

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη του ρόλου των πρωτεϊνών του
πυρήνα του φωτοσυστήματος II»

ΚΟΥΪΜΤΖΟΓΛΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1999

Μέλη εξεταστικής επιτροπής:

Βαρώτσης Κων/νος	: Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Γανωτάκης Δημήτριος	: Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Καραμπάτσος Γεράσιμος	: Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Κοτζαμπάσης Κυριάκος	: Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Ορφανόπουλος Μιχαήλ	: Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Τσιώτης Γεώργιος	: Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Χανιωτάκης Νικόλαος	: Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

rlj|©kΣψrlj...

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Κουϊμτζόγλου Ελένης

- Ημερομηνία Γέννησης:** : 8 Απριλίου 1969
- Τόπος Γέννησης** : Αθήνα
- Σπουδές** : 1992, Πτυχίο Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης με βαθμό 7,16
1992-1999, Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης. (Επιβλέπων καθηγητής κ. Δημ. Γανωτάκης)
- Γλώσσες** : Αγγλικά (LOWER Certificate)-Γαλλικά (DIPLOME D' ETUDES SUPERIEURES III του Γαλλικού Ινστιτούτου). Επάρκεια για διδασκαλία Γαλλικής Γλώσσας.
- Εκπαιδευτική Εμπειρία** : -Βοηθός εκπαιδευτής στα Εργαστήρια Γενικής Χημείας I και II και Αναλυτικής Χημείας I και II στο Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης .
-Βοηθός διδασκαλίας στα μαθήματα Βιοχημείας I και II στο Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης.
- Ερευνητική Εμπειρία** : 1991 - 1992, Διπλωματική Εργασία στο Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης με θέμα «ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ», υπό την επίβλεψη του κ. ΚΟΚΚΙΝΙΔΗ.
1992-1999: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με τίτλο «ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ II».
3-12 Ιουλίου 1994: Συμμετοχή σε «Θερινό Σχολείο» στο Ερευνητικό Κέντρο CNRS στο Saclay, Γαλλία
27 Μαρτίου-10 Απριλίου 1995: Επίσκεψη στο Εργαστήριο του Καθηγητή Junge στο Πανεπιστήμιο του Osnabrueck, Γερμανία. (Υποτροφία από το ESF).

16-20 Σεπτεμβρίου 1996: Συμμετοχή σε «Θερινό Σχολείο» στο Πανεπιστήμιο της Λιέγης, Βέλγιο.

Τεχνικές :

- Απομόνωση Φωτοσυνθετικών συμπλόκων.
- Βιοχημικός Χαρακτηρισμός (Ηλεκτροφόρηση, Ανοσοαποτύπωση, Πολαρογραφική μέτρηση οξυγόνου)
- UV Φασματοσκοπία
- EPR Φασματοσκοπία.

Δημοσιεύσεις :

Effects of mild trypsinization on the properties of a (17,23 and 33 KDa)-retaining PSII core complex.

E. Kouimtzoglou, R. K. Mishra, M. Haumann, W. Junge and D.F. Ghanotakis. In Photosynthesis: from light to Biosphere (P. Mathis, ed.), Vol. II, 305 - 308, (1995).

Study of the role of the various proteins of the Photosystem II core - complex.

E. Kouimtzoglou and D.F. Ghanotakis. In BULLETIN DE LA SOCIETE ROYALE DES SCIENCES de Liege (B. Schoefs, F. Franck, J. Aghion, ed), Vol. 65 (4-5) pp. 359, (1996).

The mode of action of capsaicin, a naturally occurring inhibitor of photosynthetic electron flow through photosystem II and the purple bacterial reaction center.

A. Spyridaki, G. Fritsch, L. Baciou, E. Kouimtzoglou, H. Michel, D.F. Ghanotakis. Manuscript in preparation.

Συμμετοχή σε Συμπόσια:

Ομιλία στο European Research Network Meeting με τίτλο "Polypeptides of Photosystem II" (Gif-sur Yvettes, 6-9 Νοεμβρίου 1996).

Ομιλία στο German-Greek Minisymposium on Photosystem II με τίτλο "Polypeptides of Photosystem II core complex" (Heidelberg, 12-15 Μαΐου 1997)

CURRICULUM VITAE

Kouimtzooglou Eleni

- Date of Birth** : April 8, 1969
- Place of Birth** : Athens, Greece
- Education** : 1992: B.Sc. in Chemistry Department, University of Crete
1992-present: Graduate student, Chemistry Department, University of Crete
- Foreign Languages** : English (LOWER CERTIFICATE)
French (DIPLOME D' ETUDES SUPERIEURES III)
- Experience** : 1992: Dissertation for B.Sc. diploma:
CRYSTALLIZATION OF PROTEINS» with Prof. Kokkinidis, Department of Biology University of Crete.
- 1992-present: Graduate student, Chemistry Department, University of Crete. Subject: «ROLE OF THE VARIOUS PROTEINS OF THE PHOTOSYSTEM II CORE-COMPLEX», with Prof. D.F. Ghanotakis.
- 3-12 July 1994: Participation in the «Summer School» in CNRS Research Center, in Saclay, France.
- March 27-April 10 1995: Visitor in Prof. Junge's lab in University of Osnabrueck, Germany (ESF fellow).
- 16-20 September 1996: Participation in the «Short Course» in University of Liege, Belgium.
- Teaching Assistant in the Analytical Chemistry Lab (undergraduate level), University of Crete.
- Teaching Assistant in the General Chemistry Lab (undergraduate level), University of Crete.
- Teaching Assistant in the Biochemistry Course (undergraduate level), University of Crete.

Related skills : -Isolation of Photosystem II complexes
-Biochemical characterization (SDS-page electrophoresis, Western Immunoblotting, Oxygen electrode)
-UV spectroscopy
-EPR spectroscopy

Publications :

Effects of mild trypsinization on the properties of a (17,23 and 33 KDa)-retaining PSII core complex.

E. Kouimtzoglou, R. K. Mishra, M. Haumann, W. Junge and D.F. Ghanotakis. In Photosynthesis: from light to Biosphere (P. Mathis, ed.), Vol. II, 305 - 308, (1995).

Study of the role of the various proteins of the Photosystem II core - complex.

E. Kouimtzoglou and D.F. Ghanotakis. In BULLETIN DE LA SOCIETE ROYALE DES SCIENCES de Liege (B. Schoefs, F. Franck, J. Aghion, ed), Vol. 65 (4-5) pp. 359, (1996).

The mode of action of capsaicin, a naturally occurring inhibitor of photosynthetic electron flow through photosystem II and the purple bacterial reaction center.

A. Spyridaki, G. Fritsch, L. Baciou, E. Kouimtzoglou, H. Michel, D.F. Ghanotakis. Manuscript in preparation.

Participation in Symposium :

European Research Network Meeting: Title of lecture:"Polypeptides of Photosystem II" (Gif-sur Yvettes, 6-9 November 1996).

German-Greek Minisymposium on Photosystem II: Title of lecture: "Polypeptides of Photosystem II core complex" (Heidelberg, 12-15 May 1997).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	9
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	12
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	14
SUMMARY.....	16
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	18
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΟ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ ΠΙ ΚΑΤΑΛΥΕΙ ΜΙΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ : ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ Η ₂ Ο ΠΡΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟ Ο ₂	19
1.1 Φωτοσύνθεση	19
1.2 Οι φωτεινές αντιδράσεις της Φωτοσύνθεσης.....	21
1.3 Ηλεκτρονιακή ροή στα φυτά και έκλυση Ο ₂	29
1.4 Το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου.....	34
1.5 Ανόργανοι συμπαράγοντες.....	37
1.6 Πολυπεπτιδική σύσταση του PS II.....	44
1.7 Φασματοσκοπία EPR	55
1.8 Έκλυση πρωτονίων κατά τον κύκλο των S-καταστάσεων.....	63
1.9 Πρωτεολυτικά ένζυμα	67
1.10 Αντιδραστήρια πρωτεϊνικής διασύνδεσης (cross-linkers).....	73
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	76
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	78
3.1 Υλικά.....	78

3.2 Μέθοδοι.....	80
3.2.1 Απομόνωση Θυλακοειδών και PS II-μεμβρανών.	80
3.2.2 Απομόνωση HM-core.....	81
3.2.3 Απομόνωση OTG-core.....	82
3.2.4 Απομόνωση OGP-core.....	82
3.2.5 Απομόνωση υποσυμπλόκου του HM-core (sub-core).	83
3.2.6 Κατεργασία δειγμάτων με NaCl.....	83
3.2.7 Κατεργασία δειγμάτων με CaCl ₂	83
3.2.8 Κατεργασία δειγμάτων με Tris.....	84
3.2.9 Κατεργασία πυρήνων με θρυψίνη.	84
3.2.10 Κατεργασία πυρήνων με EDC.....	84
3.2.11 Κατεργασία με KNO ₂	85
3.2.12 Κατεργασία με LiClO ₄	85
3.2.13 Προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφύλλης.....	85
3.2.14 Προσδιορισμός έκλυσης οξυγόνου.	86
3.2.15 Ηλεκτροφόρηση.	87
3.2.16 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).....	87
3.2.17 Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR).	88
3.2.18 Φασματοσκοπία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).	88
4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΡΥΨΙΝΗΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ II.....	89
4.1 Εισαγωγή.....	89

4.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	90
4.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	91
5. ΤΟΠΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ II ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗΣ (cross-linker) EDC.....	104
5.1 Εισαγωγή.....	104
5.2 Υλικά και μέθοδοι.....	106
5.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	107
6. ΧΡΗΣΗ LiClO ₄ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΙΟΝΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΣΤΟ PS II ΚΑΙ KNO ₂ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΑΝΙΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΙΟΝΤΑ Cl ⁻	118
6.1 Εισαγωγή.....	118
6.2 Υλικά και μέθοδοι.....	119
6.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	120
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	130
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	131

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Å	: Angstroem
ATP	: αδενόσινο-5-τριφωσφορικός εστέρας
Chl	: χλωροφύλλη
cyt b ₅₅₉	: κυτόχρωμα b ₅₅₉
DCBQ	: 2,6 διχλωροβενζοκινόνη
DCMU	: 3-(3,4-διχλωροφαινυλο)-1,1-διμεθυλουρία
EDC	: 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλοαμινοπροπυλο)καρβοδιμίδιο
EDTA	: αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
EPR	: ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός
g	: σταθερά g του ηλεκτρονίου
H	: μαγνητικό πεδίο
Hepes	: 2-[4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινο]-αιθανο-σουλφονικό οξύ
HM	:HECAMEG ή 6-O-(N-επτυλοκαρβαμυλ)-μεθυλο-α-D-γλουκοπυρανοσίδιο
II _f	: σήμα EPR της Tyr-Z ⁺
II _s	: σήμα EPR της Tyr-D ⁺
kDa	: kilodalton
LHC II	: σύμπλοκο συλλογής φωτός
MES	: 4-μορφόλινο-αιθανοσουλφονικό οξύ
NADP	: νικοτινάμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο φωσφορικού εστέρα
O.E.C.	: σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου

OGP	: n-οκτυλο-β-D-γλυκοσίδιο
OTG	: n-οκτυλο-β-D-θειογλυκοσίδιο
P ₆₈₀	: πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης του φωτοσυστήματος II
P ₇₀₀	: πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης του φωτοσυστήματος I
PC	: πλαστοκυανίνη
PEG	: πολυαιθυλενογλυκόλη
Pheo	: φαιοφυτίνη
PQ	: πλαστοκινόνη
PS II	: φωτοσύστημα II
PS I	: φωτοσύστημα I
Q _A	: πλαστοκινόνη, πρωτοταγής ηλεκτρονιοδέκτης του PS II
Q _B	: πλαστοκινόνη, δευτεροταγής ηλεκτρονιοδέκτης του PS II
RC	: κέντρο αντίδρασης
SDS	: δωδεκυλοθειικό νάτριο
Tyr-Z	: τυροσίνη, δευτεροταγής ηλεκτρονιοδότης στο PS II
Tyr-Z ⁺	: ρίζα της τυροσίνης Z
Tyr-D	: τυροσίνη, που δε συμμετέχει στην οξείδωση του νερού
Tyr-D ⁺	: ρίζα της τυροσίνης D
Tris	: τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η τοπολογία και ο ρόλος των πρωτεϊνών του Φωτοσυστήματος II. Η μελέτη αυτή επιτεύχθηκε με χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων και αντιδραστηρίων πρωτεϊνικής διασύνδεσης (cross-linkers). Επίσης, με χρήση αλάτων εξετάστηκε η επίδραση της ιονικής ισχύος στην πρωτεϊνική σύσταση και λειτουργία του συμπλόκου και ο ανταγωνισμός αρνητικά φορτισμένων ιόντων για τη θέση του χλωρίου.

Διαλυτοποίηση PS II-μεμβρανών με το απορρυπαντικό 6-O-(N-επτακαρβαμυλο)-μεθυλο- α -D-γλυκοκυρανοσίδιο (HECAMEG) επέτρεψε την απομόνωση ενός πυρήνα του Φωτοσυστήματος II, που είχε την ικανότητα να εκλύει οξυγόνο σε υψηλούς ρυθμούς, διατηρώντας τις εξωτερικές πρωτεΐνες 17, 23 και 33 kDa. Μετρήσεις έκλυσης H^+ έδειξαν ότι η στοιχειομετρία έκλυσης H^+ κατά τον κύκλο των S-καταστάσεων είναι σχεδόν 1:1:1:1 στο σύμπλοκο αυτό, το οποίο έχει και τις τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες. Το αποτέλεσμα αυτό σημαίνει ότι οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa δεν επηρεάζουν τη στοιχειομετρία, εφόσον προηγούμενες μελέτες είχαν πραγματοποιηθεί μόνο σε πυρήνες, οι οποίοι δεν περιείχαν τις μικρές εξωτερικές πρωτεΐνες και έδιναν την ίδια στοιχειομετρία.

Κατεργασία του πυρήνα αυτού με χαμηλές συγκεντρώσεις του πρωτεολυτικού ενζύμου της θρυψίνης είχε σαν αποτέλεσμα την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης D1, ενώ οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17, 23 και 33 kDa, όπως και το σύμπλοκο του μαγγανίου παρέμεναν ανεπηρέαστα. Η κατεργασία αυτή είχε σα συνέπεια την ελάττωση της ταχύτητας έκλυσης O_2 , διατηρώντας το 65% της ενεργότητας σε σύγκριση με τον πυρήνα, που δεν είχε υποστεί τη συγκεκριμένη κατεργασία. Η στοιχειομετρία έκλυσης H^+ στο κατεργασμένο δείγμα διατηρήθηκε σε 1:1:1:1 κατά τον κύκλο των S-καταστάσεων, που σημαίνει ότι η επεξεργασία με τη θρυψίνη δεν επηρεάζει τη στοιχειομετρία. Ανάλογα αποτελέσματα από την επεξεργασία με τη θρυψίνη προέκυψαν και σε πυρήνες Φωτοσυστήματος II, οι οποίοι είχαν απομονωθεί με άλλα απορρυπαντικά. Προκειμένου να εξηγηθεί η παρατηρούμενη ελάττωση στο ρυθμό παραγωγής O_2 , μετά την κατεργασία με τη θρυψίνη, παρόλο που τόσο η οξειδωτική όσο και η αναγωγική πλευρά δε φαινόταν να επηρεάζονται, εξετάστηκε η ευαισθησία του συμπλόκου ως προς τη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασία δωματίου, η ενεργότητα του κατεργασμένου συμπλόκου, σε σύγκριση με το μη κατεργασμένο σύμπλοκο, μειώθηκε σημαντικά, η περιεκτικότητά του σε μαγγάνιο δεν επηρεάζεται, ενώ παρατηρείται εκτεταμένη πρωτεόλυση.

Η τοπολογία και η αλληλεπίδραση των εξωτερικών πρωτεϊνών με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες του Φωτοσυστήματος II, εξετάστηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου πρωτεϊνικής διασύνδεσης (cross-linker) 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλοαμινοπροπυλο)καρβοδιιμίδιο (EDC). Το EDC είναι ένα αντιδραστήριο, που μπορεί να συνδέσει καρβοξυλομάδες με αμινομάδες, οι οποίες βρίσκονται σε van der Waals απόσταση. Με χρήση του αντιδραστηρίου EDC, είχε βρεθεί ότι η 33 kDa πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τη CP 47, αποτέλεσμα που επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα εργασία. Ένα άλλο προϊόν cross-linking, το οποίο ανιχνεύθηκε με τη χρήση EDC, προκύπτει από την εξωτερική πρωτεΐνη 23 kDa με την α -υπομονάδα του cyt b₅₅₉, που σημαίνει ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν. Προϊόντα cross-linking των εξωτερικών πρωτεϊνών 23 και 17 kDa με την 33 kDa δεν ανιχνεύθηκαν. Αυτό δε σημαίνει απαραίτητα ότι οι εξωτερικές πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, αφού μπορεί τα κατάλληλα αμινοξέα να μη βρίσκονται σε θέση τέτοια, ώστε να μπορούν να αντιδράσουν με το EDC και να δώσουν προϊόντα cross-linking.

Τέλος, με χρήση του άλατος LiClO₄ εξετάστηκε η επίδραση της ιονικής ισχύος στις εξωτερικές πρωτεΐνες και τη λειτουργικότητα του Φωτοσυστήματος II, ενώ το άλας KNO₂ χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί αν τα NO₂⁻ ιόντα ανταγωνίζονται τα ιόντα χλωρίου. Βρέθηκε ότι επεξεργασία PS II-μεμβρανών με 100mM LiClO₄ είχε σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση των 23 και 17 kDa, ενώ με συγκέντρωση 500mM LiClO₄ παρατηρήθηκε απομάκρυνση και της 33 kDa. Κατεργασία PS II-μεμβρανών με KNO₂ έδειξε ότι οι εξωτερικές πρωτεΐνες παρέμεναν ανεπηρέαστες, ενώ παρατηρήθηκε ελάττωση στην ταχύτητα έκλυσης O₂. Η ελάττωση αυτή μπορεί να εξηγηθεί από πειράματα οπτικής φασματοσκοπίας, τα οποία έδειξαν ότι η επεξεργασία αυτή επηρεάζει την αναγωγική πλευρά του συμπλόκου, προκαλώντας καθυστέρηση στην ηλεκτρονιακή μεταφορά μεταξύ των Q_A και Q_B.

SUMMARY

The interaction of the extrinsic with the intrinsic proteins of the Photosystem II core-complex and their relationship with the inorganic cofactors of PS II is under contention.

Solubilization of Photosystem II (PS II) membranes with the non ionic detergent 6-O-(N-heptacarbamoyl)-methyl- α -D-glucopyranoside (HECAMEG) allowed the isolation of an oxygen evolving PS II-core complex, which retains the 23 and 17 kDa extrinsic polypeptides. The pattern of proton release as a function of flash number in this PS II complex, which retains all three extrinsic proteins, was found to be close to 1:1:1:1, during the S-state cycle. Previous studies had shown the same pattern, but in core-complexes that had not the 23 and 17 kDa proteins. Thus, the presence of 23 and 17 kDa polypeptides does not change the pattern of proton release.

Mild trypsinization of the PS II complex resulted in proteolysis of D1 protein, while all three extrinsic proteins (33,23 and 17 kDa) and the manganese complex remained intact: under these conditions the pattern of proton release remained closed to 1:1:1:1. Although both the donor and acceptor side seem to remain intact after the mild trypsinization, the oxygen evolution activity decreases to 65% comparing to the control core complex. Similar results were obtained with PS II-core complexes, that had been isolated using other detergents. In order to explain the decrease of oxygen evolution activity, mild trypsinization took place at room temperature. Temperature sensitivity was observed, as the oxygen evolution activity was almost lost, while the manganese content remained intact.

The investigation of the interaction of the extrinsic with the intrinsic proteins of the Photosystem II-core complex was also examined, by using chemical substances, which can cross-link some of the proteins. EDC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide] is a zero-length cross-linker, which modifies carboxyl groups and cross-links amino groups to carboxyl groups, that are in van der Waals contact. It has been suggested that EDC cross-links the 33 kDa protein with the CP 47. Further examination of the protein cross-linking using EDC, showed that the 23 kDa protein cross-links with the α -subunit of cyt b_{559} , but couldn't give enough information about the interaction of the 33 kDa protein with the 23 and 17 kDa polypeptides. Finally, in order to examine the influence of the ionic strength to the extrinsic proteins and if NO_2^- competes with the Cl^- ions, LiClO_4 and KNO_2 were used, respectively. It

has been found that treatment of PS II membranes with 100mM LiClO₄ resulted in 23 and 17 kDa proteins release, while with 500mM LiClO₄, 33 kDa protein was also released. Treatment of PS II membranes with KNO₂ resulted in slower electron transport from Q_A to Q_B, explaining the decrease of oxygen evolution activity that was observed after the treatment, without affecting the extrinsic polypeptides 33,23 and 17 kDa .

Finally, in order to examine the influence of the ionic strength to the extrinsic proteins and if NO₂⁻ competes with the Cl⁻ ions, LiClO₄ and KNO₂ were used, respectively. It has been found that treatment of PS II membranes with 100mM LiClO₄ resulted in 23 and 17 kDa proteins release, while with 500mM LiClO₄, 33 kDa protein was also released. Treatment of PS II membranes with KNO₂ resulted in slower electron transport from Q_A to Q_B, explaining the decrease of oxygen evolution activity that was observed after the treatment, without affecting the extrinsic polypeptides 33,23 and 17 kDa .

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας-Βιοφυσικής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δ. Γανωτάκη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την επιστημονική καθοδήγηση και συνεργασία, κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ, επίσης, το Τμήμα Χημείας για τη δυνατότητα, που μου δόθηκε, για την πραγματοποίηση της διατριβής μου, καθώς και για τη χορήγηση υποτροφίας για κάποιο χρονικό διάστημα των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ, επίσης:

Τον Καθηγητή W. Junge, τους Dr. M. Haumann και Dr. O. Boegershausen και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια M. Hundelt, για την ουσιαστική βοήθειά τους για την πραγματοποίηση των πειραμάτων έκλυσης H^+ και για τη φιλική τους συμπεριφορά, κατά τη διάρκεια της επίσκεψής μου στο Πανεπιστήμιο του Osnabrueck της Γερμανίας.

Τον Καθηγητή H.J. van Gorkom και τη μεταπτυχιακή του φοιτήτρια H. Wincencjusz, για την πραγματοποίηση μιας σειράς πειραμάτων οπτικής φασματοσκοπίας, στο Πανεπιστήμιο Leiden της Ολλανδίας.

Τον Dr. B. Πετρουλέα και το μεταπτυχιακό του φοιτητή X. Γούσια, για τη βοήθειά τους στην πραγματοποίηση των πειραμάτων EPR φασματοσκοπίας σε χαμηλές θερμοκρασίες, κατά τη διάρκεια επίσκεψής μου στο Ερευνητικό Κέντρο «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

Τους Dr. R. Mishra, N. Mishra και A. Μπάκου, για την εκπαιδευτική υποστήριξη, που μου πρόσφεραν τα πρώτα χρόνια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τους Dr. G. McDermott και N. Λυδάκη και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές A. Σπυριδάκη, M. Χρόνη, M. Ψυλινάκη, M. Βάμβουκα και Σ. Καπετανάκη, για τη φιλία, τη συναδελφικότητά τους και την ανταλλαγή επιστημονικών απόψεων, καθώς και όλους τους μεταπτυχιακούς του Τμήματος Χημείας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, για τη συνεχή ηθική και υλική υποστήριξη, που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΤΟ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ Π ΚΑΤΑΛΥΕΙ ΜΙΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ : ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ Η₂Ο ΠΡΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟ Ο₂.

1.1 Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση είναι, αναμφισβήτητα, η πιο σημαντική βιοχημική διαδικασία στη γη. Είναι από τους λίγους μηχανισμούς που συνδέουν μια εξωτερική πηγή ενέργειας με τη ζωή. Μπορεί να οριστεί σα μια σειρά διεργασιών κατά τις οποίες ηλεκτρομαγνητική ενέργεια μετατρέπεται σε χημική ελεύθερη ενέργεια που χρησιμοποιείται για βιοσύνθεση. Το φως αλληλεπιδρά με τους ζωντανούς οργανισμούς με διεργασίες όπως η φωτοσύνθεση, η όραση και η βιοφωταύγεια, αλλά μόνο κατά τη φωτοσύνθεση έχουμε μετατροπή φωτεινής ηλιακής ενέργειας σε χρήσιμες μορφές χημικής ενέργειας. Η ενέργεια αυτή, στη συνέχεια, χρησιμοποιείται για τη σύνθεση οργανικών μορίων και συγκεκριμένα υδατανθράκων, που καταναλώνονται από τους ετερότροφους οργανισμούς, με παράλληλη έκλυση μοριακού οξυγόνου στο περιβάλλον.

Καθώς οι ζωντανοί οργανισμοί πλήθαιναν στην πρωτόγονη γη, η κατανάλωση των οργανικών τροφών που παράγονταν από γεωχημικές διαδικασίες υπερνίκησε την παραγωγή. Έτσι, η ανακάλυψη μιας εναλλακτικής πηγής οργανικών μορίων τόσο χρήσιμων όσο οι ενεργειακές πηγές και οι πρώτες ύλες, που απαιτούνταν για βιοσυνθετικές διαδικασίες, ήταν σημαντική για την επιβίωση. Η αφθονία CO₂ στην πρώτη ατμόσφαιρα της γης, ήταν μια φανερή πηγή άνθρακα για οργανική σύνθεση. Ομως, το CO₂ είναι ένα μόριο, χαμηλής ενέργειας. Γι' αυτό το λόγο, η διαδικασία με την οποία το CO₂ μετατρέπεται σε οργανικές ενώσεις απαιτεί ενέργεια και αναγωγική δύναμη.

Η εξέλιξη των φωτοσυνθετικών μηχανισμών, γνωστών ως *φωτοσυστήματα*, προέβλεπε τόσο την ενέργεια όσο και την αναγωγική δύναμη που χρειαζόταν για οργανική σύνθεση. Οι οργανισμοί που τα κατείχαν, είχαν το πλεονέκτημα της σίγουρης επιβίωσης, καθώς δεν εξαρτούνταν πια από την αβέβαιη τροφοδότηση οργανικών τροφών. Οι πρωτόγονοι αυτοί οργανισμοί θεωρείται ότι μοιάζουν με τα μοντέρνα *πράσινα θειούχα βακτήρια*. Τα βακτήρια

αυτά έχουν ένα φωτοσύστημα, που χρησιμοποιεί την ηλιακή ενέργεια για την πραγματοποίηση μιας σχετικά απλής διαδικασίας μεταφοράς ηλεκτρονίων, ενώ σαν αναγωγικό χρησιμοποιείται το H_2S . Υπάρχει, όμως, όριο στη χρήση του H_2S , αφού δεν παράγεται φυσιολογικά σε μεγάλες ποσότητες και επιπλέον παράγεται σε σχετικά απομονωμένες περιοχές.

Το επόμενο σημαντικό βήμα για την εξέλιξη της ζωής ήταν η ανάπτυξη ενός φωτοσυστήματος που θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει ηλεκτρόνια από το H_2O . Αφού το H_2O υπήρχε σε αφθονία, οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί είχαν τη δυνατότητα να διεισδύσουν και να εγκατασταθούν σε νέες τεράστιες περιοχές του πλανήτη. Έτσι, η φωτοσύνθεση που βασιζόταν στο H_2O , μπορούσε να πραγματοποιηθεί και από άλλους οργανισμούς. Με τον πολλαπλασιασμό των φωτοσυνθετικών οργανισμών, προβλέφθηκε μια νέα και πλούσια πηγή οργανικών μορίων για άλλες μορφές ζωής. Η σημαντικότερη, όμως, συνεισφορά τους ήταν η συσσώρευση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα. Οι οργανισμοί που επέζησαν την περίοδο αυτή προσαρμόστηκαν στις νέες συνθήκες, αναπτύσσοντας μηχανισμούς, που τους προστάτευαν από τις τοξικές συνέπειες του οξυγόνου. Τα ανώτερα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια εκλύουν O_2 σαν τελικό προϊόν της φωτοσύνθεσης, κάτι που δε γίνεται με τα αναερόβια μωβ και πράσινα βακτήρια. Θεωρείται ότι λόγω της παραγωγής O_2 , τα φωτοσυνθετικά κυανοβακτήρια οδήγησαν στη μετατροπή του αναγωγικού περιβάλλοντος της ατμόσφαιρας της γης σε οξειδωτικό και η ανάπτυξη των φωτοσυνθετικών αυτών βακτηρίων εκατομμύρια χρόνια πριν, μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα της ζωής στη γη.

Η ικανότητα των φυτών να οξειδώνουν το H_2O παράγοντας τελικά O_2 είναι η αιτία που ο κόσμος έχει τη σημερινή του μορφή. Το O_2 προκάλεσε σημαντικές ορυκτολογικές και ατμοσφαιρικές αλλαγές, που τροποποίησαν το περιβάλλον των οργανισμών [3]. Το O_2 οξείδωσε τα αναγωγικά που χρησιμοποιούσαν τα φωτοσυνθετικά βακτήρια κι έτσι το ατμοσφαιρικό O_2 κατέληξε να δημιουργήσει ένα στρώμα όζοντος, που με απορρόφηση της UV ακτινοβολίας, έδωσε τη δυνατότητα να δημιουργηθεί ζωή από τα βάθη της θάλασσας μέχρι την επιφάνεια της γης. Τέλος, το οξυγόνο είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία του μεταβολισμού μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, που ενεργειακά είναι πιο αποδοτική από τη ζύμωση και κατάλληλη για την ανάπτυξη πολύπλοκων οργανισμών.

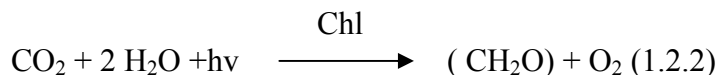
1.2 Οι φωτεινές αντιδράσεις της Φωτοσύνθεσης

Πρωτεργάτης στη μελέτη της φωτοσύνθεσης ήταν ο van Helmont, ο οποίος γύρω στα 1650 διαπίστωσε τη συμβολή του νερού στην ανάπτυξη των φυτών. Έναν αιώνα αργότερα, ο Bonnet παρατήρησε ότι τα φυτά, που ήταν εμβαπτισμένα σε νερό, ανέπτυσαν φυσαλίδες με την έκθεσή τους στον ήλιο. Το 1771, ο Priestley απέδειξε ότι τα φυτά παράγουν O₂, ενώ το 1779 ο Ingenhousz διαπίστωσε ότι τα φυτά χρησιμοποιούν τα πράσινα τμήματά τους και φως για να ανανεώνουν τον αέρα, τον οποίο καταναλώνουν με την αναπνοή κατά τη διάρκεια της νύχτας. Το 1872, ο Senebier παρατήρησε ότι τα φυτά χρειάζονται CO₂ για να εμπλουτίσουν με O₂ τον αέρα και το 1796 ο Ingenhousz πρότεινε ότι το CO₂ ήταν η πηγή για όλη την οργανική ύλη στα φυτά. Το 1804, ο de Saussure με βάση το νόμο διατήρησης της μάζας, επιβεβαίωσε τον van Helmont, ότι το μεγαλύτερο βάρος του φυτού προέρχεται από CO₂ και H₂O. Το 1845, ο Mayer απέδειξε ότι η ηλιακή ενέργεια αποθηκεύεται με τη μορφή οργανικής ύλης, σε χημική ενέργεια. Στις αρχές του εικοστού αιώνα χαρακτηρίστηκε η χλωροφύλλη και το 1920 ο van Niel περιέγραψε τη βακτηριακή φωτοσύνθεση με την αντίδραση



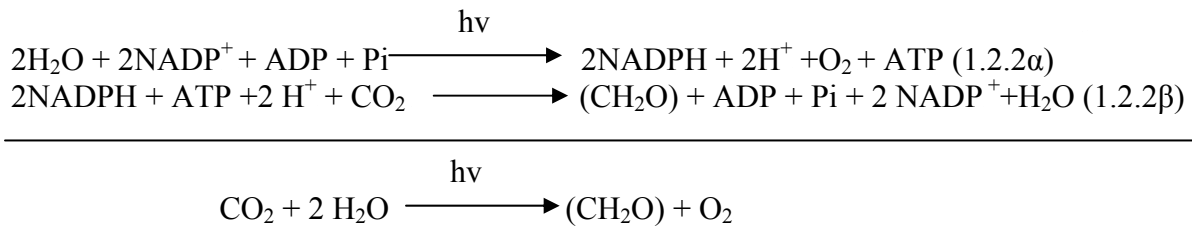
Το H₂A είναι γενικά ένα αναγωγικό, που ποικίλει ανάλογα με το είδος του φωτοσυνθετικού οργανισμού και το CH₂O συμβολίζει τον άνθρακα που δεσμεύεται στον υδατάνθρακα.

Τα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια χρησιμοποιούν σαν αναγωγικό το H₂O και η αντίδραση για τους οργανισμούς αυτούς περιγράφεται ως



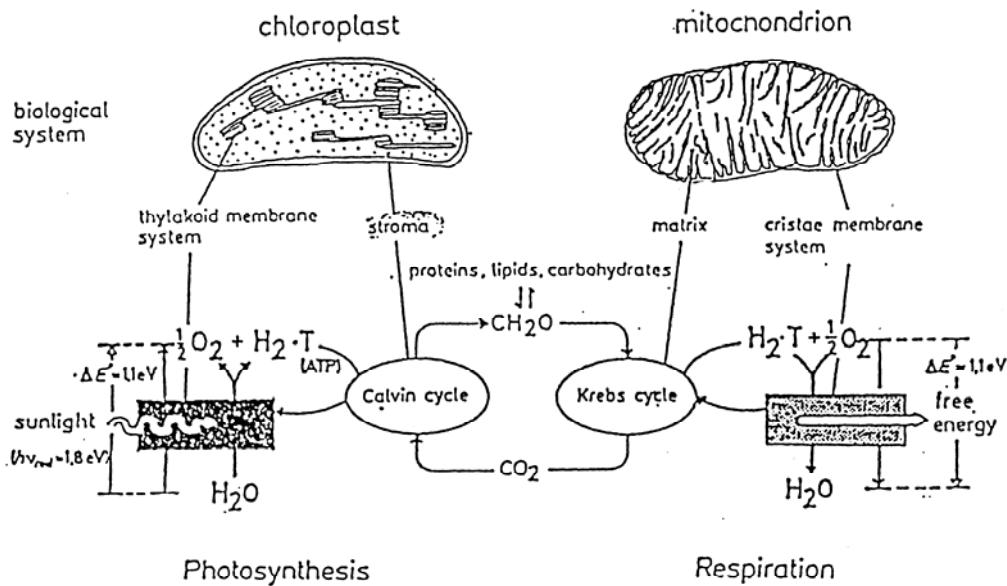
Το γεγονός ότι το αρχικό αναγωγικό δεν είναι κατάλληλο για να ανάγει άμεσα το CO₂ υπερνικάται με τη φωτοχημική παραγωγή ενός ισχυρότερου αναγωγικού, του NADPH.

Η πορεία της φωτοσύνθεσης περιλαμβάνει δύο είδη αντιδράσεων: τις φωτεινές και τις σκοτεινές. Στις φωτεινές αντιδράσεις (1.2.2α), με την απορρόφηση ηλιακής ενέργειας από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, παράγεται το ισχυρό αναγωγικό NADPH και μια πρωτονιακή διαβάθμιση (ΔpH), που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του αδενοσινο-5 τριφωσφορικού εστέρα (ATP). Στο στάδιο των σκοτεινών αντιδράσεων (1.2.2β), το ATP και το NADPH χρησιμοποιούνται σαν πηγές ενέργειας, που απαιτείται για τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού CO_2 σε υδατάνθρακα:



Στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης περιλαμβάνονται οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, που καταλύονται από μεμβρανικές οξειδοοδουκτάσες, που δρουν ως αντλίες πρωτονίων και γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων από το H_2O στο $NADP^+$, παράγοντας NADPH και μοριακό O_2 . Η ηλεκτρονιακή ροή δημιουργεί πρωτονιακή διαβάθμιση κατά μήκος της φωτοσυνθετικής μεμβράνης και η σύνθεση του ATP συμβαίνει σύμφωνα με το χημειοσμοτικό μηχανισμό μέσω της ATP-συνθετάσης.

Οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης παρουσιάζουν μεγάλη αναλογία με κάποια στάδια της αναπνοής, όπου συμβαίνουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, που καταλύονται από μεμβρανικές οξειδοοδουκτάσες, οι οποίες δρουν ως αντλίες H^+ , γίνεται μεταφορά e^- από το NADPH στο O_2 μέσα στα μιτοχόνδρια, παράγοντας NAD^+ και H_2O , ενώ δημιουργείται και πρωτονιακή διαβάθμιση κατά μήκος της μιτοχονδριακής μεμβράνης και σύνθεση του ATP (Σχ. 1).



Σχήμα 1: Σύγκριση φωτοσύνθεσης και αναπνοής

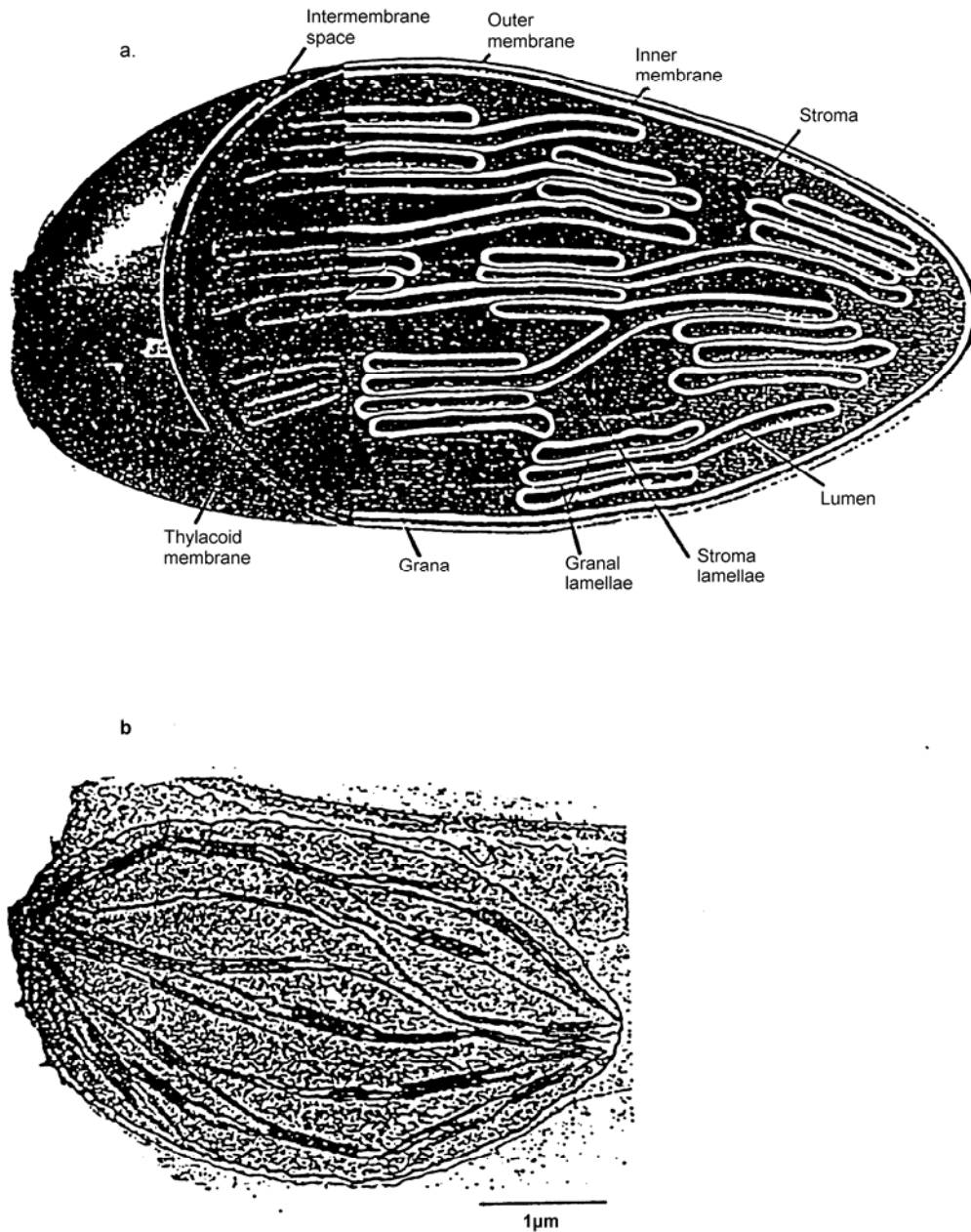
[G. Renger (1987) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 26, 643-660]

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός των φυτών εντοπίζεται μέσα σε ειδικά μεμβρανικά σωματίδια, τους **χλωροπλάστες** (Σχ. 2). Ο χλωροπλάστης βρίσκεται μέσα σε μια διπλή μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη του χλωροπλάστη είναι διαπερατή στους περισσότερους μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους, ενώ η εσωτερική μεμβράνη είναι εκλεκτικά μη διαπερατή για τις περισσότερες ουσίες. Και οι δύο μεμβράνες του χλωροπλάστη είναι αρκετά διαπερατές από το CO₂, το υπόστρωμα για τη σύνθεση του υδατάνθρακα κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Ο χώρος μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος. Η εσωτερική μεμβράνη περιβάλλει μια εσωτερική υδατική περιοχή που ονομάζεται **στρώμα**. Τα περισσότερα ένζυμα, που καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης βρίσκονται μέσα στο στρώμα. Μια συνεχής εξωτερική μεμβράνη περικλείει ένα σύστημα εσωτερικών μεμβρανών, που διατάσσονται σε αναδιπλώσεις και λέγονται **lamellae**. Σε κανονικά διαστήματα, τα lamellae διαπλατύνονται και δημιουργούν μεμβρανώδεις σάκκους, τα **θυλακοειδή**, που περιέχουν ένα εσωτερικό χώρο, γνωστό ως **lumen**. Οι φωτεινές αντιδράσεις γίνονται στις θυλακοειδείς μεμβράνες. Τέλος, τα θυλακοειδή επιστοιβάζονται κατά κάποιο τρόπο σε μορφώματα, δημιουργώντας τα **grana**.

