απορρυπαντικό και πρωτεΐνη από την οποία αναπτύχθηκαν παραμορφωμένοι μικροκρύσταλλοι.

Η χρήση χαμηλότερου μοριακού βάρους PEG 4000 περιόρισε των διαχωρισμό φάσης αλλά οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν σε μορφή θυσάνων.



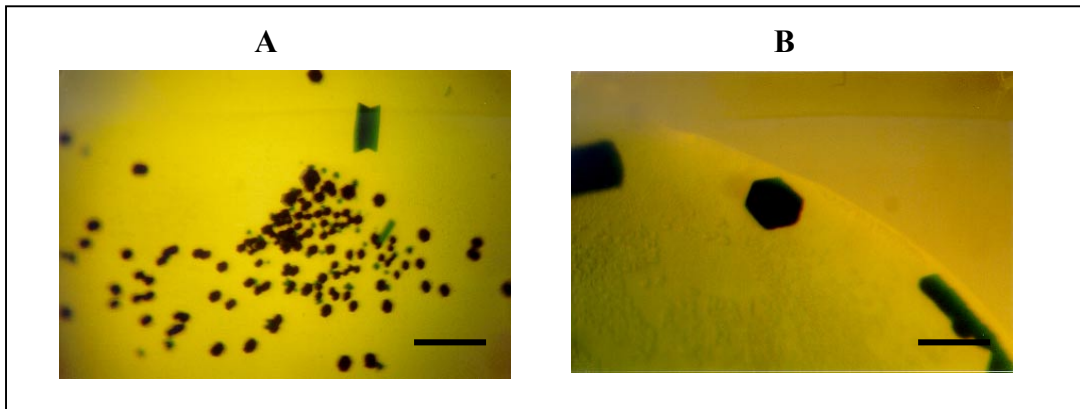
Σχήμα 33. Κρύσταλλοι της CP 47 που αναπτύχθηκαν σε 25 mM Bis-Tris pH 6.0, 50 mM NaCl, 0.04% LM, διάλυμα δεξαμενής 300 mM NaCl, 8 °C και καταβυθιστικό: PEG 2000 (A), PEG 4000 (B). Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.2 mm.

Οι καλύτεροι κρύσταλλοι ελήφθησαν με PEG 2000 με την οποία εξαφανίστηκε ο διαχωρισμός φάσης και αναπτύχθηκαν μεγαλύτεροι και καλύτερου σχήματος κρύσταλλοι.

4.3.11 Επίδραση της ιονικής ισχύος στη κρυστάλλωση της CP 47.

Η ιονική ισχύς της πρωτεϊνικής σταγόνας παίζει σημαντικό ρόλο στην κρυστάλλωση αφού σχετίζεται με τη διαλυτότητα του μακρομορίου και καθορίζει την ταχύτητα εξισορρόπησης με το διάλυμα δεξαμενής. Επιπλέον, τα ιόντα του άλατος μπορούν να μεσολαβήσουν στο σχηματισμό γεφυρών άλατος, που σταθεροποιούν το κρυσταλλικό πλέγμα.

Η προσθήκη 50-100 mM NaCl στην πρωτεϊνική σταγόνα επέφερε σημαντική βελτίωση στο μέγεθος των κρυστάλλων της CP 47. Στην παρακάτω εικόνα (σχήμα 34) δείχνονται κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν με ή χωρίς NaCl.

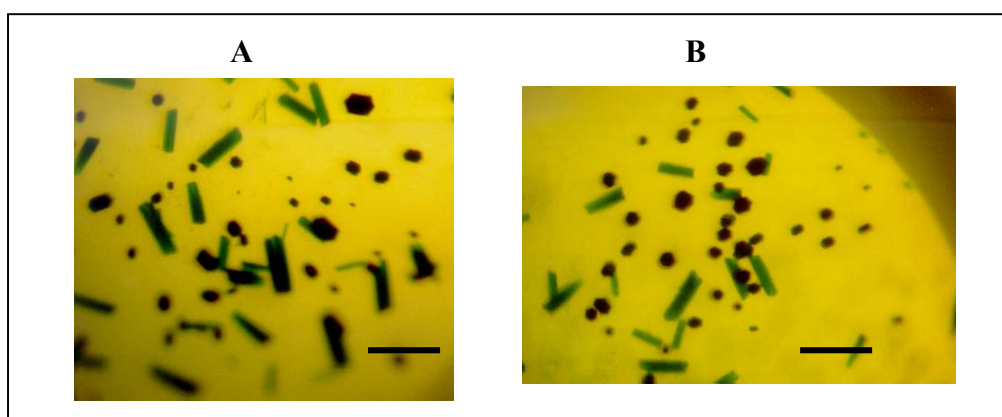


Σχήμα 34. Κρύσταλλοι της CP 47 οι οποίοι αναπτύχθηκαν σε 25 mM Bis-Tris pH 6.0, 5% PEG 2000, , 0.04% LM, διάλυμα δεξαμενής 300 mM NaCl, 8 °C και 0 mM NaCl (A), 50 mM NaCl (B). Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25 mm.

Η προσθήκη NaCl σε συγκέντρωση υψηλότερη από 100 mM έδρασε ανασταλτικά στη κρυστάλλωση της CP 47. Η παρουσία μικρής συγκέντρωσης άλατος στην πρωτεϊνική σταγόνα, πιθανόν να οδήγησε στην ελάττωση της διαφοράς

της ιονικής ισχύος μεταξύ του πρωτεϊνικού διαλύματος και του διαλύματος δεξαμενής, με αποτέλεσμα την πιο αργή και ελεγχόμενη επίτευξη ισορροπίας στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Επιπλέον ο μικρότερος αριθμός κρυστάλλων είναι ενδεικτικός του χαμηλότερου βαθμού υπερκορεσμού που είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό μικρού αριθμού πυρήνων.

Επιπλέον το NaCl επηρέασε θετικά τη σταθερότητα των κρυστάλλων, αφού οι κρύσταλλοι οι οποίοι αναπτύχθηκαν παρουσία άλατος, παραμένουν σταθεροί για περισσότερους από δύο μήνες (σχήμα 35 A).



Σχήμα 35. Κρύσταλλοι της CP 47 μετά από δύο μήνες οι οποίοι αναπτύχθηκαν παρουσία NaCl (A), απουσία NaCl (B). Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.25 mm.

Στην παραπάνω εικόνα (σχήμα 35 B) δείχνονται κρύσταλλοι χωρίς NaCl οι οποίοι διαλύθηκαν σε ένα μήνα.

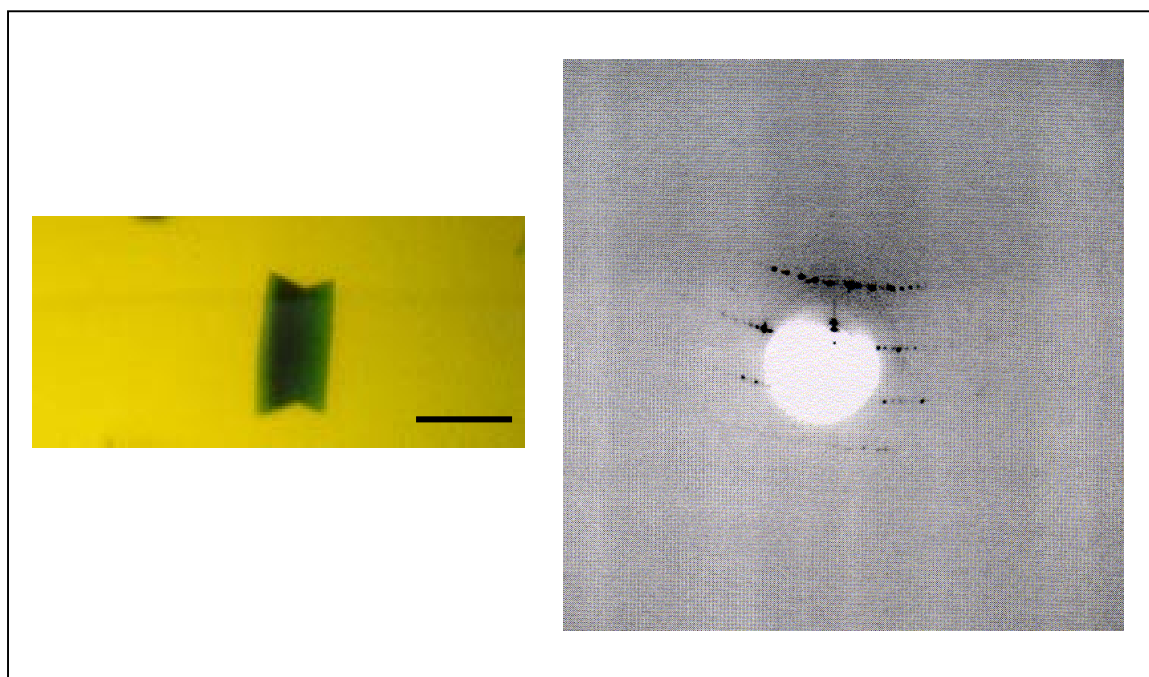
Συνδυάζοντας τις παρατηρήσεις που προέκυψαν από τη μελέτη των βασικών παραμέτρων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση, καταλήξαμε στις παρακάτω βέλτιστες συνθήκες.

PH	6.0
Θερμοκρασία	8°C
Αντιδραστήριο καταβύθισης	5% PEG 2000
Ιονική ισχύς	50 mM NaCl
Συγκέντρωση πρωτεΐνης	0.5 mg Chl/ml
Διάλυμα δεξαμενής	200-400 mM NaCl

4.3.12 Επίδραση του απορρυπαντικού στην ποιότητα των κρυστάλλων.

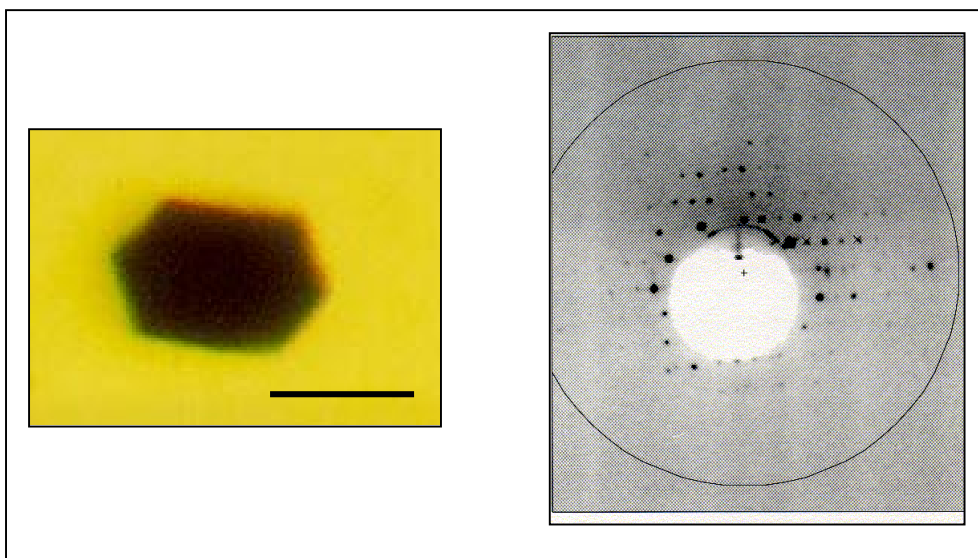
Οι συνθήκες κρυστάλλωσης οδήγησαν στην επαναλήψιμη παραγωγή κρυστάλλων, με μέγεθος ικανοποιητικό για πειράματα περίθλασης ακτίνων-X. Το απορρυπαντικό παίζει κρίσιμο ρόλο στην κρυστάλλωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, αφού το μέγεθος του μικκυλίου επηρεάζει την ποιότητα των κρυστάλλων. Δοκιμάστηκαν μια σειρά από απορρυπαντικά (Maltosides), με διαφορετικό μήκος υδρόφοβης αλυσίδας, με στόχο την ελάττωση ή αύξηση του μεγέθους του μικκυλίου το οποίο θα μπορούσε να επηρεάσει την ποιότητα των κρυστάλλων. Σε όλα τα απορρυπαντικά, εκτός το Tri-decylmaltoside, αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι οι οποίοι είχαν διαφορετική διακριτική ικανότητα.

Το nonylmaltoside (NM) ήταν το μικρότερο απορρυπαντικό της σειράς που δοκιμάστηκε αλλά η διακριτική ικανότητα των κρυστάλλων που αναπτύχθηκαν δε ξεπερνούσε τα 20 Å (σχήμα 36).



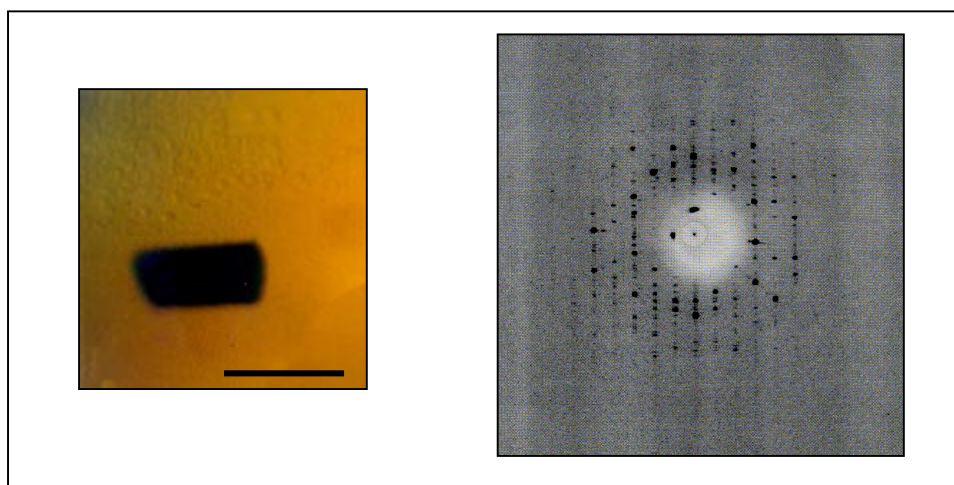
Σχήμα 36. Ραβδόμορφος κρύσταλλος της CP 47, ο οποίος αναπτύχθηκε στο απορρυπαντικό NM και διάγραμμα περίθλασης του κρυστάλλου. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.2 mm.

Το Decylmaltoside (DM), το οποίο έχει μία περισσότερη μεθυλομάδα στην υδρόφοβη αλυσίδα του, έδωσε κρυστάλλους καλύτερης ποιότητας. Η διακριτική ικανότητα των κρυστάλλων εκτείνεται στα 15 Å (σχήμα 37).



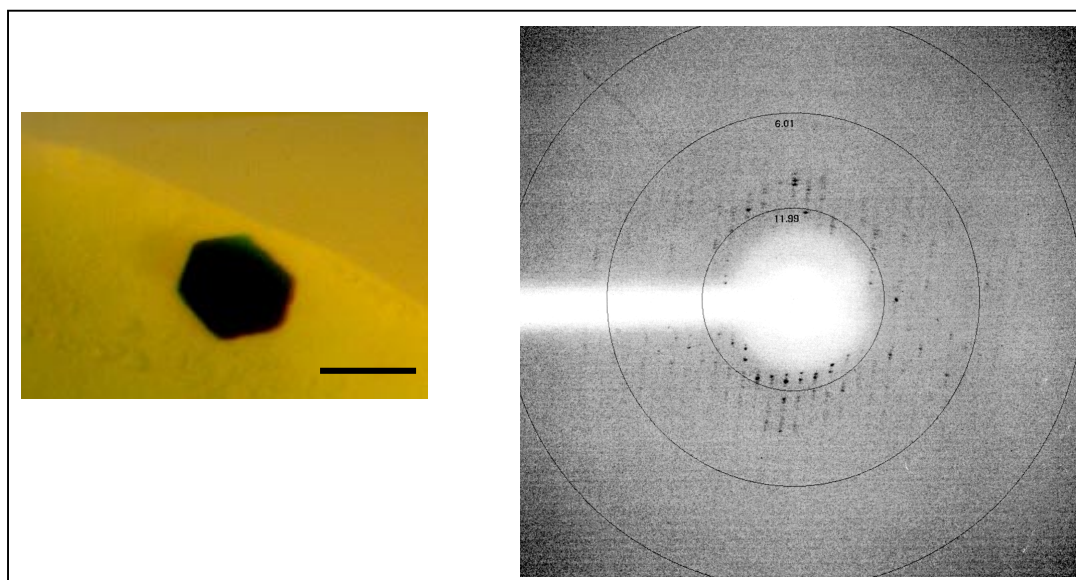
Σχήμα 37. Εξαγωνικός κρύσταλλος της CP 47 στο απορρυπαντικό DM και διάγραμμα περίθλασης του κρυστάλλου (ο κύκλος αντιστοιχεί στα 15 Å). Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί σε 0.2 mm.

Το αμέσως μεγαλύτερο απορρυπαντικό Undecylmaltoside (UM) έδωσε ακόμα καλύτερους κρυστάλλους με διακριτική ικανότητα γύρω στα 10 Å (σχήμα 38).



Σχήμα 38. Ραβδόμορφος κρύσταλλος της CP 47 στο απορρυπαντικό UM και διάγραμμα περίθλασης του κρυστάλλου. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί στα 0.2 mm.

Οι καλύτεροι κρύσταλλοι ελήφθησαν στο απορρυπαντικό Dodecylmaltoside (LM) οι οποίοι περιθλούσαν στα 4 Å περίπου (σχήμα 39).



Σχήμα 39. Εξαγωνικός κρύσταλλος της CP 47 στο απορρυπαντικό LM και διάγραμμα περίθλασης του κρυστάλλου. Το ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί στα 0.2 mm.

:

Πίνακας 4: Επίδραση του απορρυπαντικού στη διακριτική ικανότητα των κρυστάλλων της CP 47

<u>ΑΠΟΡΡΥΠΑΝΤΙΚΟ</u>	<u>CMC, mM</u>	<u>ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ</u>
NONYLMALTOSIDE	6.0	20 Å
DECYLMALTOSIDE	1.8	15 Å
UNDECYLMALTOSIDE	0.59	10 Å
DODECYLMALTOSIDE	0.15	4 Å
TRIDECYLMALTOSIDE	0.035	-

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα οι καλύτεροι κρύσταλλοι ελήφθησαν στο απορρυπαντικό Dodecylmaltoside, ενώ σε μικρότερα απορρυπαντικά η διακριτική

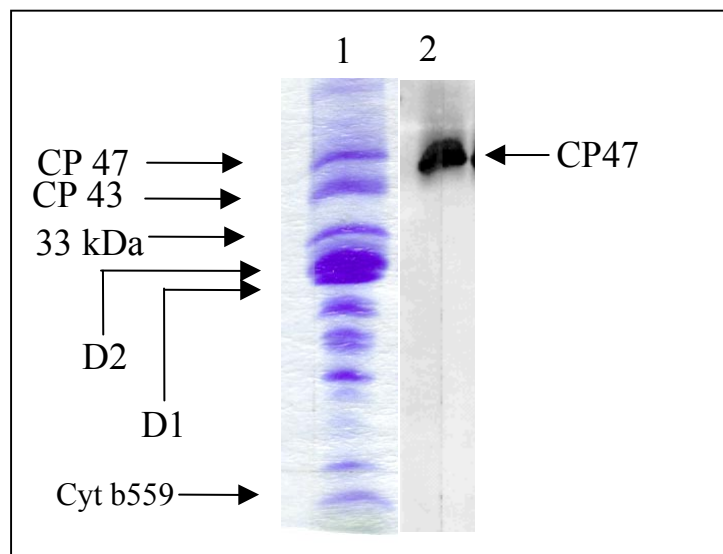
ικανότητα ήταν μικρότερη. Η μέγιστη διακριτική ικανότητα ήταν κοντά στα 4 Å, όμως ο μικρός αριθμός και η ανισοτροπία των ανακλάσεων δεν επέτρεψε την ανάλυση της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Για την βελτίωση των

κρυστάλλων δοκιμάστηκαν μικρά αμφίφιλα μόρια, τα οποία όμως δεν οδήγησαν σε καλύτερους κρυστάλλους.

4.3.13 Μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν τη σταθερότητα της CP 47

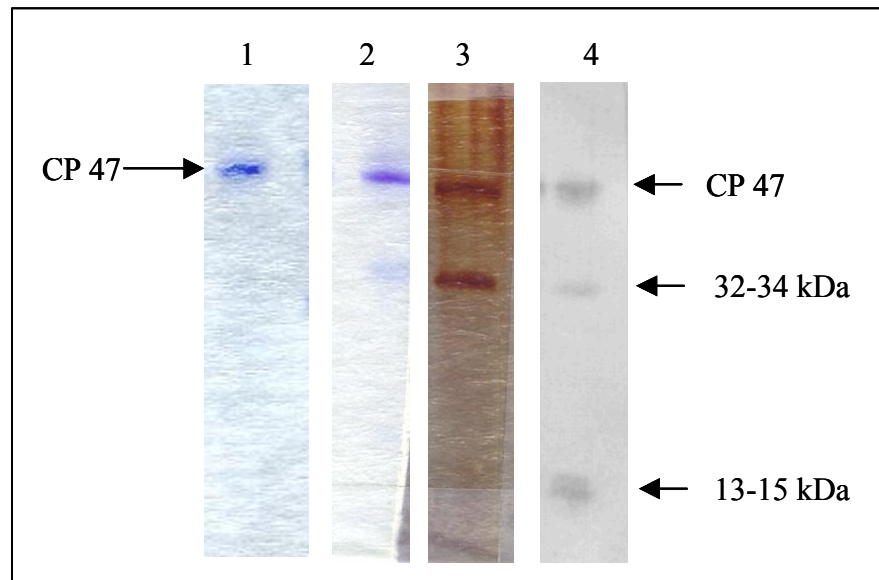
Παρά τη συστηματική μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την ποιότητα των κρυστάλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών, η ικανότητα περιθλάσης των κρυστάλλων της CP 47 παρέμενε χαμηλή. Η CP 47, πάρα την στενή της σύνδεση με το ενεργό κέντρο του PS II, δεν συμμετέχει άμεσα στην ροή ηλεκτρονίων και δεν υφίσταται διάσπαση όπως η D1 καθώς και άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται άμεσα στην ηλεκτρονιακή μεταφορά. Ωστόσο, ενδεχόμενη διάσπαση της CP 47 θα προκαλούσε ετερογένεια κατά την κρυστάλλωση, με συνέπεια την χαμηλή ικανότητα περιθλάσης των κρυστάλλων.

Για την επιλεκτική μελέτη της CP 47 παρασκευάστηκε αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει μόνο την συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Το αντίσωμα επιτρέπει την ανίχνευση θραυσμάτων της CP 47, τα οποία πιθανόν επικαλύπτονται από τις άλλες πρωτεΐνες του PS II με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Στο σχήμα 40 φαίνεται η επιλεκτική αναγνώριση της CP 47 στις μεμβράνες του PS II από το αντίσωμα.



Σχήμα 40. (1) Ηλεκτροφόρηση του PS II, (2) Ανοσοαποτύπωση της CP 47.

Για την μελέτη της σταθερότητας της CP 47, η πρωτεΐνη επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες όπου πραγματοποιήθηκε η κρυστάλλωση της, και η κατάσταση της εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση.