Το στρώμα του όζοντος της ατμόσφαιρας απορροφά σχεδόν όλη την υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου. Έτσι, το περισσότερο φως που φθάνει στη γη βρίσκεται στην ορατή περιοχή (400-700 nm) και την υπέρυθη περιοχή (700-100000nm) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (Σχ. 3).

Στη φωτοσύνθεση, η απορρόφηση της φωτεινής ακτινοβολίας γίνεται από χρωστικές που βρίσκονται στις θυλακοειδείς μεμβράνες των ανωτέρων φυτών και των φυκών και στο πλάσμα των φωτοσυνθετικών βακτηρίων. Οι κυριότερες χρωστικές των ανωτέρων φυτών, των φυκών και των κυανοβακτηρίων είναι η **χλωροφύλλη α** (Chl a) και η **χλωροφύλλη b** (Chl b). Στα φωτοσυνθετικά βακτήρια (εκτός από τα κυανοβακτήρια) οι κυριότερες χρωστικές είναι η **βακτηριοχλωροφύλλη α** (BChl a) και **βακτηριοχλωροφύλλη b** (BChl b).

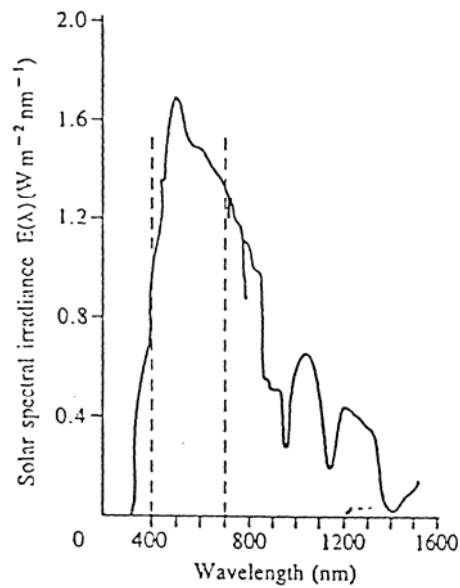
Η δομή της χλωροφύλλης αποτελείται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο, που περιέχει σύστημα διπλών δεσμών, που απορροφούν φως (Σχ. 4). Οι χλωροφύλλες διαφέρουν από άλλες γνωστές πορφυρίνες (όπως η αίμη της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης και τα κυτοχρώματα). Έτσι, στις χλωροφύλλες υπάρχει απλός και όχι διπλός δεσμός μεταξύ των C₇ και C₈ , υπάρχει ακόμα ένας δακτύλιος (ο δακτύλιος V) δίπλα στο δακτύλιο III και ο C₇ συνδέεται με μια μακριά αλυσίδα , που ονομάζεται φυτολική. Τέλος, στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου υπάρχει ένα Mg²⁺ που εξισορροπεί τα 2 αρνητικά φορτία των τεσσάρων πυρρολικών αζώτων.



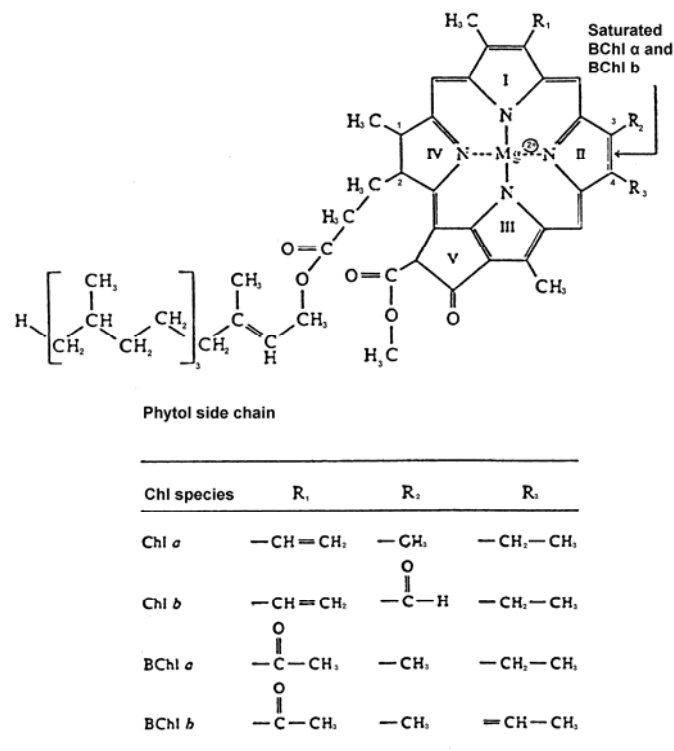
Σχήμα 2 : a. Δομή του χλωροπλάστη . b. Ηλεκτρονική μικρογραφία χλωροπλάστη από φύλλο σπανακιού [J. David Rawn, βιβλίο Βιοχημείας]

Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί περιέχουν επίσης, εκτός από τις χλωροφύλλες και άλλες χρωστικές, τα **καροτενοειδή** και τις **φυκομπιλίνες**. Τα καροτενοειδή, που διακρίνονται σε **καροτένια** και **ξανθοφυλλίνες**, βρίσκονται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς,

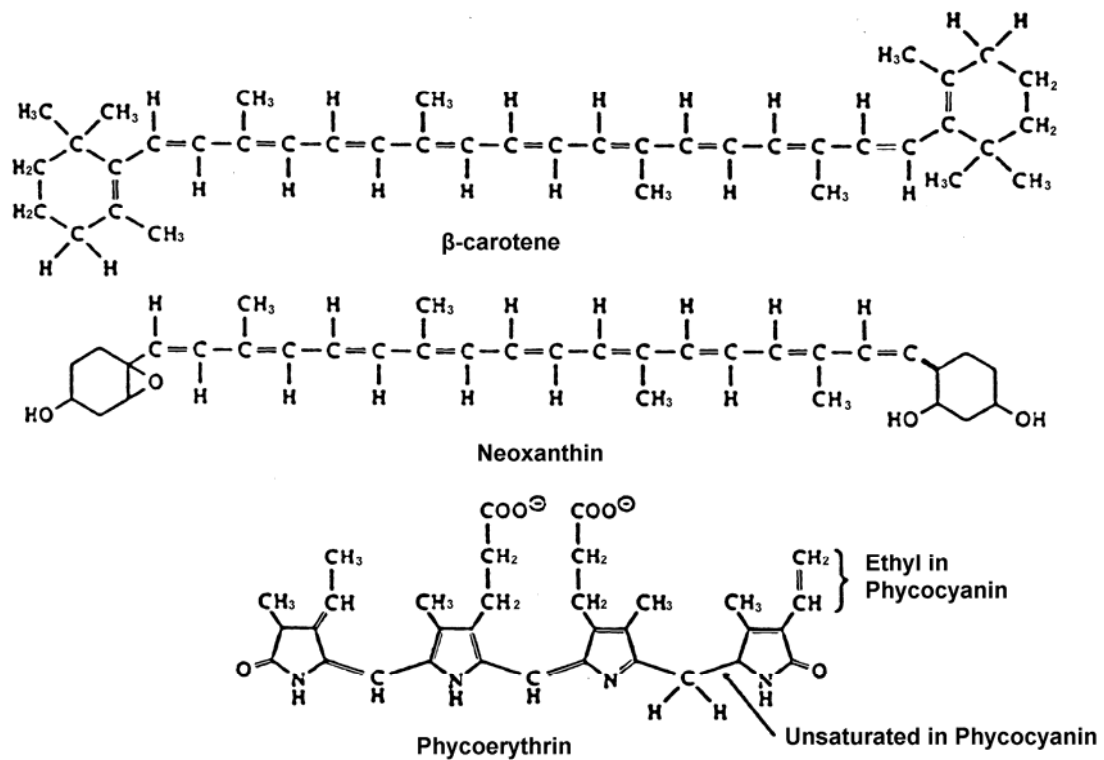
ενώ οι φυκομπιλίνες, που διακρίνονται σε *φυκοερυθρίνες* και *φυκοκυανίνες*, συναντούνται σε ορισμένα φύκη και στα κυανοβακτήρια (Σχ. 5).



Σχήμα 3: Κατανομή της ηλιακής ενέργειας στην επιφάνεια της γης
[Bolton, J.R. *Solar fuels. Science* 202: 705-711, 1976]

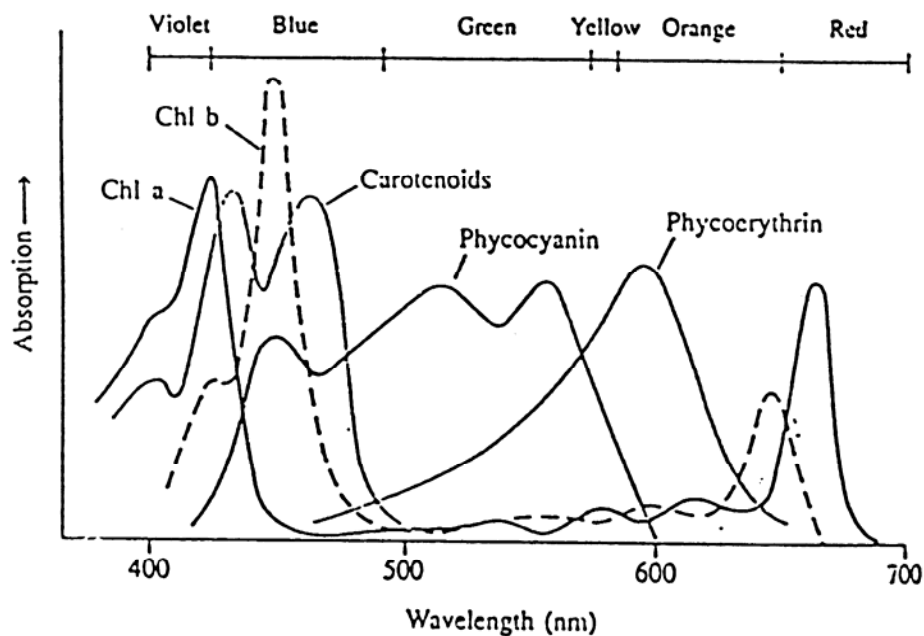


Σχήμα 4: Δομή της χλωροφύλλης
[J. David Rawn, βιβλίο *Βιοχημείας*]



Σχήμα 5: Δομές διαφόρων χρωστικών

[J. David Rawn, βιβλίο Βιοχημείας]



Σχήμα 6: Φάσμα απορρόφησης των κυριότερων φωτοσυνθετικών χρωστικών

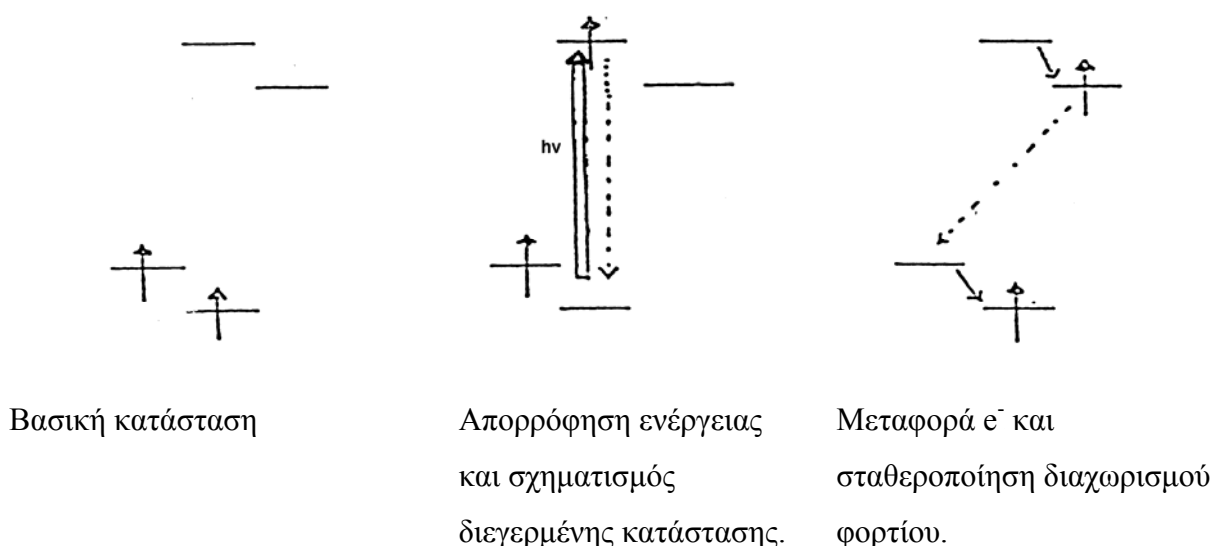
[Govindjee, G., Govindjee, R. *The absorption of light in photosynthesis. Sci.*

Amer. 231: 68-82,1974]

Οι χλωροφύλλες (Chl a, Chl b) απορροφούν τόσο στην περιοχή του μπλε (λ_{\max} 424-491 nm), όσο και στην περιοχή του κόκκινου (λ_{\max} 647-700 nm), (Σχ. 6).

Τα καροτενοειδή, εκτός από το ότι απορροφούν φως, έχουν και προστατευτική δράση στη φωτοσύνθεση. Το O_2 μπορεί να μετατραπεί σε ενεργοποιημένο οξυγόνο (singlet oxygen), καθώς απορροφά ενέργεια. Αν το ενεργοποιημένο οξυγόνο περάσει στο χλωροπλάστη, μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική καταστροφή στα μεμβρανικά λιπίδια και τις άλλες χρωστικές. Τα καροτενοειδή παίρνουν ενέργεια από το ενεργοποιημένο οξυγόνο, σχηματίζοντας ξανά τη βασική κατάσταση του οξυγόνου. Αυτή η ενέργεια, που απορροφάται από τα καροτενοειδή, χάνεται τελικά ως θερμότητα.

Κατά την έναρξη των φωτεινών αντιδράσεων δημιουργείται ένας **διαχωρισμός φορτίου**. Ένα ηλεκτρόνιο ενός χρωμοφόρου, με την απορρόφηση ηλιακής ενέργειας, διεγείρεται και η διεγερμένη κατάσταση του αποτελεί ένα ισχυρό αλλά ασταθές αναγωγικό. Το κενό τροχιακό, από το οποίο προέρχεται το e^- , αποτελεί ένα ισχυρό οξειδωτικό. Το e^- μεταφέρεται γρήγορα σε ένα κοντινό ηλεκτρονιοδέκτη με χαμηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής και ο διαχωρισμός φορτίου σταθεροποιείται έναντι της επαναφοράς του ηλεκτρονίου στο αρχικό τροχιακό (Σχ. 7).



Σχήμα 7: Αναπαράσταση διαχωρισμού φορτίου

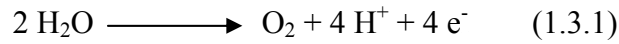
Το χρωμοφόρο, από το οποίο προέρχεται το e^- , αποτελεί τον **πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη**. Σε διαδοχικές μεταφορές, το ασύζευκτο e^- μετακινείται σε ηλεκτρονιοδέκτες, μακριά από τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη, που αποτελούν ασθενή αναγωγικά, όταν αναχθούν. Ο πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης ανάγεται κι έτσι με τη μεταφορά του οξειδωτικού ισοδυνάμου σταθεροποιείται ο διαχωρισμός φορτίου. Στα φυτά, ο πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης είναι ένα εξειδικευμένο μόριο χλωροφύλλης *a*, που χαρακτηρίζεται ως P_{680} , επειδή απορροφά στα 680 nm. Για να λειτουργήσει το ενζυμικό σύμπλοκο της φωτοσύνθεσης, είναι απαραίτητη η παρουσία των συμπαραγόντων, που συγκροτούν τις αλυσίδες δοτών και δεκτών e^- , τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη και μια σειρά χρωστικών (μόρια χλωροφύλλης και καροτενοειδών) για τη συλλογή και μεταφορά της ενέργειας στον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη. Το ενζυμικό σύμπλοκο που περιέχει τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη και όπου γίνεται ο πρωτοταγής διαχωρισμός φορτίου λέγεται **κέντρο αντίδρασης** (Reaction Center, RC). Τα φωτοσυνθετικά σύμπλοκα παράγουν μια διαβάθμιση H^+ κατά μήκος της μεμβράνης, όπου είναι βυθισμένα, καταναλώνοντας H^+ από τη μία πλευρά και απελευθερώνοντας H^+ από την άλλη. Η διαβάθμιση αυτή χρησιμοποιείται στη σύνθεση ATP από το ένζυμο ATP-συνθετάση.

1.3 Ηλεκτρονιακή ροή στα φυτά και έκλυση O_2

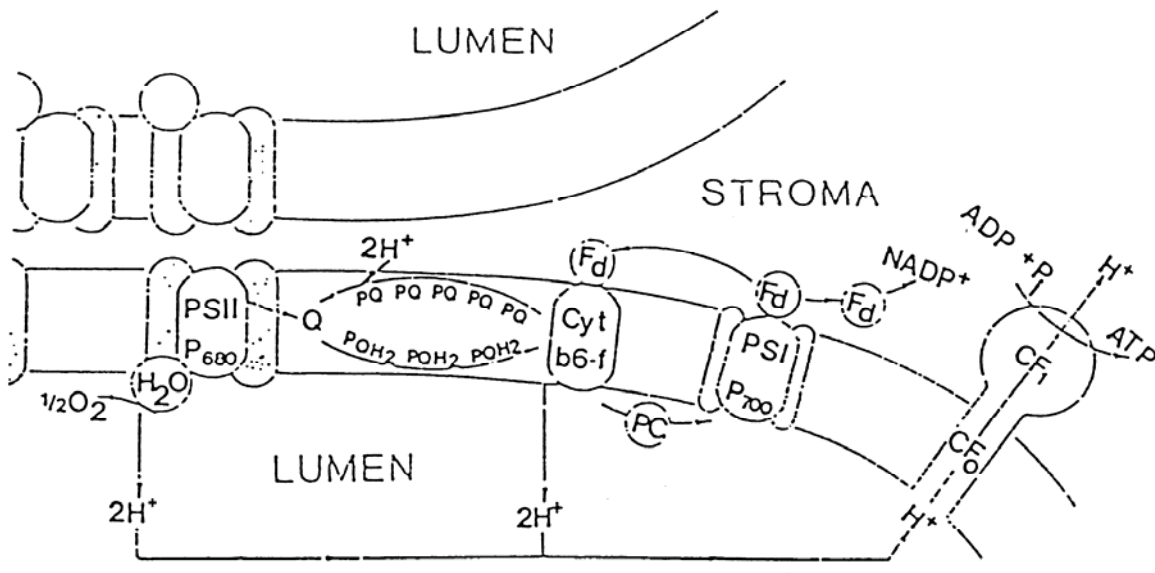
Στα φωτοσυνθετικά βακτήρια, ο αρχικός δότης e^- και ο τελικός δέκτης e^- ποικίλουν. Τα φωτοσυνθετικά τους κέντρα, όμως, ανήκουν σε δύο κατηγορίες: η μία περιέχει κέντρα αντίδρασης με πρωτοταγή δέκτη **φαιοφυτίνη** και **κινόνη**, ενώ η άλλη περιέχει κέντρα αντίδρασης με πρωτοταγή δέκτη **Fe-S** κέντρα. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα *μωβ μη θειούχα βακτήρια*, ενώ στη δεύτερη ανήκουν τα *πράσινα θειούχα βακτήρια* [1].

Στα φυτά και στα κυανοβακτήρια, ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το H_2O , το οποίο οξειδώνεται παράγοντας O_2 προς τη φερρεδοξίνη (Fd), μια υδατοδιαλυτή οξειδοαναγωγική πρωτεΐνη που ανάγει το συνένζυμο $NADP^+$. Επειδή το H_2O είναι εξαιρετικά ασθενές αναγωγικό, λειτουργούν δυο φωτοσυνθετικά σύμπλοκα (PS) για να υπερνικηθεί το δυναμικό οξειδοαναγωγής (1.2V) του H_2O και του $NADP^+$. Το περισσότερο αναγωγικό σύμπλοκο είναι το **φωτοσύστημα I (PS I)**, μοιάζει με το φωτοσυνθετικό κέντρο των πράσινων θειούχων βακτηρίων και δρα σαν οξειδοοδουκτάση πλαστοκυανίνης-φερρεδοξίνης [2]. Ο πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης του PS I απορροφά στα 700nm και χαρακτηρίζεται ως P_{700} . Το σύμπλοκο που οξειδώνει το H_2O ονομάζεται **φωτοσύστημα II (PS II)** και μοιάζει με το

φωτοσυνθετικό κέντρο αντίδρασης των μωβ θειούχων βακτηρίων. Ο πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης του PS II απορροφά στα 680nm και χαρακτηρίζεται ως P₆₈₀. Τα δύο φωτοσυστήματα συνδέονται με μικρούς μεταφορείς e⁻, την **πλαστοκινόνη (PQ)** και την **πλαστοκυανίνη (PC)**, μέσω ενός τρίτου συμπλόκου που ονομάζεται **κυτόχρωμα b/f** και δρα σαν αντλία πρωτονίων κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Το PS II βρίσκεται κυρίως στα grana, ενώ το PS I και το σύμπλοκο CF₀-CF₁ (ATP-συνθετάση), που αποτελεί τη θέση δέσμευσης του ATP, εντοπίζεται στα lamellae και τις εκτεθειμένες στο στρώμα περιοχές των grana. Το cyt b₆f είναι ομοιόμορφα κατανεμημένο και στις δύο περιοχές. Όλα αυτά τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προσανατολίζονται στη μεμβράνη με τρόπο, ώστε η επαγόμενη από το φως ηλεκτρονιακή μεταφορά, να προκαλεί πρωτονιακή μεταφορά από το στρώμα στην περιοχή lumen. Η διαβαθμισμένη συγκέντρωση πρωτονίων κατά μήκος της θυλακοειδούς μεμβράνης χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ενεργειακού μεταφορέα ATP (Σχ. 8). Η αλυσίδα μεταφοράς e⁻ από το H₂O στη φερρεδοξίνη αναπαρίσταται με μια οξειδοαναγωγική κλίμακα δυναμικού, η οποία είναι γνωστή ως **σχήμα-Z** (Σχ. 9). Όπως είναι γνωστό από την ηλεκτροχημεία, η ροή e⁻ γίνεται από ένα αρνητικό δυναμικό αναγωγής προς ένα περισσότερο θετικό δυναμικό αναγωγής. Η ηλεκτρονιακή ροή δε μπορεί να γίνει αντίθετα χωρίς την ύπαρξη ενεργειακής πηγής. Το δυναμικό αναγωγής του P₆₈₀ στο PS II είναι πιο θετικό από αυτό του P₇₀₀ στο PS I. Παρόμοια τα e⁻ δε μπορούν να μεταφερθούν από τη βασική κατάσταση του P₇₀₀ στο NADP⁺, γιατί το δυναμικό αναγωγής του P₇₀₀ είναι πιο θετικό από αυτό του NADP⁺. Έτσι κατά τη φωτοσύνθεση, με την απορρόφηση φωτός δημιουργείται η διεγερμένη κατάσταση του P₆₈₀, η P₆₈₀^{*}, της οποίας το δυναμικό αναγωγής είναι πιο αρνητικό από του P₇₀₀. Στη συνέχεια, τα e⁻ μεταφέρονται μέσω μιας σειράς ηλεκτρονιομεταφορέων από το P₆₈₀ στο P₇₀₀. Ανάλογα, η διεγερμένη κατάσταση του P₇₀₀, η P₇₀₀^{*} έχει πιο αρνητικό δυναμικό αναγωγής από το NADP⁺, οπότε μέσω μιας σειράς ηλεκτρονιομεταφορέων, τα e⁻ μεταφέρονται από το P₇₀₀ στο NADP⁺. Έτσι η ηλιακή ακτινοβολία παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για να πραγματοποιηθούν διαδικασίες που δεν ευνοούνται θερμοδυναμικά. Όταν το P₆₈₀ απορροφήσει ενέργεια, δημιουργείται η P₆₈₀^{*}. Ο πρωτοταγής αυτός δότης e⁻ μεταφέρει ένα e⁻ στη **φαιοφυτίνη α (Pheo a)**, σε χρονικό διάστημα 3 psec [4]. Η δομή της φαιοφυτίνης α είναι ίδια με αυτήν της Chl a, αλλά 2 άτομα H αντικαθιστούν το Mg²⁺. Ο πρωτοταγής διαχωρισμός φορτίου σταθεροποιείται σε χρονικό διάστημα 200 psec [5]. Το P₆₈₀ με την απώλεια ενός e⁻ μετατρέπεται σε ένα ισχυρό οξειδωτικό, το P₆₈₀⁺, (E_m=+1.1V). Η απώλεια του e⁻, καλύπτεται από το H₂O, το οποίο οξειδώνεται για να παραχθεί τελικά μοριακό O₂ και να ελευθερωθούν 4 H⁺:



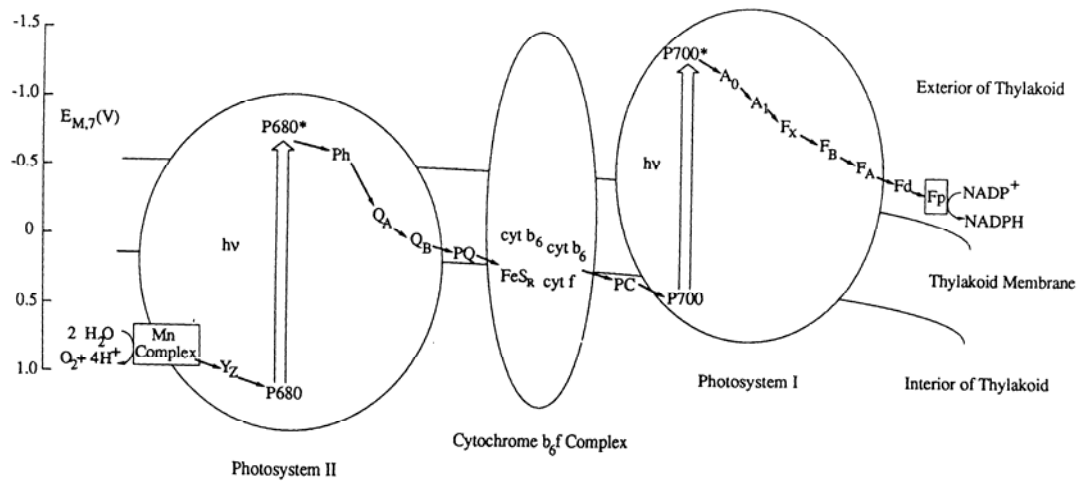
Τα 4 H⁺ που ελευθερώνονται στο lumen, συνεισφέρουν στην πρωτονιακή διαβάθμιση κατά μήκος της θυλακοειδούς μεμβράνης. Τα 4 e⁻ μεταφέρονται διαδοχικά στον μεταφορέα ενός e⁻, TyrZ. Όταν το P₆₈₀* δώσει το e⁻ στη φαιοφυτίνη α και αποκτήσει θετικό φορτίο, το e⁻ μεταφέρεται από την TyrZ στο P₆₈₀⁺. Η οξείδωση της TyrZ παράγει μια ισχυρή οξειδωτική ρίζα, την TyrZ⁺, η οποία είναι αναγκαία για την οξείδωση του H₂O. Η αντίδραση TyrZ + P₆₈₀⁺ → TyrZ⁺ + P₆₈₀, χαρακτηρίζεται από ετερογενείς κινητικές της τάξης 20-250 nsec [6], ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του συμπλόκου οξείδωσης του H₂O [6,7].



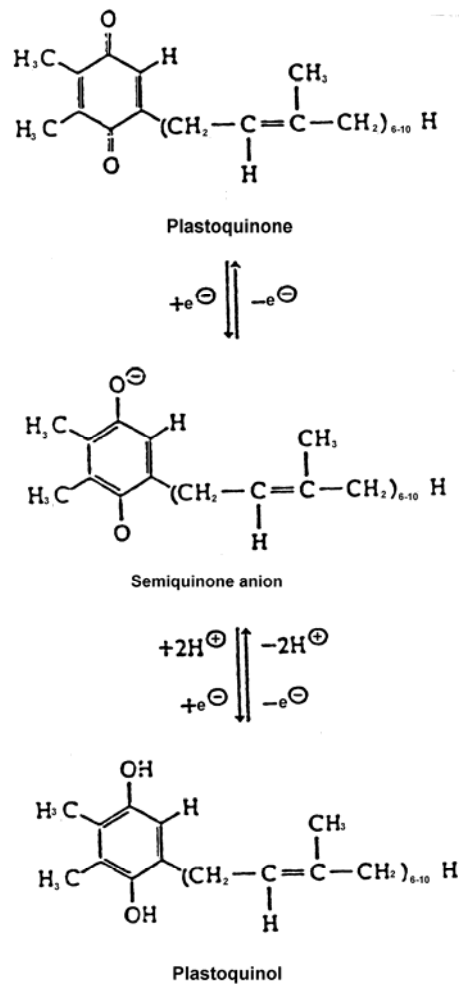
Σχήμα 8: Οργάνωση της θυλακοειδούς μεμβράνης:

στο σχήμα φαίνονται τα τέσσερα μεμβρανικά σύμπλοκα PS II, *cyt b_{6/f}*, PS I και ATP-συνθετάση

[Marder et al. *Plant, cell and Environment*, 12, 595-614, 1989]

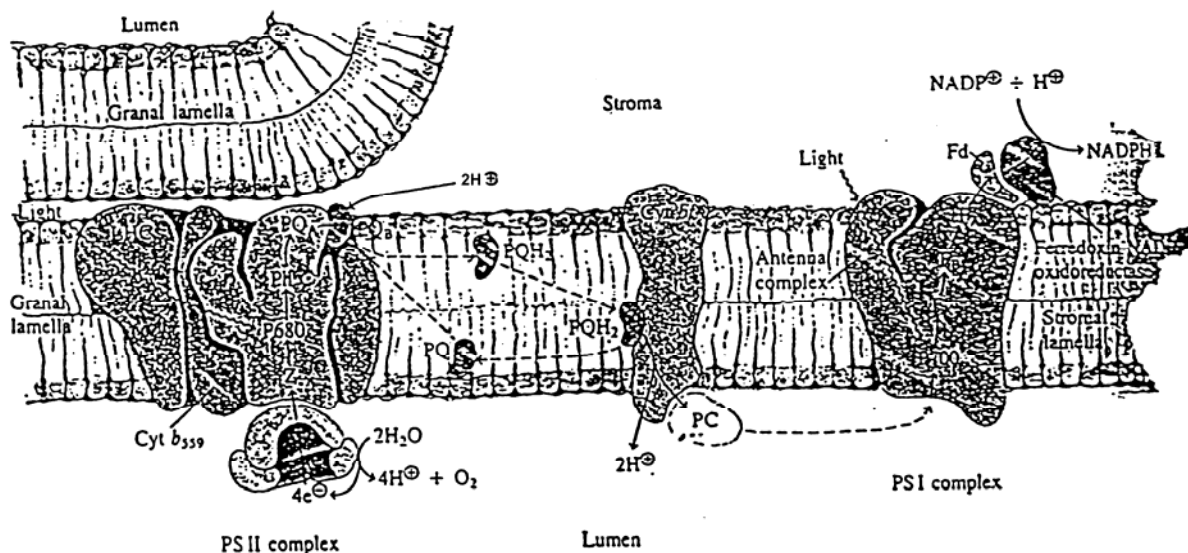


Σχήμα 9: Το σχήμα Z της φωτοσυνθετικής μεταφοράς ηλεκτρονίων
 [Miller, A.F. and Brudvig, G.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 1056:1-18, 1991]



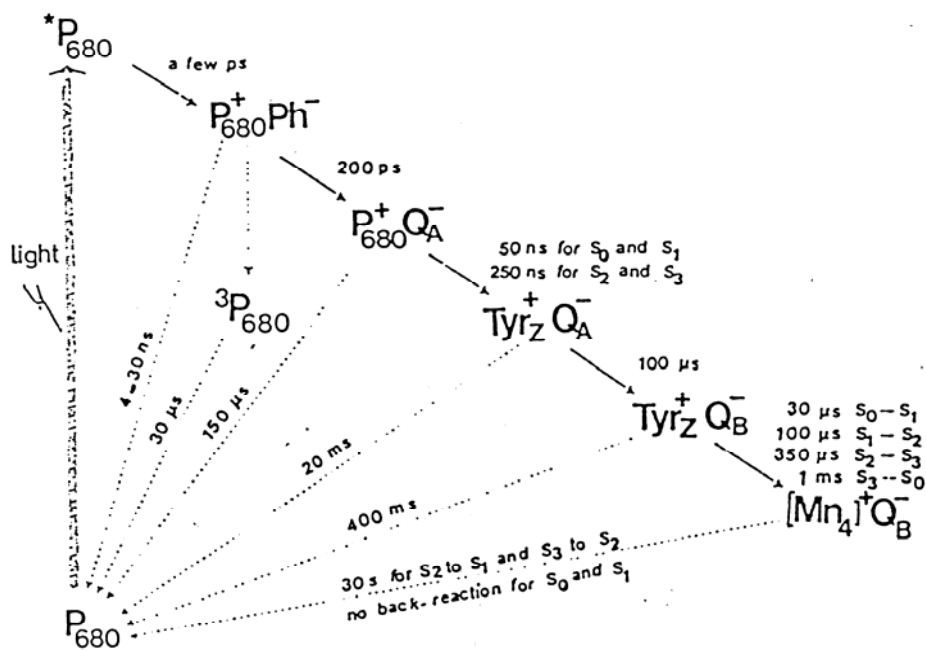
Σχήμα 10: Αναγωγή της πλαστοκινόνης σε πλαστοκινόλη
 [J. David Rawn, βιβλίο Βιοχημείας]

Η ανηγμένη φαιοφυτίνη α δίνει ένα e^- στην κινόνη Q_A που έχει το πιο αρνητικό δυναμικό αναγωγής από τις κινόνες που αποτελούν τη δεξαμενή ελεύθερης πλαστοκινόνης της μεμβράνης, (**PQ-pool**). Η Q_A οξειδώνεται δίνοντας ένα e^- στην Q_B . Η αναγωγή κατά ένα e^- μετατρέπει την Q_B σε ημικινόνη, Q_B^- . Με την απορρόφηση ενός δευτέρου φωτονίου, δηλαδή μετά από ένα δεύτερο διαχωρισμό φορτίου, η μεταφορά e^- προς την Q_B επαναλαμβάνεται. Δύο πρωτόνια προσθέτονται ταυτόχρονα στην Q_B , έτσι ώστε τελικά η κινόνη να δέχεται δύο e^- και δύο H^+ , πριν αναχθεί πλήρως σε πλαστοκινόλη, **PQH₂**, (Σχ. 10). Η πλαστοκινόλη επιστρέφει στη δεξαμενή πλαστοκινόνης [8]. Μερικά ζιζανιοκτόνα, όπως η ατραζίνη και το DCMU, απαγορεύουν τη ροή ηλεκτρονίων από την ημικινόνη Q_A^- στην κινόνη Q_B , επειδή συναγωνίζονται με την πλαστοκινόνη για τη θέση δέσμευσης της κινόνης Q_B [9]. Οι δύο ημικινόνες Q_A^- και Q_B^- αλληλεπιδρούν μαγνητικά με ένα ιόν Fe^{2+} , που δεν ανήκει σε αίμη [10, 11]. Το μεταλλικό αυτό ιόν δεν έχει οξειδοαναγωγική λειτουργία, αλλά διευκολύνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από τη φαιοφυτίνη α στην κινόνη Q_A και ακολούθως στην κινόνη Q_B . Κατόπιν, τα e^- μεταφέρονται από το PS II στο σύμπλοκο κυτόχρωμα b/f. Τέλος, τα e^- μεταφέρονται μέσω της πλαστοκυανίνης, PC, στο PS I, απ' όπου μέσω μιας σειράς ηλεκτρονιομεταφορέων, των Fe-S πρωτεϊνών και φερρεδοξίνης, τα e^- φθάνουν στο $NADP^+$ (Σχ. 11).



Σχήμα 11: Αναπαράσταση της ηλεκτρονιακής ροής

[J. David Rawn, βιβλίο Βιοχημείας]



Σχήμα 12: Κινητική των αντιδράσεων ηλεκτρονιακής μεταφοράς και των αντιδράσεων επανασύνδεσης φορτίου

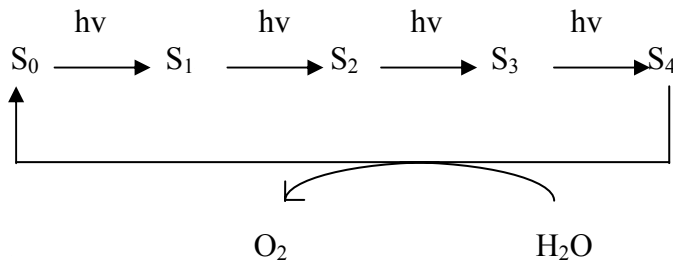
[Rutherford, A., W. Trends Biochem. Sci. 14, 227-232, 1989]

Η σταδιακή μεταφορά e^- και η κινητική των επιμέρους αντιδράσεων μεταφοράς σε θερμοκρασία δωματίου παρουσιάζονται στο Σχ. 12. Η σταθερότητα των ζευγών των φορτίων που σχηματίζονται αυξάνει προοδευτικά. Αν για κάποιο λόγο η κύρια αλυσίδα μεταφοράς e^- παρεμποδιστεί, αυξάνεται η πιθανότητα πραγματοποίησης των αντιδράσεων ανασυνδυασμού φορτίου. Αν μετά τον πρωτοταγή διαχωρισμό φορτίου δεν υπάρχει η δυνατότητα μεταφοράς του ηλεκτρονίου στην κινόνη Q_A , υπάρχουν δύο πιθανότητες: είτε να συμβεί η αντίστροφη αντίδραση είτε να σχηματισθεί η τριπλή κατάσταση $^3P_{680}$ [12]. Οι αντίστροφες αντιδράσεις σημειώνονται στο Σχ. 12 με διακεκομμένες γραμμές.

1.4 Το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου

Επειδή το δυναμικό αναγωγής του ζεύγους H_2O / O_2 είναι 0.9V στο εσωτερικό θυλακοειδών ($pH=5.0$), [13], το PS II πρέπει να παράγει ένα ισχυρό οξειδωτικό. Επίσης, όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 1.3, η οξείδωση του H_2O σε O_2 είναι μια πορεία 4 e^- , επομένως για να γίνει η αντίδραση $2H_2O \rightarrow O_2 + 4 H^+ + 4 e^-$, θα πρέπει να συνδυαστούν τέσσερα ισχυρά οξειδωτικά ισοδύναμα.

Το κλαστικό πείραμα του Joliot [14], (Σχ. 13), έδειξε ότι κάποιο συστατικό του PS II συσσωρεύει τα 4 οξειδωτικά ισοδύναμα. Χλωροπλάστες, που παρασκευάζονται στο σκοτάδι, όταν ακτινοβοληθούν με διαδοχικούς, μικρής διάρκειας, έντονους παλμούς, ώστε να προκληθεί ένας διαχωρισμός φορτίου ανά PS II και ανά παλμό, παράγεται O₂ στον τρίτο παλμό και μετά από κάθε τέταρτο. Οι οξειδωτικές καταστάσεις, που περιγράφονται με τα συσσωρευμένα οξειδωτικά ισοδύναμα αναφέρονται ως **S-καταστάσεις**.



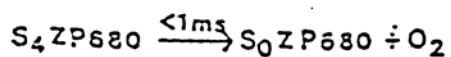
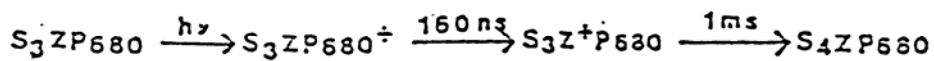
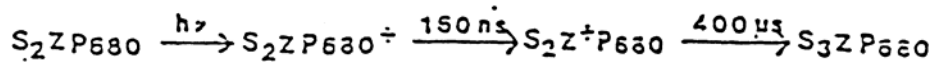
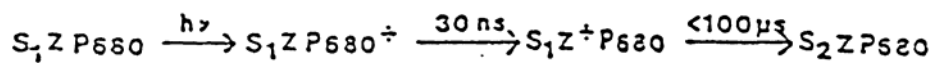
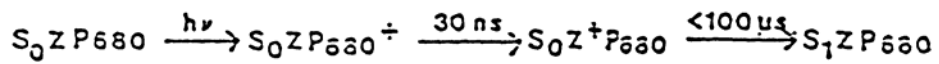
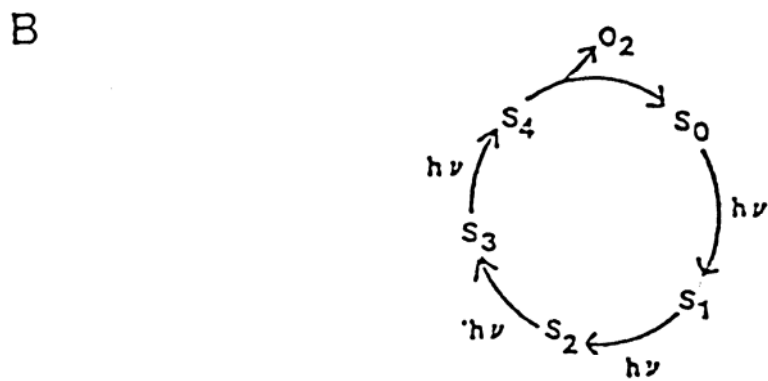
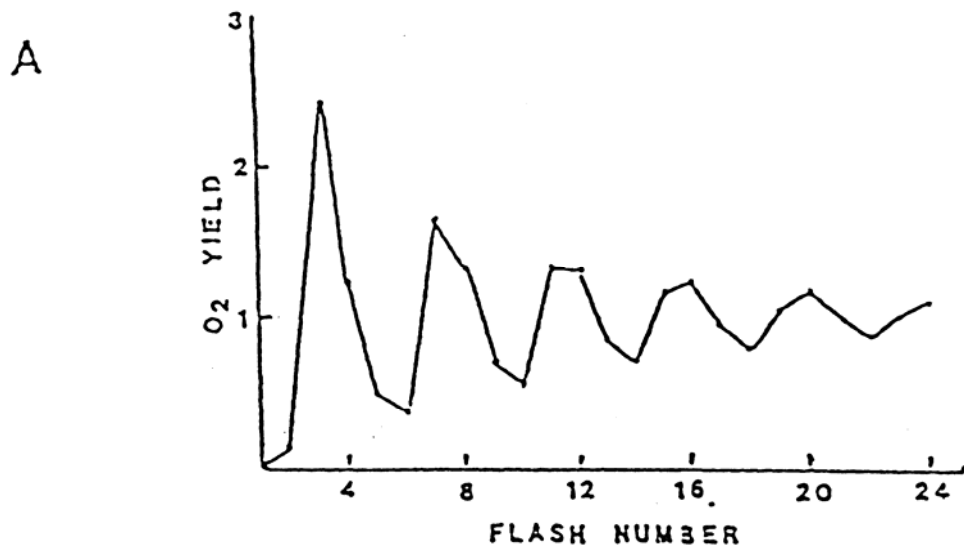
Η S₁ κατάσταση παρουσιάζει μεγάλης διάρκειας σταθερότητα, ενώ η κατάσταση S₀ οξειδώνεται αργά, (σε 1 ώρα περίπου), στην αντίστοιχη S₁ [15]. Οι καταστάσεις S₂ και S₃ ανάγονται στην κατάσταση S₁ μέσα σε λίγα λεπτά [16]. Η κατάσταση S₄ μετατρέπεται στην κατάσταση S₀ με ταυτόχρονη απελευθέρωση του O₂ μέσα σε χρόνο 1msec, περίπου.

Επειδή στο πείραμα του Joliot, τρεις παλμοί απαιτούνται για να παραχθεί το πρώτο O₂, η S₁ κατάσταση θεωρείται η σταθερή κατάσταση του PS II στο σκοτάδι. Η φθίνουσα μορφή ταλάντωσης, που παρατηρήθηκε στο πείραμα του Joliot, οφείλεται σε «διαρροές», δηλαδή στο κλάσμα των κέντρων αντίδρασης, που δεν προωθούνται ένα βήμα (miss) ή το κλάσμα των κέντρων, που προωθούνται δύο βήματα (double hit) κατά τη διάρκεια ενός παλμού

Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο, όπου γίνεται η συσώρευση των φορτίων και η οξείδωση του H₂O ονομάζεται **σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου** (Oxygen Evolving Complex, O.E.C.). Έτσι, σύμφωνα με το μοντέλο του Kok, [17], στους χλωροπλάστες υπάρχουν δύο ξεχωριστά πρωτεϊνικά σύμπλοκα, όπου στο ένα γίνεται ο διαχωρισμός φορτίου και στο άλλο η οξείδωση του H₂O.

Έχει αποδειχθεί [18], ότι **ιόντα μαγγανίου** είναι απαραίτητα για την έκλυση O₂ και συγκεκριμένα ότι απαιτούνται 4 ιόντα μαγγανίου [19].

Ταυτοποιήθηκε ότι οι S-καταστάσεις είναι σύμπλοκα Mn σε διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις.



Σχήμα 13:

A. Με ακτινοβολήση παλμών η παραγωγή O_2 παρουσιάζει περιοδικότητα τέσσερα

B. Ο κύκλος των S-καταστάσεων

1.5 Ανόργανοι συμπαράγοντες

Το **μαγγάνιο** είναι ένας από τους ανόργανους συμπαράγοντες και είναι απαραίτητο για τη φωτοχημική μετατροπή του H_2O σε μοριακό O_2 , παρουσία δύο άλλων συμπαράγοντων, των ιόντων **ασβεστίου** και **χλωρίου**.

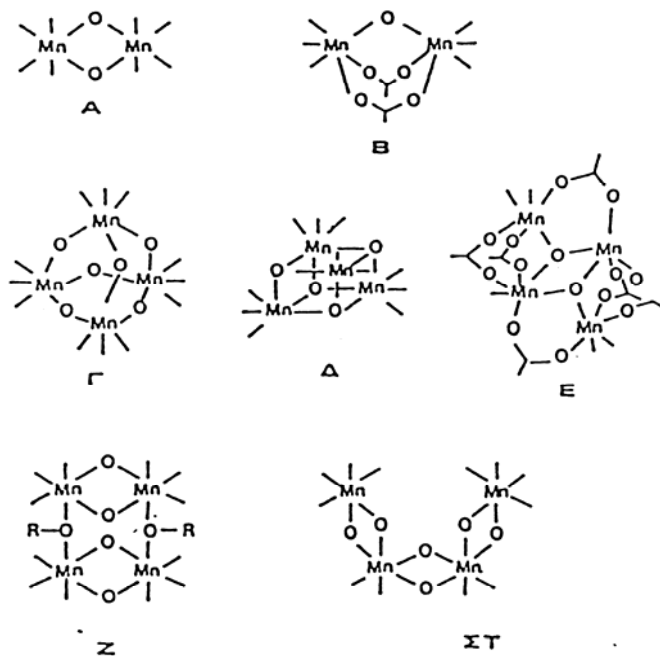
Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.4, 4 ιόντα Mn απαιτούνται για την οξείδωση του H_2O . Τα ιόντα αυτά φαίνεται να μην είναι ισοδύναμα, επειδή απελευθερώνονται και επανασυνδέονται με διαφορετικό τρόπο. Ποσοστό 75-80% του ολικού μαγγανίου μπορεί να απομακρυνθεί με κατεργασία PS II μεμβρανών με 0.8 M Tris σε pH=8.4 ή με υδροξυλαμίνη [20,21]. Το ίδιο ποσοστό Mn μπορεί να απομακρυνθεί με κατεργασία PS II μεμβρανών με 2M NaCl και κατόπιν προσθήκη ενός αναγωγικού (π.χ. υδροκινόνη, HQ) [22]. Η βασική διαφορά των δύο κατεργασιών είναι ότι με το Tris απομακρύνονται και οι τρεις υδρόφιλες πρωτεΐνες του PS II (17, 23 και 33 kDa), ενώ με το άλας/αναγωγικό απομακρύνονται μόνο οι 17 kDa και 23 kDa πρωτεΐνες. Έκθεση των PS II μεμβρανών σε 1M $CaCl_2$ έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση των 3 υδρόφιλων πρωτεϊνών, όχι όμως και των 4 ιόντων μαγγανίου. Αλλά, αν τα κατεργασμένα με $CaCl_2$ δείγματα PS II διατηρηθούν σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης ιόντων Cl^- (<100mM), δύο ιόντα μαγγανίου απελευθερώνονται [23]. Αυτό θεωρήθηκε ως ένδειξη ότι το ένα ζεύγος ιόντων Mn δεσμεύεται ασθενέστερα συγκριτικά με το άλλο ζεύγος. Δεν είναι γνωστό αν η ετερογένεια αυτή οφείλεται στην παρουσία διαφορετικών υποκαταστατών ή διαφορετικών οξειδωτικών καταστάσεων των δύο ζευγών ιόντων μαγγανίου. Ο Cheniae και οι συνεργάτες του [24] απέδειξαν ότι, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, είναι δυνατό να δημιουργηθεί ένα λειτουργικό σύμπλοκο Mn σε PS II δείγματα, που δεν περιέχουν Mn. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως *φωτοενεργοποίηση* (photoactivation) και απαιτεί φως και την παρουσία ιόντων Ca^{2+} και Cl^- .

Ο καταλυτικός ρόλος του μαγγανίου μελετάται με μια ποικιλία φασματοσκοπικών τεχνικών, οι σπουδαιότερες από τις οποίες είναι η φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR), η φασματοσκοπία ακτίνων X (X-ray) και η οπτική φασματοσκοπία.

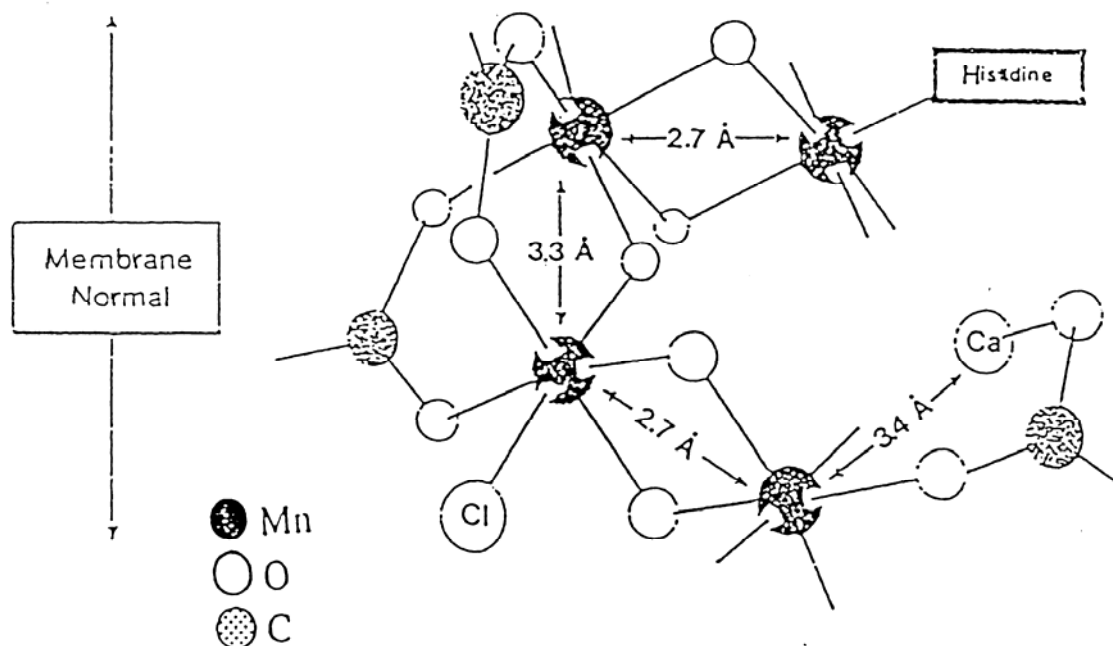
Δύο EPR σήματα αποδίδονται στην κατάσταση S_2 του συμπλόκου του Mn. Τα σήματα αυτά παρατηρούνται σε θερμοκρασία κάτω των 35K και με ακτινοβολία PS II δειγμάτων με παλμούς φωτός και είναι γνωστά ως multiline και $g=4.1$.

Οι οξειδοαναγωγικές μεταβολές στο σύμπλοκο του μαγγανίου έχουν μελετηθεί και με UV φασματοσκοπία, εφόσον οι οξειδωτικές μεταπτώσεις S του συμπλόκου συνοδεύονται από οπτικές αλλαγές απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους [25,26]. Έχει προταθεί ότι οι μεταβολές αυτές που παρατηρούνται σε φάσματα UV κατά τις $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$ και $S_2 \rightarrow S_3$ οφείλονται στην οξείδωση ενός Mn(III) σε Mn(IV) [27], ενώ άλλες ερευνητικές ομάδες δίνουν διαφορετικές εξηγήσεις [28,29].

Το είδος των υποκαταστατών (ligands) που συναρμολογούνται με το κεντρικό μεταλλικό ιόν και οι αποστάσεις μεταξύ τους εξετάζονται με φασματοσκοπία EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure). Έτσι, προσδιορίστηκαν δύο άτομα οξυγόνου (O) ή αζώτου (N) ανά Mn σε απόσταση 1.8 Å και 2-4 άτομα O ή N σε απόσταση 1.9-2.2 Å [30]. Επίσης, προσδιορίστηκαν αλληλεπιδράσεις Mn- Mn σε απόσταση 2.73 Å [30], μια αλληλεπίδραση Mn- Mn ή Mn-Ca σε απόσταση 3.3 Å και μια αλληλεπίδραση Mn- Mn ή Mn-Ca σε απόσταση 4.35 Å [31,32]. Στο Σχ. 14 παρουσιάζονται διάφορες δομές συμπλόκων Mn(III) και Mn(IV) με όξο- και αλκόξο-γέφυρες που έχουν χαρακτηριστεί με φασματοσκοπία EXAFS, ενώ στο Σχ.15 παρουσιάζεται το δομικό μοντέλο που προτάθηκε από τους Klein και Sauer [30] για το σύμπλοκο του μαγγανίου.



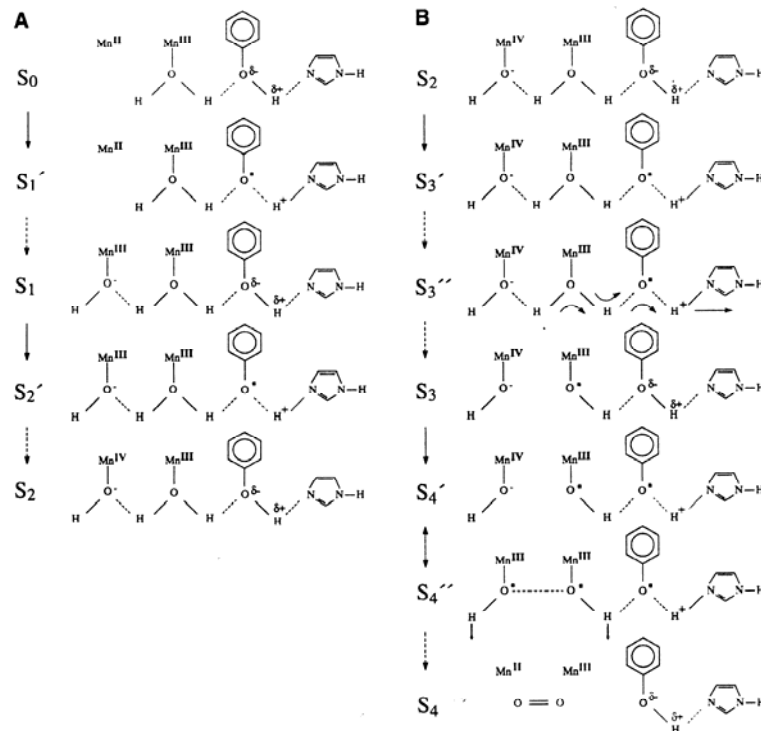
Σχήμα 14: Διάφορες δομές συμπλόκων Mn(III) και Mn(IV) με όξο- και αλκοξο-γέφυρες, που έχουν χαρακτηριστεί με φασματοσκοπία ακτίνων-X [Yachandra et al., Science, 260, 765, 1993]



Σχήμα 15: Μοντέλο για τη διάταξη στο χώρο των τεσσάρων ιόντων Mn στο Φωτοσύνστημα II [Yachandra et al., Science, 260, 765, 1993]

Η φασματοσκοπία XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) χρησιμοποιείται για τη μελέτη του σθένους των ιόντων μαγγανίου, που συμμετέχουν στη λειτουργία του συμπλόκου O.E.C.. Προτείνεται, λοιπόν, ότι η S_1 κατάσταση αποτελείται από δύο Mn(III) και δύο Mn(IV) [33], κατά την $S_1 \rightarrow S_2$ μετάβαση ένα ιόν Mn(III) οξειδώνεται σε Mn(IV) [32,34], ενώ κατά την $S_2 \rightarrow S_3$ θεωρείται ότι το Mn δεν οξειδώνεται, αφού δεν παρατηρείται μεταβολή της ενέργειας απορρόφησης [35,36] και πιθανόν να οξειδώνεται μια ιστιδίνη [35]. Επίσης, στην κατάσταση S_0 επιβεβαιώνεται η παρουσία ενός ιόντος Mn(II) [37].

Στο Σχ. 16 παρουσιάζονται οι πιθανότερες οξειδωτικές καταστάσεις των ιόντων κατά τη λειτουργία του συμπλόκου έκλυσης O_2 , σύμφωνα με τις μέχρι σήμερα πληροφορίες.



Σχήμα 16: Μοντέλο που συνδέει τα ιόντα Μαγγανίου με τις *S* καταστάσεις κατά την οξείδωση του νερού και την έκλυση οξυγόνου
[Haumann, M., Junge, W., B.B.A. 1411 (1999) 86-91]

Πολλές μελέτες έχουν γίνει για τον προσδιορισμό των θέσεων δέσμωσης του μαγγανίου και το είδος των αμινοξέων που δεσμεύουν το μαγγάνιο. Έχει αποδειχθεί ότι η απομάκρυνση της πρωτεΐνης 33 kDa μπορεί να γίνει χωρίς ταυτόχρονη απομάκρυνση του μαγγανίου [38-42]. Αυτό δεν αποκλείει την πιθανότητα ότι η πρωτεΐνη 33 kDa παρέχει κάποιους υποκαταστάτες στο μαγγάνιο, οι οποίοι μπορούν να αντικατασταθούν από H₂O ή κάποια αμινοξέα μετά την απομάκρυνση της πρωτεΐνης. Πολλές είναι οι μελέτες, που εντοπίζουν το μαγγάνιο στο διμερές των πολυπεπτιδίων D1/D2 και οι οποίες επιβεβαιώνονται από πειράματα επιλεκτικής μετάλλαξης των αμινοξέων των δύο πρωτεϊνών. Ο αριθμός των αμινοξέων που παρέχουν οι πρωτεΐνες D1 και D2 δεν αρκεί για να καλύψει τον απαιτούμενο αριθμό υποκαταστατών του συμπλόκου του Mn. Άλλοι υποκαταστάτες μπορεί να προέρχονται από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες του PS II (CP 47, CP 43, cyt b₅₅₉, πρωτεΐνη psb I κ.λ.π.) ή από το H₂O και τις καρβονυλομάδες του πεπτιδικού σκελετού.

Εκτός από το μαγγάνιο, δύο άλλοι ανόργανοι συμπαραγόντες του O.E.C. είναι τα ιόντα Ca²⁺ και Cl⁻, των οποίων ο δομικός και λειτουργικός ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί.

Ο ρόλος του **ασβεστίου** στη λειτουργία του PS II αποδείχθηκε, όταν διαπιστώθηκε ότι με προσθήκη ασβεστίου σε PS II μεμβράνες, που δεν περιέχουν τις υδρόφιλες πρωτεΐνες 23 και 17 kDa, ανακτάται η ικανότητα έκλυσης O₂ [43, 44, 45]. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες αυτές αυξάνουν σημαντικά τη φαινομενική συγγένεια του Ca²⁺ για τις θέσεις δέσμευσης στο PS II [46, 47, 48].

Με ατομική απορρόφηση προσδιορίστηκε ότι σε μεμβράνες PS II περιέχονται 2-3 ιόντα Ca²⁺ [49, 50] ανά μόριο P₆₈₀. Θεωρείται ότι υπάρχουν 1-2 θέσεις δέσμευσης χαμηλής συγγένειας και μία θέση υψηλής συγγένειας. Το Ca²⁺ από τη θέση υψηλής συγγένειας μπορεί να απομακρυνθεί με επώαση (150 min) των PS II μεμβρανών σε διάλυμα 2M NaCl παρουσία 1M EGTA και 20mM ιονοφόρου A23187 σε pH=5.0 και με ακόλουθη έκπλυση με διάλυμα 1mM EGTA και 20mM ιονοφόρου A23187 σε pH=6.0 [50, 51]. Το Ca²⁺ από τις θέσεις χαμηλής συγγένειας απομακρύνεται με ήπιες συνθήκες, όπως έκπλυση με διάλυμα 1-2 M NaCl παρουσία 1mM EGTA και 20 mM ιονοφόρου A 23187 σε pH= 6.0 [50, 51] ή με επώαση σε διάλυμα 10-20mM κιτρικού νατρίου σε pH=3.0 [52]. Η ακτινοβολήση διευκολύνει την εξαγωγή των ιόντων Ca²⁺ [53, 54] σε δείγματα που δεν κατεργάζονται ταυτόχρονα με NaCl και χηλικές ενώσεις. Η συγγένεια του PS II για το Ca²⁺ εξαρτάται από τις οξειδωτικές καταστάσεις του μαγγανίου. Η κατάσταση S₁ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγγένεια, ενώ η κατάσταση S₃ τη μικρότερη [55].

Θεωρείται ότι το ασβέστιο στη θέση υψηλής συγγένειας συμμετέχει είτε στην παραγωγή O₂ είτε στη φωτοχημεία του PS II [51]. Η παρουσία του Ca²⁺ στις χαμηλής συγγένειας θέσεις δέσμευσης είναι απαραίτητη για την έκλυση O₂, αλλά όχι για τη δημιουργία του συμπλόκου του Mn [24, 56]. Προτείνεται ότι οι θέσεις χαμηλής συγγένειας του Ca²⁺ δημιουργούνται κατά το σχηματισμό του συμπλόκου του μαγγανίου [57]. Ιόντα Sr²⁺ [44] και VO₂⁺ [58] μπορούν να καταλάβουν τις θέσεις χαμηλής συγγένειας του Ca²⁺ και διατηρούν την έκλυση O₂, αλλά με μικρότερη ταχύτητα. Τα ιόντα K⁺, Na⁺ και Cs⁺ απαγορεύουν την παραγωγή O₂ με ασθενή συναγωνισμό με το Ca²⁺ [59, 60]. Το Cd²⁺ είναι ισχυρότερος παρεμποδιστής [60], ενώ τα ιόντα Mn²⁺ απαγορεύουν την έκλυση O₂, σε ανταγωνισμό με τα ιόντα Ca²⁺ για τις ίδιες θέσεις δέσμευσης στο PS II [56]. Τα ιόντα La³⁺ παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συγγένεια για τις θέσεις δέσμευσης του Ca²⁺ [61].

Με απομάκρυνση του Ca^{2+} από τις θέσεις χαμηλής συγγένειας παρεμποδίζεται αντιστρεπτά η έκλυση O_2 και διακόπτεται η λειτουργία του κύκλου των οξειδωτικών καταστάσεων S.

Δύο εναλλακτικοί ρόλοι έχουν προταθεί για τη συμμετοχή του Ca^{2+} στην έκλυση O_2 : ο ρυθμιστικός ρόλος σε πρωτονιώσεις/αποπρωτονιώσεις που συνοδεύουν την οξείδωση του H_2O [55] και ο ρυθμιστικός ρόλος στην προσέγγιση του υποστρώματος του H_2O στην ενεργή θέση του ενζύμου [62, 63]. Έτσι, προτείνεται ότι η δέσμευση του Ca^{2+} , που εξαρτάται από τις οξειδωτικές καταστάσεις S, επηρεάζει τις σταθερές διάστασης pK_a διαφόρων καρβοξυλικών ομάδων και επομένως την απελευθέρωση H^+ κατά τη λειτουργία του κύκλου του ΚοΚ [55]. Για το δεύτερο ρόλο του Ca^{2+} , προτείνεται ότι το Ca^{2+} συναρμόζει το H_2O στις χαμηλές οξειδωτικές καταστάσεις και το ανταλλάσσει με Cl^- στο σύμπλοκο του μαγγανίου πριν την οξείδωση του H_2O [63].

Έχει διαπιστωθεί ότι το Ca^{2+} σταθεροποιεί τη δομή και τη σύνδεση του συμπλόκου του μαγγανίου [64, 65].

Επειδή θεωρείται ότι το σύμπλοκο του μαγγανίου και το ασβέστιο εντοπίζονται σε γειτονικές θέσεις κάποιοι υποκαταστάτες στο Ca^{2+} μπορεί να παρέχονται από τις πρωτεΐνες D1 και D2, χωρίς να αποκλείονται αμινοξέα υδρόφιλων περιοχών άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών ή οι εξωτερικές πρωτεΐνες [66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73].

Για το ρόλο του **χλωρίου** στην έκλυση οξυγόνου, έχουν διατυπωθεί πολλές προτάσεις:

- 1) Τα ιόντα Cl^- δρουν ως υποκαταστάτες γέφυρας μεταξύ των ιόντων μαγγανίου και διευκολύνουν τη μεταφορά e^- μεταξύ των ιόντων [74].
- 2) Η δέσμευση και η αποδέσμευση των ιόντων Cl^- στο σύμπλοκο του μαγγανίου μπορεί να ρυθμίζει τις οξειδοαναγωγικές ιδιότητες συγκεκριμένων ιόντων μαγγανίου στο σύμπλοκο [75].
- 3) Προτείνεται ένας ρυθμιστικός ρόλος του Cl^- κατά το σχηματισμό των οξειδωτικών καταστάσεων S [76].
- 4) Η δέσμευση των ιόντων Cl^- κοντά στην ενεργή θέση του ενζύμου εξουδετερώνει και έτσι σταθεροποιεί τα συσσωρευμένα οξειδωτικά ισοδύναμα των καταστάσεων S [77].
- 5) Τα ιόντα Cl^- επιταχύνουν την αφαίρεση πρωτονίων από το H_2O με τη δέσμευσή τους σε μια ομάδα ιστιδινών κοντά στην ενεργή θέση του ενζύμου που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των σταθερών pK_a των αμινοξέων [62].
- 6) Υπάρχουν ενδείξεις για την παρουσία μιας δεξαμενής ιόντων Cl^- , η οποία δε συνδέεται άμεσα με τις οξειδωτικές καταστάσεις S, αλλά μπορεί να διατηρεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυπεπτιδίων [78].

Εναλλακτικά, προτείνεται ότι η

παρουσία της δευτεροταγούς δεξαμενής ιόντων Cl^- ρυθμίζει ένα σύστημα μεταφοράς H^+ [62].

Τα ιόντα Cl^- μπορεί να αντικατασταθούν από ιόντα F^- [79], CH_3COO^- [79] και ορισμένες πρωτοταγείς αμίνες [74, 79,80]. Τα ιόντα Cl^- απομακρύνονται με επώαση δειγμάτων PS II σε $\text{pH}=9.5$ [81, 82, 83, 84] ή σε διαλύματα που δεν περιέχουν χλώριο [85, 86] ή με κατεργασία με 25-100mM SO_4^{2-} [74, 87, 88]. Με την απομάκρυνση των ιόντων Cl^- με διαλύματα ελεύθερα από Cl^- , επιβραδύνεται η μετάπτωση $\text{S}_3 \rightarrow (\text{S}_4) \rightarrow \text{S}_0$, ενώ με την απομάκρυνση των ιόντων χλωρίου σε αλκαλικό pH ή με SO_4^{2-} διακόπτεται η λειτουργία του κύκλου των S-καταστάσεων. Ο αριθμός των ιόντων Cl^- που απαιτείται για την παραγωγή O_2 στο PS II, δεν είναι γνωστός. Σε δείγματα χλωροπλαστών, που δεν περιείχαν ιόντα Cl^- και επώαστηκαν με $^{36}\text{Cl}^-$ κατά τη διάρκεια ακτινοβολήσης, προσδιορίστηκαν 5 $\text{Cl}^-/\text{PS II}$ [82]. Μια θέση δέσμευσης Cl^- προσδιορίστηκε σε δείγματα χλωροπλαστών απουσία ιόντων Cl^- [89], ενώ δύο θέσεις δέσμευσης προσδιορίστηκαν σε δείγματα PSII που περιείχαν άλλα ανιόντα [85, 88]. Η αντικατάσταση του Cl^- από τη μία θέση επιβραδύνει τη μετάβαση $\text{S}_3 \rightarrow (\text{S}_4) \rightarrow \text{S}_0$, ενώ η αντικατάσταση του Cl^- από την άλλη θέση ανενεργοποιεί πλήρως την έκλυση O_2 [88]. Η ανάκτηση της ενεργότητας επιτυγχάνεται με προσθήκη ανιόντων. Η αποτελεσματικότητα των ανιόντων αυτών στην επανενεργοποίηση των PS II δειγμάτων ακολουθεί τη σειρά $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^-$ [89].

Προτείνεται ότι οι δύο θέσεις δέσμευσης Cl^- βρίσκονται στα ίδια κέντρα αντίδρασης PS II σε δεδομένη χρονική στιγμή [85, 88]. Εναλλακτικά, προτείνεται ότι οι δύο θέσεις παρουσιάζονται σε διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις S, με αποτέλεσμα μόνο μία θέση δέσμευσης να είναι παρούσα σε δεδομένη στιγμή [91]. Ένα πρόσφατο μοντέλο προτείνει ότι κατά τον κύκλο των S καταστάσεων, ένα Cl^- ανταλλάσσεται μεταξύ του συμπλόκου του μαγγανίου και ενός ιόντος ασβεστίου [63, 92].

1.6 Πολυπεπτιδική σύσταση του PS II

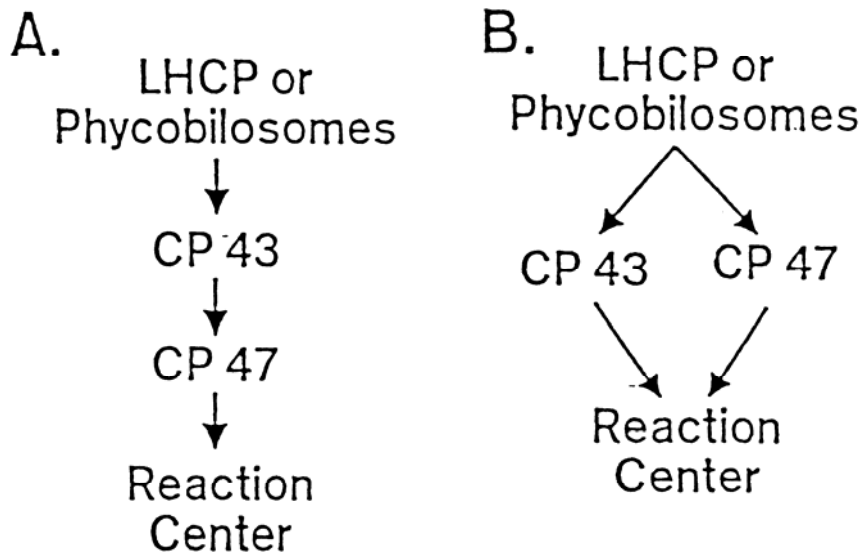
Η απομόνωση μεμβρανών PS II [93, 94, 95] αποτέλεσε ορόσημο στη μελέτη του PS II. Οι ενεργότητες και τα φασματοσκοπικά δεδομένα που υπήρχαν ως τότε, αναφέρονταν σε σχετικά ασταθή παρασκευάσματα θυλακοειδών μεμβρανών. Με την απομόνωση των PS II μεμβρανών, οι μετρήσεις αυτές μπορούσαν να πραγματοποιηθούν σε πολύ σταθερότερα δείγματα, απαλλαγμένα σχεδόν από PS I και cyt b_{6/f}.

Με τη χρήση κατάλληλων απορρυπαντικών [96], έχει επιτευχθεί η απομόνωση καθαρής και ενεργής μορφής του PS II. Το PS II είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο και αποτελείται από δύο διακριτά λειτουργικά ενζυμικά σύμπλοκα: **το σύμπλοκο συλλογής φωτός** (Light Harvesting Complex, LHC) και **τον πυρήνα** (core). Το σύμπλοκο LHC II περιέχει 6 περίπου πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 25-28 kDa και μόρια χλωροφύλλης α, χλωροφύλλης β και καροτενοειδών. Το σύμπλοκο LHC II εντοπίζεται περιφερειακά του PS II, συνδέει τις θυλακοειδείς μεμβράνες και ελέγχει την κατανομή της ενέργειας μεταξύ του PS II και του PS I [97]. Το σύμπλοκο LHC II περιέχει όλη τη Chl b και το 50% της Chl a του PS II. Ο πυρήνας του PS II είναι ένα πολυπεπτιδικό σύμπλοκο, το οποίο περιλαμβάνει το *κέντρο αντίδρασης* όπου πραγματοποιείται ο πρωτοταγής διαχωρισμός φορτίου, το *σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου* όπου συσσωρεύονται τα οξειδωτικά ισοδύναμα που δημιουργούνται κατά τις φωτοχημικές αντιδράσεις, τις *υδρόφοβες ή μεμβρανικές πρωτεΐνες* και τις *υδρόφιλες ή εξωτερικές πρωτεΐνες*.

Η προσπάθεια για τη βιοχημική βελτίωση της απομόνωσης των PS II μεμβρανών είχε σαν αποτέλεσμα την απομόνωση συμπλόκων που δεν περιείχαν τις πρωτεΐνες του LHC II [98,99]. Η απλούστερη παρασκευή πυρήνα PS II που έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα και είναι κατάλληλη για παραγωγή O₂, αποτελείται από τις πρωτεΐνες **47kDa** (CP 47), **43kDa** (CP 43), **D1** (32kDa), **D2** (34kDa), **cyt b₅₅₉** που συνίσταται από δύο υπομονάδες με μοριακά βάρη 9kDa και 4.5kDa (α και β υπομονάδες, αντίστοιχα), την εξωτερική πρωτεΐνη **33kDa** και τρία μικρότερα πολυπεπτίδια [100]. Το PS II, in vivo, περιέχει τουλάχιστον 20 πρωτεΐνες.

Οι **CP 47** (CPa-1) και **CP 43** (Cpa-2) είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες του PS II και κωδικοποιούνται από τα γονίδια psbB και psbC, αντίστοιχα. Λειτουργούν σαν εσωτερικοί μεταφορείς της ενέργειας διέγερσης από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου συλλογής φωτός προς το κέντρο αντίδρασης, ενώ έχει προταθεί ότι μπορεί να συμμετέχουν και σε άλλες

λειτουργίες. Δεν είναι γνωστό αν η μεταφορά ενέργειας είναι γραμμική ή παράλληλη (Σχ. 17), [101,102].



Σχήμα 17: Πιθανοί δρόμοι μεταφοράς ενέργειας από τη φωτοσυλλεκτική κεραία προς το κέντρο αντίδρασης

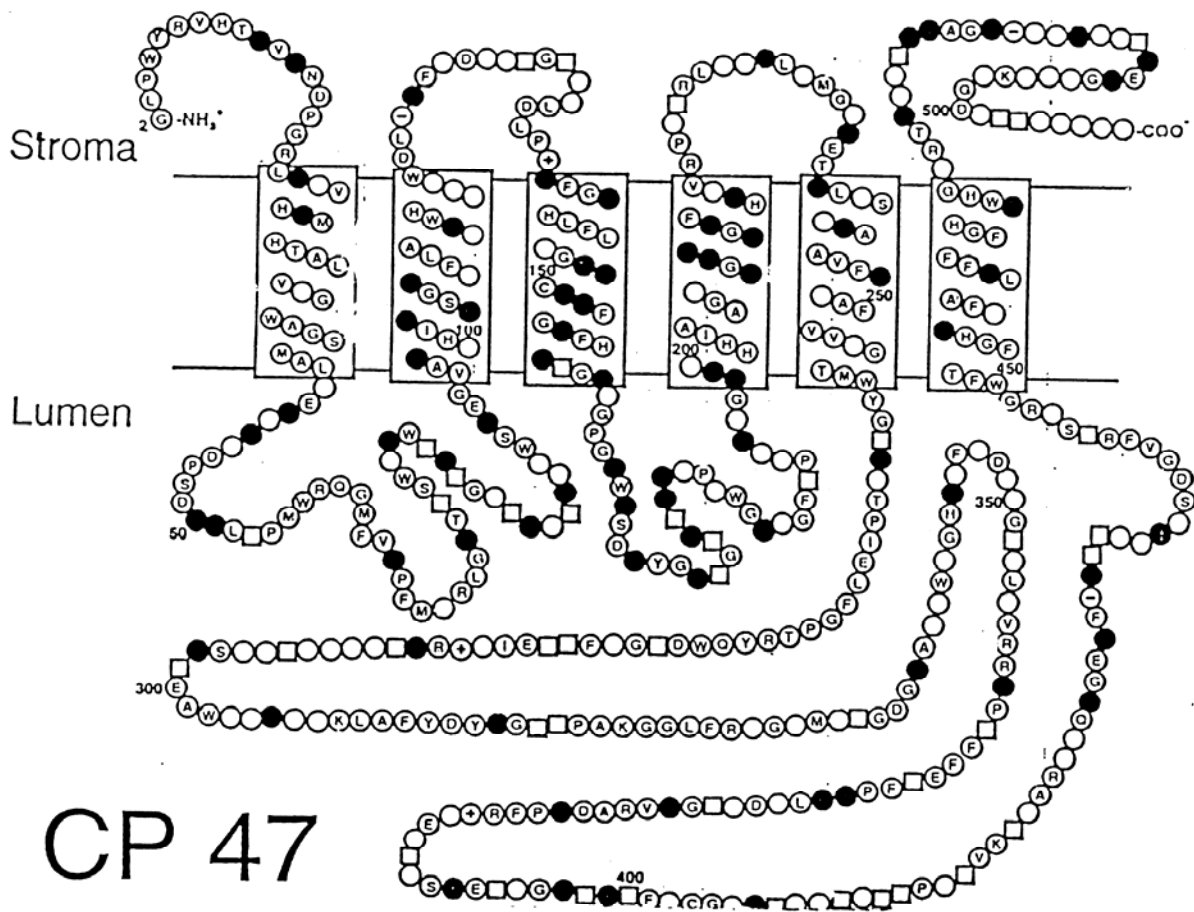
[Bricker, T.,M. and Ghanotakis, D.F., Introduction to Oxygen Evolution and the Oxygen-Evolving Complex, 1994]

Η πρωτεΐνη CP 47, από σπανάκι, περιέχει 508 αμινοξέα. Συγκρίνοντας αλληλουχίες αμινοξέων της CP 47 από 15 διαφορετικούς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, φαίνεται ότι υπάρχει ομολογία σε ποσοστό 80%. Η πρωτεΐνη αυτή έχει 6 διαμεμβρανικές έλικες (Σχ. 18) [103,104] και μια κοιλότητα (loop) 190 αμινοξέων, που εκτίθεται στην περιοχή lumen.

Δομικά η CP 43 μοιάζει με τη CP 47 (Σχ. 19). Η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από 461 αμινοξέα και περιέχει και αυτή 6 διαμεμβρανικές έλικες και μια εξωτερική κοιλότητα 134 αμινοξέων.

Ένα άλλο πολύ ενδιαφέρον χαρακτηριστικό αυτών των πρωτεϊνών είναι η κατανομή καταλοίπων ιστιδίνης στις διαμεμβρανικές έλικες. Η CP 47 περιέχει δώδεκα τέτοια αμινοξέα, ενώ η CP 43 περιέχει οκτώ. Τα κατάλοιπα αυτά βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια μεταξύ στρώμα και lumen και θεωρούνται πιθανοί υποκαταστάτες στις χλωροφύλλες. Πειράματα μεταλλάξεων έδειξαν ότι όταν οι ιστιδίνες αντικαθίστανται από τυροσίνη ή ασπαραγίνη [104,

η ικανότητα μεταφοράς ενέργειας και η σταθερότητα του PS II μειώνονται, αποτελέσματα που ενισχύουν την άποψη ότι οι ιστιδίνες είναι υποκαταστάτες των χλωροφυλλών.



CP 47

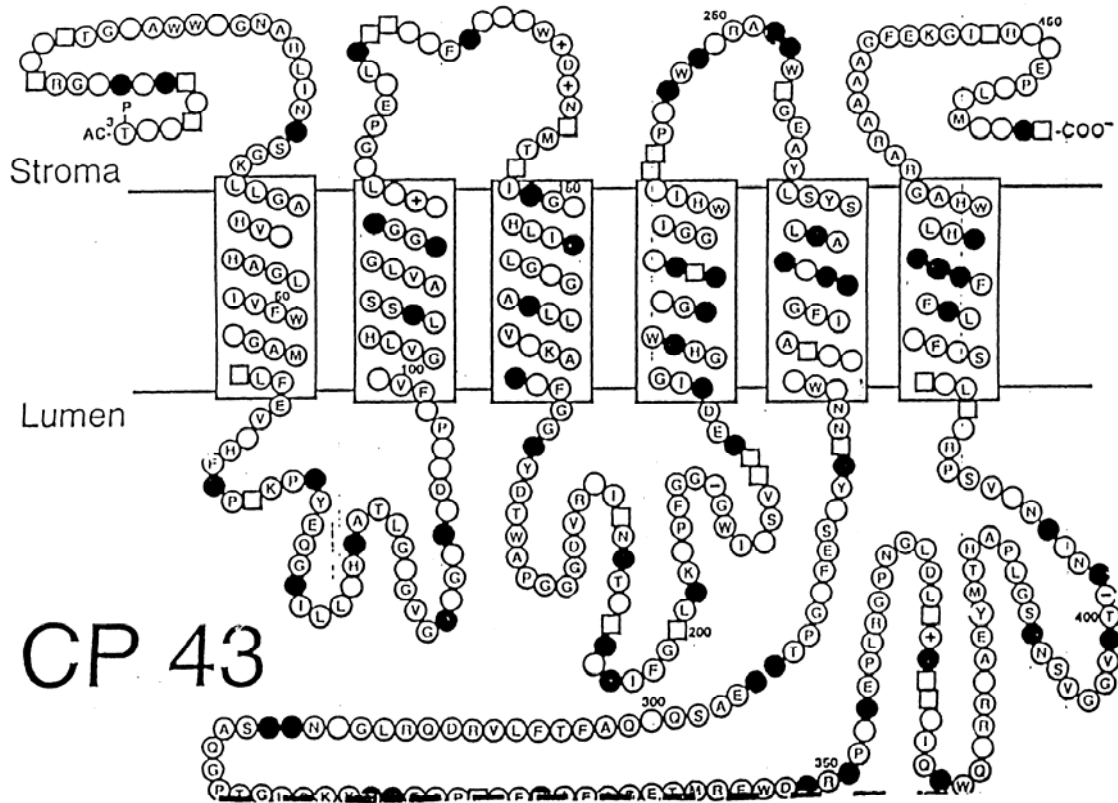
Σχήμα 18: Αλληλουχία της πρωτεΐνης CP 47

[Bricker, T.,M. and Ghanotakis, D.F., *Intoduction to Oxygen Evolution and the Oxygen-Evolving Complex*, 1994]

Πολλές μελέτες έχουν γίνει για τον προσδιορισμό του αριθμού των χρωστικών που περιέχουν οι πρωτεΐνες αυτές. Έτσι, για τη CP 47 έχει προταθεί ότι δεσμεύει 10-12 [106,107] ή 20-25 [108, 109] μόρια Chl a και περίπου 5 μόρια β-καροτενίων. Η CP 43 θεωρείται ότι περιέχει 20-25 μόρια Chl a [108] και περίπου 5 μόρια β-καροτενίων.