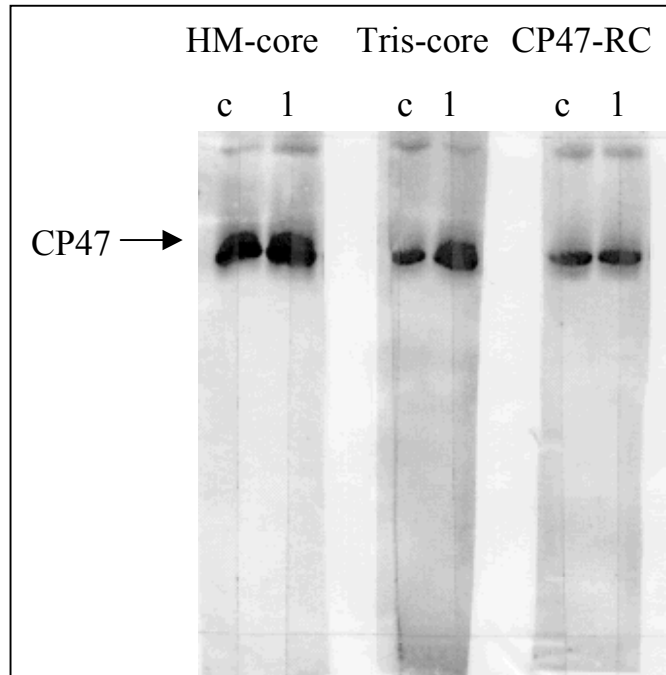


Σχήμα 41. Ηλεκτροφόρηση: (1) CP 47, (2) CP 47, η οποία επώαστηκε πέντε μέρες στις συνθήκες κρυστάλλωσης, (3) κρύσταλλος της CP 47 με χρώση αργύρου, (4) ανοσοαποτύπωση της CP 47 η οποία επώαστηκε πέντε μέρες στις συνθήκες κρυστάλλωσης.

Από τη μελέτη αυτή ανιχνεύτηκε η ύπαρξη μιας δεύτερης ζώνης, η οποία υπάρχει τόσο στην CP 47, που επώαστηκε πέντε μέρες στο σκοτάδι στους 8 °C, όσο και στο κρύσταλλο της CP 47 που αναπτύχθηκε στις ίδιες συνθήκες. Με την ανοσοαποτύπωση επιβεβαιώθηκε ότι η CP 47 διασπάται και προκύπτουν δύο επιπλέον θραύσματα, των οποίων το άθροισμα του μοριακού τους βάρους είναι περίπου 47 kDa (σχήμα 41). Η ύπαρξη θραυσμάτων στο κρύσταλλο της CP 47 μπορεί να εξηγήσει τις ατέλειες στο κρυσταλλικό πλέγμα που ευθύνονται για την χαμηλή ποιότητα των κρυστάλλων.

Προκειμένου να εντοπισθεί το στάδιο στο οποίο λαμβάνει χώρα η διάσπαση της CP 47, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον έλεγχο σταθερότητας της πρωτεΐνης στα επιμέρους σύμπλοκα που απομονώνονται κατά τα διάφορα στάδια του πρωτοκόλλου.

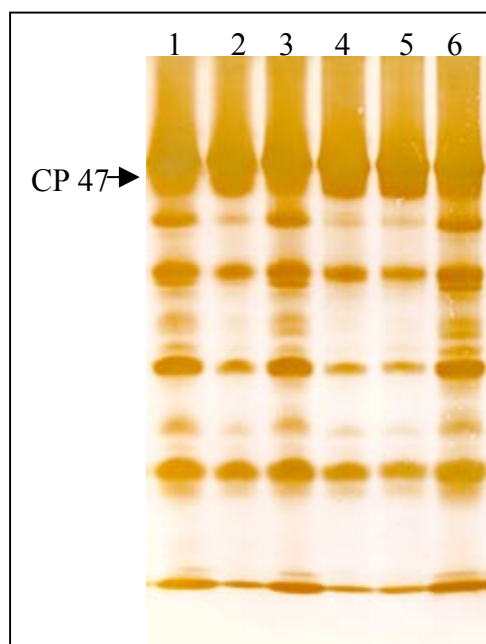
Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών, τα υποσύμπλοκα HM-core, Tris-core και το μικρότερο υποσύμπλοκο στο οποίο η CP 47 είναι δεσμευμένη με τις πρωτεΐνες του ενεργού κέντρου, επωάστηκαν στο σκοτάδι και η κατάσταση της CP 47 εξετάστηκε με ανοσοαποτύπωση.



Σχήμα 42. HM-core: (c), HM-core το οποίο επωάστηκε πέντε μέρες στο σκοτάδι (1), Tris-core (c), Tris-core το οποίο επωάστηκε πέντε μέρες στο σκοτάδι (1), CP 47-RC (c), CP 47-RC το οποίο επωάστηκε πέντε μέρες στο σκοτάδι (1).

Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι η CP 47 παραμένει σταθερή στα διάφορα υποσύμπλοκα και η διάσπαση ξεκινάει όταν απομονωθεί στο διάλυμα (σχήμα 42). Η διάσπαση των πρωτεϊνών μπορεί να αποδοθεί σε πρωτεόλυση ή στη δράση ελευθέρων ριζών. Η παρουσία ελευθέρων ριζών, και ιδιαιτέρως του οξυγόνου απλής κατάστασης, είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην διάσπαση των πρωτεϊνών του PS II κάτω από συνθήκες έντονου φωτισμού. Από τα παραπάνω πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν στο σκοτάδι αποκλείστηκε η πιθανότητα διάσπασης της CP 47 από ελεύθερες ρίζες. Για τον λόγο αυτό η μελέτη επικεντρώθηκε στην επίδραση πρωτεολυτικών αναστολέων διαφόρων τύπων πρωτεασών στη διάσπαση της CP 47. Η απομονωμένη CP 47 επωάστηκε πέντε μέρες στο σκοτάδι, παρουσία

πρωτεολυτικών αναστολέων και η κατάσταση της αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση (σχήμα 43).



Σχήμα 43. Ανοσοαποτύπωση της CP 47 η οποία επώαστηκε πέντε μέρες στο σκοτάδι στους 8°C, παρουσία αναστολέα: (1) EDTA, (2) PMSF, (3) Pepstatin, (4) Leupeptin, (5) α₂-macroglobulin, (6) χωρίς αναστολέα.

Από την μελέτη αυτή αποκαλύφθηκε ότι CP 47 απουσία αναστολέα (ζώνη 6) διασπάται και προκύπτουν τέσσερα θραύσματα, τα οποία στη συνέχεια διασπώνται σε ακόμη μικρότερα. Η παρουσία πρωτεολυτικών αναστολέων δεν παρεμπόδισε την διάσπαση της πρωτεΐνης (πίνακας 5). Αναστολείς σερινοπρωτεασών, όπως το PMSF, παρεμποδίζουν την περαιτέρω διάσπαση των τεσσάρων κύριων θραυσμάτων της CP 47.

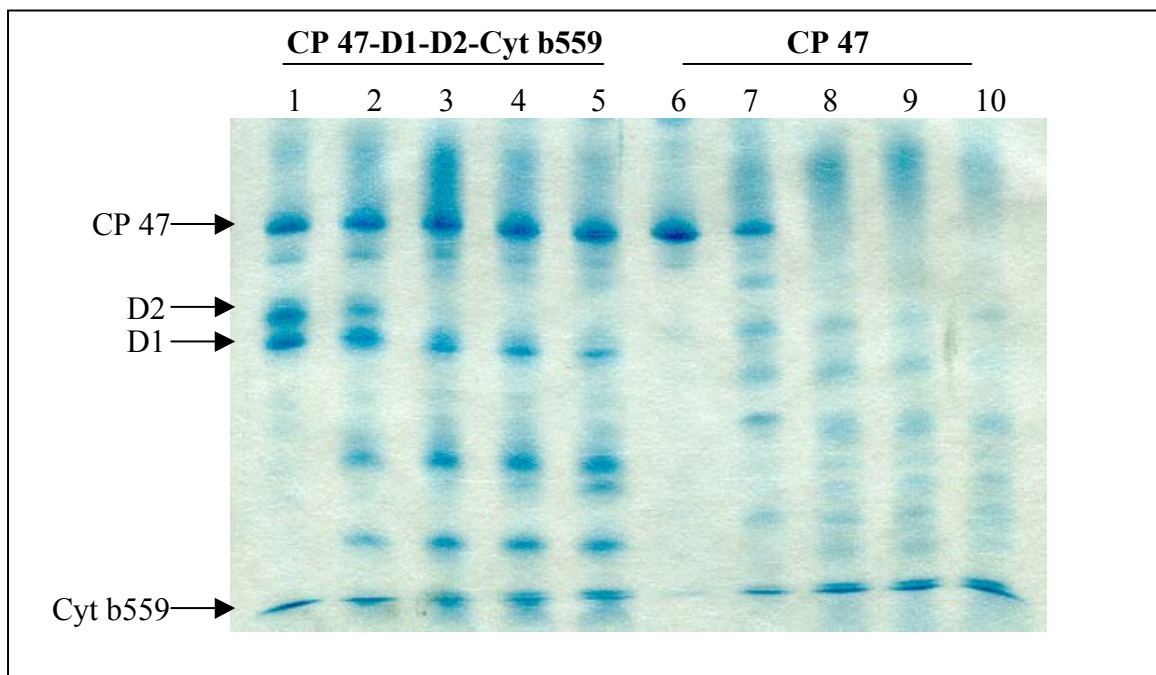
Πίνακας 5: Δράση των πρωτεολυτικών αναστολέων στη διάσπαση της CP 47

<u>Πρωτεολυτικός αναστολέας</u>	<u>Πρωτεάσες</u>	<u>Αποτελέσματα</u>
PMSF	Σερινοπρωτεάσες	Μερική αναστολή
EDTA	Μεταλλοπρωτεάσες	Μη αναστολή
Pepstatin	Όξινες πρωτεάσες	Μη αναστολή
Leupeptin	Ευρέως φάσματος	Μερική αναστολή
α ₂ -macroglobulin	Ενδοπρωτεάσες	Μερική αναστολή

4.3.14 Δομική μελέτη της CP 47 με επιλεκτική πρωτεόλυση.

Από τις μελέτες σταθερότητας αποκαλύφθηκε ότι η CP 47 παραμένει σταθερή όταν είναι συνδεδεμένη ακόμη και στο σύμπλοκο του ενεργού κέντρου, και η αποικοδόμηση της ξεκινά με την απομόνωση της στο διάλυμα. Η διάσπαση της CP 47 μπορεί να συνδέεται με κάποια αλλαγή στη διαμόρφωση της όταν αποσυνδέεται από το σύμπλοκο, η οποία οδηγεί στην αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Είναι πιθανό ακόμη οι πρωτεΐνες του ενεργού κέντρου να προστατεύουν την CP 47, καλύπτοντας κάποιες ευαίσθητες θέσεις οι οποίες αποκαλύπτονται κατά την απομόνωση της πρωτεΐνης.

Με στόχο την ανίχνευση δομικών αλλαγών στην CP 47, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επιλεκτικής πρωτεόλυσης με θρυψίνη. Τα πειράματα αυτά βασίζονται στην ικανότητα της θρυψίνης να διασπά ορισμένες περιοχές των πρωτεϊνών μόνο όταν είναι εκτεθειμένες στο υδατικό περιβάλλον. Η τεχνική αυτή παρέχει την δυνατότητα αναγνώρισης δομικών αλλαγών οι οποίες προκαλούνται με βιοχημικές επεξεργασίες.



Σχήμα 44. Ηλεκτροφόρηση του συμπλόκου CP 47-RC το οποίο επεξεργάστηκε με θρυψίνη για χρόνο: (1) 0 λεπτά, (2) 15 λεπτά, (3) 30 λεπτά, (4) 60 λεπτά, (5) 120 λεπτά. Ηλεκτροφόρηση της CP 47 η οποία επεξεργάστηκε με θρυψίνη για χρόνο: (6) 0 λεπτά, (7) 15 λεπτά, (8) 30 λεπτά, (9) 60 λεπτά, (10) 120 λεπτά.

Στο πείραμα αυτό, το σύμπλοκο CP 47-D1-D2-Cyt b559 και η απομονωμένη CP 47, επώαστηκαν με θρυψίνη και η πολυπεπτιδική σύσταση αναλύθηκε σε τακτά χρονικά διαστήματα με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Όπως φαίνεται από το gel η CP 47 δε διασπάται όταν συνδέεται στο σύμπλοκο, ακόμα και μετά από δύο ώρες επώασης με θρυψίνη. Αντίθετα η απομονωμένη CP 47 αποικοδομείται ταχύτατα και μέσα στα δέκα πέντε πρώτα λεπτά έχει διασπαστεί κατά 50% (σχήμα 44).

Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι πράγματι η CP 47 όταν συνδέεται με το υπόλοιπο σύμπλοκο προστατεύεται από την πρωτεολυτική διάσπαση. Η προστασία αυτή μπορεί να αποδοθεί είτε σε άμεση κάλυψη των ευαίσθητων περιοχών της CP 47 από τις πρωτεΐνες του ενεργού κέντρου είτε σε αλλαγή της διαμόρφωσης που οδηγεί στην απόκρυψη των περιοχών αυτών από το υδατικό περιβάλλον.

4.3.15 Μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την σταθερότητα των υποσυμπλόκων του PS II.

Η ευαισθησία των πρωτεϊνών του PS II και ιδιαίτερα της D1 είναι γνωστή, αφού κάτω από ισχυρές συνθήκες φωτισμού υφίσταται αποικοδόμηση [113-117]. Από τις παραπάνω μελέτες προέκυψε ότι η CP 47, η οποία είναι από τις πιο σταθερές πρωτεΐνες του PS II, διασπάται μετά την απομόνωση της κατά την παραμονή της στο σκοτάδι. Η σταθερότητα της πρωτεΐνης συνδέεται άμεσα με την ποιότητα των κρυστάλλων και είναι απαραίτητος ο εντοπισμός και η αναστολή των παραγόντων που προκαλούν την αποικοδόμηση. Με σκοπό την μελέτη των παραγόντων που ευθύνονται για την διάσπαση των πρωτεϊνών του PS II στο σκοτάδι πραγματοποιήθηκαν μελέτες σταθερότητας για τα υποσύμπλοκα του.

Για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση των θραυσμάτων της D1 πρωτεΐνης σε διάφορα υποσύμπλοκα. Η διάσπαση της D1 σε συνθήκες έντονου φωτισμού έχει μελετηθεί εκτεταμένα και είναι γνωστή για την ευαισθησία της. Πιστεύεται ότι, ενεργές μορφές οξυγόνου εμπλέκονται στην διάσπαση των πρωτεϊνών του PS II, οι οποίες είναι δυνατό να παραχθούν σε συνθήκες φωτοαναστολής. Επίσης πιστεύεται ότι είναι πιθανό η διάσπαση να προκαλείται από μία πρωτεάση, η οποία είναι συνδεδεμένη με το PS II.

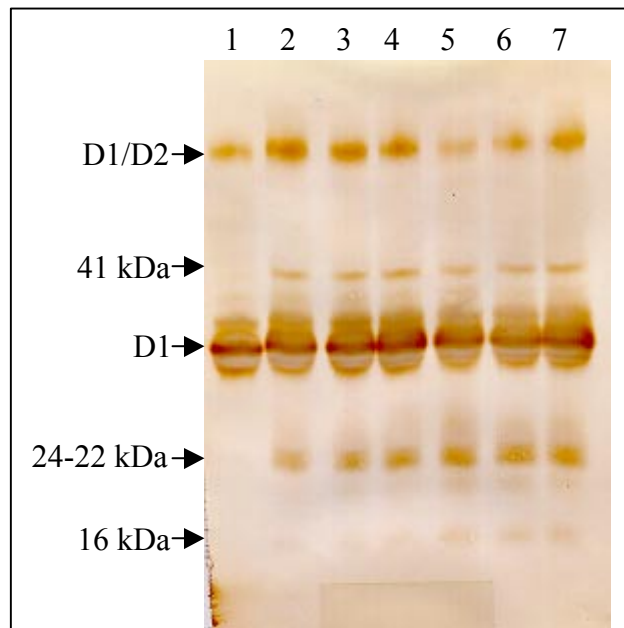
Με σκοπό τη μελέτη και αναστολή των παραγόντων που προκαλούν την διάσπαση της D1 στο σκοτάδι πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία τα

υποσύμπλοκα του PS II επώαστηκαν πέντε μέρες στο σκοτάδι στους 8 °C, παρουσία ουσιών που δρουν ως εξειδικευμένοι αποσβέστες ενεργών μορφών οξυγόνου είτε ως αναστολείς πρωτεασών (πίνακας 6).

Πίνακας 6: *Αποσβέστες ενεργών μορφών οξυγόνου και αναστολείς πρωτεασών*

Αποσβέστης	Δραστικότητα
Ιστιδίνη	Αποσβέστης οξυγόνου απλής κατάστασης
n-propyl gallate	Αποσβέστης ριζών υδροξυλίου
Καταλάση	Αποσβέστης H ₂ O ₂
α ₂ -macroglobulin	Αναστολέας ενδοπρωτεασών
PMSF	Αναστολέας σερινοπρωτεασών

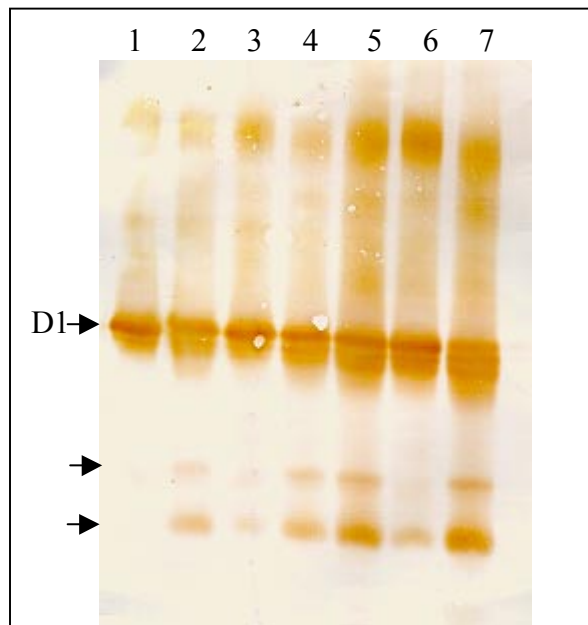
Το υποσύμπλοκο HM-core επώαστηκε στο σκοτάδι παρουσία των αναστολέων και η D1 πρωτεΐνη χαρακτηρίστηκε με ανοσοαποτύπωση.



Σχήμα 45. Ανοσοαποτύπωση της D1 στο σύμπλοκο HM-core το οποίο επώαστηκε στο σκοτάδι για: (1) μηδέν μέρες, (2) πέντε μέρες παρουσία καταλάσης, (3) πέντε μέρες παρουσία PMSF (4) πέντε μέρες παρουσία ιστοιδίνης, (5) πέντε μέρες παρουσία n-propyl gallate, (6) πέντε μέρες παρουσία α₂-macroglobulin, (7). πέντε μέρες χωρίς αναστολέα.

Όπως φάνηκε από τη μελέτη, η D1 πρωτεΐνη διασπάται στο σκοτάδι και προκύπτουν δύο θραύσματα με μοριακό βάρος 22 και 16 kDa (σχήμα 45). Επιπλέον εμφανίστηκε μία καινούρια ζώνη στα 41 kDa, η οποία αποδίδεται στην σύνδεση της D1 με το Cyt b559. Οι παρατηρήσεις αυτές ταυτίζονται με την συμπεριφορά της D1 κάτω από συνθήκες φωτοαναστολής, όπου ενεργές μορφές οξυγόνου ευθύνονται για την διάσπαση της καθώς και για την δημιουργία συσσωματωμάτων. Όμως ούτε οι αποσβέστες ενεργών μορφών οξυγόνου, ούτε ο πρωτεολυτικός αναστολέας παρεμπόδισαν την αποικοδόμηση της D1.

Την παραπάνω μελέτη επαναλάβαμε στο ενεργό κέντρο του PS II, το οποίο αποτελεί το μικρότερο υποσύμπλοκο του PS II.



Σχήμα 46. Ανοσοαποτύπωση της D1 πρωτεΐνης στο σύμπλοκο D1-D2-Cyt b559, το οποίο επώαστηκε στο σκοτάδι στους 8°C για: (1) μηδέν μέρες, (2) πέντε μέρες παρουσία καταλάσης, (3) πέντε μέρες παρουσία PMSF, (4) πέντε μέρες παρουσία ιστιδίνης, (5) πέντε μέρες παρουσία n-propyl gallate, (6) πέντε μέρες παρουσία α_2 -macroglobulin, (7) πέντε μέρες χωρίς αναστολέα.

Από τη μελέτη φάνηκε ότι η D1 πρωτεΐνη διασπάται ακόμα και στο πιο μικρό υποσύμπλοκο του PS II (σχήμα 46). Μάλιστα οι αναστολείς πρωτεασών παρεμπόδισαν σε μεγάλο βαθμό την διάσπαση της D1, σε αντίθεση με τους αποσβέστες ενεργών μορφών οξυγόνου.

4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρά το γεγονός ότι η δομική μελέτη του PS II των ανωτέρων φυτών αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας, σε παγκόσμιο επίπεδο, τα τελευταία 20 χρόνια, το μεμβρανικό αυτό πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο παραμένει από το πιο αινιγματικά σημεία της φωτοσύνθεσης. Έμμεσες βιοχημικές μελέτες έχουν αποκαλύψει πληροφορίες σχετικά με την τοπολογία και σύνδεση των πρωτεϊνών μέσα στο σύμπλοκο του PS II [52, 53]. Τα τελευταία χρόνια μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν δώσει μια εικόνα για την μορφή του συμπλόκου στο επίπεδο της τεταρτοταγούς δομής [129]. Μέχρι σήμερα απουσιάζει ένα μοντέλο του PS II το οποίο θα απεκαλύπτε τη δομή του σε μοριακό επίπεδο. Οι μόνες πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή του PS II των ανωτέρων φυτών, προέρχονται από τον συσχετισμό με τη δομή του ενεργού κέντρου των μωβ βακτηρίων, η οποία έχει αποκαλυφθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X [1-3].

Η απομόνωση και κρυστάλλωση υποσυμπλόκων του PS II αποτελεί αντικείμενο μελέτης του εργαστηρίου μας τα τελευταία 15 χρόνια [118, 119]. Από τις μελέτες αυτές επιτεύχθηκε η ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων για διάφορα υποσύμπλοκα του PS II, η διακριτική ικανότητα των οποίων δεν επέτρεψε την ανάλυση της δομής του με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Η χαμηλή ικανότητα περίθλασης των κρυστάλλων αποδόθηκε στις ετερογενείς δυνάμεις που συγκρατούν τις πρωτεΐνες δεσμευμένες στο σύμπλοκο. Αυτό έχει ως συνέπεια την αποδέσμευση των πρωτεϊνών από το υπόλοιπο σύμπλοκο σε ακραίες συνθήκες κατά την κρυστάλλωση, και τελικά την ετερογένεια του συμπλόκου που ευθύνεται για την κακή ποιότητα των κρυστάλλων.

Στην παρούσα εργασία στόχος ήταν η απομόνωση των πιο σταθερών υποσυμπλόκων και πρωτεϊνών με τελικό σκοπό την ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων και ανάλυση της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Επιχειρήθηκε για πρώτη φορά η κρυστάλλωση μιας απομονωμένης μεμβρανικής πρωτεΐνης (CP 47) και του συμπλόκου του ενεργού κέντρου (D1-D2-Cyt b559) του PS II.

Απομόνωση της CP 47 και του ενεργού κέντρου (RC).