Η CP 43 είναι ασθενέστερα δεσμευμένη στον πυρήνα του PS II συγκριτικά με τη CP 47. Με τη χρήση χαιτροπικών μέσων ή απορρυπαντικών απομακρύνεται εύκολα η CP 43 και απομονώνεται το σύμπλοκο CP 47/D1/D2/cyt b₅₅₉/psbI [110,111,112]. Η CP 43 θεωρείται απαραίτητη για τη δέσμευση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας LHC II στο σύμπλοκο CP 47/D1/D2/cyt b₅₅₉/psbI [113] και διευκολύνει τη μεταφορά ενέργειας [113]. Έχει, επίσης,

προταθεί ότι η CP 43 είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της Q_A στο PS II [110, 109, 116]. Η λειτουργία αυτή αμφισβητείται, εφόσον η Q_A είναι λειτουργικά σταθερή σε σύμπλοκα που έχουν υποστεί μετάλλαξη και δεν περιέχουν τη CP 43.



Σχήμα 19: Αλληλουχία της πρωτεΐνης CP 43

[Bricker, T.,M. and Ghanotakis, D.F., *Intoduction to Oxygen Evolution and the Oxygen-Evolving Complex*, 1994]

Τόσο η CP 47 όσο και η CP 43 θεωρούνται απαραίτητες για τη σταθερότητα του PS II [117,118] , όπως και για τη δημιουργία ενεργών κέντρων αντίδρασης.

Τοπολογικές μελέτες, που στηρίζονται σε πειράματα με χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων ή αντιδραστηρίων cross-linking δείχνουν ότι η CP 47 αλληλεπιδρά με την εξωτερική πρωτεΐνη 33 kDa. Θεωρείται ότι η μεγάλη εξωτερική κοιλότητα της CP 47 χρησιμεύει για την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη 33 kDa.

Η υπόθεση για τη συμμετοχή της CP 47 στο μηχανισμό οξείδωσης του H_2O βασίζεται σε πειράματα μεταλλάξεων, όπου η αντικατάσταση του ζεύγους των αμινοξέων $^{384}Gly^{385}Gly$

από το ζεύγος $^{384}\text{Arg}^{385}\text{Arg}$ οδηγεί σε 50% απώλεια της ενεργότητας *in vivo* και μείωση της σταθερότητας του συμπλόκου έκλυσης O_2 *in vitro* [119].

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες **D1** και **D2**, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *psbA* και *psbD* αντίστοιχα, σχηματίζουν το φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης, όπου γίνεται ο πρωτοταγής διαχωρισμός φορτίου. Οι αλληλουχίες αμινοξέων των δύο πρωτεϊνών παρουσιάζουν ομοιότητες με τις ακολουθίες των L και M υπομονάδων του κέντρου αντίδρασης των μωβ μη θειούχων βακτηρίων. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες D1 και D2 σχηματίζουν το κέντρο αντίδρασης του PS II [120]. Η απομόνωση του συμπλόκου D1/D2/*cyt b₅₅₉/psbI* ενίσχυσε την υπόθεση αυτή [121, 122], εφόσον με επιπλέον επεξεργασία για την απομάκρυνση των *cyt b₅₅₉* και *psbI*, προκύπτει το σύμπλοκο D1/D2, όπου μπορεί να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός και σταθεροποίηση φορτίου [123].

Δομικά οι D1 και D2 μοιάζουν και θεωρείται ότι σχηματίζουν ένα διμερές με συμμετρία C_2 . Και οι δύο πρωτεΐνες περιέχουν 5 διαμεμβρανικές έλικες (Σχ. 20). Η D1 περιέχει 343 αμινοξέα, ενώ η D2 περιέχει 352 αμινοξέα.

Προτείνεται ότι το διμερές D1/D2 δεσμεύει μια σειρά παραγόντων, που συμμετέχουν στην ηλεκτρονιακή ροή, όπως τον πρωτοταγή δότη ηλεκτρονίων P_{680} , τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδέκτη Pheo, τις κινόνες Q_A και Q_B , τον μη αιμικό σίδηρο Fe^{2+} και τις ρίζες TyrZ^+ και TyrD^+ . Το ετεροδιμερές D1/D2 δεσμεύει τέσσερις επιπλέον χλωροφύλλες, μια μη φωτοχημική φαιοφυτίνη και ένα έως δύο β -καροτένια [124]. Είναι πιθανό οι πρωτεΐνες αυτές να παρέχουν υποκαταστάτες στους ανόργανους συμπαράγοντες του συμπλόκου έκλυσης O_2 , καθώς, επίσης, να παρέχουν θέσεις δέσμευσης για τις εξωτερικές πρωτεΐνες του PS II. Η σύγκριση της αλληλουχίας των αμινοξέων των πρωτεϊνών D1 και D2 του PS II με την αντίστοιχη των υπομονάδων L και M των μωβ βακτηρίων, η κρυστάλλωση του κέντρου αντίδρασης των μωβ βακτηρίων και η επιλεκτική μετάλλαξη αμινοξέων του ετεροδιμερούς D1/D2 βοήθησαν στην ταυτοποίηση των πιθανών θέσεων δέσμευσης των παραγόντων που συμμετέχουν στη ροή e^- [97]. Η χλωροφύλλη P_{680} πιθανόν δεσμεύεται στην ^{198}H των D1 και D2. Η Q_A θεωρείται ότι δεσμεύεται σε μια τσέπη της D2, που σχηματίζεται από τις ^{215}H , ^{261}A και ^{254}W . Ο μη αιμικός σίδηρος, μάλλον, δεσμεύεται στις ^{215}H και ^{272}H της D1 και ^{215}H και ^{269}H της D2. Η Q_B δεσμεύεται, πιθανόν, σε μια τσέπη της D1, που σχηματίζεται από τις ^{215}H , ^{262}Y , ^{263}A , ^{264}S , ^{255}F και ^{265}F . Πιθανές θέσεις δέσμευσης των τεσσάρων επιπλέον

χλωροφυλλών είναι οι ^{118}H και ^{190}H των D1 και D2. Η TyrZ⁺ είναι η ^{161}Y της D1 και η TyrD⁺ είναι η ^{160}Y της D2 [120,127,128,129].

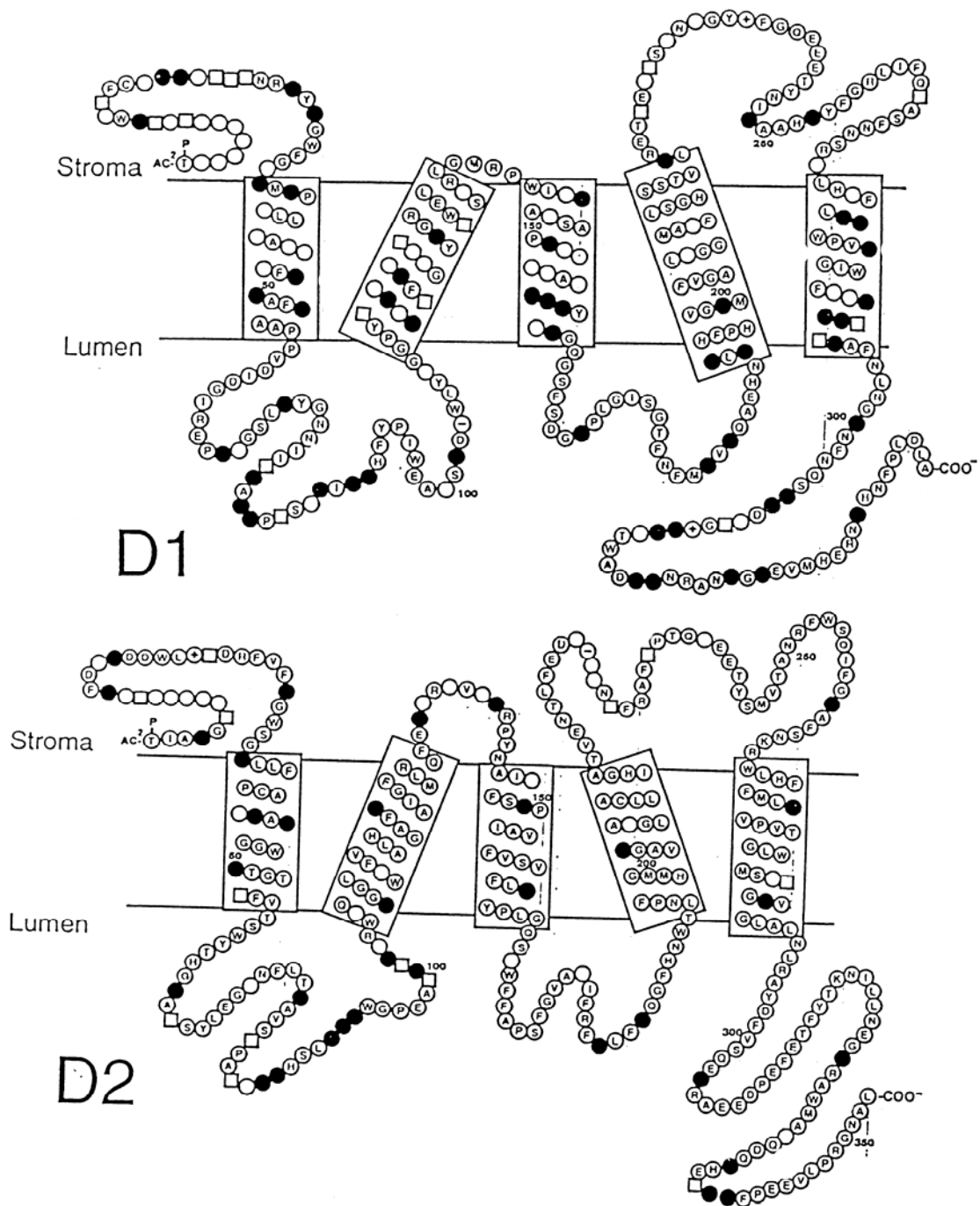
Δυστυχώς, είναι δύσκολο να προσδιοριστούν αμινοξέα των D1 και D2, που δεσμεύουν τους συμπαράγοντες και τις πρωτεΐνες του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου, εφόσον δεν υπάρχουν ανάλογα αμινοξέα στα βακτήρια. Οι ιστιδίνες και τα καρβοξυλικά θεωρούνται υποψήφιοι υποκαταστάτες του συμπλόκου του Mn. Πιθανά αμινοξέα είναι τα ^{59}D , ^{61}D , ^{65}E , ^{170}D , ^{332}H , ^{337}H , ^{342}D και το καρβοξυτελικό άκρο ^{344}A της D1 και το ^{70}E της D2.

Το **κυτόχρωμα b₅₅₉** είναι ένα από τα πιο αινιγματικά συστατικά του PS II. Έχει προταθεί ότι συμμετέχει στη συνοχή του PS II, στην έκλυση O₂, στην προστασία από φωτοαναστολή και στην κυκλική μεταφορά e⁻.

Δύο οξειδοαναγωγικές μορφές του cyt b₅₅₉ μπορεί να παρατηρηθούν: η υψηλού δυναμικού μορφή με E_m=370V [130] και η χαμηλού δυναμικού μορφή με E_m=60-80mV [131]. Η μορφή χαμηλού δυναμικού παρατηρείται όταν διακόπτεται η φυσιολογική λειτουργία του PS II.

Το cyt b₅₅₉ είναι κυτόχρωμα b-τύπου και αποτελείται από 2 υπομονάδες: την 9 kDa, α-υπομονάδα και την 4.5 kDa, β-υπομονάδα (Σχ. 21). Οι υπομονάδες α και β κωδικοποιούνται από τα γονίδια psbE και psbF, αντίστοιχα. Κάθε υπομονάδα περιέχει μια διαμεμβρανική έλικα και μία ιστιδίνη. Οι ιστιδίνες των δύο υπομονάδων συναρμόζονται με την αίμη του κυτοχρώματος. Εναλλακτικά, προτείνεται ότι το cyt b₅₅₉ περιέχει ένα ζεύγος ομοδιμερών (α₂) και (β₂), που το καθένα συνδέεται με μία αίμη [132].

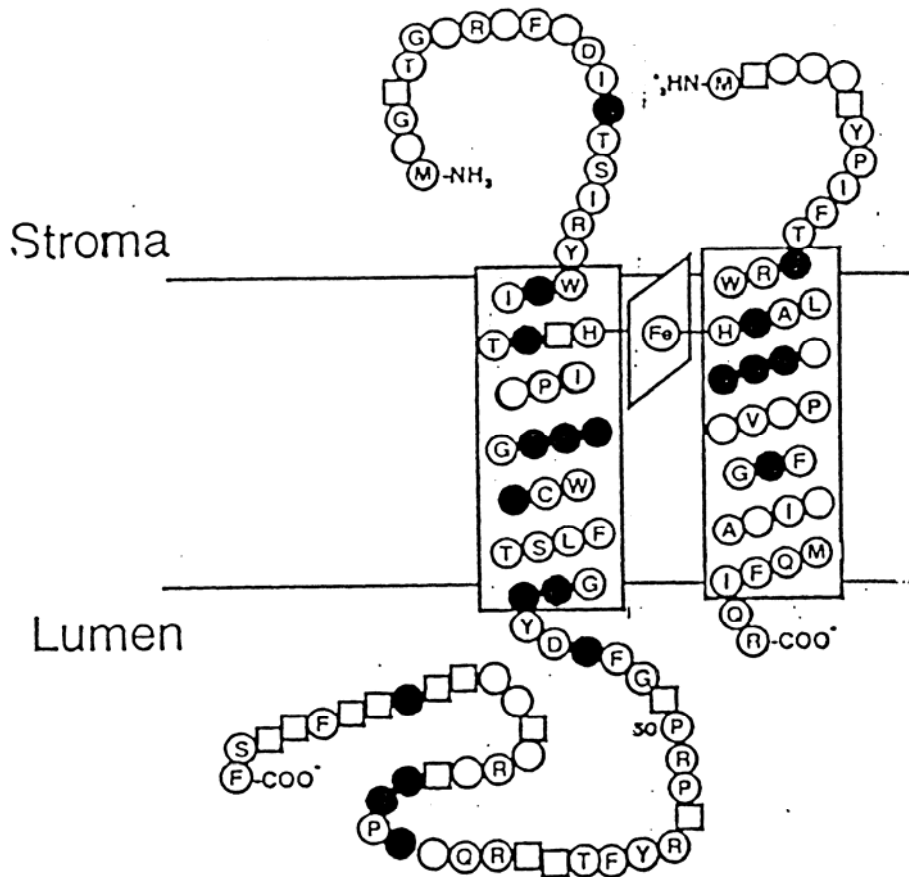
Λίγα είναι γνωστά σχετικά με το λειτουργικό ρόλο της **psbI**. Η psbI έχει μια διαμεμβρανική έλικα και περιέχει 31 αμινοξέα (Σχ. 22). Το αμινοτελικό άκρο εκτίθεται στο στρώμα [133]. Η βιοχημική απομάκρυνση της πρωτεΐνης δεν επηρεάζει τη σταθερότητα των χρωστικών ή άλλων παραγόντων του κέντρου αντίδρασης [123].



Σχήμα 20: Αλληλουχίες των πρωτεϊνών D1 και D2

[Bricker, T.,M. and Ghanotakis, D.F., *Intoduction to Oxygen Evolution and the Oxygen-Evolving Complex*, 1994]

Η 33 kDa πρωτεΐνη, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *psbO*, υπάρχει σε όλους τους οξυγονικούς οργανισμούς, ενώ η 23 kDa και η 17 kDa πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *psbP* και *psbQ*, αντίστοιχα, δεν υπάρχουν στα κυανοβακτήρια [134].



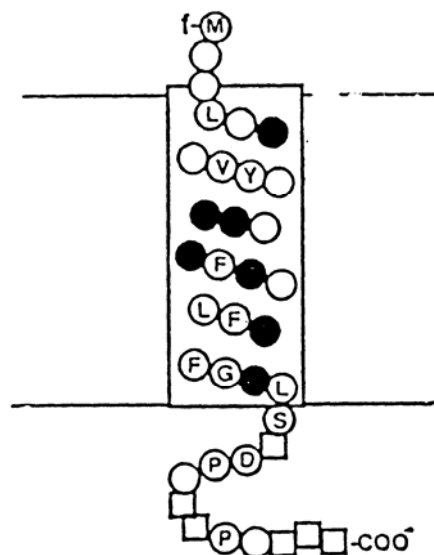
Cytochrome b₅₅₉

Σχήμα 21: Αλληλουχία της πρωτεΐνης cyt b₅₅₉

[Bricker, T.,M. and Ghanotakis, D.F., Introduction to Oxygen Evolution and the Oxygen-Evolving Complex, 1994]

Η 33 kDa φαίνεται να παίζει το σημαντικότερο ρόλο στην οξείδωση του H₂O. Απομάκρυνση της πρωτεΐνης από το PS II οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του συμπλόκου του Mn, σε χαμηλές συγκεντρώσεις (<100mM) χλωρίου [135, 136, 137]. Δύο από τα 4 Mn γίνονται παραμαγνητικά ασύζευκτα και χάνονται [138]. Σε υψηλές συγκεντρώσεις (>100mM), το σύμπλοκο του Mn είναι σταθερό και η έκλυση O₂ γίνεται σε χαμηλούς ρυθμούς [139]. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, οι καταστάσεις S₂ και S₃ εμφανίζουν μεγαλύτερους χρόνους ζωής και η S₃→(S₄)→S₀ μετάβαση καθυστερεί [140, 141].

Απομάκρυνση της πρωτεΐνης από τον πυρήνα του PS II μπορεί να επιτευχθεί με κατεργασία των δειγμάτων PS II με 0.8M Tris σε pH=8.2 [142] ή με 1M CaCl₂ ή MgCl₂ [38, 70, 143, 144] ή με 0.7M NaSCN [145] ή με υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας [146]. Απουσία της πρωτεΐνης 33 kDa, απαιτείται η προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης ιόντων Ca²⁺ στα δείγματα PS II, για να διατηρηθεί ικανοποιητική παραγωγή οξυγόνου [40, 41, 42, 104]. Αυτό θεωρήθηκε ως ένδειξη του ρόλου της πρωτεΐνης στη συγκέντρωση και/ή τη δέσμευση του ασβεστίου στο PS II. Έχει προταθεί ότι η 33 kDa ενώνεται με τη μεγάλη εξωτερική κοιλότητα της πρωτεΐνης CP 47 [148], με το ετεροδιμερές D1/D2 [149, 126], την πρωτεΐνη CP 43 [151], το cyt b₅₅₉ [152, 153] και την psbI πρωτεΐνη [153]. Τα 16-18 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης θεωρούνται απαραίτητα για τη δέσμευσή της στο PS II και την επαναφορά της ενεργότητας.



Σχήμα 22: Αλληλουχία της πρωτεΐνης psb I

[Bricker, T.,M. and Ghanotakis, D.F., Introduction to Oxygen Evolution and the Oxygen-Evolving Complex, 1994]

Η 33 kDa περιέχει ένα δισουλφιδικό δεσμό, ο οποίος θεωρείται απαραίτητος για τη διατήρηση της διαμόρφωσης, ενώ οι απόψεις διχάζονται σχετικά με το ρόλο του δισουλφιδικού δεσμού στην ικανότητα επανασύνδεσης της πρωτεΐνης στο PS II.

Φασματοσκοπικές μελέτες έχουν δείξει ότι η διαμόρφωση της πρωτεΐνης είναι διαφορετική όταν είναι δεσμευμένη με το PS II και όταν είναι ελεύθερη σε διάλυμα, όπου χάνει την καλά καθορισμένη δομή της.

Οι πρωτεΐνες **23** και **17 kDa** ενισχύουν την ικανότητα έκλυσης O₂. Απουσία των πρωτεϊνών αυτών η ταχύτητα παραγωγής οξυγόνου απαγορεύεται σε ποσοστό 80% και απαιτείται η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων εξωγενούς CaCl₂ για να αποκατασταθεί η ενεργότητα. Η πιο συνηθισμένη επεξεργασία για την απομάκρυνση των 2 αυτών πρωτεϊνών είναι με 2M NaCl [154].

Η παρουσία της 23 kDa μειώνει την απαίτηση σε ασβέστιο [43, 155], ενώ η παρουσία της 17 kDa μειώνει την απαίτηση σε χλώριο [156]. Δεν έχει διευκρινιστεί αν οι πρωτεΐνες 23 και 17 kDa δεσμεύουν τα ιόντα Ca²⁺ και Cl⁻, ή αν η δέσμευσή τους προκαλεί δομικές αλλαγές στις μεμβρανικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να ευνοούνται υψηλές ταχύτητες παραγωγής O₂ παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων Ca²⁺ και Cl⁻.

Η παρουσία της 23 kDa προστατεύει το σύμπλοκο του Mn από την επίδραση εξωγενών αναγωγικών, όπως η υδροκινόνη [155].

Με την απουσία της 23 kDa, μειώνεται η ικανότητα σύνδεσης του ζιζανιοκτόνου ατραζίνη στη θέση δέσμευσης της κινόνης Q_B [157] και το cyt b₅₅₉ μετατρέπεται από την υψηλού δυναμικού μορφή στην αντίστοιχη χαμηλού δυναμικού [158].

Η δέσμευση της 23 kDa στο PS II απαιτεί την παρουσία της 33 kDa και η δέσμευση της 17 kDa απαιτεί την παρουσία της 23 kDa [159, 160]. Δεν είναι γνωστό αν η 23 kDa δεσμεύεται στην 33 kDa ή αν η παρουσία της 33 kDa οδηγεί σε αλλαγές διαμόρφωσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών, που επιτρέπουν τη δέσμευση της 23 kDa στο PS II. Το ίδιο ισχύει και για την 17 kDa στο PS II. Η δέσμευση των πρωτεϊνών 17 και 23 kDa στο PS II σταθεροποιείται παρουσία του συμπλόκου του μαγγανίου [161, 162].

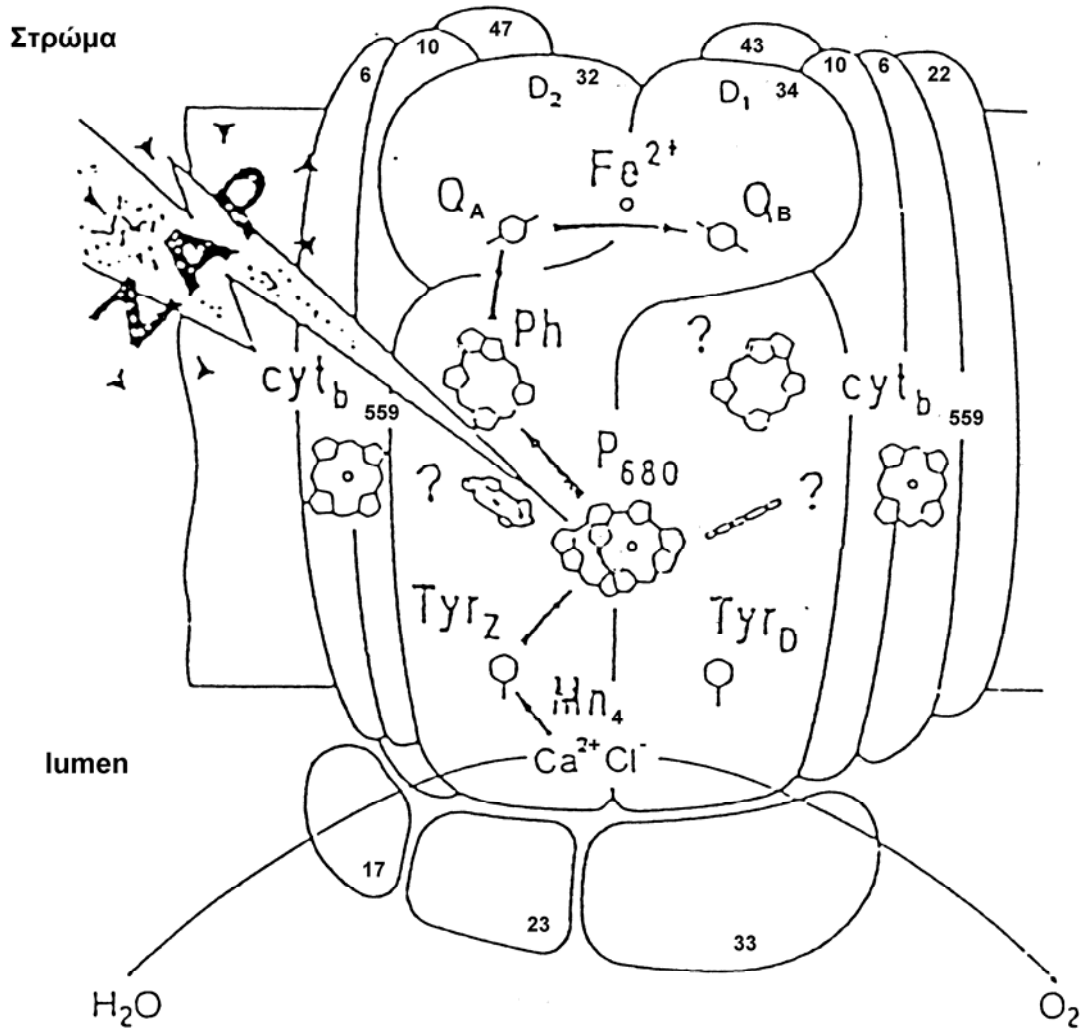
Θεωρείται ότι η στοιχειομετρία των τριών εξωτερικών πρωτεϊνών (17, 23 και 33 kDa) είναι 1:1:1, αλλά δεν έχει διευκρινιστεί αν υπάρχουν ένα ή δύο αντίγραφα από την καθεμιά.

Το PS II περιέχει, επίσης, μια σειρά μικρών πολυπεπτιδίων (**3-7 kDa**), των οποίων οι λειτουργίες δεν είναι γνωστές [163]. Θεωρείται ότι μερικές από αυτές είναι απαραίτητες για την αποτελεσματικότερη λειτουργία του πυρήνα του PS II και ότι άλλες είναι υπολείμματα της εξέλιξης των φωτοσυνθετικών οργανισμών χωρίς ιδιαίτερη λειτουργική σημασία.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η στοιχειομετρία των πρωτεϊνών D1:D2:CP 47:CP 43 στο PS II είναι 1:1:1:1 [164, 165]. Επίσης, η στοιχειομετρία των α και β υπομονάδων του cyt b₅₅₉

και της psbI πρωτεΐνης είναι 1:1:1, αλλά δεν είναι γνωστό αν υπάρχουν ένα ή δύο μόρια της κάθε πρωτεΐνης ανά κέντρο αντίδρασης.

Το Σχ. 23 παρουσιάζει ένα μοντέλο της δομής του φωτοσυστήματος II, σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα πειραματικά αποτελέσματα.



Σχήμα 23: Μοντέλο που παρουσιάζει τις κυριότερες πρωτεΐνες και τους συμπαραγόντες που συμμετέχουν στη φωτοχημεία του Φωτοσυστήματος II [Rutherford, A.W. et al. *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology* (Barber, J. ed.), 179-229, 1992

1.7 Φασματοσκοπία EPR

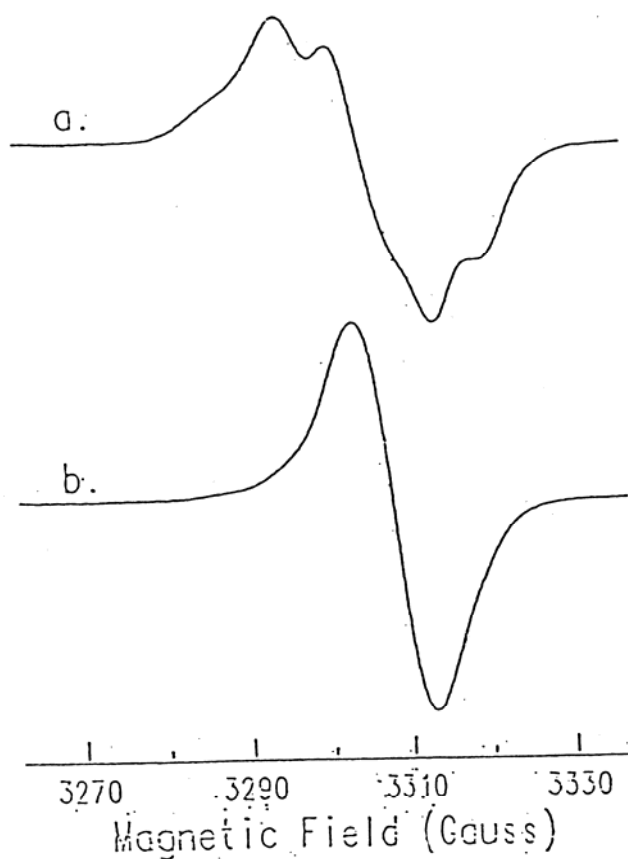
Η φασματοσκοπία EPR είναι πολύ χρήσιμη τεχνική για τη μελέτη της μεταφοράς e^- στο PS II. Τα σήματα EPR δίνουν πληροφορίες για τη δομή και τη φύση των μεταφορέων e^- . Η εξάρτηση του πλάτους και της καμπύλης του σήματος από τη θερμοκρασία και την ισχύ της μικροκυματικής ακτινοβολίας μπορεί να δώσει πληροφορίες για την απόσταση μεταξύ των εξεταζόμενων παραμαγνητικών κέντρων και τη φύση της αντίστοιχης κατάστασης.

Οι φωτοσυνθετικοί μεταφορείς φορτίου δίνουν σήμα EPR είτε πριν από την ακτινοβόληση είτε μετά από ένα διαχωρισμό φορτίου. Έτσι, σήματα από φωτοχημικά ενεργά κέντρα διαχωρίζονται από άλλα συστατικά με αφαίρεση του φάσματος πριν την ακτινοβόληση από το φάσμα μετά την ακτινοβόληση.

Οι αντιδράσεις μεταφοράς e^- από τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη P_{680} στην PQ παράγουν ένα ισχυρό οξειδωτικό, την οξειδωμένη Chl P_{680}^+ ($E_m = 1.1V$). Η οξειδωμένη αυτή Chl ανάγεται από την TyrZ [166, 128]. Η οξείδωση της TyrZ παράγει μια ισχυρή οξειδωτική ρίζα, την TyrZ $^+$. Η αντίδραση $TyrZ + P_{680}^+ \rightarrow TyrZ^+ + P_{680}$ χαρακτηρίζεται από ετερογενείς κινητικές της τάξης των 20-25nsec [6], οι οποίες εξαρτώνται από την οξειδωτική κατάσταση του συμπλόκου οξείδωσης του H_2O [6, 7]. Το φάσμα EPR της ρίζας TyrZ $^+$ με $g=2.0045$ έχει την ίδια μορφή σε ανέπαφα δείγματα PS II και σε δείγματα PS II κατεργασμένα με Tris και ονομάζεται σήμα II_{vf} και II_f , αντίστοιχα [168].

Εκτός από την TyrZ, υπάρχει και η TyrD. Το φάσμα της οξειδωμένης TyrD, TyrD $^+$, παρουσιάζει την ίδια μορφή με το αντίστοιχο της TyrZ $^+$, ονομάζεται II_s [169] και φαίνεται στο Σχ. 24. Η ρίζα TyrD $^+$ είναι σταθερή στο σκοτάδι για ώρες, αλλά δε συμμετέχει στις αντιδράσεις ηλεκτρονιακής μεταφοράς, που οδηγούν στην οξείδωση του H_2O [129, 171]. Έχει αποδειχθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η TyrD οξειδώνεται από το P_{680}^+ και το σύμπλοκο οξείδωσης του H_2O [172, 173]. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, η TyrD $^+$ ανάγεται από την ημικινόνη Q_A^- [174] και πιθανόν από το $cyt\ b_{559}$ [175]. Οι ρίζες TyrZ $^+$ και TyrD $^+$ θεωρούνται ουδέτερες ρίζες που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με γειτονικά βασικά αμινοξέα [176, 177]. Όπως φαίνεται στο Σχ. 25 υπάρχουν 4 εναλλακτικοί τρόποι αναγωγής του οξειδωμένου πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη P_{680}^+ : i) Το σύμπλοκο Mn ανάγει το P_{680} μέσω της TyrZ. ii) Από το σύμπλοκο $cyt\ b_{559}$ που μεταφέρει e^- μέσω μιας χλωροφύλλης στο P_{680} . Το οξειδωμένο $cyt\ b_{559}$ επανανάγεται από την πλαστοκινόνη (PQ) μέσω μιας κυκλικής

μεταφοράς e^- , που προστατεύει το PS II από το ισχυρό οξειδωτικό P_{680}^+ , όταν απαγορεύεται η μεταφορά e^- από το σύμπλοκο του Mn. Όταν το cyt b_{559} είναι οξειδωμένο πριν την ακτινοβολία και το Mn δε μπορεί να δώσει e^- , η Chl^+ μπορεί να παγιδευτεί και να δώσει EPR σήμα (Σχ. 24). iii) Από την TyrD, όταν απαγορεύεται η αναγωγή από το σύμπλοκο του Mn. iv) Από τον ανασυνδυασμό φορτίου του P_{680}^+ με την Q_A . Οι ταχύτητες που καθορίζουν τις παραπάνω αντιδράσεις οξειδοαναγωγής εξαρτώνται από τη θερμοκρασία ακτινοβολίας.

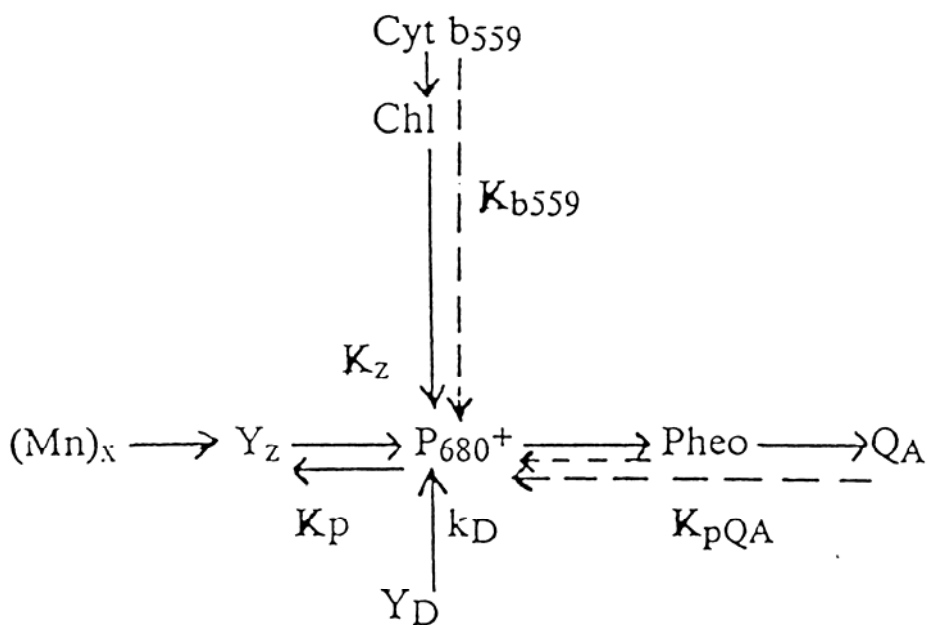


Σχήμα 24: EPR-σήματα

a. της ρίζας D^+ (σήμα I_{slow})

b. της Chl^+

[Miller, A.F. (1989), «Assembly of the catalytic Mn-complex of PS II», Thesis, Yale-University]

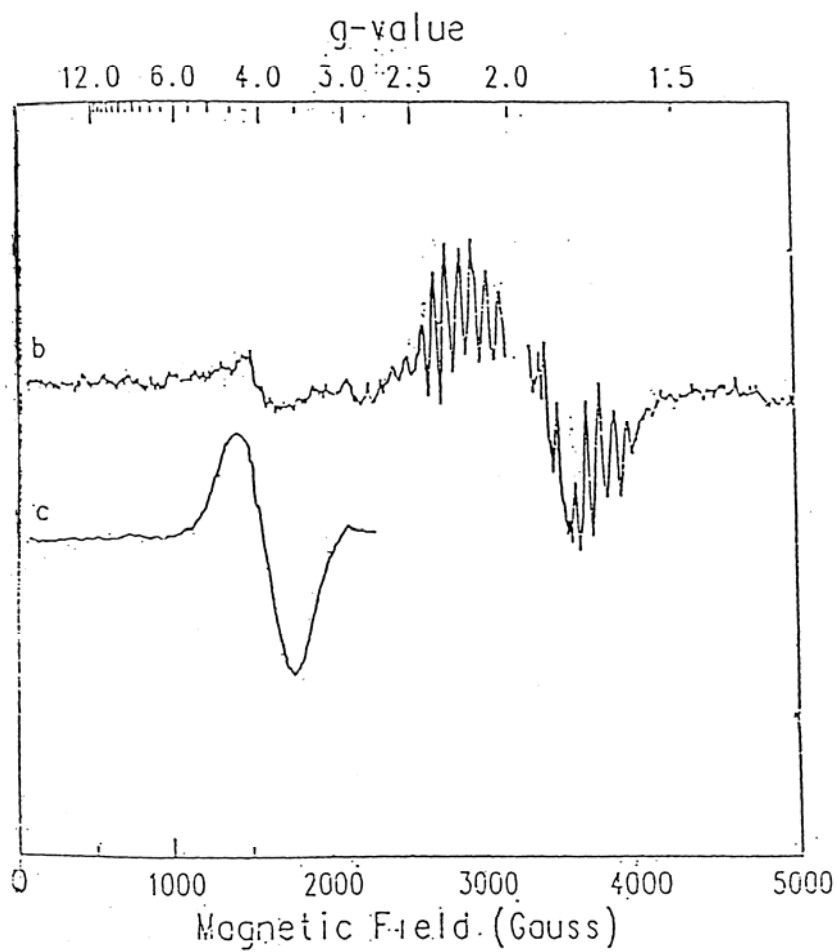


Σχήμα 25: Ηλεκτρονιοδότες που επανανάγουν το P⁺₆₈₀

Δύο διαφορετικά EPR σήματα παράγονται από την S₂ κατάσταση του συμπλόκου του Mn: το S₂-multiline και το g=4.1 (Σχ. 26). Το multiline παράγεται με συνεχή ακτινοβολία στους 160-200K [178] ή με ακτινοβολία και ταυτόχρονη ψύξη στους 77K παρουσία DCMU [179]. Το σήμα αυτό με g=1.982 ± 0.002 [180] έχει πλάτος 1500-1800Gs. Στην περιοχή συχνοτήτων 9.1-9.4GHz (X-band), το σήμα παρουσιάζει 18-20 υπέρλεπτες γραμμές, που απέχουν μεταξύ τους 85-90Gs. Το πλάτος του σήματος αυτού πάλλεται με περιοδικότητα τέσσερα μετά από ακτινοβολία με μια σειρά παλμών που δίνονται πριν την ψύξη του δείγματος [181]. Επειδή το πλάτος του σήματος μετά τον πρώτο και πέμπτο παλμό είναι μέγιστο, αποδόθηκε στην κατάσταση S₂ [181, 182]. Το δεύτερο EPR σήμα, το g=4.1, έχει πλάτος 320-360Gs και δεν παρουσιάζει υπέρλεπτη υφή. Μετά το σχηματισμό του σήματος αυτού στους 140K, θέρμανση των δειγμάτων στους 200K έχει ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση του σήματος g=4.1 και το σχηματισμό του σήματος multiline [183]. Αυτή η παρατήρηση θεωρήθηκε ως ένδειξη ότι το σήμα g=4.1 είναι πρόδρομος του σήματος multiline [183]. Επειδή το πλάτος του σήματος g=4.1 παρουσιάζει την ίδια παλμική περιοδικότητα με το πλάτος του σήματος multiline, αποδόθηκε και αυτό στην S₂ κατάσταση [184]. Οι δύο μορφές της S₂ κατάστασης, που παράγουν τα σήματα g=4.1 και multiline, προτάθηκε ότι βρίσκονται σε ισορροπία, η οποία επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες [185]. Το πλάτος των δύο σημάτων επηρεάζεται από το είδος της κατεργασίας και το κρυοπροστατευτικό που

χρησιμοποιείται για τη διατήρησή τους. Δύο μοντέλα έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη σχέση μεταξύ των δύο σημάτων της S₂-κατάστασης. Το ένα μοντέλο προτείνει δύο μονοπυρηνικά κέντρα Mn_A, Mn_B και ένα διπυρηνικό κέντρο (Mn)₂. Το διπυρηνικό κέντρο (Mn)₂ (III, IV) , δίνει το S₂-multiline, ενώ το ένα από τα δύο μονοπυρηνικά ιόντα Mn, Mn_A(III) δίνει το σήμα g=4.1. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το διπυρηνικό κέντρο (Mn)₂ και το ένα από τα δύο μονοπυρηνικά κέντρα βρίσκονται σε οξειδοαναγωγική ισορροπία στην S₂-κατάσταση: Mn₂(III, IV), Mn_A(IV) \longrightarrow [Mn₂(IV,III) , Mn_A(III)]. Το δεύτερο μοντέλο προτείνει ότι και τα δύο σήματα προκύπτουν από ένα τετραπυρηνικό σύμπλοκο μαγγανίου [22]. Η αλληλομετατροπή των δύο σημάτων, στους 200K στο σκοτάδι, εξηγείται με μια θερμοκρασιακή εξάρτηση της αλλαγής της δομής του συμπλόκου κατά το σχηματισμό της S₂-κατάστασης, που αλλάζει τις σταθερές σύζευξης των ιόντων του Mn.

Μερικές χημικές επεξεργασίες έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας εναλλακτικής κατάστασης του ηλεκτρονιοδέκτη FeQ_A, την Fe³⁺Q_A, η οποία δίνει σήμα EPR σε υψηλή μικροκυματική ισχύ και χαμηλή θερμοκρασία (20-50mW, 4- 5 K). Δημιουργείται με την παρουσία στο δείγμα ενός ηλεκτρονιοδέκτη 2 e⁻ , όπως το PPBQ στους 273 K, μετά από ακτινοβολία σε θερμοκρασία μικρότερη ή ίση των 200 K [226,227]. Η ακτινοβολία παράγει το Fe²⁺Q_A⁻, το οποίο οξειδώνεται σε Fe³⁺Q_A με την παρουσία PPBQ (Σχ. 27α). Χημική οξείδωση μπορεί να γίνει και με τον ηλεκτρονιοδέκτη Fe(CN)₆³⁻ [228]. Το Fe³⁺Q_A μπορεί να αναχθεί φωτοχημικά, δίνοντας Fe²⁺Q_A και στη συνέχεια Fe²⁺Q_A⁻. Υψηλά pH [228] και απομάκρυνση της πρωτεΐνης 28 kDa [229], διευκολύνουν τη δημιουργία του Fe³⁺Q_A (Σχ. 27β). Το σήμα που προκύπτει εμφανίζεται σε g=8 και g=5.5 [228,230]. Μετατοπίσεις των κορυφών παρατηρούνται με την παρουσία αναστολέων, που προσδένονται στο PS II και συγκεκριμένα στην Q_B [231]. Το EPR σήμα του Fe³⁺Q_A και η θερμοκρασιακή εξάρτηση αναφέρονται σε υψηλού spin Fe³⁺. Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία συναρμογή του Fe³⁺ με τυροσίνη ή ιστιδίνη [232], ενώ το NO συναρμόζεται με το Fe²⁺, δίνοντας άλλο EPR σήμα [233].

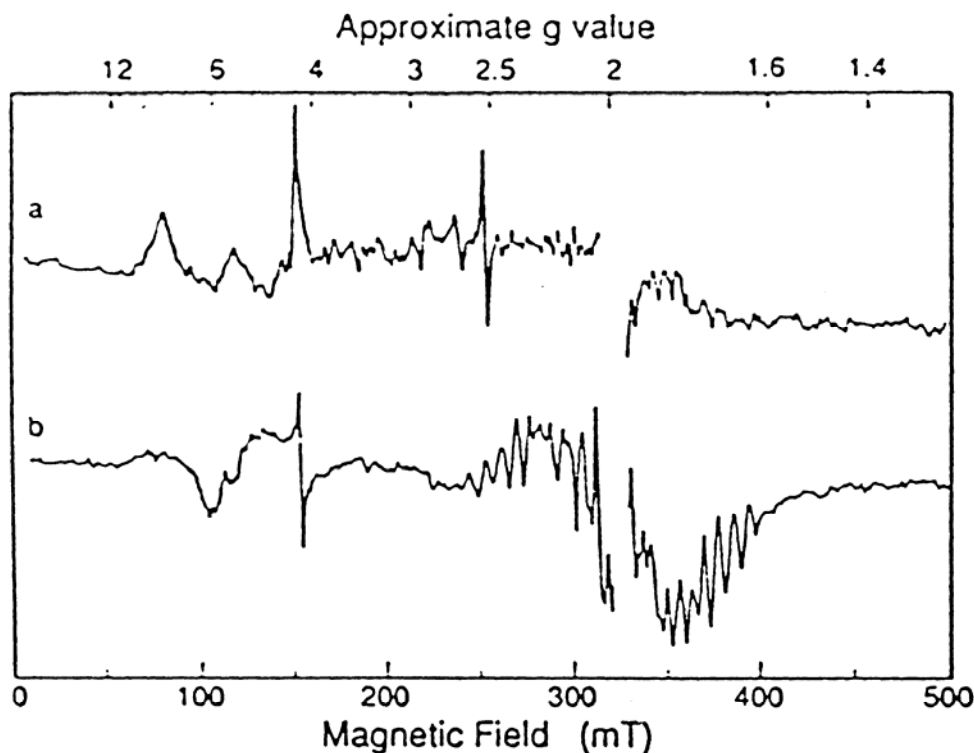


Σχήμα 26: EPR-σήματα της S_2 -κατάστασης

b. S_2 , multiline σήμα

c. S_2 , $g=4.1$

[Miller, A.F. (1989), «Assembly of the catalytic Mn-complex of PS II», Thesis, Yale-University]



Σχήμα 27: EPR-σήμα του $Fe^{3+} Q_A$

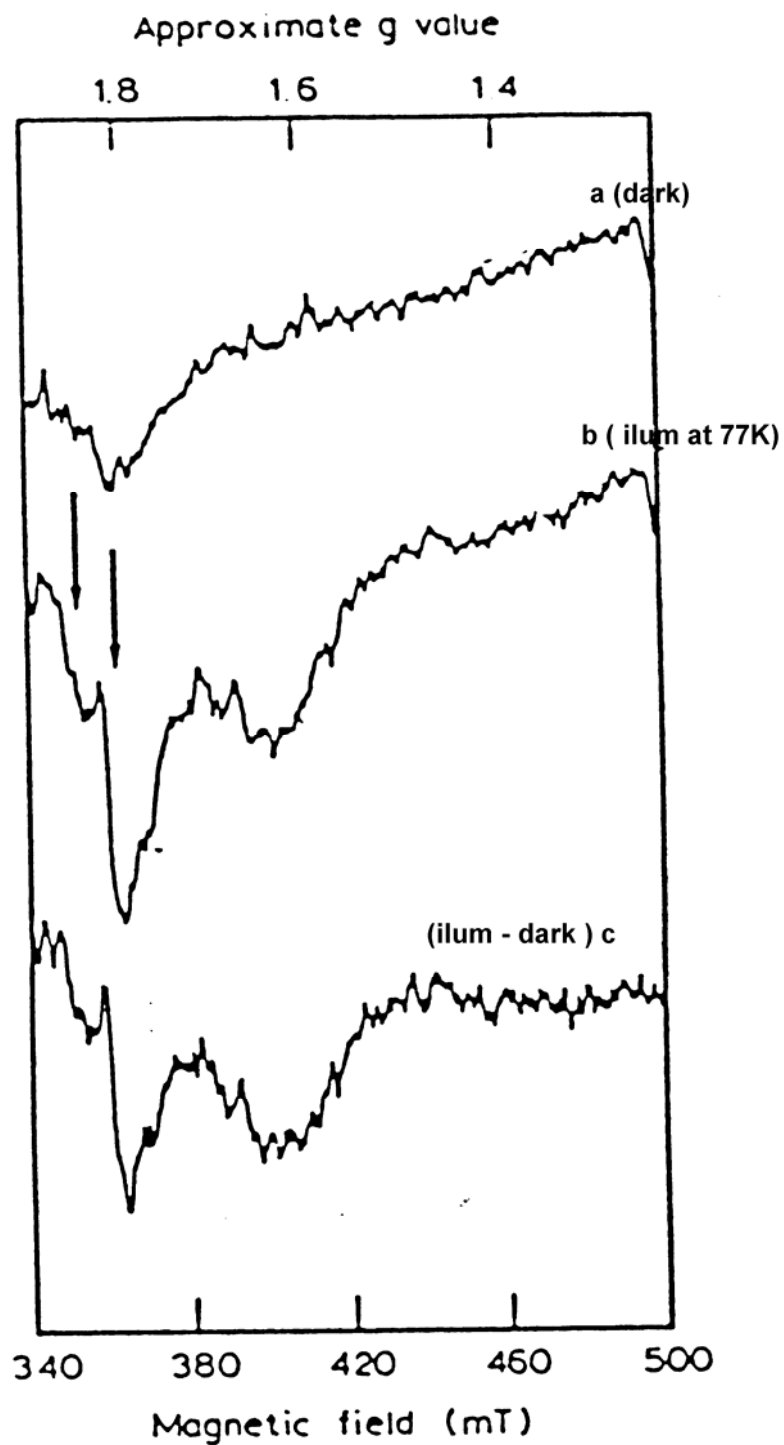
a. Δημιουργείται με φωτισμό στους 77K, με γρήγορη θέρμανση και ψύξη, παρουσία PPBQ

b. Το φάσμα αντεστραμμένο, παρουσία 30% αιθυλενο- γλυκόλης και 0.1mM DCMU

[Miller, A.F. (1989), «Assembly of the catalytic Mn-complex of PS II», Thesis, Yale-University]

Η κινόνη Q_A όταν φωτοανάγεται, αλληλεπιδρά με το γειτονικό Fe^{2+} , παράγοντας ένα EPR σήμα, πλάτους 40 mT, σε $g=1.90$ και $g=1.64$ ή ένα στενότερο σήμα σε $g=1.82$ και $g=1.67$ (Σχ. 28). Τα σήματα αυτά παρατηρούνται σε θερμοκρασία 4 K και υψηλή μικροκυματική ισχύ 20 mW.

Επίσης, EPR σήμα δίνει το cyt b_{559} . Το σήμα παρατηρείται στους 10 K και χαμηλή μικροκυματική ισχύ 0.2 mW, σε $g_z=3$ και $g_y=2.2$ (Σχ. 29). Η εξάρτηση από τον προσανατολισμό, του EPR φάσματος του cyt b_{559} δείχνει ότι η αίμη του κυτοχρώματος είναι κάθετη στη θυλακοειδή μεμβράνη.



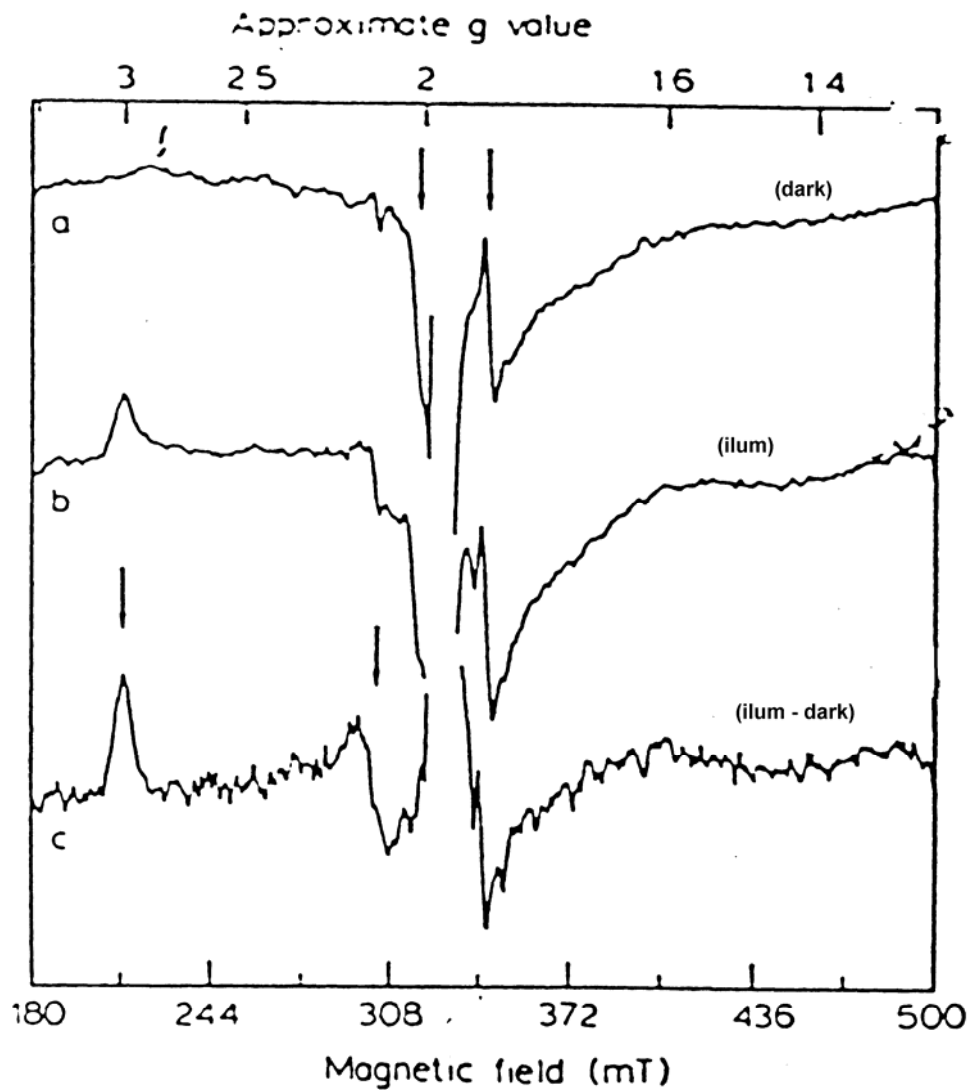
Σχήμα 28: EPR-σήμα της $Fe^{2+}Q_A^-$

a. Το φάσμα στο σκοτάδι

b. Το φάσμα με φωτισμό το δείγματος στους 77K

c. Διαφορά φάσματος b - φάσμα a

[Miller, A.F. (1989), «Assembly of the catalytic Mn-complex of PS II», Thesis, Yale-University]



Σχήμα 29: EPR-σήμα του *cyt b₅₅₉*

a. Το φάσμα στο σκοτάδι

β. Το φάσμα με φωτισμό του δείγματος στους 77K

c. Διαφορά του φάσματος b - φάσμα a

[Miller, A.F. (1989), «Assembly of the catalytic Mn-complex of PS II», Thesis, Yale-University]

1.8 Έκλυση πρωτονίων κατά τον κύκλο των S-καταστάσεων.

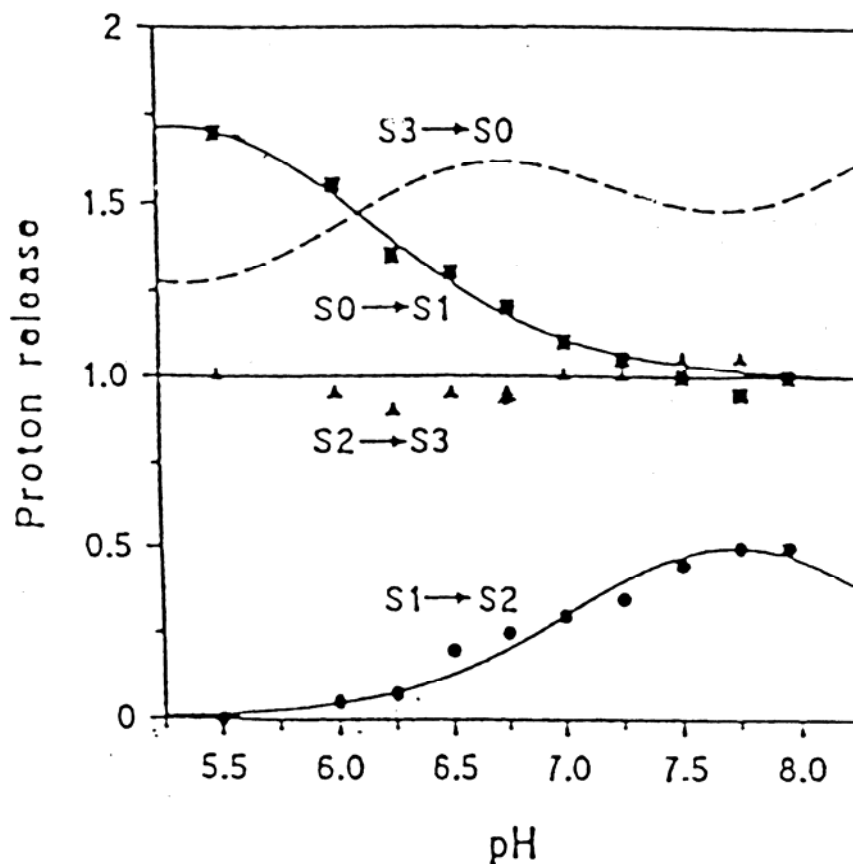
Η ακριβής στοιχειομετρία της έκλυσης πρωτονίων κατά τη διάρκεια του κύκλου των S-καταστάσεων είναι υπό συζήτηση [163]. Η προέλευση των πρωτονίων αυτών δε μπορεί να προσδιοριστεί με σιγουριά, αφού τα πρωτόνια πιθανόν να προέρχονται κατευθείαν από το H₂O, χωρίς όμως να αποκλείεται και η περίπτωση να προέρχονται από πρωτεϊνικά τμήματα, που είναι συζευγμένα με τις S-καταστάσεις, μέσω αλλαγών διαμόρφωσης.

Λόγω της εξάρτησης των ηλεκτροχρωμικών μετατοπίσεων των ταινιών απορρόφησης των καροτενοειδών ή της χλωροφύλλης α από τον κύκλο των S-καταστάσεων και της ταχύτητας αναγωγής του P₆₈₀⁺, είχε αναφερθεί αρχικά [29,206,207], ότι το σχήμα έκλυσης πρωτονίων κατά τη σειρά παλμών φωτός είναι 1:0:1:2 για τις μεταβάσεις S₀ → S₁, S₁ → S₂, S₂ → S₃ και S₃ → (S₄) → S₀, αντίστοιχα. Στην ίδια στοιχειομετρία κατέληξαν και από μετρήσεις απελευθέρωσης πρωτονίων, χρησιμοποιώντας ευαίσθητα ηλεκτρόδια υάλου [208], ή χρωστικές που είναι ευαίσθητες στο pH [209,210], ή με EPR spin επισημαντές [211].

Σύμφωνα με πρόσφατες μετρήσεις απελευθέρωσης πρωτονίων και νέα δεδομένα, η στοιχειομετρία των H⁺ που εκλύονται από ανέπαφες παρασκευές, προσδιορίστηκε ότι δεν είναι ακέραια [212,213,214] και ότι εξαρτάται από το pH [212,214,215,216,217]. Σε pH=6.5, η στοιχειομετρία βρέθηκε ότι είναι 1.2:0.2:0.95:1.65 για τις S₀ → S₁, S₁ → S₂, S₂ → S₃ και S₃ → (S₄) → S₀, αντίστοιχα [212]. Με αύξηση του pH από pH=5.5 σε pH=8.0, ο αριθμός των H⁺, που απελευθερώνονται κατά την S₀ → S₁ ελαττώνεται από 1.75 σε 1, ο αριθμός των H⁺, που εκλύονται κατά την S₁ → S₂ αυξάνεται από 0 σε 0.5 και ο αριθμός των H⁺, που απελευθερώνονται κατά την S₂ → S₃ παραμένει κοντά στο 1 [212,214]. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο Σχ. 30. Η μη ακέραια και pH εξαρτώμενη στοιχειομετρία της απελευθέρωσης H⁺ ερμηνεύτηκε με συνδυασμό ειδικής αποπρωτονίωσης και ηλεκτροστατικών pK_a μετατοπίσεων πρωτονιωμένων καταλοίπων αμινοξέων [212,213,214]. Επίσης, έχει προταθεί ότι η στοιχειομετρία αυτή σχετίζεται με τις αναγωγές των Q_A και Q_B κατά 1 e⁻ στα κέντρα αντίδρασης (R.C.) των μωβ μη θειούχων βακτηρίων [212,213,214] και ότι τα δεδομένα αυτά εξηγούνται με pK_a μετατοπίσεις κάποιων γειτονικών καταλοίπων αμινοξέων [218].

Η εξάρτηση από το pH των ηλεκτροχρωμικών μετατοπίσεων των χρωμοφόρων που συμβαίνουν κατά τις $S_0 \rightarrow S_1$ και $S_1 \rightarrow S_2$ μεταβάσεις συμφωνεί με τους εξαρτώμενους από το pH, αλλά μη ακέραιους αριθμούς των πρωτονίων, που ελευθερώνονται στις μεταβάσεις αυτές [211].

Σύμφωνα με μια άποψη, η στοιχειομετρία πρωτονιακής απελευθέρωσης που μετρήθηκε σε ανέπαφα δείγματα φανερώνει την αποπρωτονίωση στην άμεση γειτονιά του συμπλόκου οξείδωσης του H_2O και περιλαμβάνει αποπρωτονιώσεις και pK_a μετατοπίσεις καταλοίπων αμινοξέων που βρίσκονται κοντά στο σύμπλοκο του μαγγανίου [212]. Θεωρείται ότι πρέπει να συμμετέχουν τουλάχιστον 4 ομάδες, που μπορούν να δώσουν H^+ , από τις οποίες, οι δύο έχουν $pK_a=6.05$ και $pK_a=8.2$, στην S_0 κατάσταση. Έχει προταθεί, επίσης, [172] ότι μια ομάδα με $pK_a=5.8-6.0$ επηρεάζει τη μεταφορά e^- μεταξύ της Y_D και του συμπλόκου του Mn.



Σχήμα 30: Η εξάρτηση από το pH του αριθμού των H^+ που απελευθερώνονται στο διάλυμα ανά P_{680} κατά τον κύκλο των S-καταστάσεων

[Rappaport, F. and Lavergne, J., *Biochemistry* 30, 10004-10012]

Οι αριθμοί των πρωτονίων που απελευθερώνονται ανά P_{680} κατά τις $S_0 \rightarrow S_1$ και $S_1 \rightarrow S_2$ μεταβάσεις έχει προταθεί [212] ότι είναι αποτέλεσμα των αλλαγών των τιμών των pK_a τριών τουλάχιστον ομάδων, που δημιουργούνται λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με το σύμπλοκο του Mn. Το H^+ , που ελευθερώνεται κατά τη μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$, θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα αποπρωτονίωσης ενός εξειδικευμένου καταλοίπου: επειδή κατά τη μετάβαση αυτή δεν υπάρχει αξιοσημείωτη ηλεκτροχρωμική μετατόπιση των χρωμοφόρων κατά την απελευθέρωση ενός πρωτονίου ανά P_{680} , προτείνεται [212] ότι μάλλον ένα κατάλοιπο αμινοξέος οξειδώνεται κατά τη μετάβαση αυτή. Το κατάλοιπο αυτό θεωρείται ότι έχει $pK_a < 9.5$ στην ανηγμένη του μορφή και $pK_a > 3.5$ στην οξειδωμένη μορφή του.

Μια άλλη άποψη δέχεται ότι η στοιχειομετρία απελευθέρωσης H^+ αναφέρεται σε H^+ , που προσφέρονται από διάφορες πηγές και δεν αντιπροσωπεύει απαραίτητα την αποπρωτονίωση, από την οξειδωτική πλευρά του H_2O [210,214,220,221]. Θεωρείται ότι τα H^+ που απελευθερώνονται κατά την οξείδωση του H_2O μπορεί να εξισορροπούνται αργά με την εξωτερική υδατική φάση, κατά τη διάρκεια των μετρήσεων της απελευθέρωσης H^+ . Έτσι, τα H^+ που μετρούνται μπορεί να προέρχονται από pK_a μετατοπίσεις αμινοξέων, που προκαλούνται έμμεσα από διαδικασίες που συμβαίνουν στην οξειδωτική πλευρά του PS II. Αυτά τα κατάλοιπα αμινοξέων μπορεί να βρίσκονται μακριά από το σύμπλοκο του μαγγανίου [210]. Οι τιμές των pK_a αυτών των καταλοίπων μπορεί να μεταβάλλονται σύμφωνα με τις αλλαγές διαμόρφωσης στο σύμπλοκο Mn, που πιστεύεται ότι συμβαίνουν κατά τον κύκλο των S-καταστάσεων. Τέτοιες αλλαγές στα pK_a αμινοξέων, που βρίσκονται μακριά από το σύμπλοκο του Mn, μπορεί να συνεισφέρουν στο θετικό φορτίο των S_2 και S_3 καταστάσεων.

Οι χρόνοι ημιζωής απελευθέρωσης H^+ εκτιμάται ότι είναι 250 μ s, 200 μ s και 1.2 μ s για τις μεταβάσεις $S_0 \rightarrow S_1$, $S_2 \rightarrow S_3$ και $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$, αντίστοιχα, στις θυλακοειδείς μεμβράνες, ενώ παρόμοιες τιμές αναφέρονται και σε PS II δείγματα [210]. Για την $S_0 \rightarrow S_1$ μετάβαση, οι αναφερόμενες ταχύτητες έκλυσης H^+ είναι αργότερες από την ταχύτητα αναγωγής της Y_Z^+ , ενώ για την $S_2 \rightarrow S_3$ μετάβαση, οι αναφερόμενες ταχύτητες απελευθέρωσης H^+ είναι γρηγορότερες από την ταχύτητα αναγωγής της Y_Z^+ (200-250 μ s για την απελευθέρωση H^+ [210] και 350-450 μ s για την αναγωγή της Y_Z^+ [205,222,223]). Αυτό εξηγήθηκε σαν αποπρωτονίωση μιας όξινης ομάδας κοντά στη Y_Z .

Έχει βρεθεί ότι στοιχειομετρία μεταβάλλεται σημαντικά σε PS II δείγματα, από τα οποία έχουν απομακρυνθεί οι πρωτεΐνες 17 και 23 kDa και το LHC [224] ή έχουν υποστεί επεξεργασία με θρυψίνη [224]. Βρέθηκε μια στοιχειομετρία 1:1:1:1 σε θυλακοειδείς μεμβράνες, που δεν είχαν το LHC [214,225]. Έτσι, θεωρήθηκε ότι: i) ένα H^+ απελευθερώνεται από κάποια ομάδα κοντά στο σύμπλοκο του Mn κατά τις μεταβάσεις $S_0 \rightarrow S_1, S_1 \rightarrow S_2$ και $S_2 \rightarrow S_3$, ii) τέσσερα H^+ και τέσσερα e^- αφαιρούνται από το H_2O κατά τη μετάβαση $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$, iii) τρία από τα H^+ που απελευθερώνονται από το H_2O κατά την $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ μετάβαση, πρωτονιώνουν ξανά τις ομάδες που είχαν αποπρωτονιωθεί κατά τις προηγούμενες μεταβάσεις και iv) το LHC επηρεάζει την επελευθέρωση H^+ από το σύμπλοκο οξείδωσης του H_2O και ότι η απώλεια του LHC εκθέτει κατάλοιπα αμινοξέων, που βρίσκονται κοντά στο σύμπλοκο του μαγγανίου στην υδατική φάση [212]. Η αποπρωτονίωση αυτών των καταλοίπων εξουδετερώνει τη συσσώρευση του φορτίου στην περιοχή του συμπλόκου οξείδωσης του H_2O , που προκαλείται κατά τις οξειδώσεις των S-καταστάσεων, μεταβάλλοντας τις στοιχειομετρίες της απελευθέρωσης H^+ σε δείγματα που δεν έχουν το LHC και σε δείγματα, τα οποία έχουν υποστεί κατεργασία με θρυψίνη.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πυρήνες από σπανάκι (με ή χωρίς τις μικρές εξωτερικές πρωτεΐνες) ή από κυανοβακτήρια, παρουσία γλυκερόλης έδειξαν ότι η στοιχειομετρία έκλυσης H^+ δεν είναι 1:1:1:1 αλλά μοιάζει με αυτήν που προκύπτει από τις θυλακοειδείς μεμβράνες. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν την επίδραση της γλυκερόλης στη στοιχειομετρία απελευθέρωσης πρωτονίων, αντανακλώντας τη θερμική σταθερότητα των συμπλόκων από τους διαφορετικούς οργανισμούς [242].

Τέλος, πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πυρήνες από τους οποίους είχε απομακρυνθεί το Ca^{2+} έδειξαν ότι η ταχύτητα ηλεκτρονιακής μεταφοράς από την τυροσίνη Yz στο P^+_{680} μειώνεται κατά τρεις τάξεις μεγέθους, ενώ το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο αυξάνεται από 1.1 σε 2.5. Η έκλυση πρωτονίων προαπαιτείται για την πραγματοποίηση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από την Yz στο P^+_{680} . Από τα αποτελέσματα αυτά προτείνεται ότι η παρουσία του ασβεστίου είναι απαραίτητη για να ρυθμίσει το φαινομενικό pK μιας βασικής ομάδας B, με την οποία συνδέεται η τυροσίνη Yz μέσω δεσμών υδρογόνου. Για την αναγωγή του P^+_{680} σε χρόνους της τάξης των nanosecond και την πραγματοποίηση της οξείδωσης του νερού, πρέπει ένα πρωτόνιο να μείνει στην ομάδα B και να μην ελευθερωθεί στην υδατική

φάση. Η απουσία του ασβεστίου καταστρέφει το δεσμό υδρογόνου που συνδέει την Yz με την ομάδα B [243].

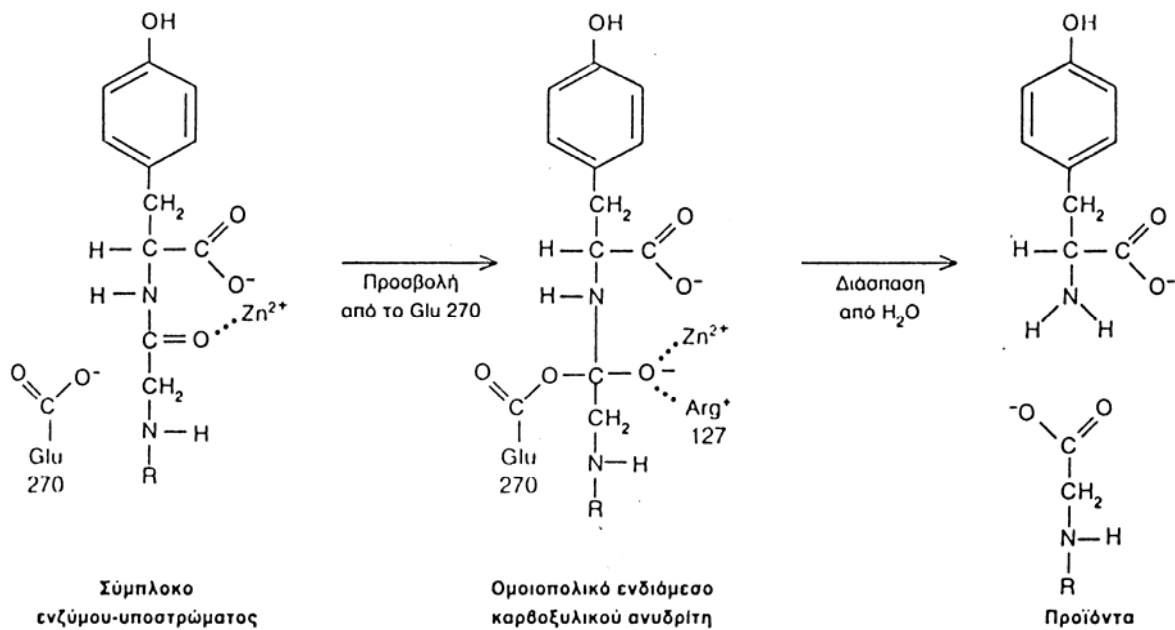
1.9 Πρωτεολυτικά ένζυμα

Η **εκλεκτική πρωτεόλυση** είναι μια σημαντική τεχνική ανάλυσης της σχέσης δομής-λειτουργίας ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου. Η εκλεκτική πρωτεόλυση μπορεί να επιτευχθεί είτε με χρήση *χημικών πρωτεολυτικών αντιδραστηρίων* είτε με *χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων*. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα είναι πιο εύκολα στη χρήση και εξασφαλίζουν περισσότερα αξιόπιστα αποτελέσματα. Διακρίνονται σε *ενδο-πρωτεάσες*, οι οποίες σχάζουν το σκελετό της πρωτεΐνης προκαλώντας θραύσματα και σε *εξω-πρωτεάσες*, οι οποίες οδηγούν σε σχάση του αμινο- ή καρβόξυ-τελικού άκρου της πρωτεΐνης. Τα πλεονεκτήματα της εκλεκτικής ενζυματικής πρωτεόλυσης είναι ότι απαιτείται μικρή μόνο ποσότητα πρωτεάσης, παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση, προκαλούν μεγάλο ποσοστό σχάσης, δεν παρατηρούνται πλευρικές αντιδράσεις και είναι εμπορικά διαθέσιμες σε υψηλή ποιότητα. Η επιλογή του πρωτεολυτικού ενζύμου εξαρτάται από τις εξειδικευμένες θέσεις της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που πρόκειται να πρωτεολυθούν. Πληροφορίες για τη δυνατότητα θραύσης κάποιων θέσεων, για την τοπολογία των συμπλόκων υποστρώματος-ενζύμου και για τους λειτουργικούς ρόλους των πολυπεπτιδικών θραυσμάτων μπορούν να εξαχθούν, αφού οι περιορισμοί της τεχνικής είναι λίγοι.

Υπάρχουν τέσσερις μεγάλες τάξεις πρωτεολυτικών ενζύμων: οι *ψευδαργυροπρωτεάσες*, οι *θειολοπρωτεάσες*, οι *καρβοξυλοπρωτεάσες* και οι *σερινοπρωτεάσες* [186].

Οι **ψευδαργυροπρωτεάσες** έχουν στο ενεργό τους κέντρο ένα ιόν ψευδαργύρου. Η *καρβοξυπεπτιδάση A*, που είναι μέλος της οικογένειας των ψευδαργυροπρωτεασών και είναι ένα ένζυμο της πέψης, αναγνωρίζει κατάλοιπα στο καρβοξυτελικό άκρο που περιέχουν μια αρωματική ή ογκώδη αλειφατική πλευρική αλυσίδα και υδρολύει τον παρακείμενο πεπτιδικό δεσμό. Η λειτουργία του ιόντος του Zn^{2+} είναι η πόλωση του ατόμου του καρβονυλικού άνθρακα του προς διάσπαση δεσμού, ώστε να γίνει περισσότερο τρωτό σε πυρηνόφιλη προσβολή. Αυτό είναι ένα παράδειγμα της επαγωγής της *στρέβλωσης δεσμού* στο υπόστρωμα. Σπουδαίο ρόλο στην κατάλυση παίζει ένα κατάλοιπο γλουταμινικού, παρακείμενο στον

καρβονυλικό άνθρακα. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός κατάλυσης για την καρβοξυπεπτιδάση φαίνεται στο Σχ. 31.

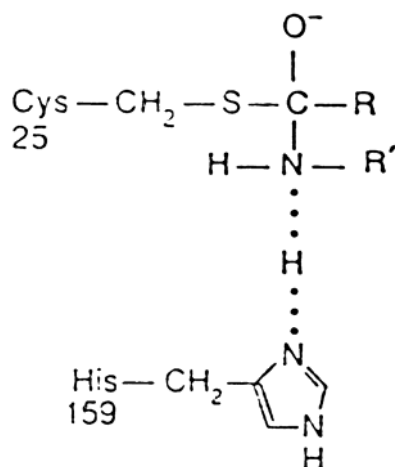


Σχήμα 31: Προτεινόμενος μηχανισμός κατάλυσης για την καρβοξυπεπτιδάση A στον οποίο το ²⁷⁰Glu προσβάλλει απ' ευθείας το καρβονυλικό άτομο άνθρακα του υπό διάσπαση δεσμού του υποστρώματος, για να σχηματίσει ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο μεικτού ανυδρίτη [Stryer, βιβλίο Βιοχημείας]

Οι **θειολοπρωτεάσες** έχουν μια κυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο. Η *παπαΐνη*, που απομονώνεται από την παπάγια, ανήκει στην τάξη των θειολοπρωτεασών. Η κατάλυση προχωρά μέσω ενός *ενδιαμέσου θειολικού εστέρα* και διευκολύνεται από την πλευρική αλυσίδα μιας παρακείμενης ιστιδίνης (Σχ. 32).

Οι **καρβοξυλοπρωτεάσες**, οι οποίες ονομάζονται και *όξιμες πρωτεάσες* είναι ενεργές μόνο σε όξινο περιβάλλον. Το πιο γνωστό μέλος της οικογένειας αυτής είναι η *πεψίνη*, που είναι η κύρια πρωτεάση στο γαστρικό υγρό. Η πεψίνη περιέχει στο ενεργό κέντρο δύο κατάλοιπα ασπαραγινικού. Για να είναι ενεργό το ένζυμο, το ένα από αυτά πρέπει να είναι στην ιοντισμένη και το άλλο στη μη ιοντισμένη μορφή· το βέλτιστο pH βρίσκεται μεταξύ 2 και 3. Καρβοξυλοπρωτεάσες με παρόμοιες ενζυμικές ιδιότητες έχουν απομονωθεί από τα λυσοσώματα, τα οποία επιτελούν την πέψη μέσα στα κύτταρα και από διάφορες μούχλες. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των καρβοξυλοπρωτεασών είναι ότι αναστέλλονται από πολύ χαμηλές

συγκεντρώσεις (περίπου 10^{-10}M) πεπστατίνης, που είναι ένα εξαπεπτίδιο με στερεοδιαμόρφωση παρόμοια με αυτή του τετραέδρου της μεταβατικής κατάστασης των φυσιολογικών υποστρωμάτων. Πολλές πρωτεάσες μπορούν εξειδικευμένα να παρεμποδιστούν από αναστολείς όπως η πεπστατίνη .



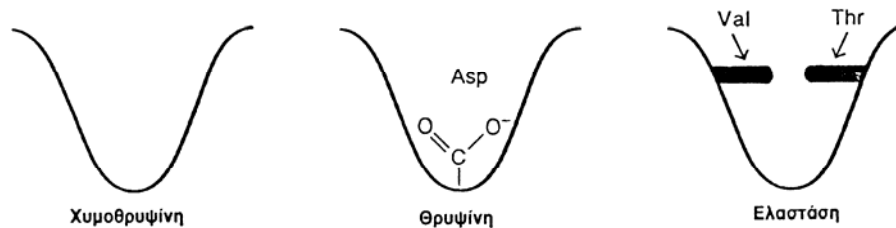
Σχήμα 32: Η μεταβατική κατάσταση στην κατάλυση από την παπαΐνη , μια θειολοπρωτεάση.

[Stryer, βιβλίο Βιοχημείας]

Οι **σερινοπρωτεάσες** είναι η άλλη μεγάλη οικογένεια των πρωτεολυτικών ενζύμων, που χρησιμοποιούν ένα κατάλοιπο σερίνης για την κατάλυση της υδρόλυσης πεπτιδικών δεσμών. Η *θρυψίνη*, η *χυμοθρυψίνη* και η *ελαστάση* είναι τα πιο γνωστά μέλη της οικογένειας αυτής. Είναι ένζυμα της πέψης και μοιάζουν σε πολλά σημεία: (1) Περίπου το 40% της αλληλουχίας των ενζύμων αυτών είναι ταυτόσημη. Στο εσωτερικό των ενζύμων το ποσοστό των καταλοίπων των αμινοξέων που είναι ταυτόσημα αυξάνει (~60%). (2)Μελέτες με ακτίνες X έδειξαν ότι οι τρισδιάστατες δομές τους είναι παρόμοιες. (3)Και στα τρία ένζυμα υπάρχει μια καταλυτική τριάδα σερίνης, ιστιδίνης και ασπαραγινικού (^{195}Ser , ^{57}His , ^{102}Asp). (4)Σε αυτή την τριάδα το κατάλοιπο της σερίνης τροποποιείται από τα φθοροφωσφορικά (όπως το DIPF) , προκαλώντας την απώλεια της καταλυτικής δραστηριότητας. Και στα τρία αυτά ένζυμα η αλληλουχία των αμινοξέων γύρω από τη σερίνη είναι η ίδια: Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro. (5)Και τα τρία ένζυμα έχουν σχεδόν ταυτόσημους καταλυτικούς μηχανισμούς. Σε κάθε ένα από αυτά, η καταλυτική τριάδα και η κοιλότητα του οξυανιόντος προάγει το σχηματισμό μιας τετραεδρικής μεταβατικής κατάστασης. Κατά τη διάρκεια της κατάλυσης σχηματίζεται και από τα τρία ένζυμα ένα ομοιολικό ενδιάμεσο ακυλοενζύμου. (6)Και τα

τρία αυτά ένζυμα εκκρίνονται από το πάγκρεας ως ανενεργά πρόδρομα , που ενεργοποιούνται με τη διάσπαση ενός μόνο πεπτιδικού δεσμού.

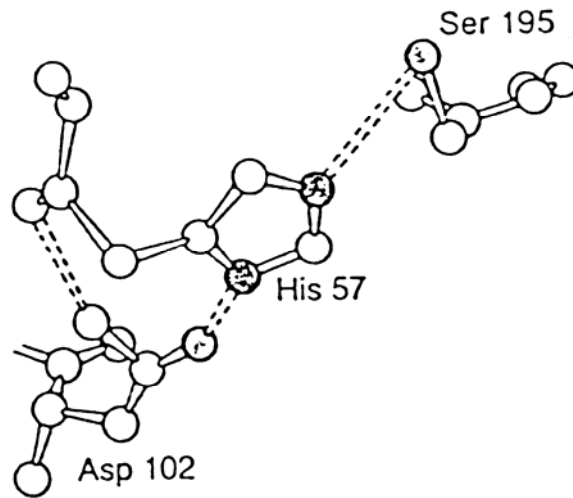
Τα ένζυμα αυτά αν και έχουν παρόμοια δομή και μηχανισμό , διαφέρουν αξιοσημείωτα ως προς την εξειδίκευση του υποστρώματος. Η χυμοθρυψίνη , για να δράσει , χρειάζεται μια αρωματική ή ογκώδη μη πολική πλευρική αλυσίδα προς την αμινο-πλευρά του δεσμού του υποστρώματος , που διασπάται. Διασπά, δηλαδή πεπτιδικούς δεσμούς μετά από αμινοξέα όπως η φαινυλαλανίνη , η τυροσίνη ή η τρυπτοφάνη. Αντίστοιχα , η θρυψίνη χρειάζεται βασικά αμινοξέα , όπως η λυσίνη ή η αργινίνη. Η ελαστάση δε μπορεί να διασπάσει κανένα από αυτά τα είδη των υποστρωμάτων . Η εξειδίκευσή της κατευθύνεται προς τις μικρότερες αφόρτιστες πλευρικές αλυσίδες , όπως η αλανίνη. Μελέτες με ακτίνες X έδειξαν ότι αυτές οι διαφορές στην εξειδίκευση οφείλονται σε μικρές διαφορές στη δομή της περιοχής πρόσδεσης (Σχ. 33). Στη χυμοθρυψίνη μια μη πολική κοιλότητα παίζει το ρόλο της κοιλότητας για την αρωματική ή την ογκώδη μη πολική πλευρική αλυσίδα. Στην θρυψίνη ένα από τα κατάλοιπα αυτής της κοιλότητας είναι διαφορετικό από αυτό της χυμοθρυψίνης: μία σερίνη έχει αντικατασταθεί από ένα ασπαραγινικό. Το ασπαραγινικό αυτό στη μη πολική κοιλότητα της θρυψίνης μπορεί να σχηματίσει έναν ισχυρό ηλεκτροστατικό δεσμό με τη θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της λυσίνης ή της αργινίνης του υποστρώματος. Στην ελαστάση η κοιλότητα δεν υπάρχει , γιατί τα δύο κατάλοιπα της γλυκίνης που υπάρχουν στη χυμοθρυψίνη έχουν αντικατασταθεί από τα ογκωδέστερα βαλίνη και θρεονίνη.