Απαραίτητη προϋπόθεση για την κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης είναι η απομόνωση της σε καθαρή και ομοιογενή κατάσταση. Το πρωτόκολλο απομόνωσης θα πρέπει να διασφαλίζει την ποσοτική απομόνωση της πρωτεΐνης διατηρώντας την

σε ομοιογενή και σταθερή κατάσταση. Επιπλέον στη περίπτωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών σημαντική θέση στο πρωτόκολλο απομόνωσης κατέχει η επιλογή του απορρυπαντικού για την διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης. Το πρωτόκολλο απομόνωσης το οποίο αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία στηρίχθηκε στην σταδιακή απομάκρυνση των περιφερειακών πρωτεϊνών και εμπλουτισμό των πρωτεϊνών του ενδιαφέροντος μας. Τα απορρυπαντικά LM και OTG που χρησιμοποιήθηκαν είναι γνωστά για την ικανότητα τους να διαλυτοποιούν τις πρωτεΐνες του PS II χωρίς να τις μετουσιώνουν. Δοκιμάσθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις των δύο απορρυπαντικών με στόχο την απομάκρυνση των CPs και της CP 43, και τον εμπλουτισμό του συμπλόκου CP 47-D1-D2-Cyt b559. Η τεχνική υπερφυγοκέντρησης σε γραμμική διαβάθμιση σουκρόζης επέτρεψε την εκτίμηση της δράσης των απορρυπαντικών στο σύμπλοκο καθώς και τον ποσοτικό διαχωρισμό των υποσυμπλόκων και πρωτεϊνών που προκύπτουν. Από τις δοκιμές αυτές φάνηκε ότι η ανάμιξη των δύο απορρυπαντικών σε ορισμένη αναλογία, οδήγησε στην επιλεκτική απομάκρυνση των CPs και CP 43 από το υπόλοιπο σύμπλοκο, επιτρέποντας έτσι τον εμπλουτισμό του συμπλόκου CP 47-D1-D2-Cyt b559 σε ένα στάδιο. Από το σύμπλοκο αυτό απομονώθηκε η CP 47 και το σύμπλοκο D1-D2-Cyt b559 σε ομοιογενή και καθαρή κατάσταση, όπως επιβεβαιώθηκε από την ηλεκτροφόρηση και τα φάσματα απορρόφησης.

Κρυστάλλωση του D1-D2-Cyt b559 και της CP 47.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την κρυστάλλωση του συμπλόκου D1-D2-Cyt b559 χωρίς όμως να επιτευχθεί η ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην μεγάλη υδροφοβικότητα του συμπλόκου, που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη των απαραίτητων πολικών αλληλεπιδράσεων για την συγκράτηση του κρυσταλλικού πλέγματος [38, 39]. Παρά την ομοιότητα των D1 και D2 με τις L και M υπομονάδες, το ενεργό κέντρο των βακτηρίων *R. viridis* περιέχει δύο επιπλέον υδρόφιλες πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στο σχηματισμό ηλεκτροστατικών δεσμών που σταθεροποιούν τον κρύσταλλο.

Η CP 47 είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία όμως έχει μεγάλες υδρόφιλες περιοχές που είναι ικανές να οδηγήσουν σε τρισδιάστατους κρυστάλλους [66]. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε στην παρούσα εργασία με την κρυστάλλωση για πρώτη φορά της CP 47. Η συστηματική μελέτη των κυριότερων παραμέτρων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση γενικά των πρωτεϊνών, οδήγησε στην επαναλήψιμη ανάπτυξη τρισδιάστατων κρυστάλλων της CP 47. Ο συνδυασμός των βέλτιστων

συνθηκών που προέκυψαν από τα πειράματα, είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή κρυστάλλων, το μέγεθος των οποίων ήταν ικανοποιητικό για πειράματα περίθλασης ακτίνων-X. Για την βελτίωση της ικανότητας περίθλασης των κρυστάλλων δοκιμάστηκαν διάφορα απορρυπαντικά και αμφίφιλα μόρια τα οποία είναι γνωστό ότι παίζουν κρίσιμο ρόλο στη κρυστάλλωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Η μέγιστη διακριτική ικανότητα των κρυστάλλων ήταν κοντά στα 4Å, όμως ο μικρός αριθμός και η ανισοτροπία των ανακλάσεων δεν επέτρεψε την ανάλυση της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X.

Μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν τη σταθερότητα της CP 47 και της D1 πρωτεΐνης.

Η χαμηλή ικανότητα περίθλασης των κρυστάλλων της CP 47 μπορεί να αποδοθεί στη διάσπαση της πρωτεΐνης κατά την κρυστάλλωση της. Από τα πειράματα μας προέκυψε ότι η πρωτεΐνη διασπάται και μάλιστα η αποικοδόμηση της ξεκινούσε αμέσως μετά την αποδέσμευση της από το σύμπλοκο του ενεργού κέντρου. Είναι γνωστή η ευαισθησία των πρωτεϊνών του PS II, ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες έντονου φωτισμού. Η CP 47 παρά την στενή της σύνδεση με τις πρωτεΐνες του ενεργού κέντρου είναι ιδιαίτερα σταθερή χωρίς να υφίσταται αποικοδόμηση παρά μόνο σε ακραίες συνθήκες. Από την εργασία μας προέκυψε ότι η CP 47 σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού παραμένει σταθερή εφόσον είναι δεσμευμένη πάνω στο πυρήνα. Όταν όμως η πρωτεΐνη αποδεσμεύεται, υφίσταται διάσπαση, η οποία εξελίσσεται στο σκοτάδι. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι στη διάσπαση των πρωτεϊνών του ενεργού κέντρου εμπλέκονται ενεργές μορφές οξυγόνου, που παράγονται σε συνθήκες φωτισμού, ενώ στο σκοτάδι η αποικοδόμηση τους αποδίδεται κυρίως σε πρωτεάσες [113-117]. Από τις μελέτες μας προέκυψε ότι η διάσπαση της CP 47 αναστέλλεται μερικώς με αναστολείς σερινοπρωτεασών. Έμμεσες δομικές μελέτες με θρυψίνη απεκάλυψαν ότι η CP 47 έχει διαφορετική δομή όταν είναι δεσμευμένη πάνω στο σύμπλοκο, και η απελευθέρωση της στο διάλυμα είναι πιθανό να συνοδεύεται από αλλαγές στη δομή της, που μπορεί να συνδέονται με την αποσταθεροποίηση της.

Τις μελέτες σταθερότητας επεκτείναμε και σε υποσύμπλοκα του PS II εξετάζοντας την κατάσταση της πιο ευαίσθητης πρωτεΐνης (D1) απουσία φωτός. Από τα πειράματα αυτά αποκαλύφθηκε ότι η D1 πρωτεΐνη διασπάται στο σκοτάδι και η αποικοδόμηση της δεν αναστέλλεται από ουσίες που δρουν ως εξειδικευμένοι αποσβέστες ενεργών μορφών οξυγόνου. Αναστολείς σερινοπρωτεασών

παρεμπόδισαν μερικώς την διάσπαση της D1 μόνο σε διαλυτοποιημένα υποσύμπλοκα του PS II. Από τις έμμεσες αυτές μελέτες φάνηκε ότι η διάσπαση των πρωτεϊνών του PS II στο σκοτάδι είναι πρωτεολυτικής φύσης, όπως έχει προταθεί και στο παρελθόν. Πιστεύεται ότι υπάρχει μία εσωτερική πρωτεάση στο PS II που είναι υπεύθυνη για την πλήρη αποικοδόμηση της D1 πρωτεΐνης κατά το φαινόμενο της φωτοαναστολής *in vivo* [130]. Η πρωτεάση αυτή μπορεί να είναι ακόμα και μία ή περισσότερες υπομονάδες του PS II, η οποία όμως δεν έχει εντοπισθεί ως σήμερα.

Από την μελέτη αυτή αποκαλύφθηκε ότι η D1 πρωτεΐνη διασπάται στο σκοτάδι ακριβώς στις ίδιες θέσεις με εκείνες κατά την αποικοδόμηση της σε συνθήκες φωτοαναστολής [131]. Προκύπτει λοιπόν ότι οι πρωτεΐνες του PS II διαθέτουν συγκεκριμένες θέσεις διάσπασης, προσδίδοντας τους ιδιαίτερη ευαισθησία κατά την απομόνωση του συστήματος. Σε αυτές τις ιδιομορφίες μπορεί να αποδοθεί η χαμηλή διακριτική ικανότητα των κρυστάλλων του PS II από ανώτερα φυτά, παρά τις εκτεταμένες προσπάθειες για την κρυστάλλωση του. Μέχρι σήμερα οι προσπάθειες για την ανάλυση της δομής του PS II των ανωτέρων φυτών έχουν ανασταλεί λόγω της χαμηλής διακριτικής ικανότητας των κρυστάλλων. Οι καλύτεροι κρύσταλλοι έχουν προκύψει από θερμόφιλα βακτήρια, το PS II των οποίων, δεν εμφανίζει τις ιδιομορφίες του φωτοσυστήματος II των ανωτέρων φυτών.

5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΤΟΥ PS II

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των φωτοσυνθετικών οργανισμών είναι η ύπαρξη του ενεργού κέντρου στο οποίο λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός φορτίου και πραγματοποιείται η μετατροπή της ηλιακής σε χημική ενέργεια. Τα φωτοσυνθετικά κέντρα ταξινομούνται με βάση την φύση του μορίου που αποτελεί τον τελικό ηλεκτρονιοδέκτη στο σύμπλοκο. Στα ενεργά κέντρα Q-τύπου (type II), ο τελικός δέκτης είναι μία κινόνη και συναντώνται στα μωβ βακτήρια, στο PS II των κυανοβακτηρίων και ανώτερων φυτών. Τα κέντρα Σιδήρου-Θείου (type I) ανάγουν ένα σύστημα Fe-S και εντοπίζονται στα πράσινα θειούχα βακτήρια και στο PS I των ανωτέρων φυτών [132]

Το ενεργό κέντρο των ανωτέρων φυτών του PS II αποτελείται από πέντε υπομονάδες, τις D1, D2, το Cyt b559 (το οποίο συνίσταται από δύο υπομονάδες Psb E και Psb F) και μία μικρότερη γνωστή ως PsbI πρωτεΐνη, ο ρόλος της οποίας παραμένει άγνωστος. Οι πρωτεΐνες D1 και D2 έχουν μελετηθεί περισσότερο και πιστεύεται ότι περιέχουν όλους τους απαραίτητους συμπράγοντες για να λάβει χώρα η ηλεκτρονιακή ροή στο PS II. Στο ετεροδιμερές των D1 και D2 εντοπίζονται ο πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης P680, οι δέκτες Pheo, Q_A, Q_B, ο μη αιμικός σίδηρος και τα οξειδοαναγωγικά αμινοξέα TyrZ, TyrD [133]. Το Cyt b559 πιστεύεται ότι είναι απαραίτητο για την δομική οργάνωση του PS II και ότι συμμετέχει στην κυκλική ροή ηλεκτρονίων, αφού μπορεί να φωτοξειδωθεί από το P680 και να φωτοαναχθεί από την πλαστοκινόλη [134, 135].

Τα ενεργά κέντρα από ανώτερα φυτά, πράσινα άλγη και κυανοβακτήρια έχουν απομονωθεί και μελετηθεί εκτεταμένα με βιοχημικές και βιοφυσικές μεθόδους [136-140]. Σημαντικές δομικές πληροφορίες για το ενεργό κέντρο των ανωτέρων φυτών προέκυψαν από τον συσχετισμό του με το ενεργό κέντρο των μωβ βακτηρίων, η δομή του οποίου είναι γνωστή σε ατομικό επίπεδο [141]. Μελέτες βασιζόμενες στις αμινοξικές ομοιότητες των πρωτεϊνών του ενεργού κέντρου του PS II και των

βακτηρίων συνετέλεσαν στην σχεδίαση ενός τρισδιάστατου μοντέλου για το ετεροδιμερές των D1 και D2 [142-145]. Επιπλέον, πρόσφατα δημοσιεύθηκε ένας ηλεκτρονιακός χάρτης με διακριτική ικανότητα 0.8 nm για το σύμπλοκο CP 47-D1-D2, παρέχοντας δομικές πληροφορίες χαμηλής διακριτικής ικανότητας για το PS II [146].

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η δομική μελέτη του ενεργού κέντρου του PS II, το οποίο απομονώθηκε από σπανάκι. Η μάζα του συμπλόκου υπολογίστηκε με δύο ανεξάρτητες τεχνικές που επέτρεψαν τον υπολογισμό της συνεισφοράς του δεσμευμένου απορροπτικού στη μάζα του συμπλόκου. Οι μελέτες αυτές επέτρεψαν την διευκρίνιση της κατάστασης ολιγομερισμού του συμπλόκου. Επιπλέον η δομική ανάλυση του συμπλόκου με STEM οδήγησε στην αποκάλυψη της τοπολογίας του συμπλόκου σε επίπεδο υπομονάδων.

5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1 Αναλυτικές Μέθοδοι.

Για την απομόνωση του ενεργού κέντρου οι μεμβράνες του PS II διαλυτοποιήθηκαν με 0.5% LM και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε υπερφυγοκέντρωση γραμμικής διαβάθμισης σουκρόζης. Η χαμηλότερη ζώνη, η οποία περιέχει τον πυρήνα του PS II, επεξεργάστηκε με συνδυασμό χαοτροπικού και απορροπτικού για την απομόνωση του ενεργού κέντρου.

Η πολυπεπτιδική σύσταση αναλύθηκε με SDS ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση 16-22.5% ακρυλαμιδίου [147]. Στην πηκτή φορτώθηκαν 5 μg πρωτεΐνης και η χρώση έγινε με νιτρικό άργυρο [148].

Για την χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιήθηκε κολώνα Superdex PC 3.2/30 (Pharmacia) συνδεδεμένη με σύστημα Pharmacia SMART. Η κολώνα εξισορροπήθηκε με διάλυμα 20 mM Mes pH 6, 10 mM CaCl₂, 0.03% LM, με ταχύτητα ροής 0.05 mL/min στους 8 °C. Η ανίχνευση των εκλουόμενων πρωτεϊνών έγινε στα 435 nm και 280 nm.

5.2.2 Αναλυτική υπερφυγοκέντρωση.

Η ταχύτητα καθίζησης και η ισορροπία καθίζησης του συμπλόκου του ενεργού κέντρου προσδιορίστηκε με χρήση αναλυτικής υπερφυγοκέντρου τύπου Beckman XLA εφοδιασμένη με ανιχνευτή απορρόφησης. Ο υπολογισμός της ταχύτητας καθίζησης πραγματοποιήθηκε με υπερφυγοκέντρωση στα 220.000xg και της ισορροπίας καθίζησης στα 18.000xg.

Ο υπολογισμός της μάζας των μεμβρανικών πρωτεϊνών με αναλυτική υπερφυγοκέντρωση βελτιώθηκε με τη χρήση ειδικού Buffer, η πυκνότητα του οποίου ήταν ίδια με εκείνη των μικκυλίων του LM.

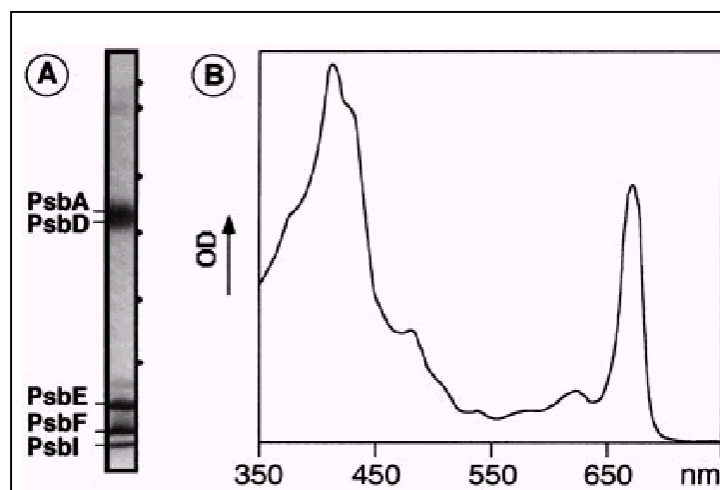
5.2.3 Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM).

Τα διαλυτοποιημένα με απορρυπαντικό σωματίδια προσροφήθηκαν σε λεπτό φιλμ άνθρακα και έγινε ψυκτοξήρανση χωρίς χρώση, για την ανάλυση της μάζας ή με αρνητική χρώση φορμικού ουρανιλίου για την ανάλυση της δομής με STEM.

5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.3.1 Χαρακτηρισμός του απομονωμένου ενεργού κέντρου με SDS-ηλεκτροφόρηση και φασματοσκοπία απορρόφησης.

Η πολυπεπτιδική σύσταση του ενεργού κέντρου του PS II, όπως απομονώθηκε από το σπανάκι, αναλύθηκε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (σχήμα 47A).



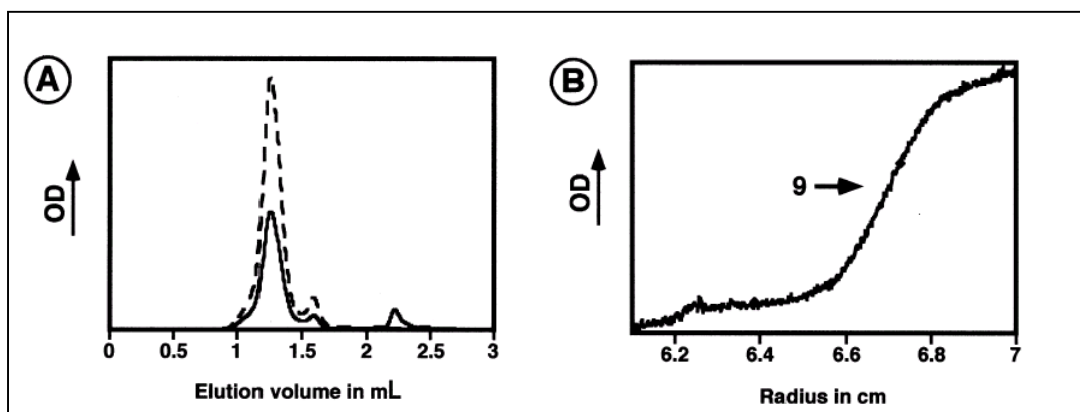
Σχήμα 47. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση του συμπλόκου RC. (A) Οι μάρτυρες μοριακού βάρους που φαίνονται ως κύκλοι είναι 94, 66, 43, 31, 21, 14 kDa. (B) Φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου RC σε θερμοκρασία δωματίου.

Από την SDS-ηλεκτροφόρηση ανιχνεύτηκαν πέντε ζώνες, εκ των οποίων η διπλή διάχυτη ζώνη ανάμεσα στα 43 και 31 kDa αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες D2 και D1. Από τις ζώνες χαμηλού μοριακού βάρους, οι ζώνες στα 9 και 5 kDa ανήκουν στις υπομονάδες του Cyt b559 και εκείνη στα 4.5 kDa στην πρωτεΐνη PsbI.

Η φασματοσκοπία ορατού επιβεβαίωσε την απομόνωση του ενεργού κέντρου σε καθαρή και σταθερή κατάσταση. Στο φάσμα φαίνονται οι κορυφές στα 675 nm (Qy μετάβαση της Chl a και Pheo) στα 543nm (Qx μετάβαση της Pheo). Η απορρόφηση στα 510-450 nm αποδίδεται στα καροτενοειδή, ο ώμος στα 437 nm είναι η Soret της Chl a και τέλος, στην κορυφή στα 417 nm συνεισφέρουν κυρίως η Soret της Pheo και του οξειδωμένου Cyt b559 (σχήμα 47B).

5.3.2 Χαρακτηρισμός του απομονωμένου ενεργού κέντρου με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και αναλυτική υπερφυγοκέντρωση.

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της κατάστασης ολιγομερισμού του ενεργού κέντρου. Το ενεργό κέντρο εκλούστηκε ως κύριο κλάσμα, ενώ οι μικρές κορυφές αποδόθηκαν σε υποσύμπλοκα (σχήμα 48A).



Σχήμα 48. (A) Προφίλ έκλουσης του συμπλόκου από την κολώνα μοριακής διήθησης όπως ανιχνεύτηκε στα 280 nm (συνεχής γραμμή) και στα 417 nm (διακεκομμένη γραμμή). (B) Αναλυτική υπερφυγοκέντρωση του συμπλόκου RC. Το βέλος δείχνει το συντελεστή καθίζησης του συμπλόκου.

Η ομοιογένεια του απομονωμένου συμπλόκου μελετήθηκε επίσης με αναλυτική υπερφυγοκέντρωση. Το ενεργό κέντρο έδειξε ότι αποτελείται από ένα

κύριο πληθυσμό σωματιδίων με συντελεστή καθίζησης 9 S και αμελητέο αριθμό συσσωματωμάτων, ενδεικτικό της άριστης ομοιογένειας του συμπλόκου (σχήμα 48B).

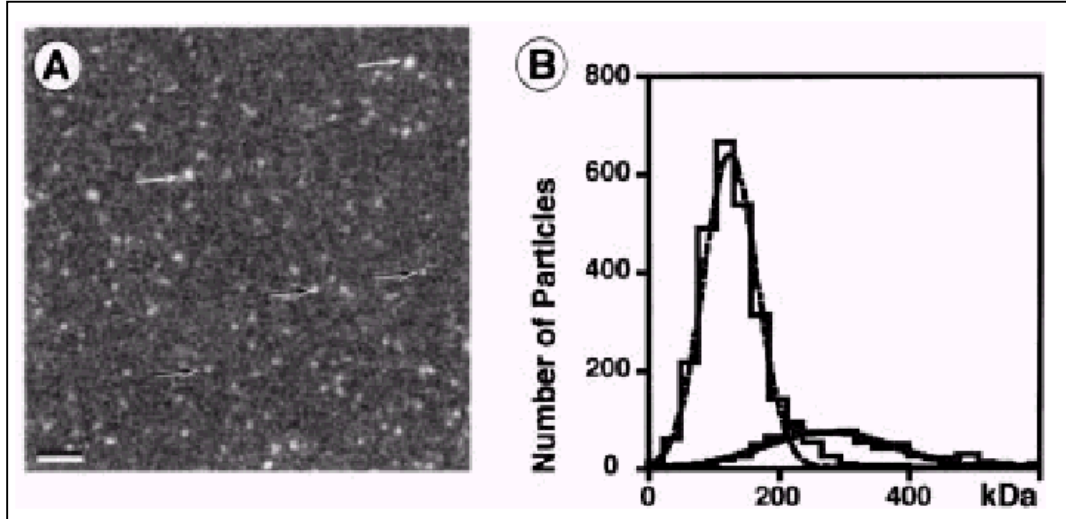
5.3.3 Υπολογισμός της μάζας του συμπλόκου του ενεργού κέντρου με αναλυτική υπερφυγοκέντρωση και STEM.

Για τον υπολογισμό της μάζας του διαλυτοποιημένου συμπλόκου με υπερφυγοκέντρωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό Buffer, η πυκνότητα του οποίου είναι ίδια με εκείνη των εφυδατωμένων μικκυλίων του LM, επιτυγχάνοντας την εξάλειψη της συνεισφοράς του μικκυλίου στη μάζα του συμπλόκου. Με τον τρόπο αυτό η μάζα του συμπλόκου υπολογίστηκε στα 107 ± 17 kDa, μια τιμή που αντιστοιχεί στην ύπαρξη ενός μόνο μορίου από κάθε μία από τις πέντε υπομονάδες του ενεργού κέντρου. Από την ανάλυση μάζας με STEM προέκυψαν δύο πληθυσμοί του συμπλόκου με διαφορετικό μέγεθος. Η μάζα των μικρών σωματιδίων υπολογίστηκε στα 132 ± 43 kDa ενώ για τα μεγαλύτερα σωματίδια στα 289 ± 100 kDa.