Σχήμα 33: Απλοποιημένη αναπαράσταση τμήματος της περιοχής πρόσδεσης του υποστρώματος στη χυμοθρυψίνη, τη θρυψίνη και την ελαστάση [Stryer, βιβλίο Βιοχημείας]

Όπως ήδη προαναφέρθηκε η καταλυτική δραστηριότητα των τριών αυτών πρωτεολυτικών ενζύμων εξαρτάται από τις ασυνήθιστες ιδιότητες μιας σερίνης , της ¹⁹⁵Ser. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες , μια ομάδα -CH₂OH δεν αντιδρά. Τι είναι όμως αυτό που

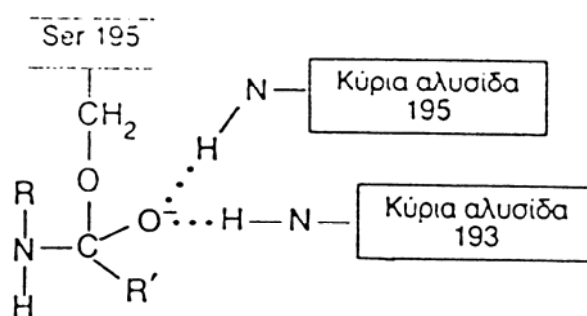
κάνει τη σερίνη να αντιδρά στο ενεργό κέντρο των σερινοπρωτεασών; Μια πειστική εξήγηση δόθηκε από μελέτες της τρισδιάστατης δομής των ενζύμων αυτών με ακτίνες Χ. Όπως είχε προβλεφθεί από τις μελέτες με τη σήμανση συγγένειας, η ^{57}His είναι παρακείμενη στη ^{195}Ser . Το καρβοξύλιο του ^{102}Asp , που είναι βυθισμένο μέσα στην πρωτεΐνη, βρίσκεται επίσης δίπλα στην ^{57}His . Αυτά τα τρία κατάλοιπα σχηματίζουν μια καταλυτική τριάδα (Σχ. 34).



Σχήμα 34: Η στερεοδιάταξη της καταλυτικής τριάδας σερίνης-ιστιδίνης-ασπαραγινικού στη χυμοθρυψίνη
[Stryer, βιβλίο Βιοχημείας]

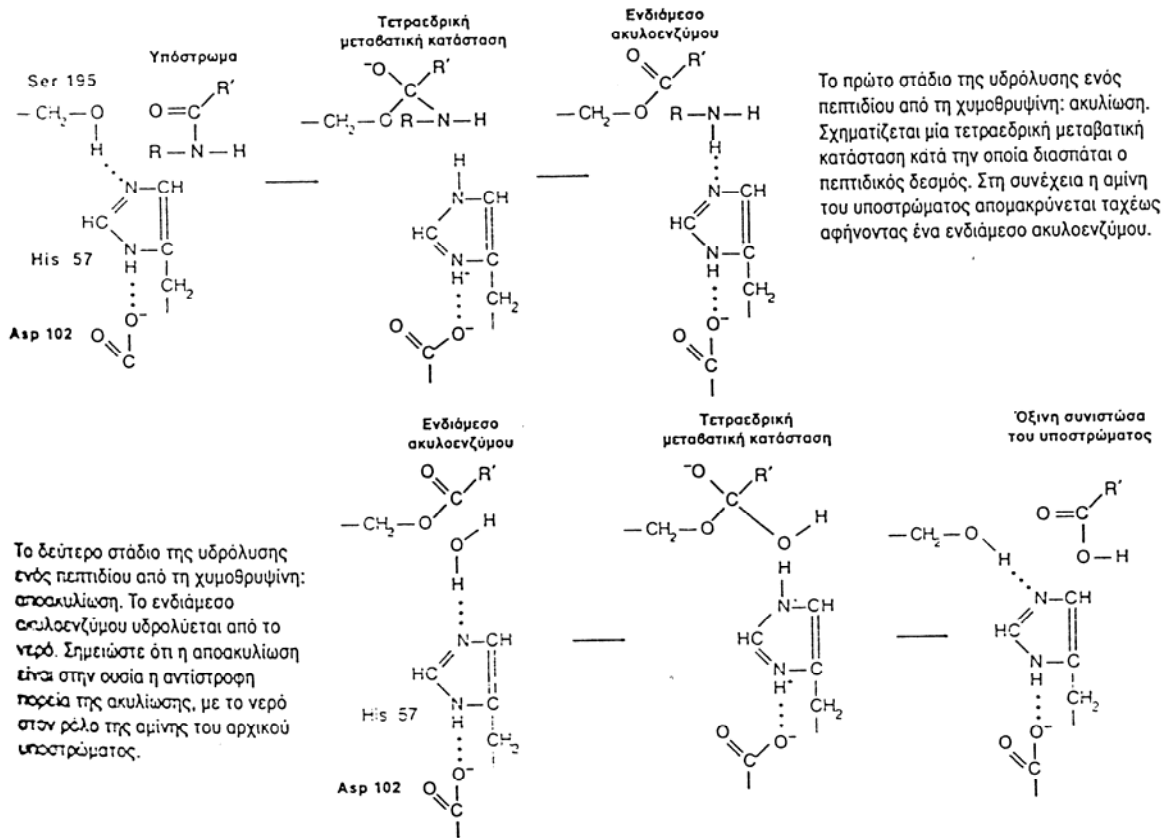
Από εκτεταμένες κρυσταλλογραφικές και χημικές μελέτες έχει εξαχθεί ένας πιθανός μηχανισμός κατάλυσης. Στο μηχανισμό αυτό, η ^{57}His και η ^{195}Ser συμμετέχουν απ' ευθείας στη διάσπαση του επιδεκτικού πεπτιδικού δεσμού. Η υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού αρχίζει με μια προσβολή από το άτομο του οξυγόνου της υδροξυλομάδας της ^{195}Ser στο καρβονυλικό άτομο άνθρακα του επιδεκτικού πεπτιδικού δεσμού. Ο δεσμός άνθρακα-οξυγόνου αυτής της καρβονυλομάδας γίνεται απλός και το οξυγόνο αποκτά ένα καθαρό αρνητικό φορτίο. Τα τέσσερα άτομα που είναι τώρα ενωμένα με τον καρβονυλικό άνθρακα είναι διατεταγμένα όπως σε ένα τετράεδρο. Ο σχηματισμός αυτού του μεταβατικού τετραεδρικού ενδιάμεσου από μια επίπεδη αμιδική ομάδα γίνεται δυνατός από τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου καρβονυλικού οξυγόνου (ονομάζεται οξυανιόν) και δύο ομάδων NH της κύριας αλυσίδας (Σχ. 35). Το άλλο ουσιαστικό γεγονός στο σχηματισμό αυτού του τετραέδρου μεταβατικής κατάστασης είναι η μεταφορά ενός πρωτονίου από τη ^{195}Ser στην ^{57}His (Σχ. 36). Η παρουσία της καταλυτικής τριάδας διευκολύνει αυτή τη μεταφορά. Το

^{102}Asp προσανατολίζει επακριβώς τον μιδαζολικό δακτύλιο της ^{157}His και εξουδετερώνει μερικώς το φορτίο που αναπτύσσεται σε αυτόν κατά τη διάρκεια της μεταβατικής κατάστασης. Το πρωτόνιο της πρωτονιωμένης μορφής της ^{57}His μεταφέρεται κατόπιν στο άζωτο του προσβαλλόμενου πεπτιδικού δεσμού, ο οποίος έτσι διασπάται. Σε αυτό το στάδιο, το αμιδικό τμήμα του πεπτιδικού δεσμού του υποστρώματος είναι ενωμένο στην ^{57}His με δεσμό υδρογόνου, ενώ το καρβοξυλικό τμήμα του πεπτιδικού δεσμού του υποστρώματος είναι εστεροποιημένο στη ^{195}Ser . Το στάδιο της ακυλίωσης της αντίδρασης υδρόλυσης συμπληρώνεται με την απομάκρυνση της αμινικής συνιστώσας. Το επόμενο στάδιο, που είναι η αποακυλίωση, αρχίζει όταν ένα μόριο H_2O καταλαμβάνει τη θέση που ήταν νωρίτερα κατειλημμένη από το αμινικό συστατικό του υποστρώματος. Στην ουσία, η αποακυλίωση είναι η αντίστροφη πορεία της ακυλίωσης, με το H_2O να αντικαθιστά την αμινική συνιστώσα του υποστρώματος. Πρώτα, το δίκτυο μεταβίβασης φορτίου διώχνει ένα πρωτόνιο από το H_2O . Το ιόν OH^- που παράγεται, προσβάλλει αμέσως το καρβονυλικό άτομο άνθρακα της ακυλομάδας που είναι προσδεμένη στη ^{195}Ser . Όπως και στην ακυλίωση, σχηματίζεται ένα μεταβατικό τετραεδρικό ενδιάμεσο. Τότε, η ^{57}His προσφέρει ένα πρωτόνιο στο άτομο του οξυγόνου της ^{195}Ser , η οποία απελευθερώνει το όξινο συστατικό του υποστρώματος. Αυτό το όξινο συστατικό απομακρύνεται και το ένζυμο είναι έτοιμο για τον επόμενο γύρο της κατάλυσης [186].



Σχήμα 35: Η τετραεδρική μεταβατική κατάσταση της αντίδρασης ακυλίωσης της χυμοθρυψίνης. Σταθεροποιείται από τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται από δύο ομάδες NH της κύριας αλυσίδας.

[Stryer, βιβλίο Βιοχημείας]



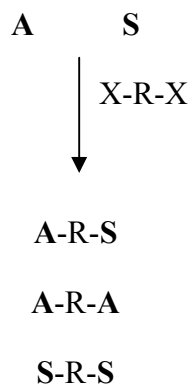
Σχήμα 36: Μηχανισμός υδρόλυσης ενός πεπτιδίου από τη χυμοθρυψίνη
[Stryer, βιβλίο Βιοχημείας]

1.10 Αντιδραστήρια πρωτεϊνικής διασύνδεσης (cross-linkers)

Ο όρος **cross-linking** αναφέρεται σε δομικές μελέτες, όπου ένα αντιδραστήριο, γνωστό ως **cross-linker**, χρησιμοποιείται για να συνδέσει πρωτεΐνες ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου, οι οποίες βρίσκονται σε απόσταση ίση με την αλυσίδα που ενώνει τις λειτουργικές ομάδες του cross-linker. Ένα βασικό πλεονέκτημα της χρήσης των cross-linkers, είναι το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες δε χρειάζεται να βρίσκονται σε διάλυμα, εφόσον σημαντικές πληροφορίες για την τοπολογία πρωτεϊνών ενός συμπλόκου μπορούν να εξαχθούν με την απ'ευθείας εισαγωγή του αντιδραστηρίου στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο.

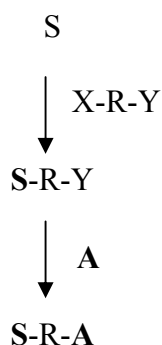
Υπάρχουν δύο είδη cross-linkers: τα **ομοδιλειουργικά** (με δύο όμοιες λειτουργικές ομάδες) και τα **ετεροδιλειουργικά** (με δύο διαφορετικές λειτουργικές ομάδες).

Τα ομοδιλειτουργικά cross-linkers είναι της μορφής X-R-X, όπου X είναι μια ομάδα που αντιδρά με πρωτεΐνη και R είναι η ομάδα που παρεμβάλλεται μεταξύ των πρωτεϊνών που συνδέονται. Το σχήμα της αντίδρασης για δύο πρωτεΐνες A και S είναι :



Το κυριότερο μειονέκτημα των ομοδιλειτουργικών cross-linkers είναι ότι προκύπτουν πολλά παραπροϊόντα. Ένα από τα πιο συνηθισμένα ομοδιλειτουργικά cross-linkers είναι η *γλουταραλδεΐδη*.

Τα ετεροδιλειτουργικά cross-linkers είναι της μορφής X-R-Y, όπου X και Y είναι δύο διαφορετικές ομάδες με μεγάλη εξειδίκευση για συγκεκριμένο τύπο αμινοξικής πλευρικής αλυσίδας. Έτσι, αν δύο πρωτεΐνες A και S αναμειχθούν με το X-R-Y, η αντίδραση θα είναι της μορφής



Με την αντίδραση αυτή δεν προκύπτουν παραπροϊόντα, εφόσον η μία πρωτεΐνη (π.χ. S) μπορεί να αντιδράσει μόνο με την ομάδα X, δίνοντας το S-R-Y, το οποίο στη συνέχεια, αντιδρώντας με την άλλη πρωτεΐνη (A), δίνει το επιθυμητό προϊόν S-R-A, ενώ προϊόντα της μορφής A-A και S-S δε μπορεί να σχηματισθούν. Πρέπει να σημειωθεί ότι το παραπάνω σχήμα της αντίδρασης είναι υπεραπλουστευμένο, καθώς θα πρέπει η ομάδα Y να είναι εξειδικευμένη για μια ομάδα της πρωτεΐνης A, αλλά όχι της S και αντίστοιχα, η ομάδα X να αντιδρά μόνο με κάποια ομάδα της S, αλλά όχι με την A.

Ένα άλλο είδος αντιδραστηρίων cross-linking είναι τα **μηδενικού μήκους cross-linkers**. Ο όρος αυτός αναφέρεται σε αντιδραστήρια που συνδέουν απ' ευθείας δύο πρωτεΐνες, χωρίς την εισαγωγή επιπλέον ατόμων ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Τα πιο γνωστά μηδενικού μήκους cross-linkers είναι τα υδατοδιαλυτά καρβοδιϊμίδια, τα οποία αρχικά αντιδρούν με καρβοξυλομάδα μιας πρωτεΐνης και ακολουθεί αντίδραση με αμινομάδα της δεύτερης πρωτεΐνης. Τα αντιδραστήρια αυτά, όπως και τα ομοδιλειουργικά cross-linkers, οδηγούν σε μια σειρά παραπροϊόντων, εκτός του κύριου προϊόντος [194].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ένα από τα αντικείμενα έρευνας γύρω από τη Φωτοσύνθεση είναι η ανακάλυψη της δομής του Φωτοσυστήματος II, που θα επιτρέψει την κατανόηση της λειτουργίας των παραγόντων, που κάνουν το πρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο μοναδικό.

Παρά την αξιόλογη πρόοδο στις γνώσεις μας, γύρω από τη δομή και λειτουργία του PS II, οι μοναδικές δομικές και μηχανιστικές ιδιότητες του συμπλόκου παραμένουν αδιευκρίνιστες.

Σκοπός της ερευνητικής αυτής εργασίας είναι η τοπολογική και η λειτουργική μελέτη των πρωτεϊνών του PS II. Η καλύτερη μέθοδος καθορισμού της δομής ενός βιολογικού μορίου είναι η κρυσταλλογραφία. Ωστόσο, επειδή ως σήμερα δεν έχει επιτευχθεί η ανάπτυξη κρυστάλλων κατάλληλων για τη λύση της δομής, στην εργασία αυτή χρησιμοποιούνται έμμεσες μέθοδοι, προκειμένου να μελετηθεί η τοπολογία των πρωτεϊνών και ο ρόλος τους στη λειτουργία του πρωτεϊνικού συμπλόκου.

Η εκλεκτική πρωτεόλυση είναι μία από τις μεθόδους, που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση δομής-λειτουργίας του πρωτεϊνικού συμπλόκου. Σαν πρωτεολυτικό ένζυμο χρησιμοποιείται η θρυψίνη, μια ενδοπεπτιδάση, που έχει την ικανότητα να υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς, μετά από αργινίνη ή λυσίνη. Επεξεργασία πυρήνων PS II με θρυψίνη, επιτρέπει την εξαγωγή σημαντικών πληροφοριών για την αρχιτεκτονική των πολυπεπτιδίων στο σύμπλοκο, καθώς η πρωτεόλυση ορισμένων πρωτεϊνών φανερώνει τη θέση τους μέσα στο σύμπλοκο και την αλληλεπίδρασή τους με τις άλλες πρωτεΐνες. Επιπλέον, η εξέταση της λειτουργικότητας των πρωτεολυμένων αυτών δειγμάτων παρουσιάζει την επίδραση της θρυψίνης τόσο στην οξειδωτική πλευρά του PS II, όπου συμβαίνει η φωτοχημική διάσπαση του H₂O, όσο και στην αναγωγική του πλευρά.

Μια άλλη μέθοδος, που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της τοπολογίας των πρωτεϊνών του PS II, μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση χημικών αντιδραστηρίων, γνωστών ως cross-linkers. Τα αντιδραστήρια αυτά μπορούν να αντιδράσουν με συγκεκριμένα αμινοξέα πρωτεϊνών, αρκεί να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις, όπως για παράδειγμα συγκεκριμένη απόσταση μεταξύ των πολυπεπτιδίων. Στην παρούσα εργασία, το cross-linker που χρησιμοποιείται είναι το υδατοδιαλυτό, μηδενικού μήκους EDC, το οποίο συνδέει καρβοξυλομάδες με αμινομάδες, που βρίσκονται σε van der Waals απόσταση. Επεξεργασία

PS II-δειγμάτων με EDC, επιτρέπει τη μελέτη της σχετικής θέσης των εξωτερικών και των μεμβρανικών πρωτεϊνών του PS II και την αλληλεπίδραση, μεταξύ τους. Τα δείγματα αυτά ελέγχονται, επίσης, ως προς την ικανότητά τους για παραγωγή O_2 , προκειμένου να διευκρινιστεί αν οι επεξεργασίες αυτές επιδρούν στη λειτουργικότητα του συμπλόκου.

Η εκλεκτική αφαίρεση των εξωτερικών πρωτεϊνών και η δυνατότητα επανασύνδεσής τους στο σύμπλοκο, σε συνδυασμό με τις δύο προηγούμενες μεθόδους, χρησιμοποιείται επίσης, για τη μελέτη του λειτουργικού ρόλου των πρωτεϊνών αυτών.

Στην εργασία αυτή, εξετάζεται, ακόμα, η επίδραση αλάτων στην πρωτεϊνική σύσταση του PS II, καθώς και στη λειτουργία του. Τα άλατα, που έχουν χρησιμοποιηθεί, είναι το KNO_2 και το $LiClO_4$. Το KNO_2 χρησιμοποιείται προκειμένου να εξεταστεί αν τα NO_2^- μπορούν να ανταγωνισθούν τα ιόντα Cl^- , ενώ το $LiClO_4$ χρησιμοποιείται για να εξεταστεί η επίδραση της ιονικής ισχύος στις πρωτεΐνες και τη λειτουργικότητα του συμπλόκου. Συγκεκριμένα, ελέγχεται η ευαισθησία των εξωτερικών πρωτεϊνών μετά τις κατεργασίες με τα αλάτια αυτά, η ενεργότητα των επεξεργασμένων δειγμάτων και η επίδραση των αλάτων στην ηλεκτρονιακή ροή, στα δείγματα μετά τις κατεργασίες.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

Οι PS-II μεμβράνες, που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή, απομονώθηκαν από φρέσκα φύλλα σπανακιού. Οι πυρήνες του PS-II, που χρησιμοποιήθηκαν, απομονώθηκαν με διαλυτοποίηση των PS-II-μεμβρανών με απορρυπαντικά. Όλες οι παρασκευές πραγματοποιήθηκαν στο σκοτάδι, στους 4°C. Τα παρασκευάσματα, πριν και μετά από κάθε βιοχημική επεξεργασία, ήταν αποθηκευμένα σε θερμοκρασία -40°C.

Η ποιότητα των αντιδραστηρίων, που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν analytical grade. Τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις εταιρείες Biomol, Vegatec, Sigma, Merck, Fluka, Pierce, Riedel-de Haen, Molecular Probes. Το νερό ήταν απιονισμένο, με στήλη ιοντοανταλλακτικών ρητινών και αποστειρωμένο με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Τα διαλύματα, που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

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

1^ο διάλυμα επαναιώρησης (1st resuspention buffer): 0.15mM NaCl, 4mM MgCl₂ και 25mM MES (pH=6.0).

2^ο διάλυμα επαναιώρησης (2nd resuspention buffer): 15mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM AsCH και 25mM MES (pH=6.0).

Διάλυμα Triton: 25% Triton X-100 στο 2^ο διάλυμα επαναιώρησης.

Διάλυμα SMN: 0.4mM sucrose, 25mM MES (pH=6.0) και 15mM NaCl.

Διάλυμα Tris: 0.8M Tris (pH=8.2).

Διάλυμα MN: 15mM NaCl και 25mM MES (pH=6.0).

Διάλυμα PEG: 40% polyethylenglycol(M.B=6000) σε διάλυμα MN (pH=6.0).

Διάλυμα NaCl: 4M NaCl και 25mM MES (pH=6.0).

Διάλυμα CaCl₂: 2M CaCl₂ και 25mM MES (pH=6.0).

Διάλυμα HECAMEG: 2% HECAMEG σε διάλυμα SMN (pH=6.0).

Διάλυμα OTG: 0.8% OTG σε διάλυμα SMN (pH=6.0).

Διάλυμα OGP: 70mM OGP, 1M sucrose, 50mM MES (pH=6.0), 0.8M NaCl και 10mM CaCl₂.

Διάλυμα θρυψίνης: 1mg/ml trypsin σε διάλυμα SMN (pH=6.0).

Διάλυμα αναστολέα θρυψίνης: 5mg/ml trypsin inhibitor σε διάλυμα SMN (pH=6.0).

Διάλυμα EDC: 1M EDC σε διάλυμα SMN (pH=6.0).

Διάλυμα KNO₂: 1M KNO₂ σε διάλυμα SMN (pH=6.0).

Διάλυμα LiClO₄: 1M LiClO₄ σε διάλυμα SMN (pH=6.0).

Διάλυμα ακετόνης: 80% acetone σε MeOH.

Διάλυμα DCBQ: 56.5mM DCBQ σε MeOH.

Διάλυμα DCMU: 1.5mM DCMU σε 50%MeOH-50%H₂O.

Διάλυμα K₃Fe(CN)₆: 300mM K₃Fe(CN)₆ σε H₂O.

Διάλυμα K₄Fe(CN)₆: 300mM K₄Fe(CN)₆ σε H₂O.

Διάλυμα υδροκινόνης: 50mM HQ σε H₂O.

3.2 Μέθοδοι

Η απομόνωση των PS II-συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με χρήση υδατικών διαλυμάτων και απορρυπαντικών σε συνδυασμό με τη μέθοδο της φυγοκέντρωσης. Ο χαρακτηρισμός τους έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου, της ανοσοαποτύπωσης, της πολαρογραφικής μέτρησης O₂, της φασματοσκοπίας ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού και της οπτικής φασματοσκοπίας.

Οι φυγοκεντρήσεις έγιναν με φυγόκεντρο Heraeus SEPATECH, τύπου Suprafuge 22, χρησιμοποιώντας κεφαλές HFA 2194 ή HFA 14290, ή με φυγόκεντρο SIGMA, τύπου 3K20, με κεφαλή Nr: 12258. Για την απομόνωση υποσυμπλόκων του πυρήνα του PS II, χρησιμοποιήθηκε υπερφυγόκεντρος SORVALL ULTRA 80^{DM}, με κεφαλή SORVALL TH-641, 41000 RPM MAX.

Το pH των διαλυμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν, είχε ρυθμιστεί σε ηλεκτρόδιο WTW pH 530.

Οι μεμβράνες, που χρησιμοποιήθηκαν σε διαδικασίες διαπίδυσης, ήταν Dialysis membranes Type 20 ή Type 8, με cut off=12-16 kDa και pore size=25Å, της εταιρίας BIOMOL. Πριν τη χρήση τους, είχαν υποστεί κατεργασία με υδατικό διάλυμα 5mM EDTA για 30 min σε 100°C και διατηρήθηκαν σε διάλυμα 0.5% v/v MeOH/H₂O.

Οι μεμβράνες, που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης, ήταν PVDF μεμβράνες, της εταιρείας Millipore και χαρακτηριστικά Filter type:PVDF, pore size:0.45nm.

3.2.1 Απομόνωση Θυλακοειδών και PS II-μεμβρανών.

Φρέσκα φύλλα σπανακιού πλύθηκαν και αλέστηκαν, σε μίξερ, με το ρυθμιστικό διάλυμα άλεσης (grinding buffer). Το μίγμα διηθήθηκε από οκταπλό φύλλο γάζας και το διήθημα φυγοκεντρήθηκε σε 7500 g για 15 min. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στο 1^ο διάλυμα επαναιώρησης και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε σε 7500 g για 20 min. Το ίζημα, που καταβυθίστηκε ήταν οι *θυλακοειδείς* μεμβράνες [234].

Οι PS II-μεμβράνες απομονώθηκαν από τις θυλακοειδείς μεμβράνες ως εξής: Το ίζημα των θυλακοειδών μεμβρανών διαλυτοποιήθηκε με το δεύτερο διάλυμα επαναιώρησης, ομογενοποιήθηκε με μηχανικό ομογενοποιητή και μετρήθηκε η περιεκτικότητά του σε χλωροφύλλη. Η συγκέντρωση χλωροφύλλης ρυθμίστηκε με την προσθήκη του 2ου διαλύματος επαναιώρησης, ώστε η τελική συγκέντρωση, με την παρουσία του απορρυπαντικού, να είναι 2 mg/ml. Στο ομογενοποιημένο διάλυμα προστέθηκε στάγδην το διάλυμα απορρυπαντικού Triton X-100 25% v/v. Το διάλυμα θυλακοειδών μεμβρανών και απορρυπαντικού επώαστηκε για 30 min στο σκοτάδι, υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Κατόπιν, φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 30 min. Το ίζημα, που καταβύθιστηκε, ήταν εμπλουτισμένο σε stacked PS II-μεμβράνες. Στη συνέχεια, το ίζημα αυτό εκπλύθηκε με διάλυμα SMN και φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 40 min. Το τελικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιήθηκε, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητά του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύθηκε στους -40°C [93,235].

3.2.2 Απομόνωση HM-core.

Το HM-core απομονώθηκε με διαλυτοποίηση των PS II-μεμβρανών με το απορρυπαντικό HECAMEG. Για την απομόνωση του συμπλόκου, V ml των PS II-μεμβρανών σε SMN με συγκέντρωση 1.5 mg Chl ml⁻¹, αναμίχθηκαν με V ml διαλύματος 2% HECAMEG σε SMN. Το μίγμα επώαστηκε για 10 min σε πάγο, στο σκοτάδι και στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 30 min. Το πράσινο υπερκείμενο αραιώθηκε με SMN, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 7/2 V ml, και 10 mM MgCl₂ προστέθηκαν στο μίγμα για να επιτευχθεί η καταβύθιση του συμπλόκου συλλογής φωτός (LHC). Το μίγμα αυτό επώαστηκε για 5 min σε πάγο, στο σκοτάδι και ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 48000 g για 20 min. Το πράσινο υπερκείμενο, που περιείχε τον πυρήνα του PS II, αναμίχθηκε με 7/4 V ml διαλύματος PEG 40% και φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 40 min, προκειμένου να ιζηματοποιηθεί ο πυρήνας. Ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN, φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η συγκέντρωσή του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύθηκε σε -40°C. Οι κυριότερες πρωτεΐνες του δείγματος αυτού είναι οι CP 47, CP 43, D1, D2, cyt b₅₅₉, 17 kDa, 23 kDa, 33kDa, CP 29, CP 26 και CP 24 [193].

3.2.3 Απομόνωση OTG-core.

Το OTG-core απομονώθηκε με διαλυτοποίηση των PS II-μεμβρανών με το απορρυπαντικό OTG. Για την απομόνωση του συμπλόκου, V ml των PS II-μεμβρανών σε SMN με συγκέντρωση $1 \text{ mg Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$, αναμίχθηκαν με V ml διαλύματος 0.8% OTG σε SMN. Το μίγμα επώαστηκε για 10 min σε πάγο, στο σκοτάδι και στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 30 min. Το πράσινο υπερκείμενο αραιώθηκε με SMN, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 3V ml, και 10 mM MgCl_2 προστέθηκαν στο μίγμα για να επιτευχθεί η καταβύθιση του συμπλόκου συλλογής φωτός (LHC). Το μίγμα αυτό επώαστηκε για 5 min σε πάγο, στο σκοτάδι και ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 48000 g για 10 min. Το πράσινο υπερκείμενο, που περιείχε τον πυρήνα του PS II, αναμίχθηκε με 3/2 V ml διαλύματος PEG 40% και φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 40 min, προκειμένου να ιζηματοποιηθεί ο πυρήνας. Ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN, φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η συγκέντρωσή του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύθηκε σε -40°C . Το δείγμα αυτό δεν περιείχε τις πρωτεΐνες 22 και 10 kDa [238,239].

3.2.4 Απομόνωση OGP-core.

Για την απομόνωση του συμπλόκου, V ml των PS II-μεμβρανών σε SMN με συγκέντρωση $2.5 \text{ mg Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$, αναμίχθηκαν με V ml διαλύματος 70 mM OGP. Το μίγμα επώαστηκε για 10 min σε πάγο, στο σκοτάδι και στη συνέχεια, αραιώθηκε με 4V ml διαλύματος, που περιείχε 1M sucrose, 50mM MES (pH=6.0), 0.4 M NaCl και 5 mM CaCl_2 . Το μίγμα αυτό επώαστηκε για 5 min σε πάγο, στο σκοτάδι και ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 48000 g για 90 min, οπότε και απομακρύνθηκε το LHC. Το πράσινο υπερκείμενο, που περιείχε τον πυρήνα του PS II, αναμίχθηκε με 3 V ml διαλύματος PEG 40% και φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 40 min, προκειμένου να ιζηματοποιηθεί ο πυρήνας. Ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN, φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η συγκέντρωσή του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύθηκε σε -40°C . Το δείγμα αυτό δεν περιείχε τις πρωτεΐνες 17 και 23 kDa.

3.2.5 Απομόνωση υποσυμπλόκου του HM-core (sub-core).

Το HM-core υπέστη κατεργασία με 2M NaCl, προκειμένου να απομακρυνθούν οι δύο μικρές εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa. Το δείγμα αυτό εκπλύθηκε με διάλυμα MN, φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 30 min και διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα MN που περιείχε απορρυπαντικό 0.5% DM. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε, επώαστηκε για 15 min σε πάγο, στο σκοτάδι και φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 20 min. Το πράσινο υπερκείμενο, που περιείχε τις πλήρως διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες, φυγοκεντρήθηκε σε υπερφυγόκεντρο για 16 ώρες, σε διάλυμα γραμμικής βαθμίδωσης σουκρόζης, με 10%-35% σουκρόζη, 0.04% DM σε MN. Μετά την υπερφυγοκέντρωση, υπήρχαν 2 ζώνες. Το υποσύμπλοκο, sub-core, βρισκόταν στη χαμηλότερη ζώνη και μετά την πρόσληψή του από τους σωλήνες φυγοκέντρωσης, καταβυθίστηκε με ίσο όγκο διαλύματος 40% PEG. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και τελική επαναιώρηση σε διάλυμα SMN. Το δείγμα αυτό περιείχε τις πρωτεΐνες CP 47, CP 43, D1, D2, cyt b₅₅₉ και 33 kDa.

3.2.6 Κατεργασία δειγμάτων με NaCl.

Οι κατεργασίες με NaCl οδηγούν στην απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών 17 και 23 kDa. Το δείγμα των μεμβρανών του PS II ή των πυρήνων επώαστηκε με διάλυμα 2M NaCl (pH=6.0) για 1 ώρα σε πάγο και στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 30 min. Το ίζημα εκπλύθηκε με διάλυμα SMN, ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min, δεύτερη έκπλυση με SMN και τρίτη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min. Το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η συγκέντρωση σε χλωροφύλλη και αποθηκεύθηκε σε -40°C.

3.2.7 Κατεργασία δειγμάτων με CaCl₂.

Οι κατεργασίες με CaCl₂ οδηγούν στην απομάκρυνση και της εξωτερικής πρωτεΐνης 33 kDa. Το δείγμα των μεμβρανών του PS II ή των πυρήνων επώαστηκε με διάλυμα 1M CaCl₂ (pH=6.0) για 1 ώρα σε πάγο και στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 30 min. Το ίζημα εκπλύθηκε με διάλυμα SMN, ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min, δεύτερη έκπλυση με SMN και τρίτη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30

min. Το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η συγκέντρωση σε χλωροφύλλη και αποθηκεύθηκε σε -40°C.

3.2.8 Κατεργασία δειγμάτων με Tris.

Το ίζημα PS II-μεμβρανών ή των πυρήνων, γνωστής συγκέντρωσης σε χλωροφύλλη, επαναιωρήθηκε σε διάλυμα Tris (0.8 M, pH=8.2), έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση σε χλωροφύλλη να είναι 0.4 mgr/ml. Το αιώρημα επώαστηκε για 30 min σε 4°C, σε φως και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 30 min. Το ίζημα εκπλύθηκε με διάλυμα SMN και φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 30 min. Ακολούθησε δεύτερη έκπλυση με διάλυμα SMN και φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η συγκέντρωση χλωροφύλλης και αποθηκεύθηκε σε -40°C.

3.2.9 Κατεργασία πυρήνων με θρυψίνη.

Ο πυρήνας του PS II, με συγκέντρωση χλωροφύλλης 0.2 mgr/ml, επώαστηκε με χαμηλή συγκέντρωση θρυψίνης (0.02 mgr/ml) σε 4°C για 10 min, στο σκοτάδι. Προσθήκη αναστολέα θρυψίνης, σε τετραπλάσια συγκέντρωση από αυτήν της θρυψίνης, (0.08 mgr/ml), διακόπτει τη δράση της θρυψίνης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN. Στη συνέχεια, έγινε δεύτερη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και δεύτερη έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN. Μετά από μια τρίτη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min, το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η συγκέντρωση χλωροφύλλης και αποθηκεύθηκε σε -40°C. Τέτοιου είδους παρασκεύασμα αναφέρεται ως tr.core.

3.2.10 Κατεργασία πυρήνων με EDC.

Ο πυρήνας του PS II, με συγκέντρωση χλωροφύλλης 0.5 mgr/ml, επώαστηκε με EDC σε συγκέντρωση 10 mM σε 4°C για 60 min, στο σκοτάδι. Προσθήκη διαλύματος SMN σε τετραπλάσιο όγκο από αυτόν του μίγματος πυρήνα-EDC διακόπτει τη δράση του EDC. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN. Στη συνέχεια, έγινε δεύτερη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και δεύτερη έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN. Μετά από μια τρίτη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min, το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η

συγκέντρωση χλωροφύλλης και αποθηκεύθηκε σε -40°C . Τέτοιου είδους παρασκευάσμα αναφέρεται ως EDC-core.

3.2.11 Κατεργασία με KNO_2 .

Οι PS II-μεμβράνες, με συγκέντρωση χλωροφύλλης 0.25 mgr/ml , επώαστηκαν με διάλυμα KNO_2 σε συγκέντρωση 10mM ή 20 mM ή 50 mM σε 4°C για 60 min , στο σκοτάδι. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN. Στη συνέχεια, έγινε δεύτερη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και δεύτερη έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN. Μετά από μια τρίτη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min , το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η συγκέντρωση χλωροφύλλης και αποθηκεύθηκε σε -40°C . Τέτοιου είδους παρασκευάσματα αναφέρονται ως $\text{KNO}_2\text{-PS II}$.

3.2.12 Κατεργασία με LiClO_4 .

Οι PS II-μεμβράνες, με συγκέντρωση χλωροφύλλης 1 mgr/ml , επώαστηκαν με διάλυμα LiClO_4 σε συγκέντρωση 100mM ή 250 mM ή 500 mM ή 1M , σε 4°C για 60 min , στο σκοτάδι. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN. Στη συνέχεια, έγινε δεύτερη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min και δεύτερη έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN. Μετά από μια τρίτη φυγοκέντρωση σε 48000 g για 30 min , το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η συγκέντρωση χλωροφύλλης και αποθηκεύθηκε σε -40°C . Τέτοιου είδους παρασκευάσματα αναφέρονται ως $\text{LiClO}_4\text{-PS II}$.

3.2.13 Προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφύλλης.

Ο προσδιορισμός της χλωροφύλλης έγινε φασματοσκοπικά σύμφωνα με τη μέθοδο Arnon [236]. Για τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης κάθε δείγματος, προστέθηκαν 12.5 μl δείγματος σε 5 ml υδατικού διαλύματος $80\% \text{ v/v}$, για να εκχυλισθούν οι χλωροφύλλες από τις πρωτεΐνες. Το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε 15000 στροφές/λεπτό για να ιζηματοποιηθούν οι πρωτεΐνες. Η απορρόφηση του διαλύματος χλωροφύλλης προσδιορίστηκε σε δύο μήκη κύματος, στα 645 nm και 663 nm . Για τον υπολογισμό της ποσότητας χλωροφύλλης, οι συντελεστές απορρόφησης, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 20 και 8 για τα 645 nm και 663 nm ,

αντίστοιχα και η σχέση που δίνει τη συγκέντρωση χλωροφύλλης (mgr/ml), είναι $\{(A_{645} \cdot 20) + (A_{663} \cdot 8)\} / 5 \cdot 2$.

3.2.14 Προσδιορισμός έκλυσης οξυγόνου.

Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου των PS II δειγμάτων μετρήθηκε πολαρογραφικά με ηλεκτρόδιο τύπου Clark της εταιρείας YSI. Το ηλεκτρόδιο αποτελείται από κάθοδο λευκόχρυσου και άνοδο αργύρου με διαφορά δυναμικού 0.8 V. Το ηλεκτρόδιο καλύπτεται από μια λεπτή μεμβράνη, εκλεκτικά διαπερατή σε μικρά μόρια και ιόντα. Όταν εφαρμοστεί κατάλληλη τάση, το οξυγόνο που παράγεται από την οξείδωση του H₂O, αντιδρά στην κάθοδο, παράγοντας ηλεκτρικό ρεύμα. Το ρεύμα, αυτό είναι ανάλογο του ποσού του οξυγόνου, που διέρχεται από τη μεμβράνη. Αυτό που μετράται στην πραγματικότητα είναι η πίεση του παραγόμενου οξυγόνου. Το οξυγόνο, που παράγεται, καταναλώνεται γρήγορα στην κάθοδο, γι' αυτό μπορεί να θεωρηθεί ότι η πίεση του οξυγόνου μέσα στη μεμβράνη είναι μηδέν. Έτσι, η ταχύτητα διάχυσης του οξυγόνου μέσα στη μεμβράνη είναι ανάλογη με την απόλυτη πίεση του οξυγόνου, έξω από τη μεμβράνη. Η σχέση μεταξύ της εξωτερικής πίεσης του οξυγόνου και του ηλεκτρικού ρεύματος είναι γραμμική.

Η ρύθμιση του ηλεκτροδίου έγινε σε 25°C με απιονισμένο H₂O, που ήταν κορεσμένο σε οξυγόνο. Η κυψελίδα, που χρησιμοποιήθηκε ήταν γυάλινη με πρόσθετο γυάλινο περίβλημα, που επιτρέπει τη διέλευση H₂O, προκειμένου να διατηρείται η θερμοκρασία στους 25 °C. Το φως παραγόταν από 2 λάμπες βολφραμίου ισχύος 250 W και εστιαζόταν στο δείγμα, έτσι ώστε να δημιουργούνται συνθήκες φωτοκορεσμού. Το φως πριν φθάσει στην κυψελίδα, διέρχεται πρώτα από μια γυάλινη φιάλη μήκους 5 cm, που περιείχε διάλυμα 0.2% w/v CuSO₄. Το διάλυμα αυτό απορροφώντας τα μεγάλα μήκη κύματος, προστάτευε το δείγμα από γρήγορη θέρμανση. Στη συνέχεια, το φως διερχόταν από ένα κόκκινο πλαστικό φίλτρο, που απορροφούσε τα μικρά μήκη κύματος, για προστασία των πρωτεϊνικών δεσμών. Έτσι, το φως, που διερχόταν στην κυψελίδα με το δείγμα, κυμαινόταν σε ένα εύρος μηκών κύματος 500-700 nm. Για τις μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου, 3 ml διαλύματος SMN, 50 μM συγκέντρωσης χλωροφύλλης του εξεταζόμενου δείγματος και 290 μM DCBQ ως ηλεκτρονιοδέκτης τοποθετούνταν στην κυψελίδα. Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου προσδιορίστηκε με μέτρηση της κλίσης της καμπύλης παραγωγής οξυγόνου, που καταγράφηκε σε καταγραφικό χαρτί και εκφράζεται σε μmoles O₂/[(mgr Chl)·hr].

3.2.15 Ηλεκτροφόρηση.

Η πρωτεϊνική σύσταση των δειγμάτων εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση πλάκας πολυακρυλαμιδίου (Laemmli σύστημα), όπου σαν απορρυπαντικό χρησιμοποιήθηκε το δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (SDS), το οποίο καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε στο πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel), το οποίο παρασκευαζόταν με διαβάθμιση συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου (12%-17%). Πριν την είσοδο των πρωτεϊνών στο πήκτωμα διαχωρισμού, οι πρωτεΐνες διέρχονταν από το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel), το οποίο είχε συγκέντρωση 5% πολυακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου. Τα δύο πηκτώματα περιείχαν 4M ουρία. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες εμφανίστηκαν μετά από χρώση με διάλυμα Coomassie Blue R-250. Η συσκευή, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν Hoefer Scientific Instruments, Vertical Slab gel unit-model SE 400. Η μετακίνηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε μετά την εφαρμογή δυναμικού. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών είναι ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

3.2.16 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).

Λεπτομερέστερη μελέτη των πρωτεϊνών έχει επιτευχθεί με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετήθηκε σε φίλτρο PVDF. Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στο φίλτρο, πραγματοποιήθηκε σε συσκευή LKB 2117-250 NOVABLOT Electroforetic Transfer Kit, μετά την εφαρμογή δυναμικού. Το φίλτρο PVDF επώαστηκε σε διάλυμα αντισώματος της προς μελέτη πρωτεΐνης για ένα βράδυ. Στη συνέχεια, μετά από εκπλύσεις του φίλτρου, το φίλτρο επώαστηκε για 1 ώρα σε διάλυμα 2^{ου} αντισώματος το οποίο περιείχε το ένζυμο HRP, που είναι μια υπεροξειδάση και αντιδρά με το διάλυμα εμφάνισης, το οποίο αποτελείται από 0.01 M Tris-HCl (pH=7.5), διαμινοβενζιδίνη, CoCl₂ και H₂O₂. Μετά την εμφάνιση των πρωτεϊνών, το φίλτρο φυλάχτηκε προστατευόμενο από φως.