Πίνακας 7: Μοριακή μάζα του συμπλόκου RC όπως προκύπτει από θεωρητικές και υπολογιστικές μελέτες

<u>Υπομονάδες</u>	<u>Μοριακή μάζα (kDa)</u>
D1	38
D2	39
Psb E	9
Psb F	4
Psb I	4
6 Chl a	6
2 β-Car	1
2 Pheo	2
Άθροισμα	103
Μάζα από STEM	132 ± 43
Μάζα από υπερφυγοκέντρωση	107 ± 17

Από το συνδυασμό όλων των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την μελέτη της μάζας, υπολογίσθηκε η μάζα του συμπλόκου στα 126 kDa και αποκαλύφθηκε η ύπαρξη του ενεργού κέντρου σε ομοιογενή μονομερή κατάσταση (σχήμα 49)



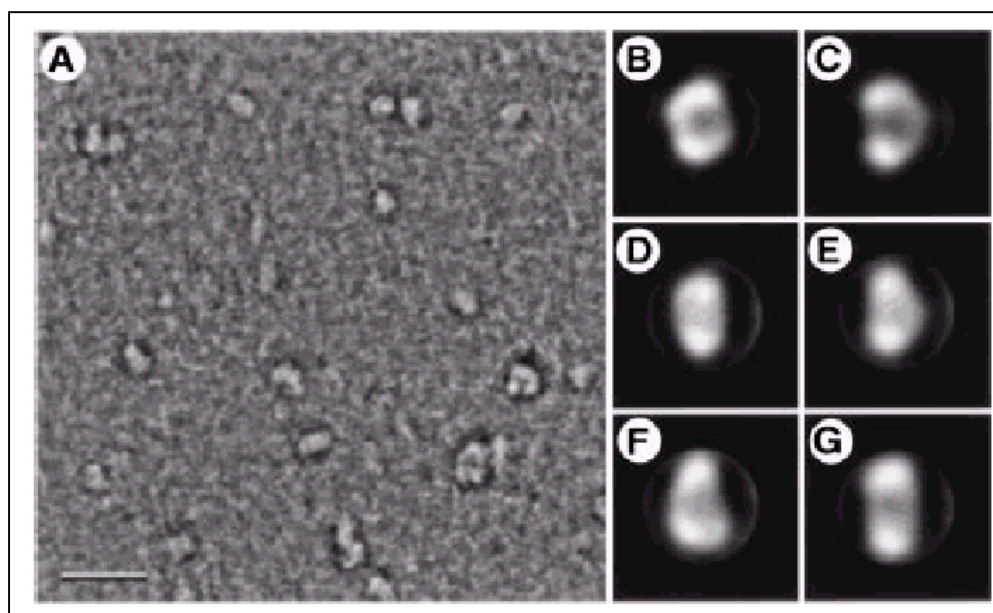
Σχήμα 49. Ανάλυση της μάζας του συμπλόκου RC. (A) Εικόνα ακινητοποιημένων σωματιδίων σε φιλμ άνθρακα χωρίς χρώση. Τα λευκά βέλη δείχνουν τα μεγάλα σωματίδια ενώ τα μαύρα δείχνουν τα μικρότερα. Η κλίμακα είναι 50 nm. (B) Ιστόγραμμα μάζας του RC.

5.3.4 Δομική ανάλυση του συμπλόκου με STEM

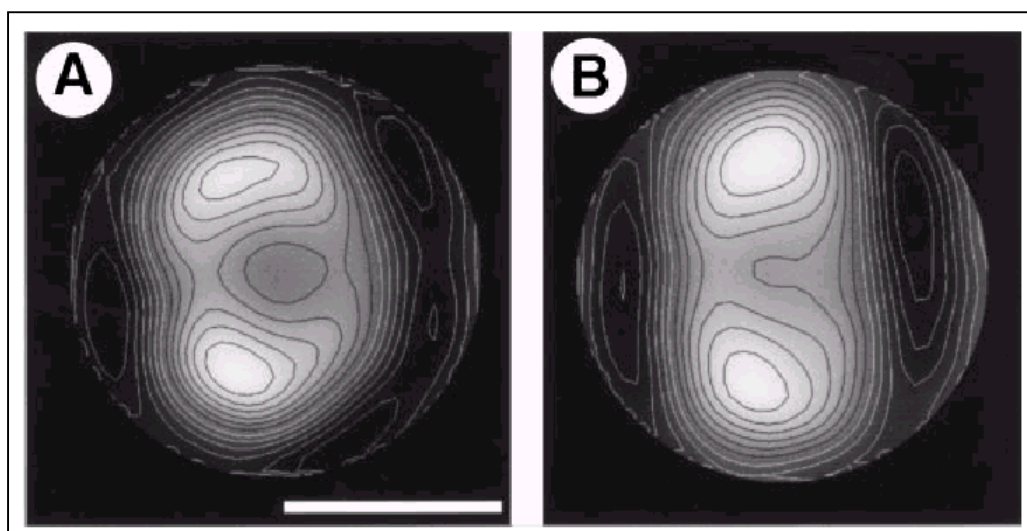
Από την μελέτη του ακινητοποιημένου συμπλόκου σε φιλμ άνθρακα με αρνητική χρώση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο καταγράφηκαν εικόνες οι οποίες στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για δομική ανάλυση (σχήμα 49A). Η στατιστική ανάλυση των εικόνων οδήγησε στη ταξινόμηση των σωματιδίων σε έξι κατηγορίες σχετικά με τον προσανατολισμό τους πάνω στο φύλλο του άνθρακα (σχήμα 49B).

Από την συγκριτική αλληλεπίθεση σωματίων με όμοιο προσανατολισμό προέκυψαν οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας για την πλάγια και επάνω όψη του συμπλόκου. Η επάνω όψη του συμπλόκου έχει μήκος 8.1 nm και πλάτος 5.2 nm και φαίνεται ότι οι δύο υπομονάδες χωρίζονται στην μέση δίνοντας στο σύμπλοκο ψευδοσυμμετρία δευτέρας τάξης. Το σύμπλοκο στην πλάγια όψη έχει διαστάσεις 9.3x4.7 nm και τόσο το μήκος όσο και η απόσταση ανάμεσα στις δυο περιοχές της

μεγάλης πρωτεϊνικής πυκνότητας είναι παρόμοια με εκείνα της επάνω όψης του συμπλόκου (σχήμα 50).

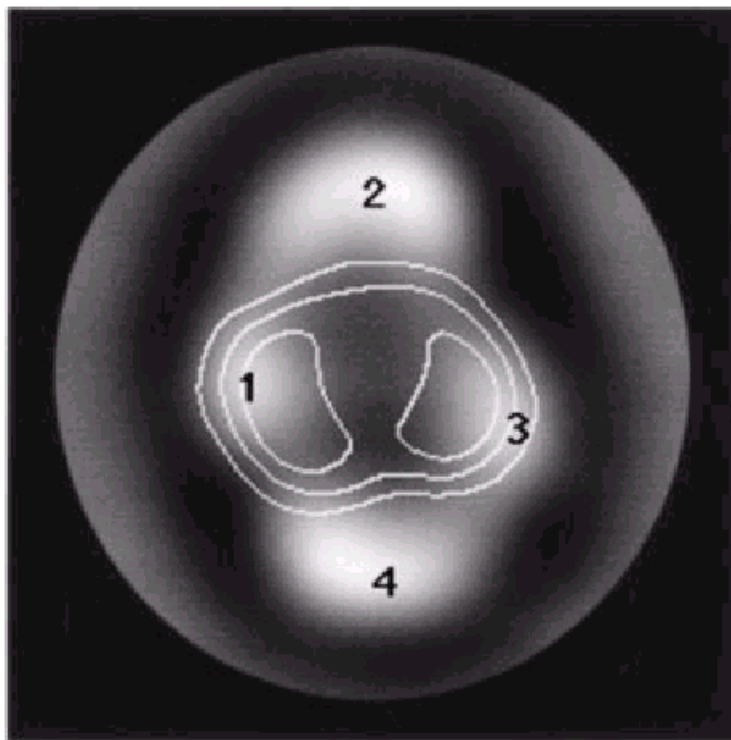


Σχήμα 49. Ταξινόμηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία των ακινητοποιημένων σωματιδίων πάνω σε φιλμ άνθρακα με αρνητική χρώση. (A) Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στην οποία το σύμπλοκο RC φαίνεται ως φωτεινός σχηματισμός και η κλίμακα είναι 20 nm. (B-G) Ταξινόμηση 586 σωματιδίων με στατιστική ανάλυση σε έξι κατηγορίες.



Σχήμα 50. (A) Μέσος όρος 190 προβολών της επάνω όψης του συμπλόκου RC. (B) Μέσος όρος 146 προβολών της πλάγιας όψης του συμπλόκου RC. Η κλίμακα είναι 5 nm.

Με σκοπό την δομική μελέτη του πυρήνα, πραγματοποιήσαμε απευθείας σύγκριση της επάνω όψης του συμπλόκου του ενεργού κέντρου με το χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας του σύμπλοκου του πυρήνα (CP 47-CP 43-RC), ο οποίος έχει προκύψει από προηγούμενη μελέτη [158].



Σχήμα 51. Σύγκριση των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας του πυρήνα του PS II και του συμπλόκου RC (λευκές γραμμές).

Από την σύγκριση προέκυψε ότι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του ενεργού κέντρου εντοπίζεται στο κέντρο του πυρήνα. Οι πρωτεΐνες D1 και D2 καταλαμβάνουν τις θέσεις 1 και 3 ενώ οι CP 47 και CP 43 εντοπίζονται στις θέσεις 2 και 4 του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας.

5.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη του ενεργού κέντρου από το PS II, όπως απομονώθηκε από σπανάκι. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από πέντε υπομονάδες και το μοριακό του βάρος, όπως υπολογίστηκε από αναλυτική

υπερφυγοκέντρωση είναι 106 kDa. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στην ύπαρξη ενός αντιγράφου από κάθε υπομονάδα στο σύμπλοκο (συνολική μάζα 94 kDa), και των συμπαραγόντων Chla, Pheo, β-Car, αίμη σε στοιχειομετρία 6 : 2 : 2 : 1 (12 kDa) και των μεταλλικών ιόντων Mg και Fe [149-152]. Με την αναλυτική υπερφυγοκέντρωση έγινε δυνατός ο υπολογισμός του μοριακού βάρους του μεμβρανικού συμπλοκου χωρίς τη συνεισφορά του μοριακού βάρους του μικκυλίου του απορρυπαντικού. Ο υπολογισμός της μάζας με STEM οδήγησε σε μία τιμή μοριακού βάρους 132 kDa. Η διαφορά του μοριακού βάρους κατά 26 kDa, όπως υπολογίστηκε από τις δύο μεθόδους, αποδίδεται στη συνεισφορά του μικκυλίου. Οι τιμές του μοριακού βάρους που υπολογίστηκαν στην παρούσα εργασία είναι πολύ μικρότερες από εκείνες που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες [149]. Οι διαφορές μπορούν να αποδοθούν σε σφάλμα, λόγω χρήσης υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, ως πρότυπα για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Παρά την ανάπτυξη διαφόρων πρωτοκόλλων για την απομόνωση του ενεργού κέντρου, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχει γίνει μελέτη για την κατάσταση ολιγομερισμού του συμπλόκου [136-138]. Από τα αποτελέσματα μας προέκυψε ότι το σύμπλοκο είναι σε μονομερή μορφή, σε αντίθεση με άλλη μελέτη που προτείνει την ύπαρξη του συμπλόκου σε διμερή κατάσταση [149]. Η κατάσταση ολιγομερισμού του συμπλόκου εξαρτάται από το πρωτόκολλο και τα απορρυπαντικά που χρησιμοποιούνται κατά την απομόνωση του.

Η στατιστική ανάλυση των εικόνων που καταγράφηκαν με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο απεκάλυψε δύο τάξεις σωματίων που ερμηνεύτηκαν ως η επάνω και πλάγια όψη του συμπλόκου. Οι διαστάσεις του συμπλόκου ομοιάζουν με εκείνες της διαμεμβρανικής περιοχής του ενεργού κέντρου των μωβ βακτηρίων [141, 153]. Αυτές οι ομοιότητες είναι σε συμφωνία με τις ομοιότητες που προκύπτουν από την υδροφοβικότητα των D1 και D2 πρωτεϊνών του ενεργού κέντρου του PS II, με τις L και M υπομονάδες του ενεργού κέντρου των βακτηρίων [142, 154].

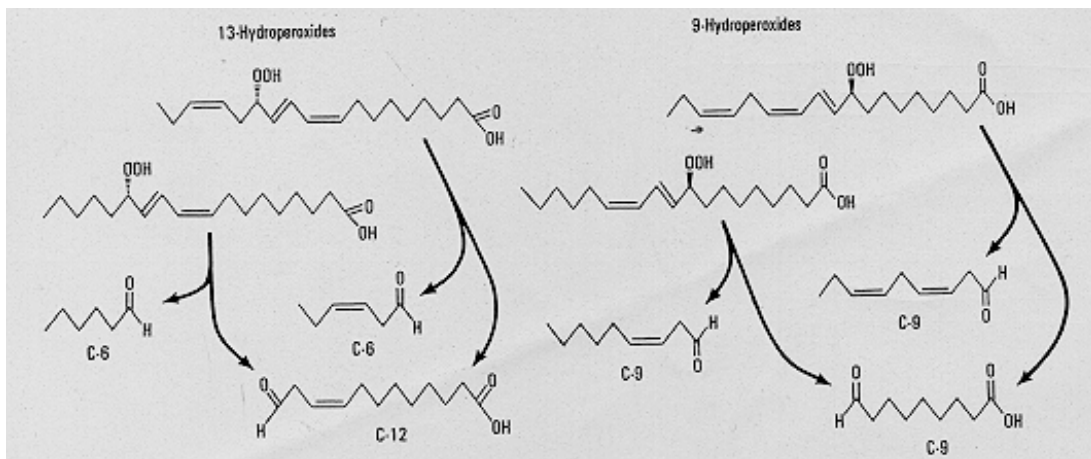
Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε επίσης μελέτη της δομής του πυρήνα του PS II σε τεταρτοταγές επίπεδο. Από μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε δισδιάστατους κρυστάλλους και ακινητοποιημένα σύμπλοκα σε φιλμ άνθρακα με αρνητική χρώση, έχουν προκύψει διάφορα μοντέλα για την σχετική θέση των CP 47, CP43, D1, D2 πρωτεϊνών στο σύμπλοκο του πυρήνα του PS II. Σύμφωνα με το ένα μοντέλο οι πρωτεΐνες του ενεργού κέντρου εντοπίζονται στο κέντρο του πυρήνα ενώ οι πρωτεΐνες CP 47 και CP 43 τοποθετούνται στην περιφέρεια,

προσδίδοντας στο σύμπλοκο ψευδοσυμμετρία δευτέρας τάξης [155-158]. Άλλο μοντέλο υποστηρίζει την τοποθέτηση των πρωτεϊνών του ενεργού κέντρου στη περιφέρεια, ώστε το μονομερές σύμπλοκο να έχει ασύμμετρη μορφή [159, 160]. Για την μελέτη της τοπολογίας των πρωτεϊνών του πυρήνα του PS II πραγματοποιήσαμε απευθείας σύγκριση της επάνω όψης του συμπλόκου του ενεργού κέντρου με το χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας του συμπλόκου του πυρήνα, ο οποίος έχει προκύψει από προηγούμενη μελέτη [158]. Η σύγκριση αυτή αποκάλυψε την τοποθέτηση των πρωτεϊνών του ενεργού κέντρου στο κέντρο του πυρήνα και των CP 43, CP 47 στη περιφέρεια. Το μοντέλο αυτό είναι σύμφωνο με την βελτιωμένη ερμηνεία των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας ολόκληρου του συμπλόκου του PS II [161, 162].

6. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΥΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΔΡΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

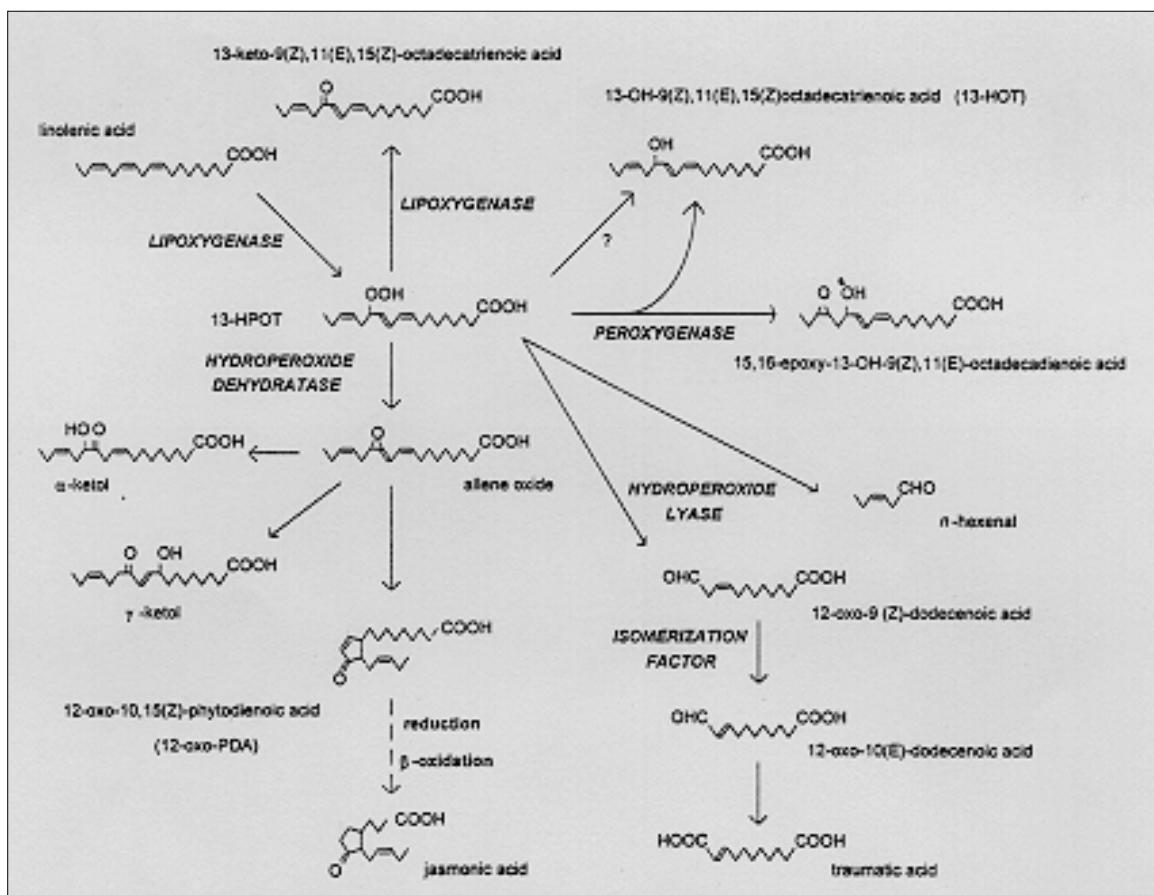
Η λύαση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων (HPO lyase) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την διάσπαση του δεσμού C-C στα υδροϋπεροξειδία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και οδηγεί στη παραγωγή μικρού μοριακού βάρους αλδευδών και ω-όξο-οξέων [163]. Η HPO lyase καταλύει την μετατροπή των 13- και 9- υδροϋπεροξειδίων του λινελαϊκού και λινολενικού οξέως στις αντίστοιχες αλδεϋδες (με 6 ή 9 άτομα άνθρακα) και ω-όξο-οξέα (με 12 ή 9 άτομα άνθρακα).



Σχήμα 52. Αντιδράσεις διάσπασης των 9 και 13-υπεροξειδίων των λιπαρών οξέων από την HPO lyase

Η HPO lyase είναι ευρέως διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο και αποτελεί μέρος μιας μεταβολικής οδού, γνωστή ως μονοπάτι της λιποξυγενάσης (**Lipoxygenase pathway**) [164, 165]. Η σημασία της μεταβολικής αυτής οδού για τα φυτά είναι μεγάλη αφού πιστεύεται ότι είναι η αντίστοιχη με εκείνη των ‘εικοσανοειδών’ στο ζωικό βασίλειο [166]. Το μονοπάτι ξεκινά με την μετατροπή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από την λιποξυγενάση (LOX) στα αντίστοιχα υδροϋπεροξειδία και συνεχίζεται με το μεταβολισμό τους από μεγάλο αριθμό ενζύμων που οδηγεί σε ενώσεις με μεγάλη σπουδαιότητα για τα φυτά, γνωστές ως **οξυλιπίνες**. Παρά το γεγονός ότι οι οξυλιπίνες έχουν χαρακτηριστεί πολύ πριν την

ανακάλυψη των ενζύμων, ο φυσιολογικός τους ρόλος δεν είναι απόλυτα γνωστός [167]. Οι μικρού μοριακού βάρους αλδεύδες που προκύπτουν από την δράση της HPO lyase και οι αντίστοιχες αλκοόλες τους είναι γνωστό ότι αποτελούν σημαντικά συστατικά του χαρακτηριστικού αρώματος (green odour) των φρούτων, λαχανικών και πράσινων φύλλων [168-169]. Ακόμη οι ενώσεις αυτές έχουν αντιβακτηριακή δράση και πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών σε παθογόνους μικροοργανισμούς [170-172]. Το άλλο προϊόν από την δράση της HPO lyase (ω-όξο-οξύ), αποτελεί πρόδρομη ένωση της ορμόνης των φυτών, τραυματίνη. Η ορμόνη αυτή προκαλεί την διαίρεση των κυττάρων και τον σχηματισμό προστατευτικού κάλου στην περιοχή της πληγωμένου φυτικού ιστού [173]. Στο κύκλο συμμετέχει και το ένζυμο **Allene Oxide Synthase (AOS)** που οδηγεί στο σχηματισμό του jasmonic acid. Η ένωση αυτή έχει ιδιότητες αυξητικής ορμόνης και εμπλέκεται στον αμυντικό μηχανισμό των φυτών [174].



Σχήμα 53. Μεταβολικό μονοπάτι της λιποξυγενάσης

Παρά το γεγονός ότι η HPO lyase έχει απομονωθεί από μεγάλο αριθμό φυσικών προϊόντων, η μικρή συγκέντρωση του ενζύμου στους φυτικούς ιστούς δεν

έχει επιτρέψει την δομική και λειτουργική της μελέτη [175-182]. Μόνο η HPO lyase από πιπεριά έχει απομονωθεί σε σχετικά μεγάλη ποσότητα και ο χαρακτηρισμός της απεκάλυψε την ύπαρξη αίμης (πρωτοαίμη IX), ως προσθετική ομάδα στο ένζυμο [183]. Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας του ενζύμου απεκάλυψε 40% ομοιότητα με την AOS, η οποία ανήκει στην οικογένεια των κυτοχρωμάτων P450 (CYP74A) και ομολογία με τρεις διατηρημένες περιοχές των P450 [184]. Από τις ομοιότητες αυτές η HPO lyase (CYP74B) κατατάσσεται ως μέλος μιας νέας κατηγορίας κυτοχρωμάτων P450s (CYP74), παρά το ότι μέχρι σήμερα δεν έχει καταστεί δυνατή η λήψη του φάσματος Fe(II)-CO με μέγιστο απορρόφησης στα 450 nm, που αποτελεί διαγνωστικό χαρακτηριστικό των P450s.

Η HPO lyase παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, τόσο για τον κεντρικό ρόλο που κατέχει στον αμυντικό μηχανισμό των φυτών, όσο και για τα μοναδικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της. Η HPO lyase μαζί με την AOS ανήκουν σε μία νέα κατηγορία κυτοχρωμάτων P450s (CYP74) που ανακαλύφθηκαν μόλις πριν δέκα χρόνια και η μελέτη τους είναι σε αρχικά στάδια [185-186]. Τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής παρουσιάζουν ιδιαίτερες λειτουργικές ιδιότητες, αφού δεν χρειάζονται οξυγόνο και αναγωγικό συμπάραγοντα για την καταλυτική τους δράση. Η δομική ανάλυση της HPO lyase θα οδηγούσε στην κατανόηση και εκμετάλλευση των μοναδικών λειτουργικών χαρακτηριστικών των ενζύμων CYP74 με σημαντικές βιολογικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Στην παρούσα εργασία η HPO lyase απομονώθηκε από βακτήρια *E. coli*, τα οποία περιέχουν το ανασυνδιασμένο DNA του ενζύμου από πιπεριά. Από τα βακτήρια η HPO lyase εκφράστηκε σε ικανοποιητική ποσότητα που επέτρεψε τον βιοχημικό και φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό του ενζύμου. Η εργασία επικεντρώθηκε στη δομική μελέτη του περιβάλλοντος της αίμης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR). Η φασματοσκοπική μελέτη του ενζύμου στηρίχτηκε στη δέσμευση εξωγενών ligands στο σίδηρο της αίμης του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου και στην σύγκριση των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών με εκείνα πρωτεϊνών με γνωστή δομή. Από τις μελέτες αυτές προέκυψαν δομικές πληροφορίες για το περιβάλλον της αίμης της HPO lyase σχετικά με την γεωμετρία, την κατάσταση spin του σιδήρου και το είδος του πέμπτου ligand. Από την εργασία αυτή ελήφθησαν για πρώτη φορά φασματοσκοπικά

δεδομένα τα οποία στηρίζουν την υπόθεση ότι στη πέμπτη θέση συναρμογής της αίμης υπάρχει κυστεΐνη και η HPO lyase είναι ένα κυτόχρωμα P450.

6.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.2.1 Διαλύματα.

- 1) *Lysis Buffer*: 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 1mM EDTA, 0.1 M NaCl, 0.1 mM PMSF, 1mg/ml Lysozyme.
- 2) *Διάλυμα διαλυτοποίησης*: 50mM Na-Phosphate pH 8.0, 1M NaCl, 0.5% Triton X-100, 5 mM ιμιδαζόλιο.
- 3) *Διάλυμα έκπλυσης*: 50mM Na-Phosphate pH 8.0, 1M NaCl, 0.2% Triton X-100, 15 mM ιμιδαζόλιο.
- 4) *Διάλυμα έκλουσης*: 50mM Na-Phosphate pH 4.0, 1M NaCl, 0.2% Triton X-100.
- 5) *Θρεπτικό υλικό (TB medium)*: 12 gr/l Bacto-peptone, 24 gr/l Bacto-yeast extract, 4 ml/l Glycerol, 100ml/l αποστειρωμένου διαλύματος με 0,17 M KH_2PO_4 και 0,72 M K_2HPO_4 .

6.2.2 Καλλιέργεια βακτηρίων *E. coli*.

Η HPO lyase εκφράστηκε από κύτταρα *E. coli* (strain M 15) τα οποία περιέχουν πλασμίδιο (pQE31) με το cDNA του ενζύμου από πιπεριά (bell pepper). Μία αποικία *E. coli* από στερεή καλλιέργεια εμβολιάστηκε σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό υλικό (TB medium) στο οποίο είχε προστεθεί αμπικιλίνη (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) και καναμικίνη (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με ανάδευση στους 37°C για 20 ώρες και αραιώθηκαν σε μεγαλύτερες καλλιέργειες (αραίωση 1: 10). Η ανάδευση των κύτταρων συνεχίστηκε στους 37°C έως την στατική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας. Η έκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 1 mM IPTG και επώαση των κυττάρων στους 16 °C για 22 ώρες. Τέλος τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 10000xg για 15 λεπτά.

6.2.3 Απομόνωση της HPO lyase.

Τα κύτταρα από *E. coli* επαναιωρήθηκαν σε Lysis Buffer σε αναλογία 3ml Buffer ανά γραμμάριο κύτταρων. Τα κύτταρα επώστηκαν για 30 λεπτά υπό ανάδευση και στη συνέχεια έγινε θραύση των κυτταρικών τοιχωμάτων με υπέρηχους στους 4 °C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (10.000xg για 15 λεπτά) και το υπερκείμενο υπερφυγοκεντρήθηκε (140.000xg για 60 λεπτά) για την συλλογή του μεμβρανικού κλάσματος των βακτηριακών κύτταρων. Οι μεμβράνες επαναιωρήθηκαν στο διάλυμα διαλυτοποίησης και αφού επώστηκαν υπό ανάδευση για 60 λεπτά υπερφυγοκεντρήθηκαν ξανά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε χρωματογραφική στήλη αγκιστείας μετάλλου, Ni-NTA agarose (Qiagen). Η στήλη εξισορροπήθηκε με πενταπλάσιο όγκο από το διάλυμα διαλυτοποίησης και οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη στήλη μη εξειδικευμένα, απομακρύνθηκαν με δεκαπλάσιο όγκο διαλύματος έκπλυσης. Τέλος η HPO lyase αποδεσμεύεται και λαμβάνεται από την στήλη με 10 ml διαλύματος έκλυσης.

6.2.4 Παρασκευή του υποστρώματος.

Το υπόστρωμα HPOD (13-S-hydroperoxy-9-Z, 11-E-octa-decadienoic acid), παρασκευάστηκε με τη χρήση soybean LOX (Sigma) [187]. Σε κωνική φιάλη αναμίχθηκαν περίπου 5mg λινελαϊκού οξέως με 10ml διαλύματος 0.1M βορικού pH 9.0. Το μίγμα τέθηκε σε ανάδευση με παράλληλη διοχέτευση οξυγόνου διατηρώντας την θερμοκρασία στους 0°C. Η έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 1 mg LOX και η πορεία της παρακολουθήθηκε μετρώντας την απορρόφηση στα 234 nm. Όταν η αντίδραση είχε ολοκληρωθεί το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο pH 3.0 με προσθήκη HCl. Το διάλυμα κορέσθηκε με NaCl και το μίγμα εκχειλίστηκε τρεις φορές με 5ml διαιθυλαιθέρα. Η οργανική στιβάδα εκπλύθηκε με νερό, ξηράνθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο και συμπυκνώθηκε στο κενό. Το υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε αιθανόλη και καταψύχθηκε.

6.2.5 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της HPO lyase.

Η δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στους 25 °C μετρώντας την ελάττωση της απορρόφησης στα 234 nm λόγω της ενζυμικής διάσπασης του δεσμού C-C που οδηγεί στην εξαφάνιση του συζυγιακού συστήματος στο 13-υπεροξειδίου του λινελαϊκού οξέος (13-HPOD) . .

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με συνεχή ανάδευση σε κυψελίδα Quartz που περιέχει Buffer 0.1 M Na-phosphate pH 6.0 στο οποίο είχε προστεθεί 100 μM 13-HPOD. Ο συντελεστής απόσβεσης του 13-HPOD είναι 25000 M⁻¹ και ως μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας (1 Unit) ορίστηκε η ποσότητα της HPO lyase που προκαλεί την κατανάλωση ενός μM υποστρώματος ανά λεπτό στους 25°C.

6.2.6 Ηλεκτροφόρηση.

Η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου κατά το σύστημα Laemmli. Η ανοσοαποτύπωση πραγματοποιήθηκε με πολυκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο για την HPO lyase από πιπεριά, το οποίο παραχωρήθηκε από τον Dr Matsui Kenji.

Η χρώση της αίμης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Thomas et al. [188]. Τρεις όγκοι διαλύματος 6.3 mM TMBZ σε μεθανόλη αναμίχθηκαν με επτά όγκους διαλύματος 0.25 M οξικού νατρίου pH 5.0. Το gel εμβαπτίστηκε στο παραπάνω διάλυμα και η αντίδραση ξεκίνησε με προσθήκη H₂O₂. Η παρουσία της αίμης ανιχνεύτηκε από την εμφάνιση μπλε χρώματος, μετά από ένα λεπτό.

6.2.7 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της HPO lyase.

Τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε θερμοκρασία δωματίου λήφθηκαν με φασματοφωτόμετρο AMINCO DW 2000. Για την λήψη των φασμάτων η πρωτεΐνη μεταφέρθηκε σε Buffer 50 mM φωσφορικού νατρίου (Na-Pi), pH 7.0, 300 mM NaCl, 0.2% Triton X-100. Η παραγωγή των συμπλόκων της HPO lyase με ligands πραγματοποιήθηκε με τιτλοδότηση του ενζύμου (1 ml) από πυκνά διαλύματα (3M) KCN και (3M) ιμιδαζολίου.

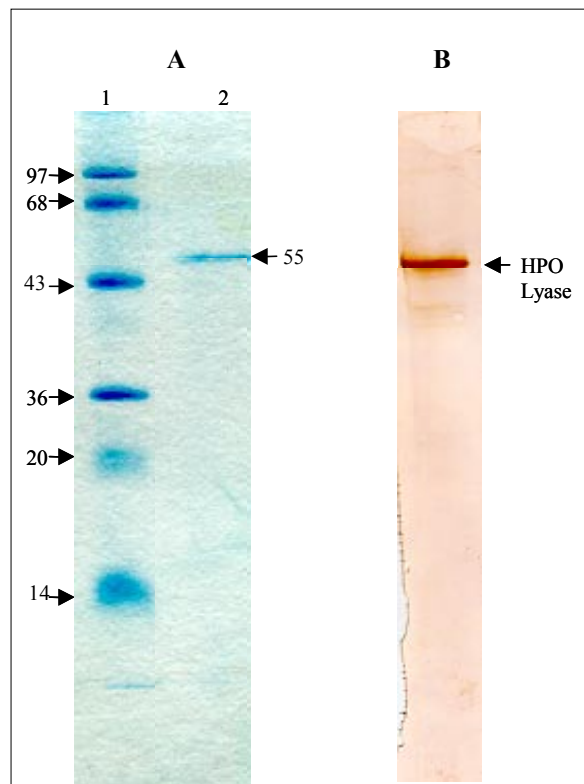
Τα φάσματα EPR (X-Band EPR) σε θερμοκρασία ηλίου καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο EPR JOEL ME-3X (X-Band) εφοδιασμένο με κρυστάτη Oxford

ESR-900 και κυλινδρική κοιλότητα συντονισμού. Η πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε σε συγκέντρωση 100μM με Buffer 50 mM Na-Phosphate, pH 7.0, 300 mM NaCl, 0.2% Triton X-100. Τα φάσματα ελήφθησαν σε θερμοκρασία 4.2 K και μικροκυματική ισχύ 32 mW

6.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.3.1 Απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός της HPO Lyase.

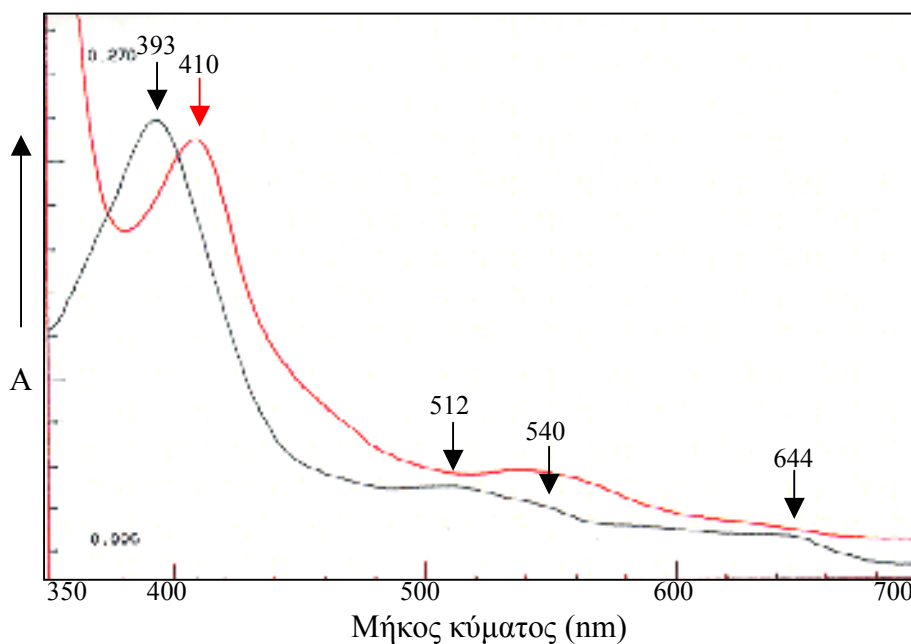
Η HPO Lyase διαλυτοποιήθηκε από το μεμβρανικό κλάσμα των κυττάρων του *E. coli* με το απορρυπαντικό Triton X-100 και απομονώθηκε από τις υπόλοιπες μεμβρανικές πρωτεΐνες με χρωματογραφία αγκιστείας νικελίου. Η πρωτεΐνη εκφράστηκε με μία προέκταση έξι ιστιδινών (6x His-tag) στο N-τελικό της άκρο και αυτό επέτρεψε την επιλεκτική δέσμευση της πρωτεΐνης σε κολώνα με ακινητοποιημένο νικέλιο.



Σχήμα 54. (A) Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση: 1) μάρτυρες μοριακού βάρους, 2) HPO Lyase. (B) Ανοσοαποτύπωση.

Από την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση φάνηκε ότι η πρωτεΐνη αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα με μοριακό βάρος περίπου 55 kDa, που συμφωνεί με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης [184], όπως υπολογίστηκε από την αμινοξική αλληλουχία (σχήμα 54 A). Με τη μέθοδο αυτή η πρωτεΐνη απομονώθηκε με υψηλή καθαρότητα και με απόδοση περίπου 3 mg πρωτεΐνης ανά λίτρο καλλιέργειας. Η πρωτεΐνη ταυτοποιήθηκε με αναγνώριση της από πολυκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο για την HPO lyase από πιπεριά (σχήμα 54 B). Η μη ανίχνευση αίμης στην αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η αίμη είναι μη ομοιοπολικά δεσμευμένη με την πρωτεΐνη με αποτέλεσμα την απώλεια της σε μετουσιωτικές συνθήκες, που εφαρμόζονται κατά την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

Το φάσμα απορρόφησης της HPO lyase η οποία απομονώθηκε στη παρούσα εργασία είναι πανομοιότυπο με εκείνο της λύσης, όπως απομονώθηκε από την πιπεριά (σχήμα 55).



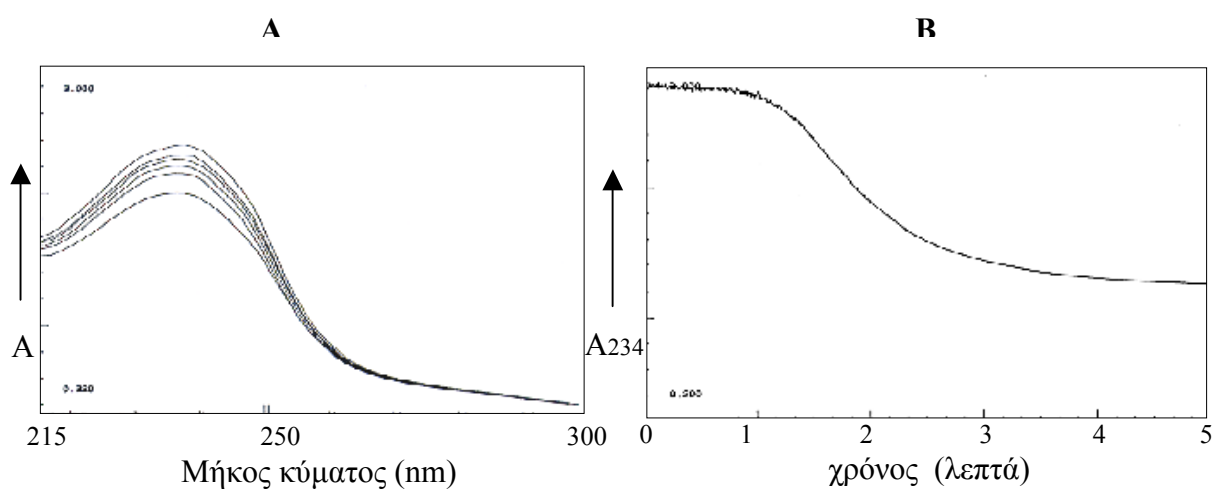
Σχήμα 55. Φάσμα απορρόφησης της HPO lyase (μαύρη γραμμή) και του ανηγμένου ενζύμου (κόκκινη γραμμή)

Διαγνωστικά χαρακτηριστικά στο φάσμα είναι η απορρόφηση στα 393 nm, που αποδίδεται στη Soret ταινία της αίμης, καθώς και η α και β ταινία στα 540 nm και 512 nm αντίστοιχα. Επιπλέον η απορρόφηση στα 644 nm, που αποδίδεται στην

ταινία μεταφοράς φορτίου από το πέμπτο ligand της αίμης στο σίδηρο (Charge Transfer), είναι ενδεικτική της κατάστασης υψηλού spin του σιδήρου της αίμης [183]. Αναγωγή του ενζύμου με $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ οδήγησε στη μετατόπιση της Soret απορρόφησης στα 410 nm και στην εμφάνιση μιας ευρείας απορρόφησης στα 550 nm. Τα παραπάνω βιοχημικά και φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά είναι όμοια με εκείνα της HPO lyase όπως απομονώθηκε από πιπεριά και είναι ενδεικτικά της απομόνωσης του ενζύμου σε φυσιολογική μορφή.

6.3.2 Μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας της HPO lyase.

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της ενζυμικής δράσης στηρίζεται στην ελάττωση της απορρόφησης στα 234 nm, λόγω της διάσπασης του συζυγιακού συστήματος του 13-HPOD από την HPO lyase. Η διάσπαση του υποστρώματος αναγνωρίστηκε από την ελάττωση της απορρόφησης στα 234 nm και τα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας (GC-MS).

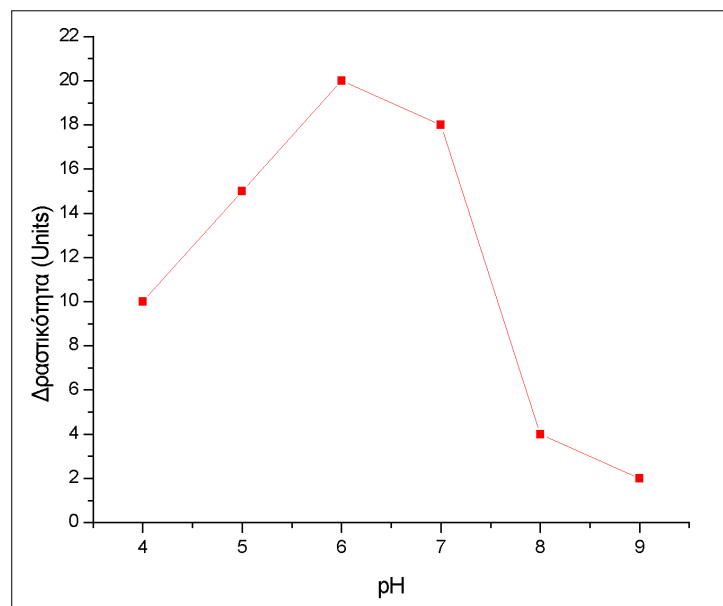


Σχήμα 56. (A) Φάσματα απορρόφησης του 13-HPOD, τα οποία καταγράφηκαν ανά 10 s μετά την προσθήκη της HPO lyase. (B) Διάγραμμα της απορρόφησης του 13-HPOD στα 234 nm σε συνάρτηση με το χρόνο.

Από την κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης ελάττωσης της απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο κατέστη δυνατός ο υπολογισμός της δραστηριότητας του ενζύμου.

Αρχικά η απορρόφηση στα 234 nm μειώνεται γραμμικά, και με τη πάροδο του χρόνου η ταχύτητα ελαττώνεται έως ότου μηδενιστεί μετά από περίπου τρία λεπτά (σχήμα 56 B). Η απενεργοποίηση του ενζύμου κατά την διάρκεια της καταλυτικής δράσης έχει αναφερθεί τόσο για την HPO lyase όσο και για την AOS, που έχουν απομονωθεί από διάφορους φυτικούς ιστούς [175-182].

Με στόχο την εύρεση του pH στο οποίο η HPO lyase εμφανίζει την μέγιστη δραστηριότητα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δραστηριότητας του ενζύμου σε διάφορες τιμές pH (σχήμα 57)



Σχήμα 57. Καμπύλη της μεταβολής της δραστηριότητας της HPO lyase σε συνάρτηση με το pH.

Από τη μελέτη της κινητικής του ενζύμου σε διάφορα pH βρέθηκε ότι το βέλτιστο pH για την δράση του ενζύμου είναι κοντά στο pH 6.0. Η HPO lyase διατηρεί μεγάλο μέρος της δραστηριότητας (50%) σε όξινα pH, ενώ σε pH 9 η δραστηριότητα μειώνεται στο 10% της βέλτιστης.

Από τις παραπάνω μελέτες προέκυψε ότι η HPO lyase όπως απομονώθηκε από τα κύτταρα *E. coli* διατηρεί τα φυσιολογικά δομικά και λειτουργικά της χαρακτηριστικά και αυτό επιτρέπει την παραπέρα φασματοσκοπική μελέτη του ενζύμου.

6.3.3 Μελέτη του μεταλλικού κέντρου της HPO lyase με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis).

Με στόχο την μελέτη του περιβάλλοντος της αίμης πραγματοποιήθηκαν φασματοσκοπικές μελέτες των συμπλόκων της HPO lyase με εξωγενείς υποκαταστάτες (ligands). Υποκαταστάτες που συναρμόζονται στην έκτη θέση συναρμογής (distal) του αιμικού σιδήρου, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την μελέτη του μεταλλικού κέντρου αιμοπρωτεϊνών. Από την μελέτη των συμπλόκων αυτών με φασματοσκοπία UV-Vis, λαμβάνονται πληροφορίες για την οξειδωτική κατάσταση, την ηλεκτρονική δομή και τον αριθμό συναρμογής του σιδήρου. Η σύγκριση των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών σε σύμπλοκα των πρωτεϊνών με εξωγενείς υποκαταστάτες παρέχει πληροφορίες για τη φύση του εγγύτατου (proximal) ligand στην πέμπτη θέση συναρμογής του αιμικού σιδήρου.

Τα χαρακτηριστικά του φάσματος UV-Vis της HPO lyase (σχήμα 55) συγκρίθηκαν με εκείνα ενζύμων (P450, χλωροπεροξειδάση CPO, υπεροξειδάση του κυτοχρώματος C CcP, μυσφαιρίνη Mb) στα οποία είναι γνωστό το proximal ligand (πίνακας 8).