3.2.17 Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR).

Η φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία δωματίου έγινε με φασματοφωτόμετρο EPR της εταιρείας BRUCKER τύπου ER 200D (X-band, συχνότητα=9.5 GHz). Μια γυάλινη κυψελίδα χρησιμοποιήθηκε για την τοποθέτηση του δείγματος. Τα πειραματικά δεδομένα, που παρουσιάζονται, πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου 100 kHz. Το παραγόμενο σήμα συλλεγόταν και επεξεργαζόταν με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Με φασματοσκοπία EPR εξετάστηκε το σήμα Π_s της τυροσίνης D, όπως και ο ποσοτικός προσδιορισμός του Mn. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του Mn, τα δείγματα (0.5 ml) επώστηκαν με 5 ml πυκνού HCl οξέος για 5 min στους 37°C, με αποτέλεσμα την καταστροφή του συμπλόκου του Mn και την απελευθέρωσή του με τη μορφή $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, που δίνει χαρακτηριστικό σήμα με 6 κορυφές.

Η φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία ηλίου έγινε με φασματοφωτόμετρο EPR JOEL ME-3X (X-band) εφοδιασμένο με κρυοστάτη της εταιρείας Oxford ESR-900 και κυλινδρική κοιλότητα συντονισμού. Τα πειραματικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

3.2.18 Φασματοσκοπία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

Οι μετρήσεις οπτικής φασματοσκοπίας έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου, σύμφωνα με τη διαδικασία, που περιγράφεται στην αναφορά [237]. Οι παλμοί φωτός παρήχθησαν με σύστημα laser Nd-YAG. Τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Η στοιχειομετρία και η ταχύτητα απελευθέρωσης H^+ έγινε με μετρήσεις κινητικής φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους. Για την έκλυση H^+ χρησιμοποιήθηκαν μια αμφίφιλη και μια υδρόφιλη χρωστική. Η αμφίφιλη χρωστική Neutral Red (NR) απορροφάται από τη μεμβράνη και δείχνει την κινητική της έκλυσης H^+ . Οι υδρόφιλες χρωστικές Bromocresol purple (BCP) για $\text{pH} < 7.3$ και cresol red για $\text{pH} > 7.3$ χρησιμοποιήθηκαν στο διάλυμα επαναίωσης και με μετρήσεις κινητικής εξήχθησαν πληροφορίες για την απελευθέρωση H^+ . Η διαδικασία, που ακολουθήθηκε, περιγράφεται στις αναφορές [215,216,217]

4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΡΥΨΙΝΗΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ II.

4.1 Εισαγωγή

Η **θρυψίνη** είναι ένα από τα περισσότερο χρησιμοποιημένα πρωτεολυτικά ένζυμα, λόγω της εξειδικευμένης ικανότητάς της να διασπά πεπτιδικούς δεσμούς μετά το καρβοξυτέλος μιας λυσίνης ή μιας αργινίνης. Γενικά, το 12% των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης είναι λυσίνες και αργινίνες. Έτσι, η επιλογή της θρυψίνης ως πρωτεολυτικό ένζυμο μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή και τη λειτουργία του πρωτεϊνικού συμπλόκου.

Η επίδραση της θρυψίνης στις πρωτεΐνες και την ηλεκτρονιακή ροή έχει μελετηθεί τόσο σε θυλακοειδή όσο και σε PS II μεμβράνες [187]. Σε δείγματα επεξεργασμένα με θρυψίνη παρατηρείται ελαττωμένη ικανότητα έκλυσης οξυγόνου, καθώς και εκλεκτική διάσπαση πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η θρυψίνη είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση της αρχιτεκτονικής των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη λειτουργία του συμπλόκου οξειδωσης του H₂O.

Οι συνέπειες της επεξεργασίας PS II δειγμάτων με θρυψίνη έχουν μελετηθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η θρυψίνη τροποποιεί τόσο την αναγωγική όσο και την οξειδωτική πλευρά του PS II, όμως τα αποτελέσματα εξαρτώνται από το pH [187]. Έτσι, ενώ η αναγωγική πλευρά τροποποιείται σε ένα εύρος pH μεταξύ 5.5 και 9.0, η καταστροφή της οξειδωτικής πλευράς (ικανότητα έκλυσης O₂) από την θρυψίνη συμβαίνει σε pH > 7.25. Ο ρόλος της θρυψίνης στη λειτουργική ακεραιότητα του συμπλόκου έκλυσης του O₂ σε pH = 6.5 δε μπορεί να αποδοθεί στην προσβολή των εξωτερικών πρωτεϊνών (17, 23 και 33 kDa), οι οποίες διασπώνται μετά από την επεξεργασία με υψηλές συγκεντρώσεις θρυψίνης, ενώ η ικανότητα έκλυσης O₂ παραμένει σχεδόν ανεπηρέαστη.

Επεξεργασία του PS II με θρυψίνη, προκαλεί σχάση της 33 kDa πρωτεΐνης, δίνοντας ένα θραύσμα 15 kDa [187, 189]. Το ποσοστό του θραύσματος αυτού και η περιεκτικότητα του επεξεργασμένου PS II σε Mn σχετίζονται με την ικανότητα έκλυσης O₂. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στην οξειδωτική πλευρά συμβαίνουν τροποποιήσεις, οι οποίες εξαρτώνται από το pH και κάνουν ορισμένες πρωτεΐνες προσιτούς στόχους για την θρυψίνη. Το θραύσμα αυτό έχει προταθεί [189] ότι περιέχει τη θέση δέσμευσης της 33 kDa

στο PS II, αφού παραμένει δεσμευμένο στο PS II μετά από επεξεργασία με θρυψίνη. Η παρατήρηση αυτή δεν μπορεί, βέβαια, να αποκλείσει την πιθανότητα ότι υπάρχουν κι άλλα μικρότερα θραύσματα προσδεμένα στο PS II τα οποία λόγω του μεγέθους τους δε μπορούν να ανιχνευθούν με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης.

Έχει παρατηρηθεί ότι η CP 47 πρωτεΐνη είναι αρκετά ευαίσθητη σε επεξεργασία με θρυψίνη [190], όταν η 33 kDa πρωτεΐνη απομακρύνεται από το PS II. Το γεγονός ότι η 33 kDa προστατεύει τη CP 47 από πρωτεόλυση, φανερώνει τη γειτονική θέση των δύο πρωτεϊνών στο PS II.

Η απουσία της 33 kDa καθιστά, επίσης, τη CP 43 πρωτεΐνη προσιτή στην θρυψίνη [191, 192]. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η απομάκρυνση της 33 kDa από το PS II, έχει σαν αποτέλεσμα τη σχάση της CP 43 μετά το αμινοξύ ³⁵⁷Arg. Επιπλέον, παρατηρείται σχάση της α-υπομονάδας του cyt b₅₅₉ μετά την ⁵⁷Arg. Πειράματα επανασύνδεσης, έδειξαν ότι η επανασύνδεση της 33 kDa πρωτεΐνης σε PS II- μεμβράνες, οι οποίες είχαν υποστεί επεξεργασία με θρυψίνη, μειώνεται παράλληλα με την παρατηρούμενη θραυσματοποίηση της CP 43 και του cyt b₅₅₉. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι η μία ή και οι δύο από αυτές τις πρωτεΐνες χρειάζονται για την επανασύνδεση της 33 kDa στο φωτοσύστημα II.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα εκλεκτικής διάσπασης των πρωτεϊνών του PS II με τη χρήση του πρωτεολυτικού ενζύμου της θρυψίνης. Για την εκλεκτική πρωτεόλυση χρησιμοποιήθηκαν μικρές συγκεντρώσεις θρυψίνης τόσο σε PS II μεμβράνες όσο και σε PS II-cores, πυρήνες δηλαδή του PS II σε αντίθεση με προηγούμενες εργασίες, όπου οι συγκεντρώσεις θρυψίνης που χρησιμοποιούνταν ήταν μεγαλύτερες. Η φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού, η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους, η ηλεκτροφόρηση, η ανοσοαποτύπωση και η πολυρογραφική μέτρηση ρυθμών παραγωγής O₂ είναι χρήσιμα εργαλεία για τη μελέτη και το χαρακτηρισμό των συστημάτων αυτών.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

Επεξεργασία με θρυψίνη έχει πραγματοποιηθεί τόσο σε PS II-μεμβράνες, όσο και σε πυρήνες του PS II (PS II-cores). Η πρωτεολυτική κατεργασία έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.9. Η πρωτεϊνική ανάλυση των διαφόρων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, με τη

μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.15. Η ανίχνευση των θραυσμάτων, που προέρχονται από την πρωτεόλυση έγινε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.16. Οι ταχύτητες έκλυσης O₂ μετρήθηκαν με ηλεκτρόδιο οξυγόνου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.14. Ο αριθμός ιόντων Mn στα δείγματα προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία EPR, σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.17. Με φασματοσκοπία EPR ελέγχεται, επίσης, η λειτουργία του PS II στην οξειδωτική και την αναγωγική πλευρά σύμφωνα με τις παραγράφους 3.2.17. Η στοιχειομετρία και οι κινητικές έκλυσης H⁺ υπολογίστηκαν σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.18. Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας EPR σε χαμηλές θερμοκρασίες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Δρ. Πετρουλέα, στο Δημόκριτο. Τα πειράματα για την έκλυση H⁺ πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του καθηγητή Junge στο Osnabrueck της Γερμανίας.

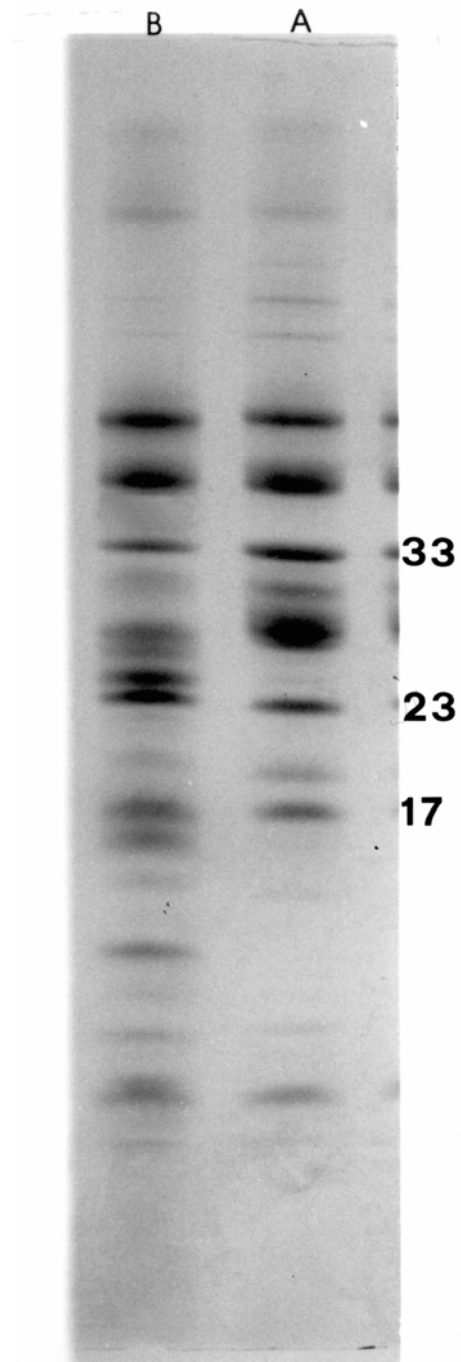
4.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Τα παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις επεξεργασίες με θρυψίνη ήταν τα εξής: PSII-μεμβράνες, HM-core, OTG-core, OGP-core και sub-core. Τα δείγματα αυτά μελετήθηκαν με βιοχημικές, φασματοσκοπικές και πολωρογραφικές τεχνικές. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το HM-core, το οποίο είναι ένα σύμπλοκο που απομονώθηκε με διαλυτοποίηση των PSII-μεμβρανών με το απορρυπαντικό HECAMEG. Το σύμπλοκο αυτό εκλύει οξυγόνο με υψηλούς ρυθμούς, διατηρεί τις τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες και παρουσιάζει στοιχειομετρία έκλυσης H⁺ 1:1:1:1.

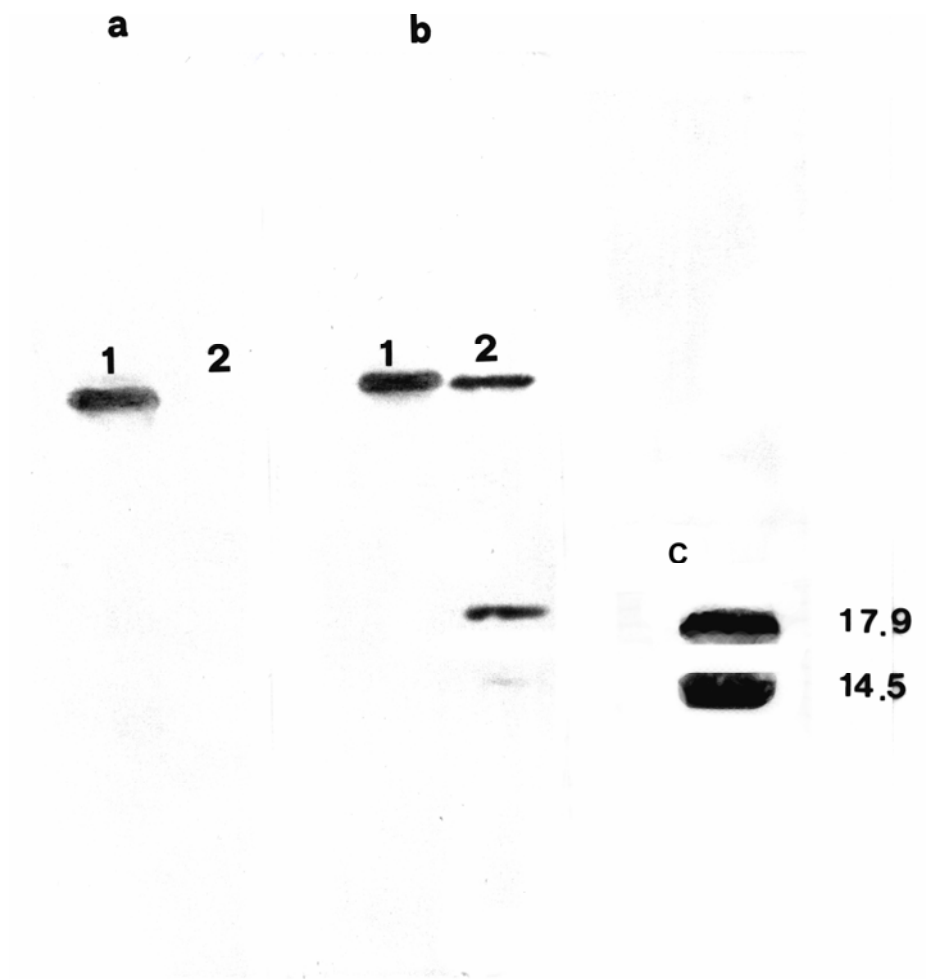
Στο Σχ. 37 φαίνεται η πολυπεπτιδική σύσταση του HM-core και του επεξεργασμένου με θρυψίνη HM-core. Στις συνθήκες, που πραγματοποιήθηκε η κατεργασία με τη θρυψίνη [193], πρωτεόλυση υπέστησαν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες D1 και D2, ενώ οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17, 23 και 33 kDa παραμένουν ανεπηρέαστες. Προκειμένου να ανιχνευθούν τα θραύσματα που προκύπτουν από την πρωτεόλυση και κατά συνέπεια, να εντοπισθούν οι ακριβείς θέσεις που η θρυψίνη κόβει τις πρωτεΐνες, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχ. 38. Επειδή το αντίσωμα της D1, που αναγνωρίζει το αμινοτελικό άκρο δεν κατάφερε να αναγνωρίσει κανένα θραύσμα, χρησιμοποιήθηκε ένα άλλο αντίσωμα της D1, το οποίο κατάφερε να ανιχνεύσει 2 θραύσματα, με μοριακά βάρη 14.5 kDa και 17.9 kDa, περίπου. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι, οι συγκεκριμένες συνθήκες πρωτεόλυσης οδηγούν στη σχάση της D1 πρωτεΐνης σε δύο

τουλάχιστον θέσεις, μία κοντά στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και μία μεταξύ των διαμεμβρανικών ελίκων II και III.

Στον Πίνακα I παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού του HM-core και του tr. HM-core.



Σχήμα 37: Πολυπεπτιδική σύσταση των (α) HM-core και (β) tr.HM-core



Σχήμα 38: Ανοσοαποτυπώματα για την πρωτεΐνη D1 σε (1) HM-core και (2) tr. HM-core

a. αντίσωμα που αναγνωρίζει το αμινοτελικό άκρο της D1

b. αντίσωμα που αναγνωρίζει άλλη περιοχή της D1

c. όπως το (b), αλλά σε υπερφορτωμένο gel, όπου ανιχνεύονται τα δύο θραύσματα της D1

Οι ρυθμοί παραγωγής O_2 στο HM-core και το tr. HM-core έχουν υπολογιστεί πολωρογραφικά, χρησιμοποιώντας σαν τεχνητούς ηλεκτρονιοδέκτες τη λιποδιαλυτή ένωση DCBQ και την υδατοδιαλυτή $Fe(CN)_6^{3-}$. Είναι φανερό ότι το $Fe(CN)_6^{3-}$ έχει αρκετά μικρότερη δραστηριότητα από το DCBQ. Στον Πίνακα I, φαίνεται ότι η θρυψίνη, διασπώντας εκλεκτικά τις μεμβρανικές πρωτεΐνες D1 και D2, ελαττώνει την ενεργότητα στο 62%, σε σύγκριση με το HM-core. Επεξεργασία του HM-core με χαμηλή συγκέντρωση θρυψίνης δε φαίνεται να επηρεάζει την αναγωγική πλευρά. Το αποτέλεσμα αυτό προκύπτει από το γεγονός

ότι η ενεργότητα χάνεται με την παρουσία του DCMU, το οποίο δρα ως ζιζανιοκτόνο και διακόπτει τη ροή e^- από την Q_A στην Q_B . Η διαπίστωση, ότι το DCBQ είναι καλύτερος ηλεκτρονιοδέκτης από το $Fe(CN)_6^{3-}$ και ότι το DCMU επιδρά ανασταλτικά στην ηλεκτρονιακή ροή, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πλευρά αναγωγής του PS II λειτουργεί «κανονικά».

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι

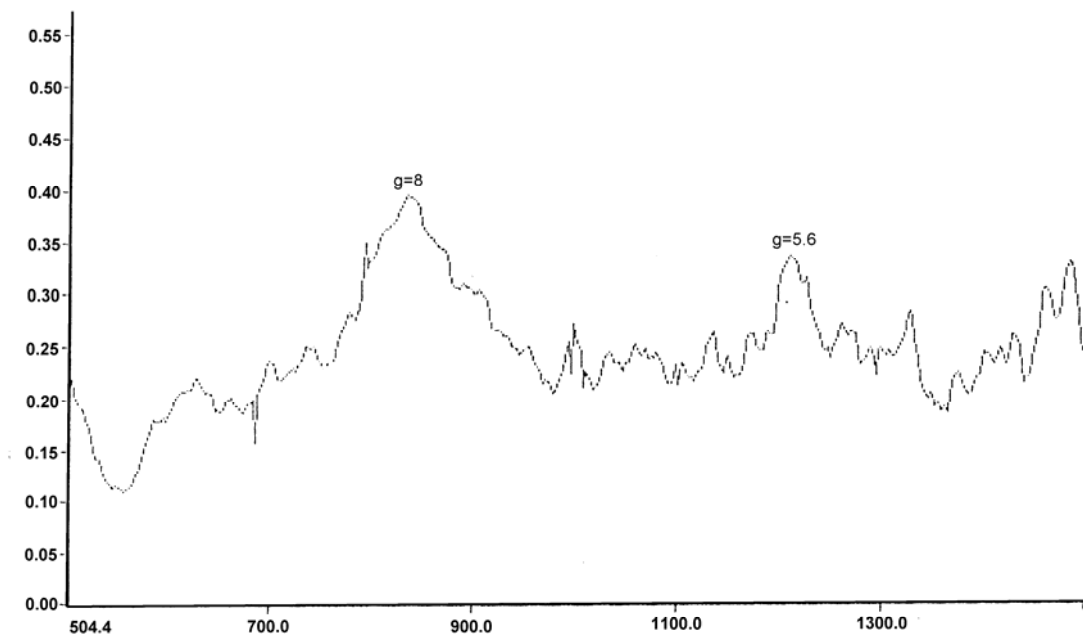
	<u>Δείγματα</u>	
	HM-core	tr. HM-core
i) Περιεκτικότητα σε Mn	4Mn/TyrD ⁺	4Mn/TyrD ⁺
ii) V_{O_2} ($\mu\text{moles } O_2 / \text{mgr Chl} \cdot \text{hr}$) (με την προσθήκη)		
300 μM DCBQ	1070 (99%)	670 (62,6%)
300 μM DCBQ +10mM $CaCl_2$	1080 (100%)	680 (63%)
300 μM DCBQ +10mM $CaCl_2$ +5 μM DCMU	250 (23%)	180 (17%)
2mM $Fe(CN)_6^{3-}$	380 (35%)	220 (20%)
2mM $Fe(CN)_6^{3-}$ +10mM $CaCl_2$	580 (54%)	470 (43%)
2mM $Fe(CN)_6^{3-}$ +10mM $CaCl_2$ +5 μM DCMU	170 (16%)	150 (14%)
iii) Στοιχειομετρία έκλυσης H^+	0.96:0.96:0.9:1.12	1.0:0.92:1.08:1.0

Η αναγωγική πλευρά στο HM-core και το tr. HM-core, μελετήθηκε και με φασματοσκοπία EPR σε χαμηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τα σήματα της Q_A και του ανόργανου Fe³⁺. Το μόνο σήμα που επηρεάζεται, είναι το σήμα του Fe³⁺ μετά την επεξεργασία με τη θρυψίνη. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια μετατόπιση στην κορυφή που εμφανίζεται σε g=8 στα ανεπεξέργαστα δείγματα, στο g=8,28 στα δείγματα που είχαν υποστεί κατεργασία με θρυψίνη, ενώ η κορυφή που εμφανίζεται στα g=5.6 που υπάρχει στα ακατέργαστα δείγματα, σχεδόν χάνεται από το φάσμα του κατεργασμένου με θρυψίνη πυρήνα. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στα Σχ. 39 και Σχ. 40. Η μετατόπιση, που παρατηρείται μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του ανόργανου Fe³⁺, μετά την κατεργασία με τη θρυψίνη.

Η μελέτη της οξειδωτικής πλευράς του HM-core και του tr. HM-core, πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία EPR. Όπως φαίνεται στο Σχ. 41, η ηλεκτρονιακή μεταφορά από το σύμπλοκο του Mn στην TyrZ⁺ δε παρεμποδίζεται μετά από την ήπια επεξεργασία με τη θρυψίνη.

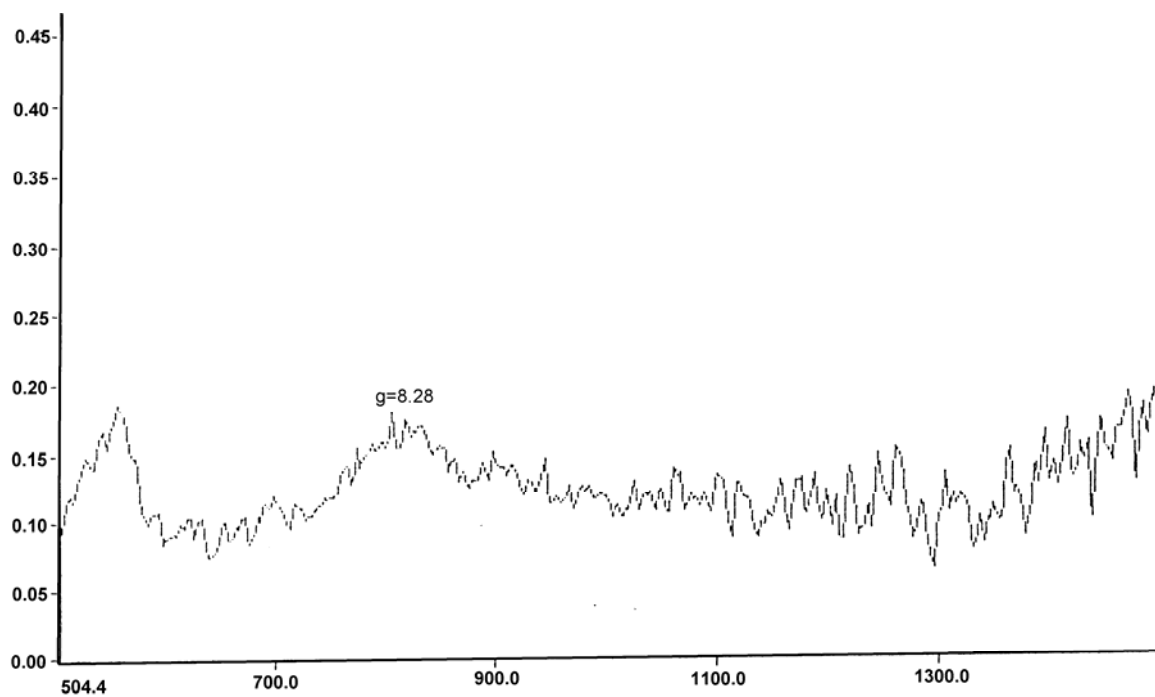
Με φασματοσκοπία EPR προσδιορίστηκε επίσης ο αριθμός των Mn στο HM-core και το tr. HM-core. Όπως φαίνεται στον Πίνακα I και στο Σχ. 42, η περιεκτικότητα σε Mn δε μειώνεται κατά την κατεργασία με τη θρυψίνη.

Επιπλέον, στα Σχ. 43 και Σχ. 44 παρουσιάζονται τα σήματα multiline για το HM-core και το tr. HM-core, από τα οποία προκύπτει ότι η επεξεργασία με τη θρυψίνη δεν τροποποιεί το σήμα multiline, που προκύπτει από την S₂ κατάσταση του συμπλόκου του Mn.



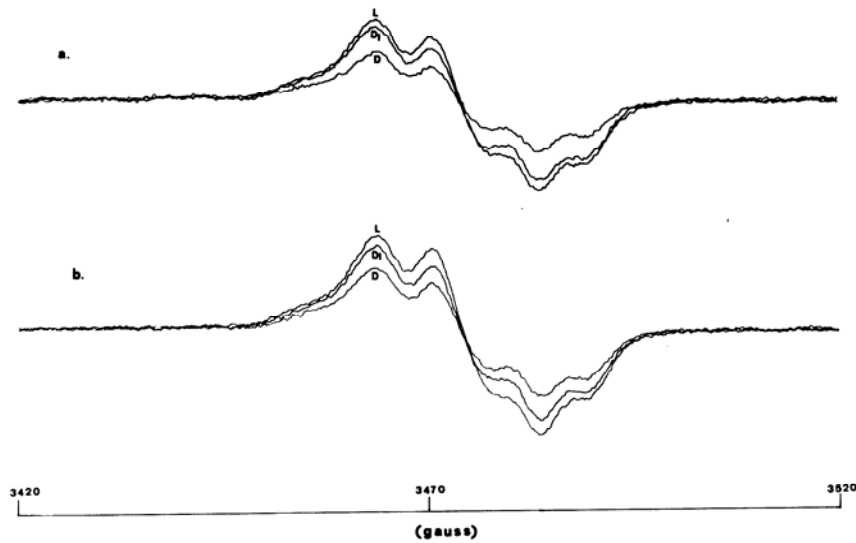
T=4.3K Att=8dB mod.amp. =16.00 Gpp $\nu=9.421091$ GHz

Σχήμα 39: EPR-φάσμα του $Fe^{3+}Q_A$ σε HM-core

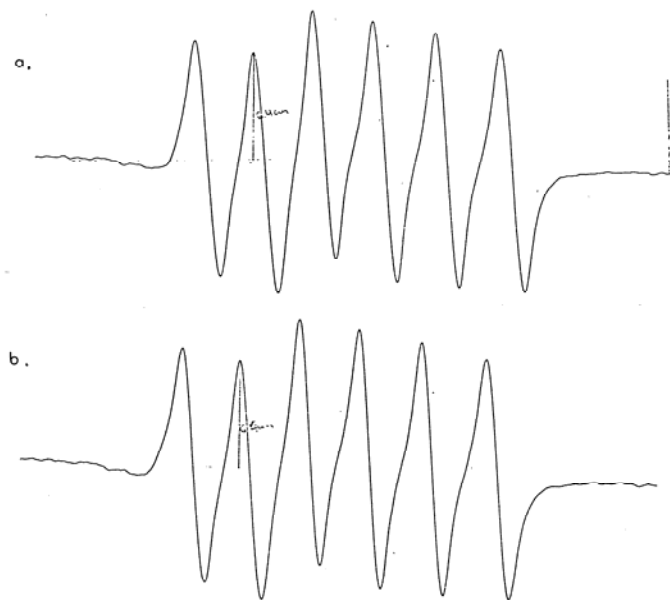


T=4.3K Att=8dB mod.amp. =16.00 Gpp $\nu=9.421091$ GHz

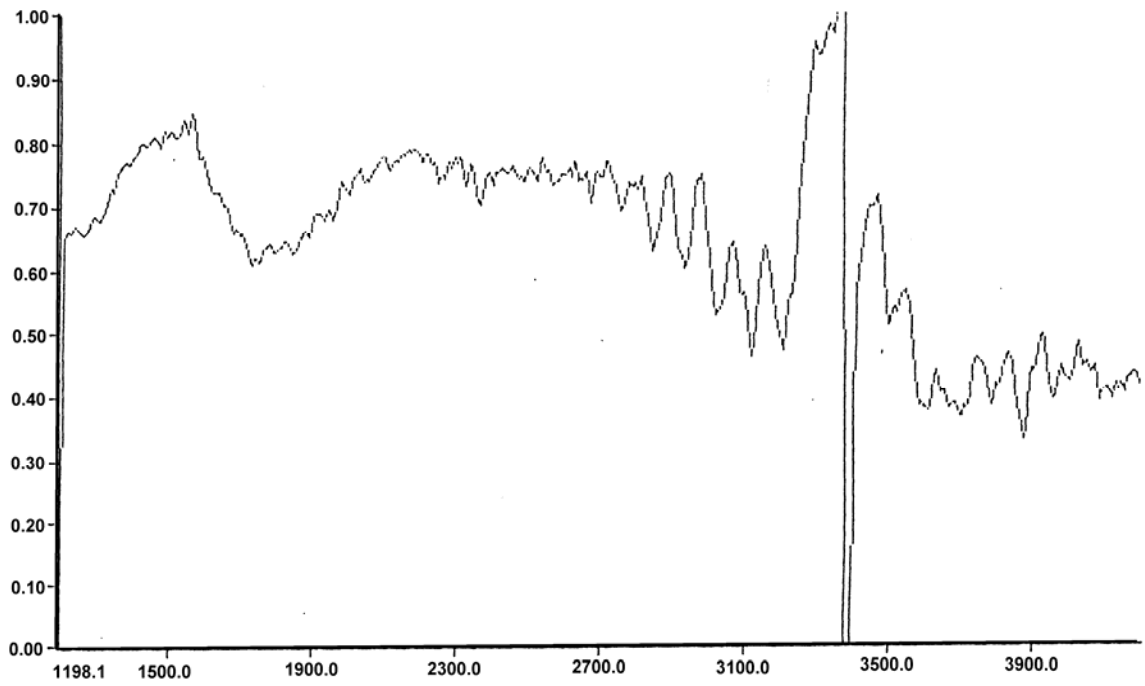
Σχήμα 40: EPR-φάσμα του $Fe^{3+}Q_A$ σε tr.HM-core



Σχήμα 41: EPR-φάσμα σε (a) HM-core και (b) tr. HM-core
 Φασματοσκοπικές συνθήκες:
 Μικροκυματική ισχύς = 9.5 GHz
 Συχνότητα ρυθμιστικού πεδίου = 100 kHz
 Πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου = 4 Gs
 Εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο : 3420-3970 Gs
 Θερμοκρασία = 20°C

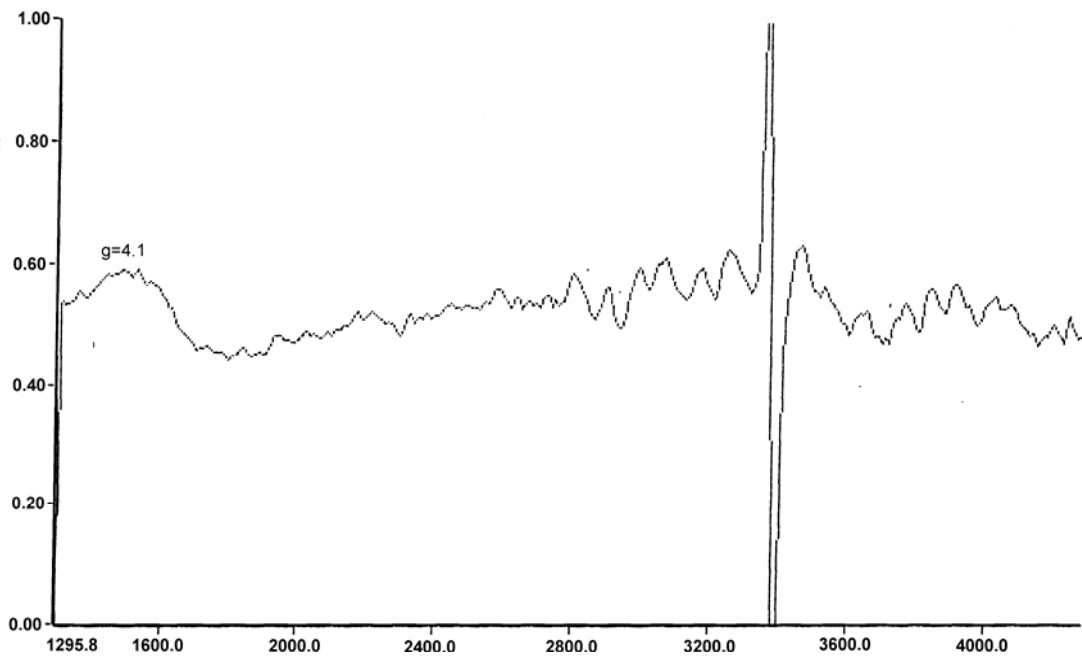


Σχήμα 42: EPR-φάσμα του διασθενούς μαγγανίου $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ σε (a) HM-core και (b) tr. HM-core για τον προσδιορισμό αριθμού μαγγανίων
 Φασματοσκοπικές συνθήκες:
 Μικροκυματική ισχύς = 9.5 GHz
 Συχνότητα ρυθμιστικού πεδίου = 100 kHz
 Πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου = 10 Gs
 Εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο : 2200-4200 Gs
 Θερμοκρασία = 20°C



T=11.0K Att=8dB mod.amp. =16.00 Gpp ν =9.426832 GHz

Σχήμα 43: EPR-φάσμα multiline σε HM-core



T=13.0K Att=8dB mod.amp. =16.00 Gpp ν =9.425956 GHz

Σχήμα 44: EPR-φάσμα multiline σε tr.HM-core

Από τις μετρήσεις έκλυσης O₂ στον Πίνακα I, φαίνεται ακόμα ότι η προσθήκη CaCl₂ δεν επιφέρει καμιά αλλαγή στην ενεργότητα, κατά την κατεργασία με τη θρυψίνη, γεγονός που ενισχύει την παρατήρηση ότι οι πρωτεΐνες 17 και 23 kDa δεν επηρεάζονται από τη θρυψίνη.

Στην παράγραφο 1.8 αναφέρθηκε ότι οι PS II-μεμβράνες και το PS II-core παρουσιάζουν διαφορετικές στοιχειομετρίες απελευθέρωσης H⁺. Το PS II-core, στο οποίο αναφέρονται οι μετρήσεις αυτές, δεν είχε τις εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκαν τα δείγματα HM-core και tr. HM-core ως προς τη στοιχειομετρία και τις κινητικές απελευθέρωσης H⁺. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχ. 45 και συνοπτικά στον Πίνακα I. Η στοιχειομετρία στο HM-core είναι σχεδόν 1:1:1:1 και δε μεταβάλλεται από την κατεργασία με χαμηλή συγκέντρωση θρυψίνης. Οι κινητικές για την έκλυση H⁺ είναι για το HM-core μονοφασική (256 msec) και για το tr. HM-core μονοφασική (17 msec).

Σε ανάλογα αποτελέσματα οδήγησαν τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε PS II-μεμβράνες, OTG-core και OGP-core, όπως και στο υποσύμπλοκο του HM-core, το sub-core, που προκύπτει με διαλυτοποίηση του HM-core με το απορρυπαντικό DM και υπερφυγοκέντρωση.

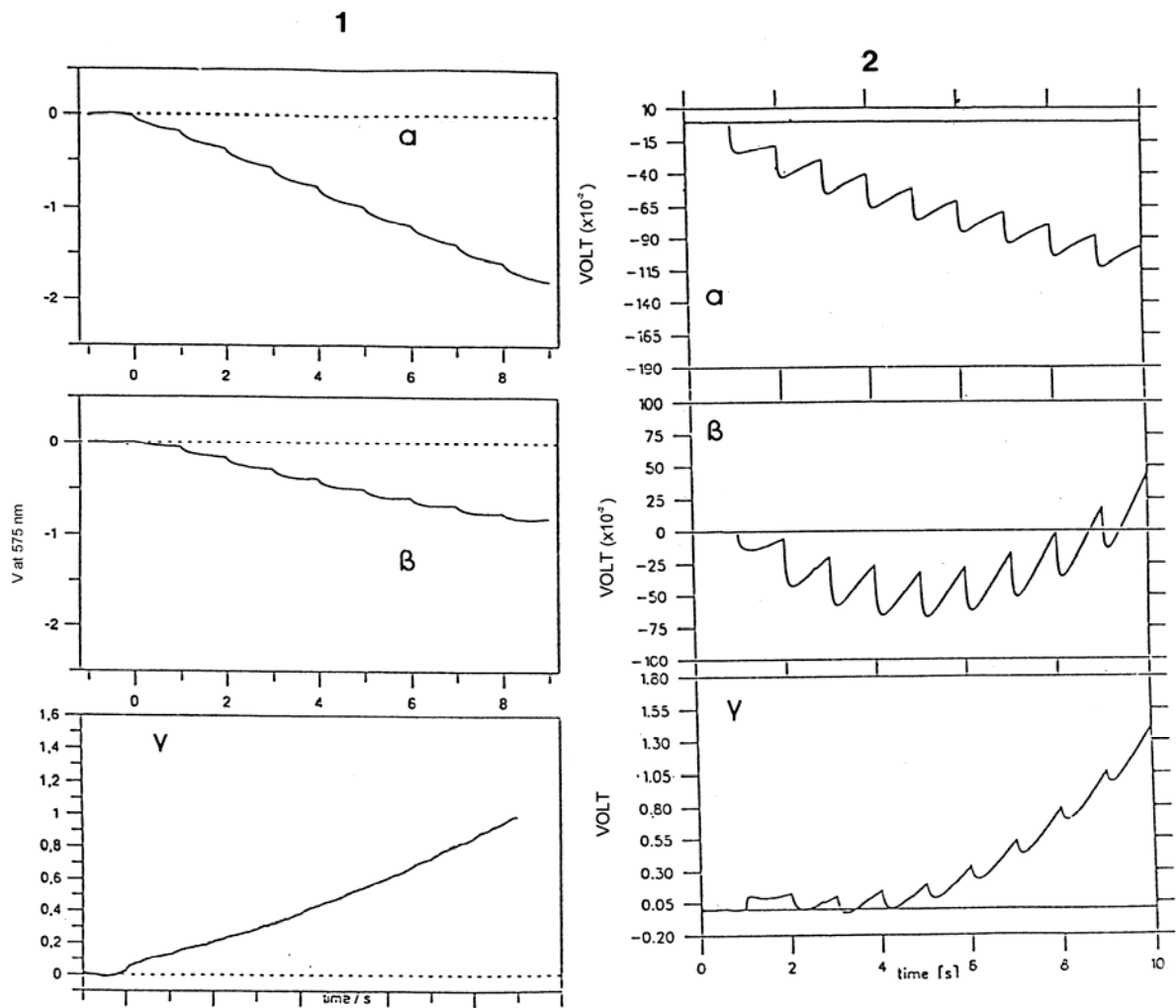
Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι, η κατεργασία του PS II με χαμηλές συγκεντρώσεις θρυψίνης οδηγεί σε εκλεκτική πρωτεόλυση της D1 πρωτεΐνης, με παράλληλη μείωση της ταχύτητας έκλυσης O₂. Αυτή η μείωση της ενεργότητας θα μπορούσε εύκολα να ερμηνευθεί αν η μεταφορά ηλεκτρονίων παρεμποδιζόταν στην οξειδωτική ή την αναγωγική πλευρά. Κάτι τέτοιο, όμως, δεν παρατηρείται, σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, που προαναφέρθηκαν. Έτσι, μελετήθηκε η ευαισθησία του συμπλόκου πριν και μετά την ήπια κατεργασία με θρυψίνη ως προς τη θερμοκρασία. Μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου έδειξαν ότι το κατεργασμένο με θρυψίνη δείγμα χάνει την ενεργότητά του όταν επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αντίθετα το μη κατεργασμένο με θρυψίνη δείγμα διατηρεί το 65 % της ενεργότητας, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ταχύτητες έκλυσης O₂ πριν την επώαση στη θερμοκρασία δωματίου. Αυτό δείχνει ότι η κατεργασία με τη θρυψίνη, κάνει τα δείγματα ευαίσθητα στην αύξηση της θερμοκρασίας, χωρίς όμως να επηρεάζεται η περιεκτικότητά τους σε μαγγάνιο.