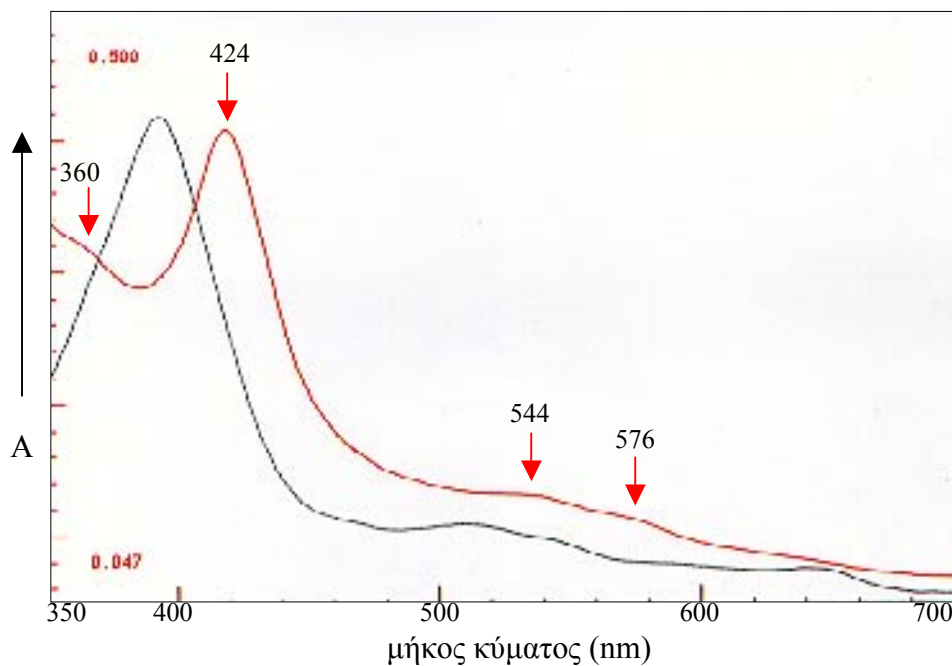
Πίνακας 8: Φασματοσκοπικά (UV-Vis) χαρακτηριστικά πρωτεϊνών με γνωστό proximal

proximal ligand	πρωτεΐνη	<i>ligand</i>					αναφορά
		ταινία δ	ταινία Soret	ταινία β	ταινία α	ταινία CT	
	<u>HPO lyase</u>		393	512	540	644	
Κυστεΐνη	P450		391	515		646	[189]
Κυστεΐνη	CPO		396	515		650	[190]
Ιστιδίνη	CcP		408	509		646	[191]
Ιστιδίνη	Mb		407	502		633	[192]

Από την σύγκριση προκύπτει ότι το απόλυτο φάσμα της HPO lyase παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με τα φάσματα πρωτεϊνών που έχουν κυστεΐνη ως proximal ligand και κυρίως με το P450. Η Soret ταινία στα 393 nm είναι χαρακτηριστική για το οξειδωμένο κυτόχρωμα P450, στο οποίο ο σίδηρος είναι σε κατάσταση υψηλού spin με πέντε υποκαταστάτες στην σφαίρα συναρμογής του.

Αντίθετα, σε αιμοπρωτεΐνες με ιστιδίνη σε θέση proximal, η Soret ταινία εμφανίζεται σε μήκος κύματος μεγαλύτερο από 400 nm. Η απορρόφηση στα 644 nm είναι χαρακτηριστική για την κατάσταση υψηλού spin και αποδίδεται στην ταινία μεταφοράς φορτίου (CT) από το θείο της κυστεΐνης στον σίδηρο της αίμης.

Το πρώτο ligand το οποίο εξετάστηκε ήταν το ιμιδαζόλιο, που αποτελεί γνωστό φυσικό υποκαταστάτη σε πολλές αιμοπρωτεΐνες, όπως στην αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη και πολλές άλλες.



Σχήμα 58. Φάσμα απορρόφησης της HPO lyase (μαύρη γραμμή) και του ενζύμου με 540 mM ιμιδαζόλιο (κόκκινη γραμμή).

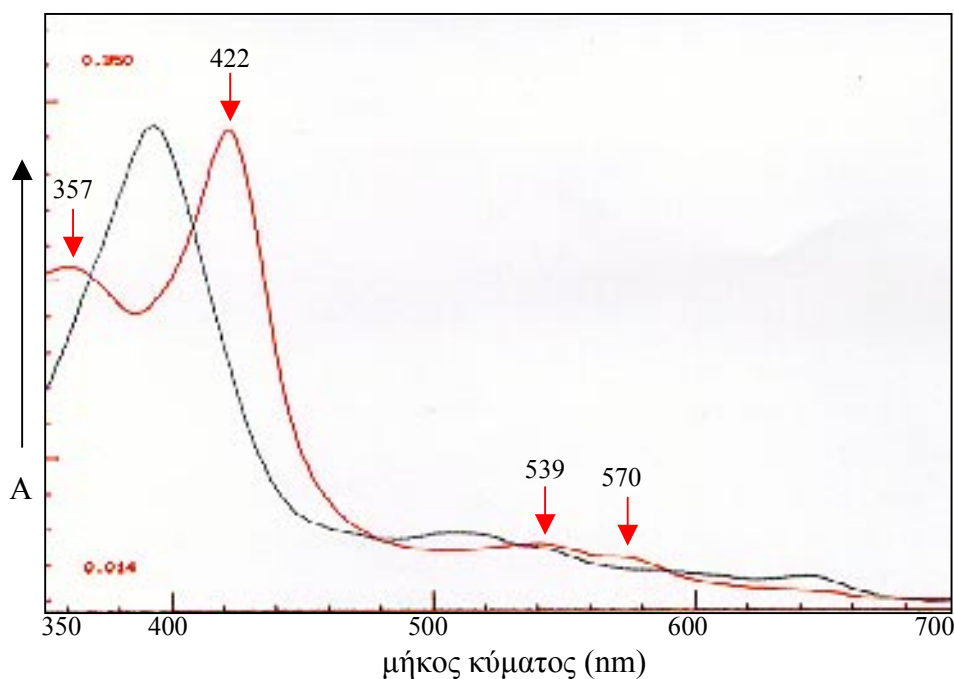
Τιτλοδότηση της HPO lyase με ιμιδαζόλιο οδήγησε σε αλλαγές στο φάσμα UV-Vis που είναι ενδεικτικές της συναρμογής του ligand στην έκτη θέση του σιδήρου (σχήμα 58). Στο σύμπλοκο του ενζύμου με ιμιδαζόλιο η Soret απορρόφηση μετατοπίζεται από τα 393 στα 424 nm και επιπλέον παρουσιάζεται μία απορρόφηση στα 544 nm και ένας ώμος στα 576 nm. Η εξαφάνιση της CT ταινίας από το φάσμα του συμπλόκου είναι χαρακτηριστική της μετατροπής της κατάστασης του spin του αιμικού σιδήρου από υψηλό σε χαμηλό.

Η σύγκριση των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών του συμπλόκου της HPO lyase με ιμιδαζόλιο, αποκαλύπτει ομοιότητες με πρωτεΐνες που έχουν κυστεΐνη σε θέση trans ως προς το ιμιδαζόλιο (πίνακας 9).

Πίνακας 9: *Φασματοσκοπικά (UV-Vis) χαρακτηριστικά του συμπλόκου αιμοπρωτεϊνών με ιμιδαζόλιο.*

proximal ligand	πρωτεΐνη	ταινία δ	ταινία Soret	ταινία β	ταινία α	ταινία CT	αναφορά
	HPO lyase	360	424	544	576		
Κυστεΐνη	P450	360	425	541	578		[193]
Κυστεΐνη	CPO	360	429	546	580		[194]
Ιστιδίνη	CcP		412	536	563		[191]
Ιστιδίνη	Mb		417	535			[192]

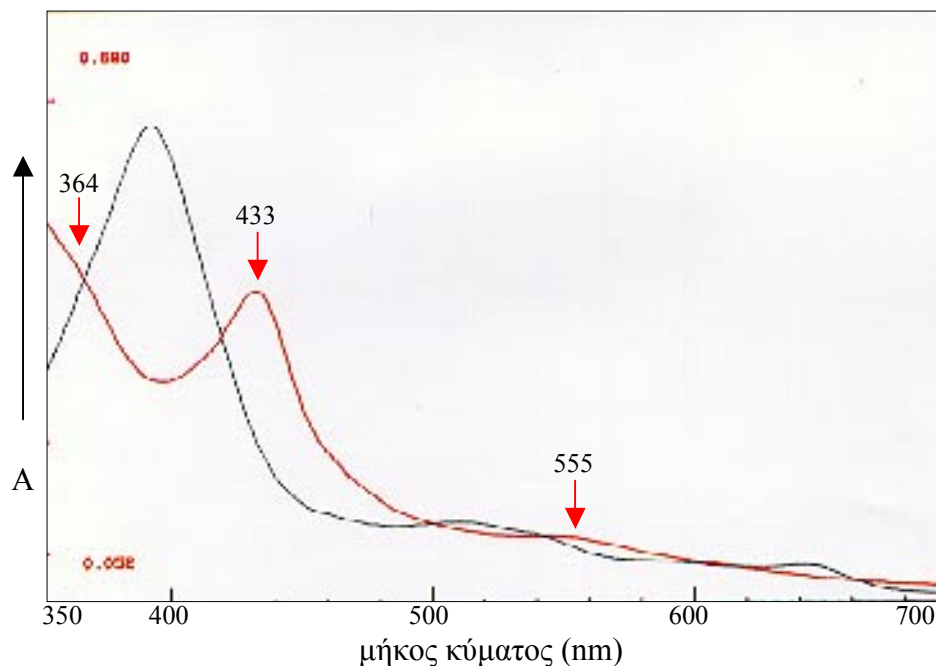
Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και με το παράγωγο του ιμιδαζολίου, N-μεθυλ-ιμιδαζόλιο, όπως αναμενόταν λόγω της όμοιας φύσης των ligands. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά δείχνουν συναρμογή του ligand με την αίμη και οι θέσεις των ταινιών είναι όμοιες με εκείνες του συμπλόκου του ενζύμου με ιμιδαζόλιο.



Σχήμα 59. Φάσμα απορρόφησης της HPO lyase (μαύρη γραμμή) και του ενζύμου με N-μέθυλ-ιμιδαζόλιο (κόκκινη γραμμή).

Η συναρμογή του N-μέθυλ-ιμιδαζολίου φαίνεται από την μετατόπιση της Soret στα 422 nm και από την εξαφάνιση της απορρόφησης στα 644 nm, ενδεικτική της κατάστασης υψηλού spin (σχήμα 59).

Μελετήθηκε και το σύμπλοκο του ενζύμου με το ανιονικό ligand CN^- , το οποίο είναι γνωστό για την δημιουργία συμπλόκων χαμηλού spin στο P450. Τιτλοδότηση του ενζύμου με KCN οδήγησε στην μετατόπιση της Soret από τα 393 nm στα 433 nm. Επιπλέον παρατηρήθηκε η εξαφάνιση της ταινίας στα 644 nm και η εμφάνιση της β ταινίας στα 555 nm (σχήμα 60).



Σχήμα 60. Φάσμα απορρόφησης της HPO lyase (μαύρη γραμμή) και φάσμα του ενζύμου με (200mM) CN^- (κόκκινη γραμμή).

Στο σύμπλοκο του ενζύμου με CN^- , η Soret ταινία μετατοπίζεται κατά 30 nm όπως και στο αντίστοιχο σύμπλοκο του P450 και της CPO. Αντίθετα στο σύμπλοκο αιμοπρωτεϊνών με proximal ιστιδίνη η Soret ταινία εμφανίζεται στα 420 nm, μετατοπισμένη κατά 10 nm (πίνακας 10). Επιπλέον ο σίδηρος είναι χαμηλού spin όπως προκύπτει από την μετατόπιση της β ταινίας και την εξαφάνιση της CT ταινίας.

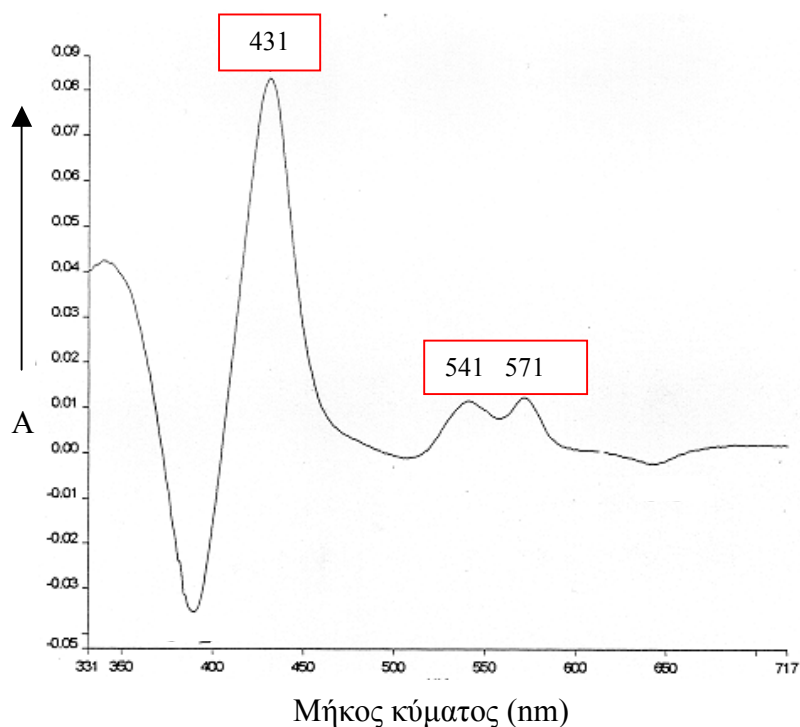
Η σύγκριση του φάσματος της HPO lyase με δεσμευμένο CN^- απεκάλυψε σημαντικές ομοιότητες των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών με τα αντίστοιχα σύμπλοκα πρωτεϊνών (CPO, P450), οι οποίες έχουν κυστεΐνη σε θέση trans.

Στον πίνακα 10 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά του φάσματος απορρόφησης του συμπλόκου επιλεγμένων αιμοπρωτεϊνών με CN⁻.

Πίνακας 10: Φασματοσκοπικά (UV-Vis) χαρακτηριστικά του συμπλόκου αιμοπρωτεϊνών με CN⁻

proximal ligand	πρωτεΐνη	ταινία δ	ταινία Soret	ταινία β	ταινία α	ταινία CT	αναφορά
	HPO lyase	364	433	555			
Κυστεΐνη	P450	364	438	558			[193]
Κυστεΐνη	CPO	365	439	557	594		[193]
Ιστιδίνη	CcP	360	420	542	568		[191]
Ιστιδίνη	Mb		422	541			[195]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το φάσμα της HPO lyase (Fe III) με το μονοξείδιο το αζώτου (NO) το οποίο είναι ταυτόσημο με το φάσμα του P450 (Fe III)-NO (σχήμα 61).



Σχήμα 61. Οπτικό φάσμα διαφοράς του συμπλόκου της HPO lyase με NO.

Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του συμπλόκου HPO lyase (Fe III)-NO συγκρίθηκαν με φάσματα πρωτεϊνών, που είναι γνωστό το ligand σε trans θέση ως προς το NO (πίνακας 11).

Πίνακας 11: Φασματοσκοπικά (UV-Vis) χαρακτηριστικά του συμπλόκου αιμοπρωτεϊνών (Fe III) πρωτεϊνών με NO.

proximal ligand	πρωτεΐνη	ταινία δ	ταινία Soret	ταινία β	ταινία α	ταινία CT	αναφορά
	HPO lyase		431	541	571		
Κυστεΐνη	P450		430	541	571		[196]
Κυστεΐνη	CPO		437	545	577		[194]
Ιστιδίνη	CcP		419	537	571		[197]
Ιστιδίνη	HRP		419	533	568		[197]

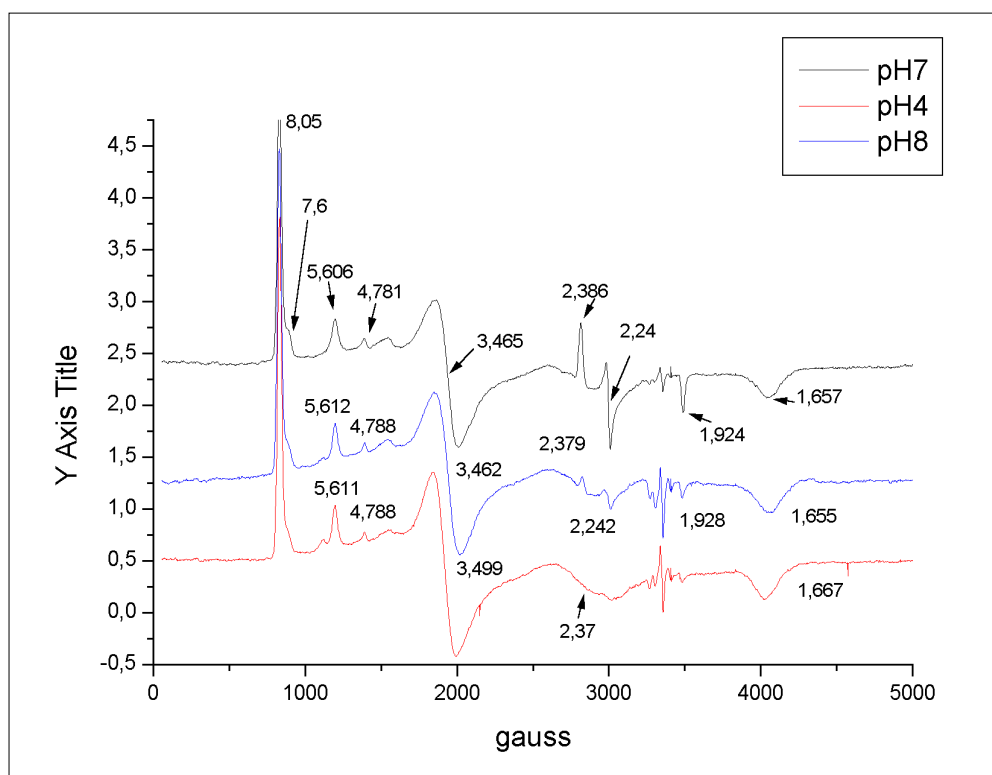
Από τη σύγκριση προκύπτουν ομοιότητες για την Soret στα 431 nm (430 nm για το P450) καθώς και για τις ταινίες α (571 nm) και β (541 nm) με το P450-NO (571 nm και 541 nm αντίστοιχα). Η ομοιότητες του φάσματος της HPO lyase-NO με εκείνο του P450-NO δείχνει την ύπαρξη όμοιου ligand στα δύο ένζυμα σε trans θέση ως προς το NO.

6.3.4 Μελέτη του μεταλλικού κέντρου της HPO lyase με φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (X-band EPR).

Η φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την δομική μελέτη του μεταλλικού κέντρου σε διάφορες αιμοπρωτεΐνες. Από μελέτες με φασματοσκοπία EPR έχουν προκύψει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την συμμετρία και την ηλεκτρονική δομή του αιμικού σιδήρου καθώς επίσης και τη φύση των αξονικών ligands. Τα χαρακτηριστικά του EPR φάσματος των αιμοπρωτεϊνών είναι ιδιαίτερος ευαίσθητα σε αλλαγές συμμετρίας λόγω της πρωτεϊνικής δομής, παρέχοντας δομικές πληροφορίες για το περιβάλλον της αίμης.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το μεταλλικό κέντρο της HPO lyase με EPR σε θερμοκρασία ηλίου και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών με φάσματα πρωτεϊνών οι οποίες, έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοντέλα σε μελέτες με φασματοσκοπία EPR.

Το EPR φάσμα της HPO lyase εμφανίζει μεγάλη ρομβική σχάση με τρεις τιμές g για κάθε άξονα, 8.05, 3.5, 1.65, που είναι χαρακτηριστικές για αιμοπρωτεΐνες, στις οποίες η πλειοψηφία των κέντρων είναι σε κατάσταση υψηλού spin. Όπως προκύπτει από την ολοκλήρωση του σήματος ένα μικρό ποσοστό (8%) των κέντρων είναι σε κατάσταση χαμηλού spin με τιμές g, 2.38, 2.24, 1.92 (σχήμα 62).



Σχήμα 62. EPR φάσμα της HPO lyase σε διαφορετικές τιμές pH.

Από την σύγκριση των φασμάτων EPR που λήφθηκαν σε διάφορες τιμές pH προέκυψε ότι ο σίδηρος στο κέντρο της HPO lyase παραμένει σε κατάσταση υψηλού spin σε όλη την κλίμακα του pH. Στα φάσματα αυτά παρατηρούνται σήματα που αποδόθηκαν στη συνεισφορά της $\pm 3/2$ κατάστασης με τιμές $g_z=5.6$ και g_x, g_y περίπου 2.37.

Για την μελέτη του περιβάλλοντος του αιμικού σιδήρου της HPO lyase, έγινε σύγκριση του EPR φάσματος της HPO lyase με EPR φάσματα πρωτεϊνών (P450, CPO, CcP), οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοντέλα για την ερμηνεία των φασμάτων. Η σύγκριση αποκάλυψε σημαντική ομοιότητα των τιμών g (g-values) με πρωτεΐνες όπως το P450 και η CPO. Επιπλέον η μεγάλη ρομβική σχάση που εμφανίζει το σήμα του EPR της HPO lyase είναι χαρακτηριστικό αιμοπρωτεϊνών με κυστεΐνη στην πέμπτη θέση συναρμογής του σιδήρου. Στον πίνακα φαίνεται η ταύτιση των τιμών g του φάσματος EPR της HPO lyase με τη μεταλλαγμένη μυοσφαιρίνη (H93C), στην οποία η proximal ιστιδίνη έχει αντικατασταθεί με κυστεΐνη. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικών ομοιοτήτων στο μεταλλικό κέντρο της HPO lyase και του P450.

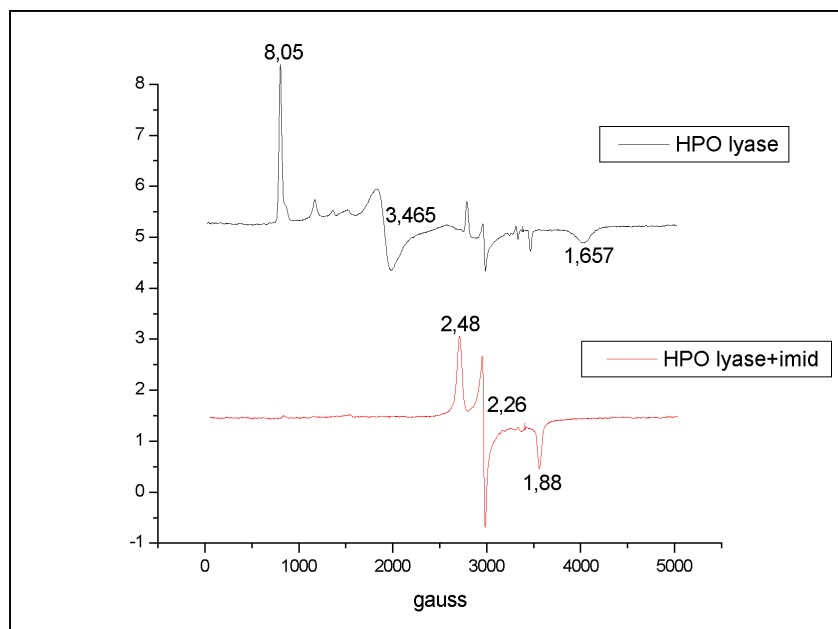
Πίνακας 12: *EPR παράμετροι (g-values) επιλεγμένων αιμοπρωτεϊνών*

proximal ligand	πρωτεΐνη	g-values			αναφορά
		g ₁	g ₂	g ₃	
	<u>HPO lyase</u>	8.05	3.46	1.65	
Κυστεΐνη	P450	7.9	4.0	1.8	[198]
Κυστεΐνη	CPO	7.6	4.3	1.8	[199]
Κυστεΐνη	Mb (H93C)	8.4	3.2	1.6	[200]
Ιστιδίνη	CcP	6.4	5.3	2.0	[191]

Με στόχο την παραπέρα μελέτη του περιβάλλοντος της αίμης στο ένζυμο, ελήφθησαν EPR φάσματα της λύσης μετά την προσθήκη εξωγενών ligands, ιμιδαζόλιο και κυάνιο. Τα ligands που χρησιμοποιήθηκαν είναι το , Τα σύμπλοκα της HPO lyase με τα ligands αυτά έχουν χαρακτηριστεί με φασματοσκοπία απορρόφησης UV-Vis. Σύμπλοκα αυτών των ligands με διάφορες αιμοπρωτεΐνες έχουν μελετηθεί εκτεταμένα με φασματοσκοπία EPR και οι αλλαγές που επιφέρουν στα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά παρέχουν πληροφορίες για το περιβάλλον του σιδήρου.

Από το EPR φάσμα του συμπλόκου της λύσης με ιμιδαζόλιο φαίνεται ότι η συναρμογή του ligand οδήγησε στην μετατροπή του spin από υψηλό σε χαμηλό, όπως είχε προκύψει και από τον χαρακτηρισμό του συμπλόκου με φασματοσκοπία UV-Vis.

Το φάσμα EPR του συμπλόκου της λυάσης με ιμιδαζόλιο εμφανίζει ρομβική σχάση με τιμές g , (2.48, 2.26, 1.88) που είναι χαρακτηριστικές για σύμπλοκα αιμοπρωτεϊνών με κυστεΐνη σε θέση trans ως προς το ιμιδαζόλιο (σχήμα 63).



Σχήμα 63. EPR φάσμα της HPO Lyase (μαύρη γραμμή) και του ενζύμου με 540 mM ιμιδαζόλιο (κόκκινη γραμμή).

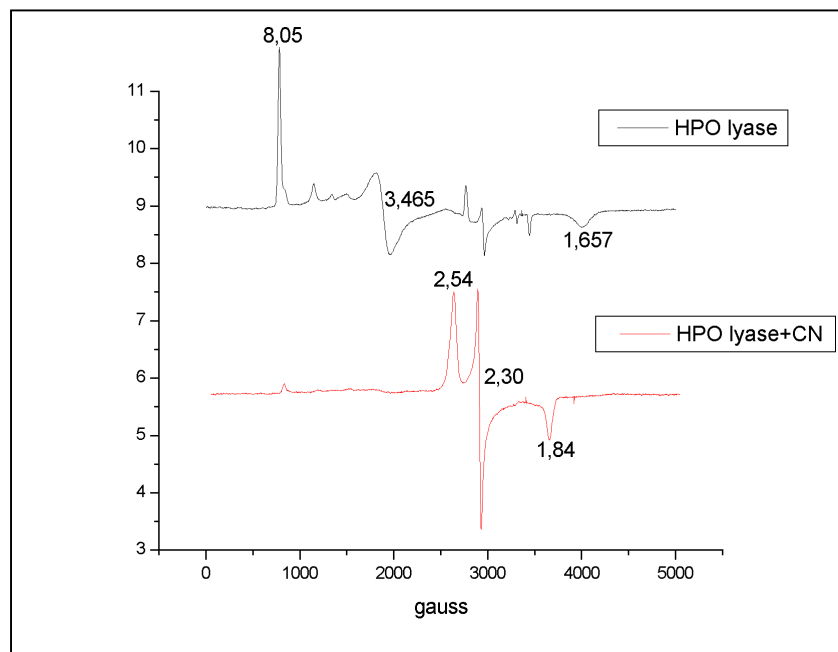
Στον πίνακα 13 παρουσιάζονται οι τιμές g από EPR φάσματα του συμπλόκου διαφόρων αιμοπρωτεϊνών με ιμιδαζόλιο.

Πίνακας 13: EPR παράμετροι (g -values) του συμπλόκου αιμοπρωτεϊνών με ιμιδαζόλιο

proximal ligand	πρωτεΐνη	<u>g-values</u>			αναφορά
		g_1	g_2	g_3	
	<u>HPO Lyase</u>	2.48	2.26	1.88	
Κυστεΐνη	P450	2.56	2.27	1.87	[198]
Κυστεΐνη	CPO	2.53	2.28	1.85	[201]
Ιστιδίνη	Mb	2.86	2.27	1.53	[192]
Ιστιδίνη	CcP (+RSH)	2.46	2.26	1.91	[191]

Το μικρό εύρος διασποράς των τιμών g στο EPR φάσμα του συμπλόκου με ιμιδαζόλιο είναι χαρακτηριστικό αιμοπρωτεϊνών με κυστεΐνη σε θέση *trans* ως προς το ιμιδαζόλιο. Η ταύτιση του φάσματος EPR του συμπλόκου HPO lyase–ιμιδαζόλιο με εκείνο του συμπλόκου CcP-RS, είναι ενδεικτική της ομοιότητας του περιβάλλοντος της αίμης στα δύο αυτά σύμπλοκα, και συγκεκριμένα της συναρμογής κυστεΐνη-Fe(III)-ιμιδαζόλιο.

Η προσθήκη CN^- στην HPO lyase οδήγησε στην μετατροπή του 93% των κέντρων στην κατάσταση *low spin* με τιμές g : 2.54, 2.30, 1.84 (σχήμα 64).



Σχήμα 64. Φάσμα EPR της HPO lyase (μαύρη γραμμή) και του ενζύμου με 200 mM KCN.

Το EPR φάσμα του συμπλόκου της HPO lyase εμφανίζει ρομβική σχάση και οι τιμές g παρουσιάζουν μικρή διασπορά (2.54-1.84). Το μικρό εύρος των τιμών g είναι χαρακτηριστικό του EPR φάσματος του συμπλόκου με κυάνιο αιμοπρωτεϊνών, όπως το P450 και η CPO. Αντίθετα σε αιμοπρωτεΐνες με *proximal* ιστιδίνη οι τιμές g στο φάσμα EPR του συμπλόκου με CN^- εμφανίζουν μεγαλύτερη διασπορά (3.45-0.93). Τα χαρακτηριστικά του φάσματος EPR του συμπλόκου HPO lyase-CN στηρίζουν την ύπαρξη κυστεΐνης σε θέση *trans* ως προς κυάνιο, $CN-Fe(III)-Cys$.

Στον πίνακα 14 παρουσιάζονται οι τιμές g από τα φάσματα EPR επιλεγμένων αιμοπρωτεϊνών με κυάνιο.

Πίνακας 14: EPR παράμετροι (g-values) του συμπλόκου αιμοπρωτεϊνών με

CN

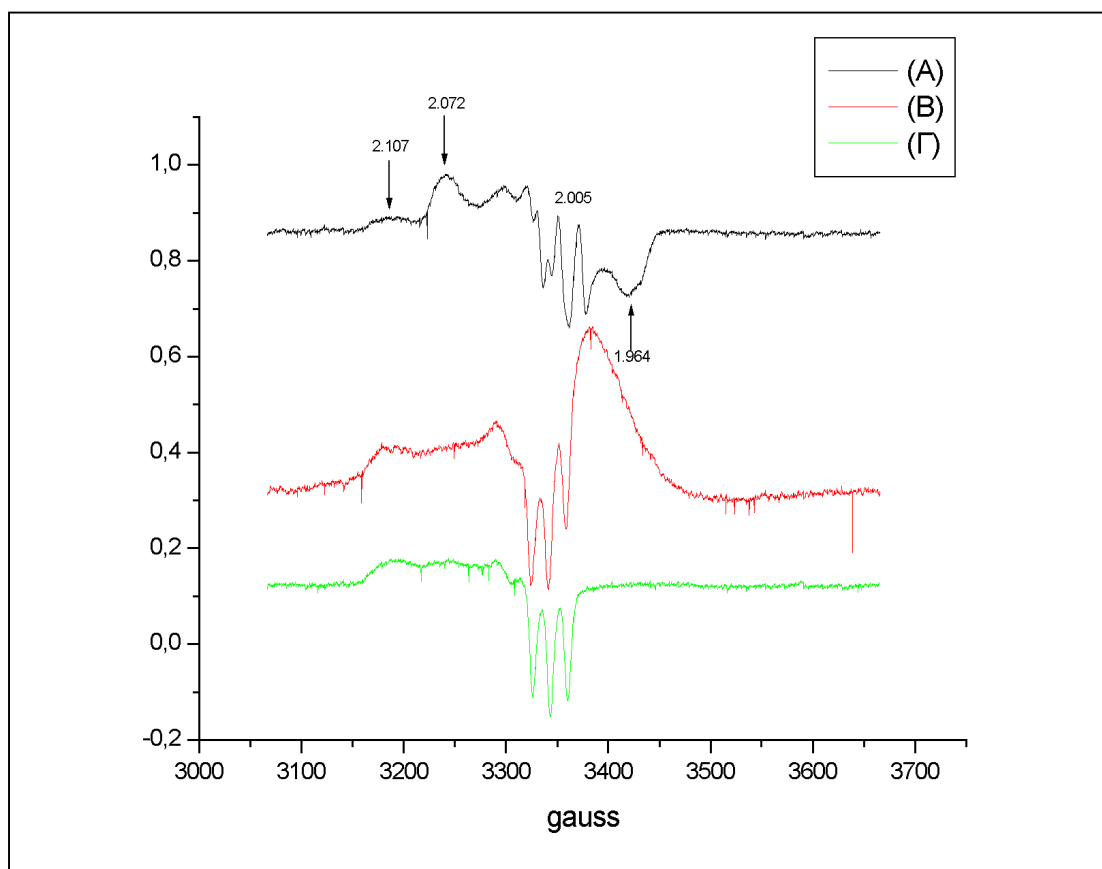
proximal ligand	πρωτεΐνη	g-values			αναφορά
		g ₁	g ₂	g ₃	
	<u>HPO lyase</u>	2.54	2.30	1.84	
Κυστεΐνη	P450	2.45	2.28	1.83	[198]
Κυστεΐνη	CPO	2.66	2.31	1.77	[201]
Ιστιδίνη	Mb	3.45	1.89	0.93	[202]
Ιστιδίνη	CcP	3.30	2.00		[191]

Από την σύγκριση των τιμών g αποκαλύπτεται σημαντική ομοιότητα του μεταλλικού κέντρου της HPO lyase με αιμοπρωτεΐνες όπως το P450 και η CPO. Κοινό χαρακτηριστικό των ενζύμων αυτών είναι η κυστεΐνη στην πέμπτη θέση συναρμογής του σιδήρου, η οποία καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τα χαρακτηριστικά του φάσματος EPR.

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η δημιουργία συμπλόκου του ανηγμένου ενζύμου (Fe II) με μονοξείδιο του αζώτου (NO) και χαρακτηρισμός του με φασματοσκοπία EPR. Το μονοξείδιο του αζώτου έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για τη μελέτη της ηλεκτρονικής δομής του μεταλλικού κέντρου σε διάφορες αιμοπρωτεΐνες. Το NO σχηματίζει σύμπλοκα με το σίδηρο της αίμης και στις δύο οξειδωτικές καταστάσεις. Το σύμπλοκο Fe(III)-NO είναι διαμαγνητικό και δεν εμφανίζει EPR σήμα. Αντίθετα το σύμπλοκο Fe(II)-NO είναι παραμαγνητικό λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου του μονοξειδίου του αζώτου και το φάσμα EPR είναι ευαίσθητο στις αλλαγές του περιβάλλοντος της αίμης.

Για την παρασκευή του συμπλόκου (Fe-NO), το ένζυμο αρχικά ανάγεται με Na₂S₂O₄ και στη συνέχεια διοχετεύονται 2ml αερίου NO σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το δείγμα ψύχεται απευθείας σε υγρό άζωτο (77 K) και λαμβάνεται το EPR φάσμα σε θερμοκρασία 30 K.

Το φάσμα EPR που λαμβάνεται μετά την αναγωγή του ενζύμου και την πρώτη προσθήκη NO παρουσιάζει πολυπλοκότητα που αποδόθηκε στην συνεισφορά δύο σημάτων (σχήμα 65 A). Το ένα σήμα με τιμές $g_x=2.072$, $g_y=1.964$ και g_z περίπου 2.005 παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα με το EPR του συμπλόκου P450 (Fe II)-NO [203]. Το σήμα αυτό έχει ρομβική συμμετρία και η απορρόφηση g_z εμφανίζει τριπλή σχάση (hyperfine splitting) λόγω της αλληλεπίδρασης του ηλεκτρονικού spin με το πυρηνικό spin του αζώτου στο NO.



Σχήμα 65. EPR φάσμα της ανηγμένης HPO lyase (Fe II) με NO: (A) προσθήκη 2 ml NO σε HPO lyase, (B) προσθήκη επιπλέον 2 ml NO, (Γ) προσθήκη 2 ml αζώτου για την απομάκρυνση της περίσσειας NO.

Το δεύτερο σήμα εμφανίζει αξονική συμμετρία και χαρακτηρίζεται από g_x , g_y στα 2.107 και οξεία τριπλή σχάση του g_z . Το σήμα αυτό εμφανίζεται μετά από επιπλέον προσθήκη NO και εμφανίζει τα ίδια χαρακτηριστικά με το σύμπλοκο του NO με μετουσιωμένο P450 (σχήμα 65 Γ).

Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι, το σύμπλοκο της HPO lyase (Fe II)-NO είναι ιδιαίτερα ασταθές και μετατρέπεται στο πιο σταθερό σύμπλοκο της μετουσιωμένης λύασης με το NO.

6.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λύαση του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων κατέχει κεντρικό ρόλο στον αμυντικό μηχανισμό των φυτικών οργανισμών συμμετέχοντας στο μεταβολικό μονοπάτι της λιποξυγενάσης [164, 165]. Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τόσο για τον σπουδαίο βιολογικό του ρόλο όσο και για τα μοναδικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του. Τα προϊόντα της ενζυμικής δράσης της λύασης εμπλέκονται στην αντίσταση των φυτών σε μικρόβια καθώς και στην επούλωση τραυμάτων των φυτικών ιστών [168-173]. Η δομική και λειτουργική μελέτη του ενζύμου είναι σε αρχικό στάδιο, παρά την πρόωμη ανακάλυψη των προϊόντων που παράγονται κατά την δράση του. Η φασματοσκοπική μελέτη της HPO lyase έχει παρεμποδιστεί από την μικρή ποσότητα του ενζύμου στους φυτικούς ιστούς. Τα τελευταία χρόνια η απομόνωση του γονιδίου της HPO lyase από διάφορους φυτικούς ιστούς έχει επιτρέψει της αποκάλυψη της αμινοξικής αλληλουχίας και την σύγκριση της με άλλα ένζυμα. Οι μελέτες αυτές απεκάλυψαν σημαντικές ομοιότητες με την οικογένεια των κυτοχρωμάτων P450 και κατέταξαν την λύαση στην οικογένεια CYP74 [184]. Η HPO lyase διαφέρει από τα κλασσικά P450 στο ότι δεν απαιτείται ούτε οξυγόνο ούτε αναγωγικό και επιδεικνύει υψηλή ταχύτητα ανακύκλωσης. Επιπλέον δεν υπάρχουν φασματοσκοπικά δεδομένα τα οποία αποδεικνύουν την ύπαρξη κυστεΐνης στην πέμπτη θέση συναρμογής της αίμης.

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε για πρώτη φορά η φασματοσκοπική μελέτη της HPO lyase με στόχο την αποκάλυψη δομικών πληροφοριών για το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η μελέτη στηρίχτηκε στην συναρμογή εξωγενών ligands στο σίδηρο της αίμης του ενζύμου και χαρακτηρισμό των συμπλόκων με φασματοσκοπία απορρόφησης (UV-Vis) και EPR.

Η παρουσία της Soret στα 393 nm καθώς και της CT ταινίας στα 644 nm στο απόλυτο φάσμα απορρόφησης της HPO lyase ταυτίζονται με τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του πεντασυναρμοσμένου υψηλού spin P450 [189].

Από το EPR φάσμα του ενζύμου προέκυψαν επιπλέον δεδομένα που στηρίζουν την ύπαρξη κυστεΐνης στην proximal θέση της αίμης [198-200]. Το σήμα EPR παρουσιάζει μεγάλη ρομβική σχάση με τιμές g_x , g_y και g_z στην κλίμακα 7-8, 3-4 και 1,8-1.6, που είναι χαρακτηριστικές ενζύμων υψηλού spin με κυστεΐνη στην πέμπτη θέση συναρμογής όπως το P450 και η CPO [199, 204-208].

Το φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου του ενζύμου με ιμιδαζόλιο στηρίζει την ύπαρξη κυστεΐνης ligand σε θέση trans ως προς το ιμιδαζόλιο. Η συναρμογή του ιμιδαζολίου προκαλεί την μετατόπιση της Soret στα 424 nm όπως και στο κυτόχρωμα P450 [193, 194]. Αντίθετα η συναρμογή του ιμιδαζολίου σε πρωτεΐνες με ιστιδίνη μετατοπίζει την Soret περίπου κατά 10 nm (412-417 nm) που είναι τυπικό για ένζυμα με δύο ιστιδίνες ως αξονικά ligands στην αίμη (κυτόχρωμα b_5) [191, 192, 209, 210]. Το φάσμα EPR της λυάσης με ιμιδαζόλιο εμφανίζει τιμές g με μικρή διαφορά μεταξύ τους και αυτό είναι χαρακτηριστικό πρωτεϊνών σε κατάσταση low spin με κυστεΐνη στην proximal θέση της αίμης [198, 199, 201, 204, 206, 207, 211]. Το EPR φάσμα πρωτεϊνών με ιμιδαζόλιο ως proximal ligand της αίμης (Cyt b_5 και Mb) εμφανίζει τιμές g σε μεγαλύτερη διασπορά (3.0, 2.1 και 1.5) [192, 212].

Το CN^- αποτελεί ισχυρότερο ligand της αίμης από ότι το ιμιδαζόλιο και επιπλέον έχει αρνητικό φορτίο. Το σύμπλοκο του CN^- με την λυάση εμφανίζει την Soret στα 433 nm, όπως το αντίστοιχο σύμπλοκο του P450 και αυτό επιβεβαιώνει την ύπαρξη κυστεΐνης σε θέση trans [193]. Πρωτεΐνες με ιστιδίνη στην proximal θέση της αίμης παρουσιάζουν την Soret στα 420 nm και β ταινία στα 540 nm, που είναι ενδεικτικές του συμπλόκου CN-Fe-His [191, 195]. Το φάσμα EPR του συμπλόκου της HPO lyase με το CN^- είναι χαρακτηριστικό για αιμοπρωτεΐνες σε κατάσταση low spin και ο σχηματισμός αποκλειστικά χαμηλού spin συμπλόκων με ανιονικά ligands αποτελεί χαρακτηριστικό πρωτεϊνών με proximal κυστεΐνη. Η παρουσία της κυστεΐνης στηρίζεται και από την μικρή διασπορά των τιμών g , αφού σε πρωτεΐνες όπως το P450 και η CPO η τιμή g_1 είναι μεταξύ 2.33-2.66, ενώ σε πρωτεΐνες όπως η Mb και η CcP η τιμή αυτή είναι μεταξύ 2.38-3.45 [202].

Από την ομοιότητα του φάσματος της HPO lyase (Fe III)-NO με το αντίστοιχο σύμπλοκο του P450 επιβεβαιώνεται η δομική ομοιότητα στα κέντρα των δύο ενζύμων. Η Soret ταινία στο φάσμα UV-Vis του συμπλόκου HPO lyase (Fe III)-NO εμφανίζεται στα 430 nm σημαντικά μετατοπισμένη, όπως και η Soret ταινία του συμπλόκου του P450 και της CPO με NO [196].

Αντίθετα σε ένζυμα όπως η HRP και η CcP η Soret ταινία του συμπλόκου Fe(III)-NO παρουσιάζεται στα 419 nm. Επιπλέον τόσο η α (571 nm) όσο και η β (541 nm) ταινία εμφανίζονται στο ίδιο μήκος κύματος για τα σύμπλοκα του P450 και της HPO lyase με NO [197].

Το EPR φάσμα της ανηγμένης HPO lyase με το NO εμφανίζει ρομβική συμμετρία με τριπλή σχάση για το gz σήμα. Η τριπλή σχάση (hyperfine splitting) αποδίδεται στην αλληλεπίδραση του ηλεκτρονικού spin με το πυρηνικό spin του αζώτου του NO [203, 213]. Όμοια φάσματα EPR έχουν προκύψει από τα σύμπλοκα του NO με αιμοπρωτεΐνες που έχουν κυστεΐνη στην proximal θέση όπως το P450, η CPO και η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου [196, 203, 213]. Αντίθετα το EPR φάσμα, του συμπλόκου αυτού σε αιμοπρωτεΐνες που έχουν proximal ιστιδίνη (HRP, CcP, Mb) εμφανίζει εννιαπλή σχάση (superhyperfine splitting). Η υπέρλεπτη αυτή δομή αποδίδεται στην αλληλεπίδραση του ηλεκτρονικού spin του ασύζευκτου ηλεκτρονίου στο NO με το πυρηνικό spin του αζώτου του ιμιδαζολίου [197]. Η έλλειψη superhyperfine splitting από το EPR φάσμα του συμπλόκου HPO lyase Fe(III)-NO μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη proximal ligand χωρίς πυρηνικό spin όπως το θείο. Το σύμπλοκο HPO lyase Fe (III)-NO εμφανίζεται ασταθές και το ρομβικό σήμα μετατρέπεται σε σήμα με αξονική συμμετρία και οξεία σχάση του gz. Το φάσμα αυτό έχει αναφερθεί και για άλλες αιμοπρωτεΐνες (Mb, P450) οι οποίες έχουν υποστεί μετουσίωση και αποδίδεται στην αποδέσμευση του proximal ligand του σιδηρού [196, 203].

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της HPO lyase και προέκυψαν αποτελέσματα σχετικά με τη δομή του μεταλλικού κέντρου του ενζύμου. Μέχρι σήμερα, οι πληροφορίες σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά του ενζύμου έχουν προέλθει από τη σύγκριση της πρωτοταγούς δομής του ενζύμου με το P450 και με άλλα ένζυμα της οικογένειας CYP74. Ο συνδυασμός φασματοσκοπίας EPR και UV-Vis οδήγησε σε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δομή του ενεργού κέντρου της HPO lyase. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της λύσης παρουσιάζουν σημαντική ομοιότητα με εκείνα του P450, στηρίζοντας την ύπαρξη σημαντικών ομοιοτήτων στο ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών. Με την παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε το πρώτο βήμα στην μελέτη μίας νέας κατηγορίας ενζύμων που παρουσιάζουν μοναδικές δομικές και λειτουργικές ιδιότητες.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. and Michel, H. (1984). *J. Mol. Biol.* 180, 385.
2. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. and Michel, H. (1985). *Nature* 318, 618.
3. Deisenhofer, J., Epp, O., Sinning, I. and Michel, H. (1995). *J. Mol. Biol.* 246, 429.
4. Henderson, R. and Unwin, P. N. T. (1975). *Nature.* 257. 28
5. Brisson, A. and Unwin, P. N. T. (1985). *Nature.* 315, 474.
6. Rosenbusch, J, P. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 8019.
7. Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E. and Downing, K.H. (1990). *J. Mol. Biol.* 213, 899.
8. Grigorieff, N., Ceska, T.A., Downing, K.H., Baldwin, J.M. and Henderson, R. (1996). *J. Mol. Biol.* 259, 393.
9. Kimura, Y., Vassylyev, D.G., Miyazawa, A., Kidera, A., Matsushima, M., Mitsuoka, K., Murata, K., Hirai, T. and Fujiyoshi, Y. (1997). *Nature* 389, 206.
10. Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J.P., and Landau, E.M. (1997). *Science* 277, 1676.
11. Kuhlbrandt, W., Wang, D.N. and Fujiyoshi, Y. (1994). *Nature* 367, 614.
12. McDermott, G., Prince, S.M., Freer, A.A., Hawthornthwaite-Lawless, A.M., Papiz, M.Z., Cogdell, R.J. and Isaacs, N.W. (1995) *Nature* 374, 517.
13. Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schulten, K. and Michel, H. (1996) *Structure* 15, 581.
14. Krauss, N., Schubert, W.D., Klukas, O., Fromme, P., Witt, H.T. and Saenger, W. (1996). *Nat. Struct. Biol.* 3, 965.
15. Weiss, M.S., Wacker, T., Weckesser, J., Welte, W. and Schulz, G.E. (1990) *FEBS Lett* 267, 268.
16. Weiss, M.S., Kreuzsch, A., Schiltz, E., Nestel, U., Welte, W., Weckesser, J. and Schulz, G.E. (1991) *FEBS Lett* 280, 379.
17. Weiss, M.S., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W. Schiltz, E. and Schulz, G.E. (1991). *Science* 254, 1627.

18. Smith, B.S., Kobe, B., Kurumbail, R., Buchanan, S.K., Venkatramani, L., van der Helm, D. and Deisenhofer, J. (1998) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 697.
19. Buchanan, S., Smith, B., Venkatramani, L., Xia, D., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D., & Deisenhofer, J., presented at American Crystallographic Association meeting, July, 1998, abstr.
20. Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H. and Gouaux, J.E. (1996). *Science* 274, 1859.
21. Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and MacKinnon, R. (1998). *Science* 280, 69.
22. Picot, D., Loll, P.J. and Garavito, R.M. (1994). *Nature* 367, 243.
23. Loll, P.J., Picot, D. and Garavito, R.M. (1995). *Nature Structural Biology* 2, 637.
24. Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehause, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C. and Stallings, W.C. (1996). *Nature* 384, 644.
25. Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C. and Browner, M.F. (1996). *Nature Structural Biology* 3, 927.
26. Wendt, K.U., Poralla, K. and Schulz, G.E. (1997). *Science* 277, 1811.
27. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. and Michel, H. (1995). *Nature* 376, 660.
28. Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U. and Michel, H. 1997). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 94, 10547.
29. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1995). *Science* 269, 1069.
30. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1996). *Science* 272, 1136.
31. Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L. and Deisenhofer, J. (1997). *Science* 277, 60.
32. Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S. and Jap, B.K. 1998). *Science* 281, 64.
33. Helenius, A. and Simons, K. (1975). *Biochim. Biophys. Acta.* 415, 29.
34. Tanford, C. and Reynolds, J.S. (1976). *Biochim. Biophys. Acta.* 457, 133.

35. Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E. and Tanford, C. (1981). *Methods Enzymol.* 56, 734.
36. Michel, H. (1983). *Trends Biochem Sci.* 8, 56.
37. Garavito, R. M., Markovic-Housley. And Jenkins, A. J. (1986). *J. Crystal Growth.* 76, 701.
38. Garavito, M. R. and Picot, D. (1990). *METHODS: A companion to Methods in Enzymology.* Vol. 1. No.1. pp.57-69.
39. Ostermeier, C and Michel, H. (1997). *Current Opinion in Structural Biology.* 7, 697.
40. Jansson, S. (1994). *Biochom. Biophys.Acta.* 1184, 1.
41. Anderson, J. M. and Anderson, B. (1988). *Trends Biochem Sci.* 13, 351-355.
42. Bricker, T. M. and Ghanotakis, D. F. (1996). Introduction to Oxygen Evolution and the Oxygen-Evolving Complex. (eds Donald R. Ort and Charles F, Yocum). *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, pp. 113-136. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
43. Ghanotakis, D. F. and Yocum, C. F. (1990). *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 41, 255-276.
44. Debus, R. J. (1992). *Biochim Biophys Acta.* 1102, 269-352.
45. Klimov, V. V. , Dolan, E. and Ke. B. (1980). *FEBS Lett.* 112, 97.
46. Debus, R. J. , Barry, B. A. , Sithole, I. , Babcock, G. T. and McIntosh, L. (1988a). *Biochemistry.* 27, 9071.
47. Debus, R. J. , Barry, B. A. , Babcock, G. T. and McIntosh, L. (1988b). *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 427.
48. Joliot, P. , Barbieri, G. and Chabaud, R. (1969). *Photochem Photobiol.* 10, 309.
49. Kock, B. , Forbush, B. and Mc Gloin, M. (1970). *Photochem Photobiol.* 11, 457.
50. Berthold, D. A. , Babcock, G. T. and Yocum, C. F. (1981). *FEBS Lett.* 134, 231.
51. Kuwabara, T. and Murata, N. (1982). *Plant cell Physiol.* 23, 533.
52. Ikeuchi, M. , Yuasa, M. and Inoue, Y. (1985). *FEBS Lett.* 197, 316.
53. Ghanotakis, D. F. and Yocym, C. F. (1987). *Biochim Biophys Acta.* 891, 15.

54. Deisenhofer, J. , Epp, O. , Miki, K. , Huber, R. and Michel, H. (1985). *Nature*. 318, 618.
55. Trebst, A. (1986). *Z. Naturforsch.* 41C, 240.
56. Michel, H. and Deisenhofer, J. (1988). *Biochemistry*. 27, 1.
57. Rutherford, A., W. (1986). *Biochem. Soc. Trans.* 14, 15.
58. Barber, J. (1987). *Trends Biochem Sci.* 12, 321.
59. Trebst, A. and Depka, B. (1985). In: *Antennas and Reactions Centers in Photosynthetic Bacteria-Interactions and Dynamics*. (Beyerle, M. E. , ed.), pp. 216-224, Springer-Verlag, Berlin.
60. Nanba, O. and Satoh, K. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84, 109.
61. Montoya, G. , Yruela, I. And Picorel, R. (1991). *FEBS Lett.* 283, 255.
62. Kobayashi, M. , Hiroyuki, M. , Tadashi, W. and Satoh, K. (1990). *FEBS Lett.* 260, 138.
63. Eijkelhoff, C. and Dekker, P. J. (1995). *Biochim. Biophys. Acta.* 1231, 21.
64. Yachandra, V. K. , DeRose, V. J. , Latimer, M. J. , Mukerji, I. , Sauer, K. and Klein, M. P. (1993). *Science*. 260, 675.
65. Gounaris, K. , Chapman, D. J. and Barber, J. (1988). *FEBS Lett.* 234, 374.
66. Bricker, T. M. (1990). *Photosyn. Res.* 24, 1.
67. Vermaas, W. F. J. , Williamw, J. G. K. and Arntzen, C. K. (1987). *Plant. Mol. Biol.* 8, 317.
68. Sayre, R. T. and Wrobel-Boerner, E. A. (1994). *Photosyn Res.* 40, 11.
69. Zuber, H. , Brunisholz, R. and Silder, W. (1987). *Structure and Function of Light Harvesting Pigment Protein Complexes*. In: Ames, J (ed). *Photosynthesis*, pp. 233-271. Elsevier Press, Amsterdam.
70. Tannig, X. S. and Satoh, K. (1984). *Plant. Cell. Physiol.* 25, 935.
71. Barbato, R. , Race, H. L. , Frisko, G. and Barber, J. (1991). *FEBS Lett.* 286, 86.
72. De Vitry, C. Wollmann, F. A. and Delepelaire, P. (1984). *Biochim. Biophys. Acta.* 767, 415.
73. Yamaguchi, N. Takahashi, Y. and Satoh, K. (1988). *Plant Cell Physiol.* 29, 131.
74. Wechsler, T. , Suter, F. , Fuller, R. C. and Zuber, H. (1985). *FEBS Lett.* 181, 173

75. Bassi, R. , Hoyer-Hansen, G. , Barbato, R. , Giacometti, G. M. and Simpson, D. J. (1987). *J. Biol. Chem.* 262, 13333.
76. Akabori, K. , Tsukamoto, H. , Tsukihara, J. , Nagatsuka, T. , Mtokawa, O. and Toyoshima, Y. (1988). *Biochim. Biophys. Acta.* 932, 345.
77. Ghanotakis, D. F. , de Paula, J. C. , Demetriou, D. M. , Bowlby, N. R. , Petersen, J. , Babcock, G. T. and Yocum, C. F. (1989). *Biochim. Biophys. Acta.* 974. 44.
78. Rogner, M. , Chisholm, D. A. and Diner, B. (1991). *Biochemistry.* 30, 5387.
79. Bricker, T. M, T. M. and Frankel, L. K. (1987). *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 295.
80. Frankel, L. K. and Bricker, T. M. (1989). *FEBS Lett.* 257, 279.
81. Bricker, T. M. , Odom, W. R. and Queirolo, C. B. *FEBS Lett.* 231, 111.
82. Frankel, L. K. and Bricker, T. M. (1992). *Biochemistry.* 31, 11063.
83. Hayashi, H. , Fujimura, Y. , Mohanty, P. S. and Murata, N. (1993). *Photosyn, Res.* 36, 35.
84. Enami, I. , Kaneko, M. , Kitamura, N. , Koike, H. , Sonoike, K. , Inoue, Y. and Katoh, S. (1991). *Biochim. Biophys, Acta.* 1060, 224.
85. Hackett, C. S. and Strittmatter, P. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 3275.
86. Odom, W. R. and Bricker, T. M. (1992). *Biochemistry.* 31, 5616.
87. Bricker, T. M. (1992). *Biochemistry.* 31,4623.
88. Miyao, M. and Murata, N. (1984). *FEBS Lett.* 168, 281.
89. Kuwabara, T. , Miyao, M. , Murata, T. and Murata, N.(1985). *Biochim. Biophys. Acta.* 806, 283.
90. Miyao, M. and Murata, N. (1984). *FEBS Lett.* 168, 118.
91. Mitao, M. and Murata, N. (1985). *FEBS Lett.* 180, 303.
92. Waggoner, C. M. and Yocum, C. F. (1987). Selective depletion of water-soluble polypeptides associated with PS II. In: Bigginns, J(ed). Progress in Photosynthesis Research, Vol. I, pp. 685-688.. Martinus Nijhoff, Dordrecht.
93. Miyao, M. and Murata, N. (1983). *Biochim. Biophys. Acta.* 725, 87.
94. Miyao, M. and Murata, N. (1989). *Biochim. Biophys. Acta.* 977, 315.
95. Debus, R.G. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 269.
96. Cheniae, G.M. (1980) *Methods Enzymol.* 69, 349.
97. Amesz, J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 726, 1.

- ⁹⁸. Brudwig, G. W. and de Paula, J.C. (1987) In: Progress in Photosynthesis Research (Biggins, J. ed.) Vol. I, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- ⁹⁹. Kok, B. Forbush, B. and McGloin, M. (1970) *Photochem. Photobiol.* 11, 457.
100. Kyle, D. J. (1987) in Photoinhibition (kyle, D. J., Osmond, C. B., and Arntzen, C. J., Eds) pp 197-226, Elsevier, Amsterdam.
101. Barber, J. and Anderson, B. (1992). *Trends Biochem Sci.* 17, 61
102. Aro, E.-M., Virgin, I. And Andersson, B. (1993). *Biochem. Biophys. Acta.* 1143, 113.
103. Vass, I., Strying, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E.-M., and andersson, B.(1992). *Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1408.
104. Seltik, I., Allakhverdiev, S. I., Nedbal, L., Setlikova, E. and Klimov, V. (1990). *Photosynth. Res.* 23, 39.
105. Strying, S., Virgin, I., Ehrenberg, A. and Andersson, B (1990). *Biochem. Biophys. Acta.* 1015, 269.
106. Van Mieghem, F. J. E., Searle, G. F. W., Rutherford, A. W. and Schaafsma, T. J. (1992). *Biochem. Biophys. Acta.* 1100, 198.
107. Macpherson, A. N., Tefler, A., Barber, J. and Truscott, G. T. (1993). *Biochem. Biophys. Acta.* 1143, 301
108. Cogdell, R. J. and Frank, H.A. (1987). *Biochim. Biophys. Acta.* 895, 63.
109. Mishra, N. P., Francke, C., Van Gorkom, H.J. and Ghanotakis, D. F.(1994). *Biochim. Biophys. Acta.* 1186, 81
110. Mishra, N. P. and Ghanotakis, F. (1994). *Biochim. Biophys. Acta.* 1187,296.
111. Blubaugh, D. J., Atamian, M., Babcock, G. T., Goldbeck, J.H. and Cheniae, G. M. (1991). *Biochemistry.* 30, 7586.
112. Eckert, H.-J., Geiken, B., Bernarding, J., Napiwotzki, A., Eichler, H.-J. and Renger G. (1991). *Photosynth. Res.* 27, 97.
113. Matto, A. K., Pick. U., Hoffman-Falk, H. nad Edelman, M. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 1572.
114. Matto, A., Hoffman-Falk, H., Marder, J. B. and Edelman, M. (1984). *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 81, 1380.
115. Shipton, C. A. and Barber, J. (1992). *Biochim. Biophys. Acta.* 1099, 85
116. De Las Rivas, J., Shipton, C. A., Ponticos, M and Barber, J. (1993). *Biochemistry.* 32, 6944.
117. Bradley, R. L., Long, K. M. and Frasch, W. D. (1991). *FEBS Lett.* 286, 209.

118. Φωτεινού Κωνσταντίνα. (1993). Διδακτορική διατριβή.
119. Σπυριδάκη Ασπασία. (1999). Διδακτορική διατριβή.
120. Fotinou, C., Kokkinidis, M., Fritzsche, G., Haase, W., Michel, H. and Ghanotakis, D. F. (1993). *Photosynth. Res.* 37, 41.
121. Adir, N., Okamura, Y. and Feher, G. (1992). *Biophys. J.* 61, 101.
122. Robinson, H. H., Sharp, R. R. and Yocum, C. F. (1981). *Archiv. Biochem. Biophys.* 207, 1.
123. Ghanotakis, D.F., Babcock, G. and Yocum, C.F. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 765, 388.
124. Kuwabara, T. and Murata, N. (1982) *Pl. Cell Physiol.* 24, 741-747.
125. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680.
126. Arnon, D. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1.
127. Drenth, J. Principles of Protein X-ray Crystallography.
128. Kouimtjoglou, E., Mishra, R. and Ghanotakis, D. F.(1995). In: Photosynthesis: from Light to Biosphere (P. Mathis ed) Vol. II. 305. Kluwer Academic Publishers.
129. Tsiotis, G., McDermott, G. and Ghanotakis, D. F. (1996). *Photosynth. Res.* 50, 93.
130. Virgin, I., Ghanotakis, D. F. and Andersson B. (1990). *FEBS Lett.* 269, 45.
131. Miyao, M., Ikeuchi, M., Yamamoto, N. and Ono, T. (1995). *Biochemistry.* 34, 10019.
132. Barber, J. and Andersson, B. (1994). *Nature* 370, 3.
133. Tang, X.S., Fushimi, K. and Satoh, K. (1990). *FEBS Lett* 273, 257.
134. de Barber, J. and las Rivas, J. (1993). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 10942.
135. Poulson, M., Samson, G. & Whitmarsh, J. (1995). *Biochemistry* 34, 10932.
136. Nanba, O. & Satoh, K. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 109.
137. Gounaris, K., Chapman, D.J. & Barber, J. (1989). *Biochim. Biophys. Acta* 973, 296.
138. Ghanotakis, D., de Pavla, J., Demetriou, D., Bowlby, Peterson, J., Babcock, G. and Yocum, C. (1989). *Biochim. Biophys. Acta* 974, 44.
139. Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1988). *Plant Cell Physiol.* 29, 1233.
140. Barry, B.A. and Boener, R. (1994) The use of cyanobacteria in the study of the structure and function of photosystem II. In: The Molecular Biology of

- Cyanobacteria (Bryant, D.A., ed.), pp. 217-257. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
141. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. and Michel, H. (1985). *Nature* 318, 618.
 142. Trebst, A. (1986). *Z.Naturforsch.* 41c, 240.
 143. Michel, H. and Deisenhofer, J. (1988). *Biochemistry* 27, 1.
 144. Svensson, B., Vass, I., Cedergren, E. and Styring, S. (1990). *EMBO J.* 9, 2051.
 145. Ruffle, S.V., Donnelly, D., Blundell, T.L. & Nugent, J.H.A. (1992). *Photosynth. Res.* 34, 287.
 146. Rhee, K.H., Norris, E.P., Zheleva, D., Hamkamer, B., KuÈ hlbrandt, W. and Barber, J. (1997). *Nature* 389, 522.
 147. Tsiotis, G., Nitschke, W., Haase, W. and Michel, H. (1993). *Photosynth. Res.* 35, 285.
 148. Ansorge, W. (1985). *J. Biochem. Biophys. Methods* 11, 13.
 149. Zheleva, D., Hankamer, B. and Barber, J. (1996). *Biochemistry* 35, 15074.
 150. Kobayashi, M., Maeda, H., Watanabe, T., Nakatane, H. and Satoh, K. (1990). *FEBS Lett.* 260, 138.
 151. Eijkelhoff, C. and Dekker, J.P. (1995). *Biochim. Biophys. Acta* 1231, 21.
 152. Gounaris, K., Chapman, D.J., Booth, P., Crystall, B., Giorjiy, L.B., Klug, D.R., Porter, G. and Barber, J. (1990). *FEBS Lett* 265, 88.
 153. Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H. and Rees, D.C. (1987). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84, 6162.
 154. Deisenhofer, J. and Michel, H. (1989). *EMBO J.* 8, 2149.
 155. Holzenburg, A., Bewley, M.C., Wilson, F.H., Nicholson, W.V. and Ford, R.C. (1993). *Nature* 363, 470.
 156. Ford, R.C., Rosenberg, M.F., Shepherd, F.H., McPhie, P. and Holzenburg, A. (1995). *Micron* 26, 133.
 157. Tsiotis, G., Walz, T., Spyriolaki, A., Lustig, A., Enyel, A. and Ghanotakis, D. (1996). *J.Mol. Biol.* 259, 241.
 158. Hasler, L., Ghanotakis, D., Fedtke, B., Spyriolaki, A., Miller, M., Muller, S.A., Enyel, A. and Tsiotis, G. (1997). *J. Struct. Biol.* 119, 273.
 159. Boekema, E.J., Hamkamer, B., Bald, D., Kruip, A., Nicol, J., Boonstra, A.F., Barber, J. and Rognar, M. (1995). *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 92, 175.
 160. Marr, K.M., Mastronarde, D.N. and Lyon, M.K. (1996). *J. Cell Biol.* 132, 823.

161. RoÈgner, M., Boekema, E.J. and Barber, J. (1996). *TIBS* 21, 44.
162. Barber, J. (1998). *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 269.
163. Vick, B. A. and Zimmerman, D. C. (1976). *Plant Physiol.* 57, 780.
164. Gardner, H. W. (1991). *Biochim. Biophys. Acta.* 1084, 221.
165. Grechkin A. (1998). *Prog. Lipids. Res.* 37, 317.
166. B. Samuelson, S. E., Dahlen, J. A., Lindgren, C. A., Rouzer, C. N., Serhan. (1987). *Science.* 237, 1171.
167. Blee, E. (1998). *Prog. Lipid. Res.* 37, 33.
168. Phillips, D. R. and Galliard, T. (1978). *Phytochemistry.* 17, 355.
169. Hatanaka, A. (1993). *Phytochemistry.* 34, 1201.
170. Croft, K. P. C., Juttner, F. and Slusarenko, A. J. (1993). *Plant Physiol.* 101, 13.
171. Bate, N. J. and Rothstein, S. J. (1998). *Plant J.* 16. 561.
172. Pare, P. W. and Tumlinson, J. H. (1999). *Plant Physiol.* 121, 325.
173. Zimmerman, D. C. and Coudron, C. A. (1979). *Plant Physiol.* 63, 536.
174. Creelman, R. A. and Mullet, J. E. (1997). *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 355.
175. Noordermeer, M. A., Veldinl, G. A., Vliegenthart, J. F. G. (1999). *FEBS Lett.* 443, 201.
176. Salas, J. J. and Sanchez, J. (1999). *Plant Science.* 143, 19.
177. Matsui, K., Toyota, H., Kajiwara, T., Kakuno, T. and Hatanaka, A. (1991). *Phytochemistry.* 30, 2109.
178. Fauconnier, M. L., Perez, A. G., Sanz, C. and Marlier, M. (1997). *J. Agric. Food. Chem.* 45, 4232.
179. Kim, I. S. and Grosch, W. (1981). *J. Agric. Food. Chem.* 29, 1220.
180. Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwara, T. and Hatanaka, A. (1995). *Plant. Cell. Physiol.* 36, 147.
181. Hornostaj, A. R. and Robinson, D. S. (1999). *Food Chemistry.* 66, 173.
182. Itoh, A. and Vick, B. A. (1999). *Biochim. Biophys. Acta.* 1436, 531.
183. Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwara, T. and Hatanaka, A. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Com.* 207, 438.
184. Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T. and Kajiwara, T. (1996). *FEBS Lett.* 394, 21.
185. Song Wen-Chao. and Brash, A. R. (1991). *Science.* 253, 781.

186. Song, W. C., Funk, C. D. and Brash, A. R. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 8519.
187. Schneider, C., Schreier, P. and Herderich, M. (1997). *Lipids.* 32, 331.
188. Thomas, P. E., Ryan, D. and Levin, W. (1976). *Analytical Biochemistry.* 75, 168.
189. Yu, C-A. and Gunsalus, I. C. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 94.
190. Hollenberg, P. F. and Hager, L. P. (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 2630.
191. Sigman, J. A., Pond, A. E., Dawson, J. H. and Lu, Y. (1999). *Biochemistry.* 38, 11122.
192. Jefcoate, C. R. E. and Gaylor, J. L. (1974) *Biochemistry.* 8, 3464.
193. Dawson, J. H., Andersson, L. A. and Sono, M. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 3606.
194. Sono, M. and Dawson, J. H. (1986). *Biochemistry* 25, 347.
195. Adachi, S.-i., Nagano, S., Watanabe, Y., Ishimori, K. and Morishima, I. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 138.
196. O'Keefe, D. H., Ebel, R. E. and Peterson, J. A. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 3509.
197. Yonetani, T., Yamamoto, H., Erman, J. E., Leigh, J. S. and Reed, H. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 2447.
198. Lipscomb, J. D. (1980). *Biochemistry.* 19, 3590.
199. Hollenberg, P.F., Hager, L. P., Blumberg, W. E. and Peisach, J. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 4801.
200. Adachi, S.-i., Nagano, S., Ishimori, K., Watanabe, Y., Morishima, I., Egawa, T., Kitagawa, T. and Makino, R. (1993). *Biochemistry.* 32, 241.
201. Sono, M., Hager, L. P. and Dawson, J. H. (1991). *Biochim. Biophys. Acta.* 1078, 351.
202. Sono, M. And Dawson, J. H. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 5496.
203. Ebel, R. E., O' Keefe, D. H. and Peterson J. A. (1975). *FEBS Lett.* 55, 198.
204. Collman, J. P., Sorrell, T. N. and Hoffman, B. M. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* 97, 913.
205. Koch, S., Tang, S. C., Holm, R. H. and Frankel, R. H. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* 97, 914.
206. Tang, S. C., Koch, S., Papaefthymiou, G. C., Foner, S., Frankel, R. B., Ibers, J. A. and Holm, R. H. (1976). *J. Am. Chem. Soc.* 98, 2414.

207. Dawson, J. H. And Sono, M. (1987). *Chem. Rev.* 87, 1255.
208. Tsai, R., Yu, C. A., Gunsalus, I. C., Peisach, J., Blumberg, W., Orme-Johnson, W. H. and Beinert, H. (1970). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 66, 1157.
209. Ozols, J. and Srittmatter, P. (1964). *J. Biol. Chem.* 239, 1018.
- ²¹⁰. Lloyd, E., Hildebrand, D. P., Tu, K. M. and Mauk, A. G. (1995). *J. Am. Chem. Soc.* 6434.
211. Chevion, M., Peisach, J. and Blumberg, W. E. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 3637.
212. Martinis, S. A., Sotiriou, C. and Chang, C. K. (1989). *Biochemistry.* 28, 879.
213. Shiro, Y., Fujii, M., Isogai, Y., Adachi, S. and Iizuka, T. (1995). *Biochemistry.* 34, 9052