Παρά το γεγονός ότι οι εξωτερικές πρωτεΐνες κατέχουν περιφερειακές θέσεις στο σύμπλοκο, η πρωτεόλυση ξεκινά από τις μεμβρανικές D1 και D2 πρωτεΐνες. Αυτό σημαίνει

ότι οι θέσεις στις οποίες θραυσματοποιούνται οι δύο αυτές πρωτεΐνες, είναι πιο προσιτοί στόχοι για το πρωτεολυτικό ένζυμο και επομένως, οι εξωτερικές πρωτεΐνες, ίσως μετά την κατεργασία με την θρυψίνη, να έχουν μια διαμόρφωση τέτοια, ώστε να προστατεύονται από την πρωτεόλυση.

Πειράματα με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θρυψίνης οδηγούν στην πρωτεόλυση και άλλων πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων είναι και οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa, οι οποίες έχουν αρκετά κατάλοιπα Lys και Arg. Αξίζει, μάλιστα, να σημειωθεί ότι τα θραύσματα των δύο αυτών πρωτεϊνών, που προκύπτουν από την κατεργασία με τη θρυψίνη, συμπίπτουν όταν οι πρωτεΐνες είναι συνδεδεμένες με τον πυρήνα και όταν είναι ελεύθερες σε διάλυμα (Σχ. 46,47,48).

Τέλος, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η έκλυση πρωτονίων δεν επηρεάζεται από την παρουσία ή την απουσία των εξωτερικών πρωτεϊνών 17, 23 και 33 kDa, διατηρώντας τη στοιχειομετρία 1:1:1:1 κατά τον κύκλο των S-καταστάσεων. Η στοιχειομετρία αυτή δεν επηρεάζεται, επίσης, από την κατεργασία με τη θρυψίνη.

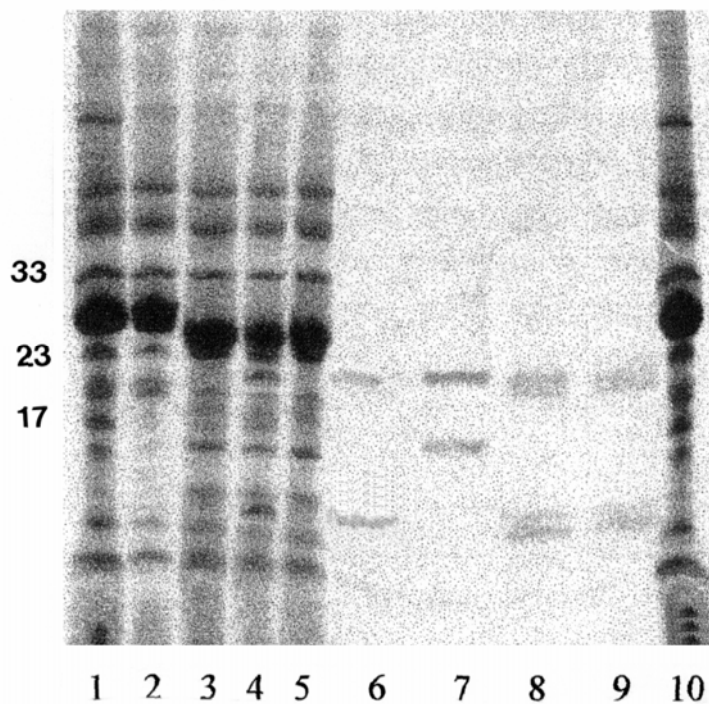


Σχήμα 45: Φάσματα απελευθέρωσης H^+ σε (1) HM-core και (2) tr.HM-core

(α) Παλμικός φωτισμός

(β) Σκοτάδι

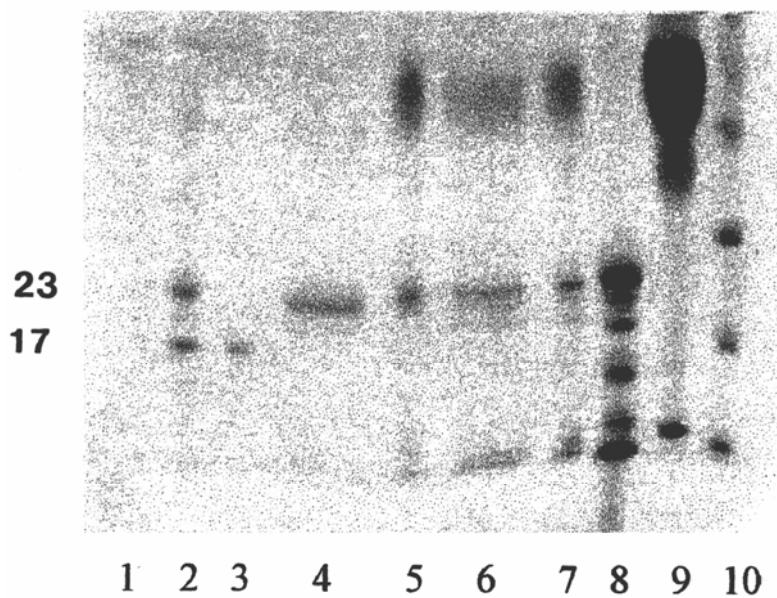
(γ) Διαφορά των (β) - (α)



Σχήμα 46:

Ηλεκτροφόρηση

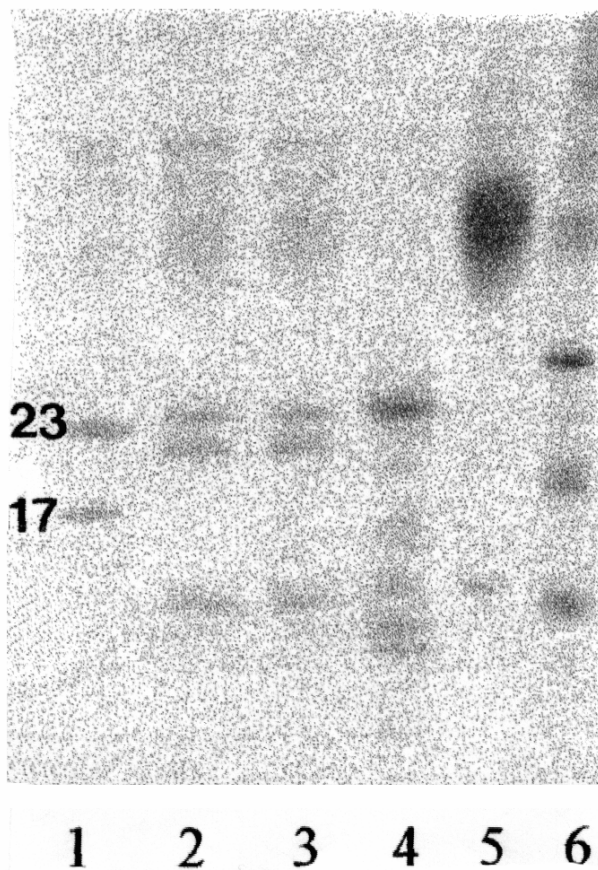
1. PS II
2. h.s.-PS II
3. tr. h.s.-PS II
4. tr. PS II
5. h.s.-tr. PS II
6. Υπερκείμενο του h.s.-tr. PS II
7. 17 kDa, 23 kDa
8. tr. (17,23)
9. tr (17,23)
10. PS II



Σχήμα 47:

Ηλεκτροφόρηση

1. —
2. 17 kDa, 23 kDa
3. 17 kDa
4. 23 kDa
5. tr. 17
6. tr. 23
7. tr. (17,23)
8. Θρυψίνη
9. αναστολέας θρυψίνης
10. μάρτυρας M.B.



Σχήμα 48:

Ηλεκτροφόρηση

1. 17 kDa, 23 kDa

2. tr. (17,23)

3. tr. (17,23)

4. Θρυψίνη

5. Αναστολέας

θρυψίνης

6. μάρτυρας M.B.

5. ΤΟΠΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ II ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗΣ (cross-linker) EDC.

5.1 Εισαγωγή

Η οργάνωση των πρωτεϊνών στον πυρήνα του PS II μελετάται από πολλές ερευνητικές ομάδες. Μέχρι σήμερα, η δομή του PS II για τα ανώτερα φυτά δεν έχει λυθεί και τα περισσότερα μοντέλα που προτείνονται στηρίζονται στη δομή του κέντρου αντίδρασης των μωβ βακτηρίων. Ένας έμμεσος τρόπος για να μελετηθεί η τοπολογία των πρωτεϊνών του πυρήνα του PS II είναι η χρήση των αντιδραστηρίων πρωτεϊνικής διασύνδεσης (cross-linkers). Μια σειρά από cross-linkers έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να μελετηθεί η σχετική θέση των πρωτεϊνών μέσα στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο και η αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Ένα από τα cross-linkers που έχει χρησιμοποιηθεί είναι το ομοδιλειτουργικό hexamethylene-diisocyanate (HMDI) που μπορεί να συνδέσει πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται σε απόσταση 11 Å. Έχει βρεθεί ότι η 33 kDa βρίσκεται σε απόσταση μικρότερη των 11 Å από την α-υπομονάδα του cyt b₅₅₉ και την psb I πρωτεΐνη, προτείνοντας ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορεί να έχουν δομικό ρόλο, συμβάλλοντας στη σύνδεση της 33 kDa με το PS II [195]. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι τόσο η α-υπομονάδα του cyt b₅₅₉, όσο και η psb I πρωτεΐνη είναι διαμεμβρανικές και διαθέτουν αμινοξέα, που μπορούν να αντιδράσουν με τη μία λειτουργική ομάδα του HMDI, ενώ η άλλη λειτουργική ομάδα του cross-linker αντιδρά με την 33 kDa. Ένα άλλο προϊόν που προκύπτει με την επεξεργασία με HMDI, σε αλκαλικές συνθήκες, θεωρείται ότι σχηματίζεται από την ε-αμινομάδα της ³Lys της psb I και την αμινοτελική α-αμινομάδα της α-υπομονάδας του cyt b₅₅₉ [196].

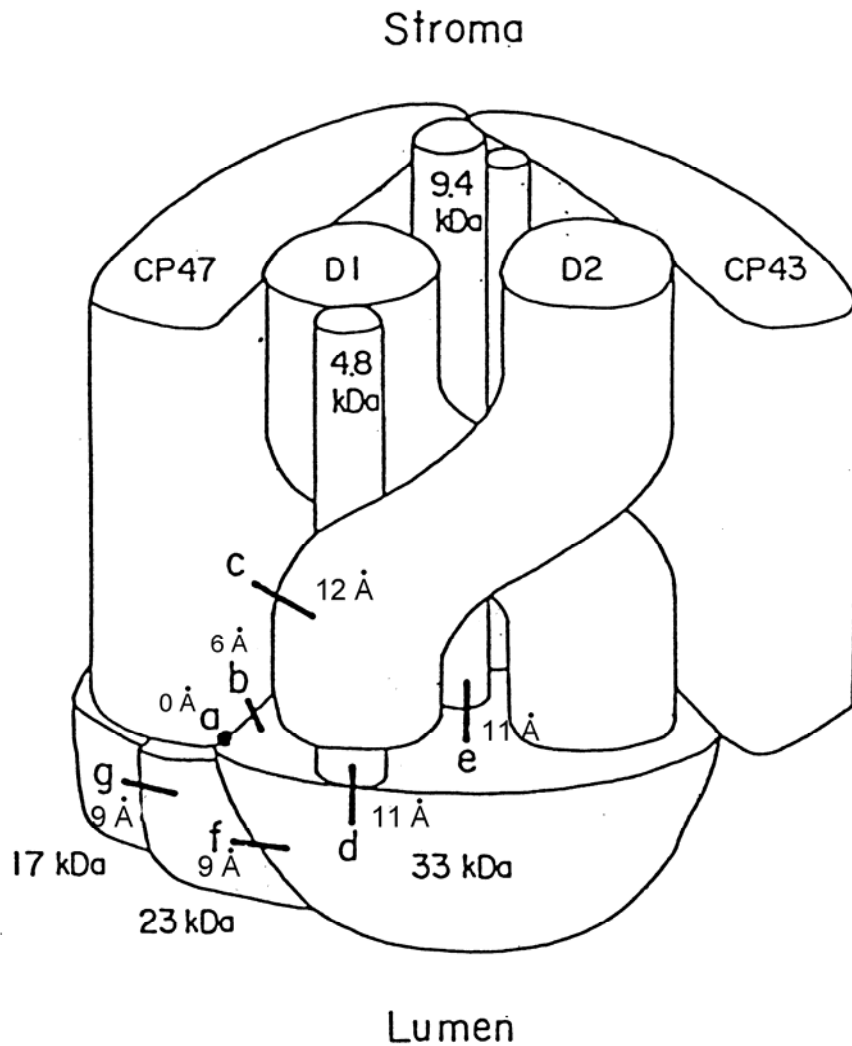
Ένα άλλο είδος ομοδιλειτουργικών cross-linkers, που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της τοπολογίας των πρωτεϊνών του PS II είναι οι δισουξινιμιδικοί εστέρες (dissuccinimidyl esters), με ανθρακικές αλυσίδες, των οποίων το μήκος ποικίλλει από 6-11 Å. Επεξεργασία του PS II με τέτοιου είδους cross-linkers, έχει σαν αποτέλεσμα [197] το σχηματισμό προϊόντων, που προκύπτουν από τη CP 47 και την 33 kDa σε απόσταση μικρότερη των 6 Å, από την 33 kDa με την 23 kDa σε απόσταση 6-11 Å και από την 23 kDa με την 17 kDa σε απόσταση 11 Å. Από τα αποτελέσματα αυτά προτείνεται ότι οι τρεις

εξωτερικές πρωτεΐνες 33, 23 και 17 kDa είναι οργανωμένες σαν ένα ξεχωριστό κομμάτι, το οποίο τοποθετείται περιφερειακά γύρω από το PS II στο lumen και αλληλεπιδρά με το υπόλοιπο PS II μέσω της 33 kDa, η οποία αλληλεπιδρά με την CP 47. Αλληλεπίδραση των δύο μικρών εξωτερικών πρωτεϊνών με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες δε φαίνεται να προκύπτει από αυτό το είδος των cross-linkers.

Το 3,3 dithiobis(succinimidyl propionate), (DSP), είναι ένα άλλο ομοδιλειτουργικό cross-linker που έχει χρησιμοποιηθεί για την τοπολογική μελέτη των πρωτεϊνών του PS II. Ένα προϊόν της επεξεργασίας με DSP θεωρείται [196] ότι προέρχεται από την ε-αμινομάδα της ³Lys της psb I πρωτεΐνης με μία από τις ε-αμινομάδες της D2, που είναι εκτεθειμένες στο στρώμα και μπορεί να είναι στο αμινοτελικό άκρο της D2 (από το N-τελικό ως τη¹⁹Met) ή στο κομμάτι μεταξύ 3^{ης} και 4^{ης} έλικας της D2 (από ²⁴⁸Val ως ²⁷⁵Met). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η δύο πρωτεΐνες βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 12 Å. Επίδραση του DSP σε PS II έχει, επίσης, σαν αποτέλεσμα [198] την αλληλεπίδραση της 23 kDa με την 17 kDa σε απόσταση 12 Å και την 33 kDa με τη CP 47.

Το περισσότερο χρησιμοποιημένο cross-linker για τη μελέτη της τοπολογίας των πρωτεϊνών του PS II είναι το υδατοδιαλυτό μηδενικού μήκους cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, (EDC), που συνδέει καρβοξυλομάδες με αμινομάδες που βρίσκονται σε απόσταση van der Waals. Έχει βρεθεί [199] ότι η 33 kDa βρίσκεται σε van der Waals απόσταση με τη CP 47. Πιο συγκεκριμένα [200,201] προτείνεται ότι οι ⁷⁶Lys, ⁶⁶Lys, ²⁰Lys και ¹⁸Glu της 33 kDa βρίσκονται σε van der Waals απόσταση με τα ⁸⁷Asp, ⁹⁴Glu, ³⁸⁷Glu και ³⁸⁹Lys αντίστοιχα, της CP 47. Εκτός από το διαμοριακό cross-linking, το EDC προτείνεται [202] ότι οδηγεί και σε ενδομοριακό cross-linking της 33 kDa, με συνέπεια την απώλεια της έκλυσης O₂, χωρίς να επηρεάζεται η ικανότητα επανασύνδεσης της 33 kDa στο PS II και η σταθερότητα του συμπλόκου σε Mn.

Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο Σχ. 49. Στην παρούσα εργασία έχει χρησιμοποιηθεί το EDC, προκειμένου να μελετηθεί εκτενέστερα η τοπολογία των πρωτεϊνών του PS II.



Σχήμα 49: Μοντέλο που παρουσιάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών του PS II με χρήση μη μηδενικού μήκους cross-linkers [Enami et al., Plant Cell Physiol. 33(3):291-297, 1992]

5.2 Υλικά και μέθοδοι

Επεξεργασία με EDC έχει πραγματοποιηθεί σε PS II μεμβράνες, σε HM-core και σε sub-core. Η επεξεργασία έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.10. Η πρωτεϊνική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.15. Η ανίχνευση των προϊόντων από τη διαδικασία του cross-linking έγινε με

τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.16. Η ικανότητα έκλυσης O₂ μετρήθηκε πολαρογραφικά με ηλεκτρόδιο O₂, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.14. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε Mn προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία EPR σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.17.

5.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

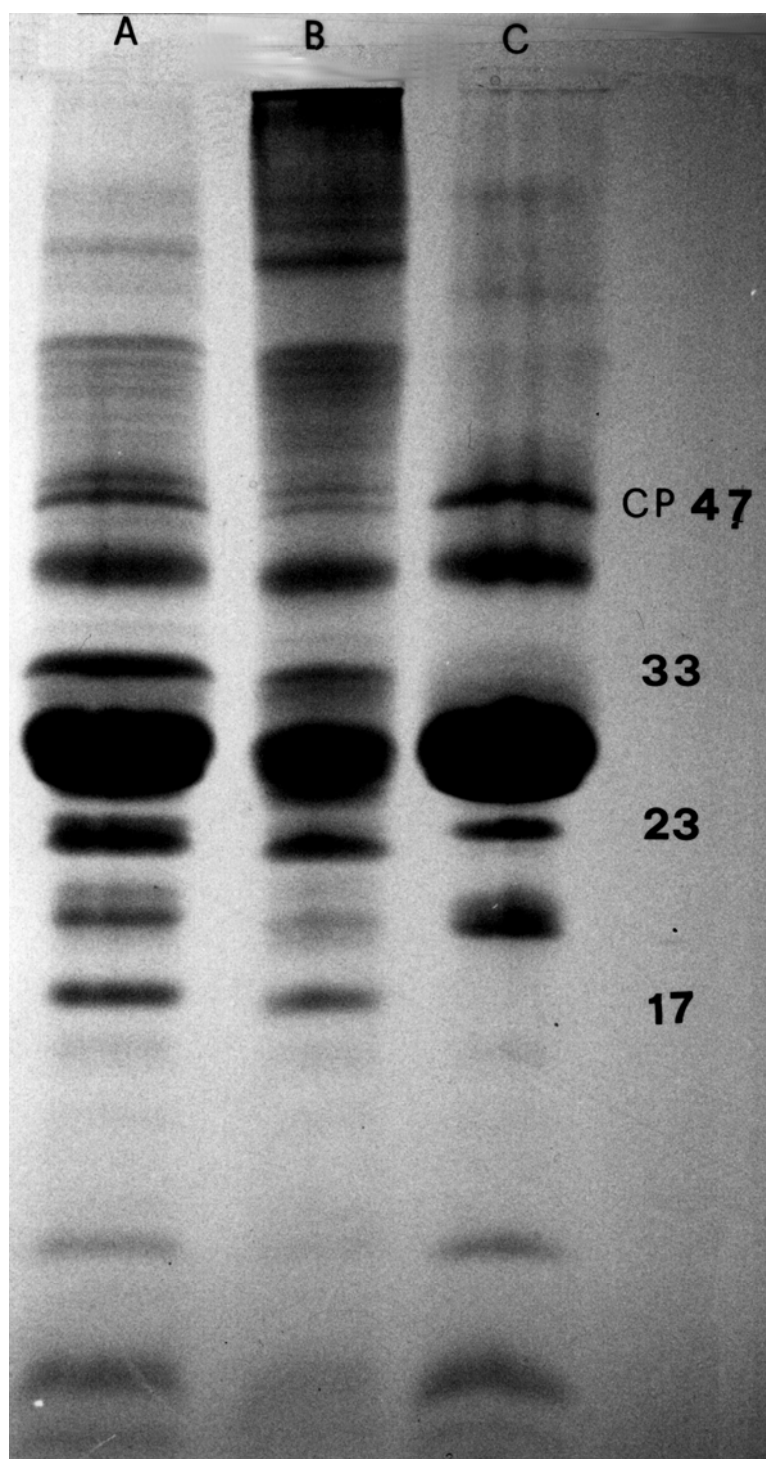
Τα παρασκευάσματα που εξετάστηκαν με EDC ήταν οι PS II-μεμβράνες, το HM-core και το sub-core. Η μελέτη των δειγμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε με βιοχημικές, πολαρογραφικές και φασματοσκοπικές τεχνικές. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών παρουσιάζονται παρακάτω:

Στο Σχ. 50 φαίνεται η πολυπεπτιδική σύσταση ενός δείγματος PS II-μεμβρανών και ενός δείγματος PS II-μεμβρανών, το οποίο είχε υποστεί κατεργασία με EDC. Ο μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών οδηγεί στο σχηματισμό συσσωματωμάτων και παρεμποδίζει την εξαγωγή πληροφοριών. Ωστόσο, φαίνεται καθαρά μια νέα μπάντα, ακριβώς πάνω από τη CP 47, η οποία πρέπει να εξακριβωθεί πώς προκύπτει.

Στον Πίνακα II φαίνονται οι μετρήσεις έκλυσης O₂ και η περιεκτικότητα σε Mn, σε ακατέργαστες και κατεργασμένες με EDC, PS II-μεμβράνες. Η κατεργασία με EDC διατηρεί την ικανότητα για έκλυση O₂ στο 75-80% σε σύγκριση με τις ακατέργαστες PS II-μεμβράνες. Επίσης, η περιεκτικότητα σε Mn δεν επηρεάζεται από την κατεργασία με EDC.

ΠΙΝΑΚΑΣ II

Δείγμα:	PSII	EDC-PSII
i) Περιεκτικότητα σε Mn	4Mn/TyrD ⁺	4Mn/TyrD ⁺
ii) VO₂ (μmoles O₂ / mgr Chl · hr)		
(με την προσθήκη)		
300μM DCBQ	600 (100%)	450 (75%)
300μM DCBQ +10mM CaCl ₂	600 (100%)	500 (83,3%)



Σχήμα 50: Πολυπεπτιδική ανάλυση σε

(A): PS II-μεμβράνες

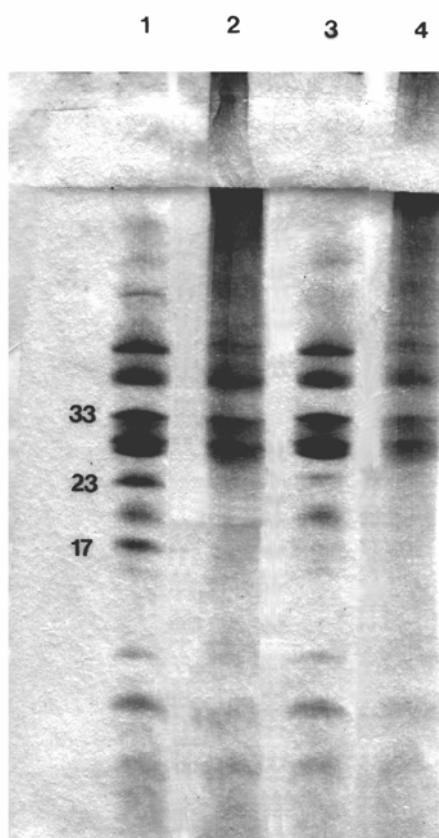
(B): EDC-PS II

(C): Tris-PS II

Ανάλογα αποτελέσματα για την ενεργότητα και την περιεκτικότητα σε Mn προκύπτουν και για το HM-core.

Το HM-core, που είναι απαλλαγμένο από το σύμπλοκο συλλογής φωτός, LHC II, είναι καλύτερο σύστημα για τη μελέτη της επίδρασης του EDC στις πρωτεΐνες του φωτοσυστήματος II

Στο Σχ. 51 φαίνεται ο χαρακτηρισμός του HM-core και του επεξεργασμένου, με EDC, HM-core, όπως μελετήθηκε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης, ενώ στον Πίνακα III φαίνονται οι μετρήσεις έκλυσης O₂ και η περιεκτικότητα σε Mn στο HM-core, πριν και μετά την επεξεργασία με το EDC. Επειδή και το HM-core έχει πολλές πρωτεΐνες, μελετήθηκε αρχικά ένα υποσύμπλοκο του HM-core, το οποίο αναφέρεται ως sub-core. Το sub-core έχει όλες τις πρωτεΐνες του HM-core, εκτός από τις CP 29, CP 26 και CP 24 και τις μικρές εξωτερικές πρωτεΐνες 23 και 17 kDa. Η πρωτεϊνική σύσταση του sub-core φαίνεται στο Σχ.52.



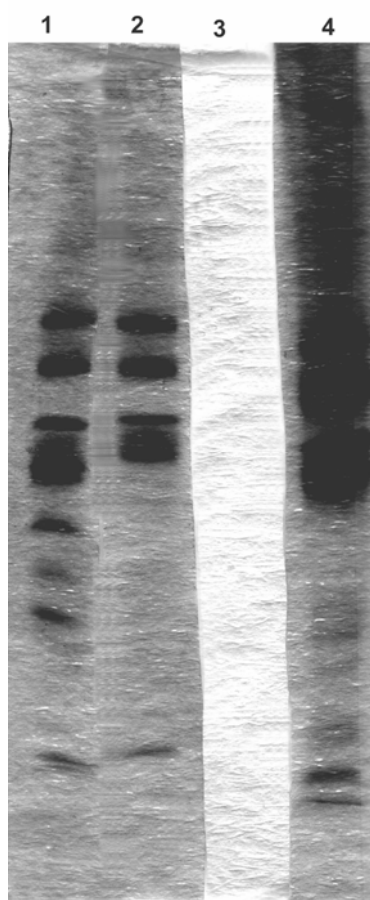
Σχήμα 51: Πολυπεπτιδική ανάλυση σε

1. HM-core

2. EDC-(HM-core)

3. h.s. core

4. EDC-h.s. core



Σχήμα 52: Ηλεκτροφόρηση σε

1. HM-core

2. sub-core

3. -

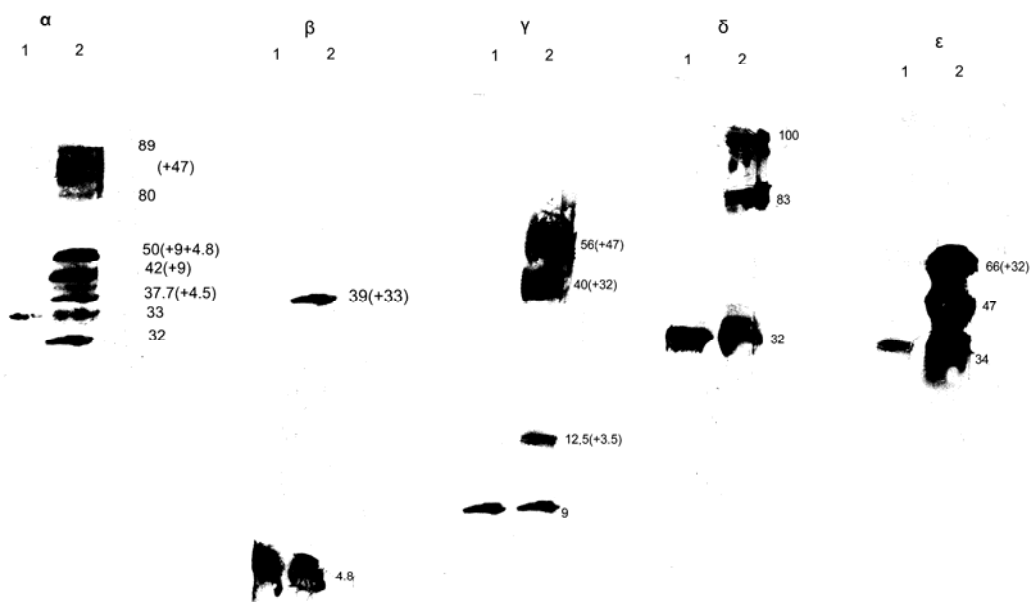
4. EDC-(sub-core)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ

Δείγμα:	HM-core	EDC-(HM-core)
i) Περιεκτικότητα σε Mn	4Mn/TyrD ⁺	4Mn/TyrD ⁺
ii) VO ₂ (μmoles O ₂ / mgr Chl · hr)		
(με την προσθήκη)		
300μM DCBQ	1017(100%)	850 (83,6%)
300μM DCBQ +10mM CaCl ₂	1017(100%)	867 (85,3%)

Με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης εξετάστηκε η κάθε πρωτεΐνη χωριστά προκειμένου να ελεγχθεί η συμμετοχή της στο cross-linking. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχ. 53.

Για την 33 kDa πρωτεΐνη, (Σχ. 53α) οι μπάντες που εμφανίζονται μετά την επεξεργασία με EDC έχουν μοριακά βάρη περίπου στα 89 kDa (33+CP 47), 50 kDa, 42 kDa, 37.5 kDa και 32 kDa. Η 50 kDa μπορεί να αποδοθεί σε cross-linking της 33 kDa με την α-υπομονάδα του cyt b₅₅₉ και την psb I πρωτεΐνη, η 42 kDa σε cross-linking της 33 kDa με την α-υπομονάδα του cyt b₅₅₉, ενώ η 37.5 kDa σε cross-linking της 33 kDa με τη β-υπομονάδα του cyt b₅₅₉ ή με την psb I πρωτεΐνη. Όταν το sub-core που είχε ήδη υποστεί επεξεργασία με EDC, επεξεργάστηκε με Tris, στο ανοσοαποτύπωμα της 33 kDa παρατηρούνται πάλι οι μπάντες που αναφέρθηκαν πριν, εκτός από την 32 kDa. Αυτό σημαίνει ότι η 32 kDa οφείλεται σε ενδομοριακό cross-linking της 33 kDa, ενώ οι υπόλοιπες μπάντες οφείλονται σε διαπρωτεϊνικό cross-linking. Όταν η επεξεργασία με Tris προηγηθεί της επεξεργασίας με EDC, δεν παρατηρείται καμιά από τις παραπάνω μπάντες, όπως βέβαια, αναμένεται.



Σχήμα 53: Ανοσοαποτυπώματα σε (1) sub-core, (2) EDC-(sub-core)
 α. anti-33
 β. anti-psb I
 γ. anti-cyt₅₅₉
 δ. anti-D1
 ε. anti-D2

Για την psb I (Σχ. 53β) παρατηρείται μια μπάντα στα 39 kDa περίπου, η οποία μπορεί να αποδοθεί σε διαμοριακό cross-linking της 33 kDa με την psb I. Πιθανόν, η μπάντα αυτή να είναι η ίδια με τη μπάντα που παρατηρείται στο ανοσοαποτύπωμα της 33 kDa στα 37.5 kDa. Δεν παρατηρείται όμως μπάντα στα 50 kDa, που να επιβεβαιώνει cross-linking της πρωτεΐνης αυτής με την 33 kDa και το cyt b₅₅₉.

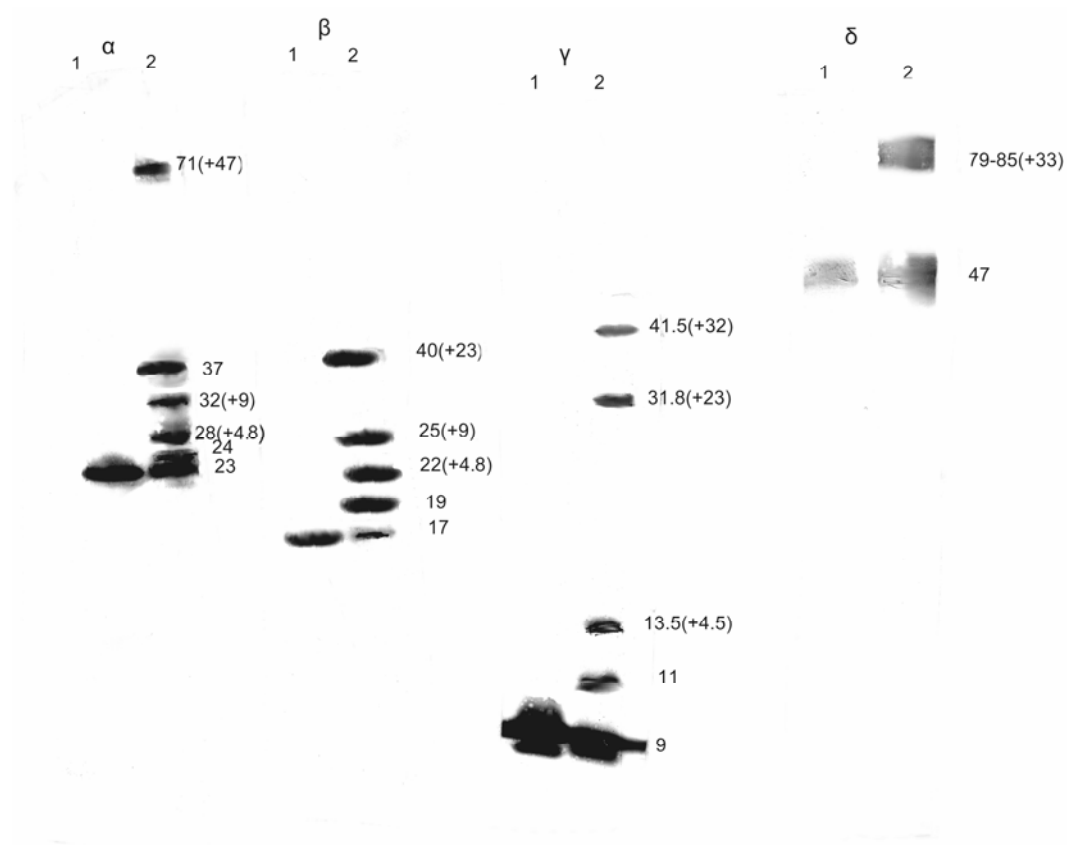
Για την α-υπομονάδα του cyt b₅₅₉ (Σχ. 53γ) παρατηρούνται μπάντες με μοριακά βάρη περίπου 56 kDa, 40 kDa και 12.5 kDa. Η μπάντα 56 kDa μπορεί να αποδοθεί σε διαμοριακό cross-linking της CP 47 με την α-υπομονάδα του cyt b₅₅₉, αλλά το ανοσοαποτύπωμα της CP 47 δεν ανίχνευσε κάποια αντίστοιχη μπάντα. Η 40 kDa μπορεί να οφείλεται σε διαμοριακό cross-linking της D1 με την α-υπομονάδα του cyt b₅₅₉ και η 12.5 kDa σε cross-linking της α-υπομονάδας του cyt b₅₅₉ με τη β-υπομονάδα του cyt b₅₅₉. Λόγω έλλειψης αντισώματος που αναγνωρίζει τη β-υπομονάδα του cyt b₅₅₉, δεν είναι δυνατό να επαληθευθεί το cross-linking για τη μπάντα που παρατηρείται στα 12.5 kDa.

Για την D1 πρωτεΐνη (Σχ. 53δ) εμφανίζονται μπάντες στα 83 kDa και μία ευρεία μπάντα στα 100 kDa περίπου, οι οποίες, όμως, δεν εμφανίζονται σε ανοσοαποτύπωμα κάποιας άλλης πρωτεΐνης του συμπλόκου.

Για την D2 πρωτεΐνη (Σχ. 53ε) οι νέες μπάντες εμφανίζονται στα 66 kDa και στα 47 kDa, περίπου. Η 66 kDa θα μπορούσε να αποδοθεί σε cross-linking της D1 με την D2, αλλά στο ανοσοαποτύπωμα της D1 δεν παρατηρείται μπάντα σε αυτό το μοριακό βάρος. Η 47 kDa δε μπορεί να επαληθευθεί από κανένα άλλο ανοσοαποτύπωμα.

Μετά τον έλεγχο για τη συμμετοχή στο cross-linking των πρωτεϊνών του υποσυμπλόκου του HM-core, εξετάστηκε το HM-core, το οποίο όπως προαναφέρθηκε περιέχει επιπλέον τις μικρές εξωτερικές πρωτεΐνες 23 και 17 kDa και τις μικρές CPs.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης για την κάθε πρωτεΐνη του HM-core, φαίνονται στο Σχ. 54.



Σχήμα 54: Ανοσοαποτύπωμα σε (1) HM-core, (2) EDC-(HM-core)

α. anti-23

β. anti-17

γ. anti-cyt b₅₅₉(α-υπομονάδα)

δ. anti-CP 47

Το ανοσοαποτύπωμα της 33 kDa δεν εμφάνισε καμιά νέα μπάντα, σε σύγκριση με αυτές που παρατηρήθηκαν στο sub-core. Αυτό σημαίνει ότι η 33 kDa δε δίνει προϊόν cross-linking με τις δύο μικρές εξωτερικές πρωτεΐνες 23 και 17 kDa. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στα ανοσοαποτυπώματα για την psb I πρωτεΐνη, την D2 και την D1.

Για την πρωτεΐνη 23 kDa (Σχ. 54α), οι νέες μπάντες που παρατηρούνται εντοπίζονται περίπου στα 71 kDa, στα 37 kDa, στα 32 kDa, στα 28 kDa και στα 24 kDa. Η ευρεία μπάντα στα 71 kDa θα μπορούσε να αποδοθεί σε cross-linking της 23 kDa με τη CP 47, η 32 kDa σε cross-linking της 23 kDa με τη α-υπομονάδα του cyt b₅₅₉, η 28 kDa σε cross-linking της 23 kDa με την psb I, της οποίας το ανοσοαποτύπωμα δεν εμφανίζει αντίστοιχη μπάντα και η 24 kDa σε ενδομοριακό cross-linking της 23 kDa.

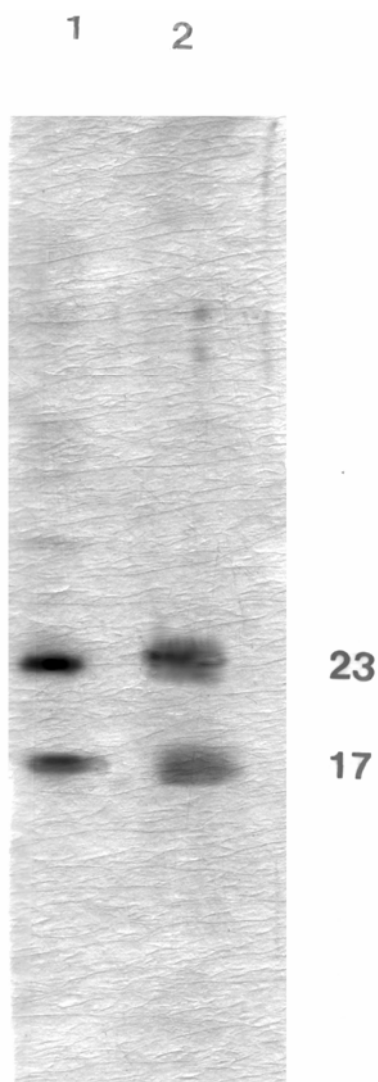
Στο ανοσοαποτύπωμα της 17 kDa (Σχ. 54β) παρατηρούνται μπάντες στα 40 kDa, στα 25 kDa, στα 22 kDa και στα 19 kDa. Η 40 kDa μπορεί να προκύπτει από cross-linking της 17 kDa με την 23 kDa. Για την 23 kDa, όμως, παρατηρείται μια μπάντα στα 37 kDa και δε μπορεί να επαληθευθεί με σιγουριά το cross-linking των δύο αυτών πρωτεϊνών. Η 25 kDa μπορεί να οφείλεται σε cross-linking της 17 kDa με την α -υπομονάδα του cyt b₅₅₉, η 22 kDa σε cross-linking της 17 kDa με την psb I, της οποίας όμως το ανοσοαποτύπωμα δεν αναγνωρίζει μπάντα σε αυτό το μοριακό βάρος και η 19 kDa σε ενδομοριακό cross-linking.

Το ανοσοαποτύπωμα της α -υπομονάδας του cyt b₅₅₉ (Σχ. 54γ) παρουσιάζει νέες μπάντες στα 41.5 kDa, στα 31.8 kDa, στα 13.5 kDa, στα 11 kDa και στα 10 kDa. Η 41.5 kDa μπορεί να προέρχεται από cross-linking της α -υπομονάδας του cyt b₅₅₉ με την D1, μπάντα που δεν επαληθεύεται, όμως από το ανοσοαποτύπωμα της D1. Η 31.8 kDa μπορεί να είναι προϊόν από cross-linking της α -υπομονάδας του cyt b₅₅₉ με την 23 kDa, η 13.5 kDa από cross-linking της α -υπομονάδας με τη β -υπομονάδα του cyt b₅₅₉, ενώ οι 11 kDa και 10 kDa από ενδομοριακό cross-linking της α -υπομονάδας του cyt b₅₅₉.

Τέλος, στο ανοσοαποτύπωμα της CP 47 (Σχ. 54δ) εμφανίζεται μια ευρεία μπάντα στα 79-82 kDa, η οποία οφείλεται στο cross-linking της CP 47 με την 33 kDa. Επίσης, φαίνεται μια ευρεία μπάντα μεταξύ 47 και 49 kDa, μέσα στην οποία μπορεί να βρίσκεται η μπάντα, που φαίνεται λίγο πιο πάνω από τη CP 47 (Σχ. 50) και η οποία μπορεί να προκύπτει από cross-linking της CP 47 με κάποια μικρή πρωτεΐνη ή από ενδομοριακό cross-linking της πρωτεΐνης.

Στο σημείο αυτό, πρέπει να σημειωθεί ότι οι μπάντες που εμφανίζονται σε κάποια ανοσοαποτυπώματα και δεν επαληθεύονται από αντίστοιχες μπάντες σε ανοσοαποτυπώματα άλλων πρωτεϊνών, μπορεί να οφείλονται σε μη εξειδικευμένη πρόσδεση του EDC σε κάποιες πρωτεΐνες.

Στο Σχ. 55 φαίνονται τα αποτελέσματα της κατεργασίας με EDC των εξωτερικών πρωτεϊνών 17 και 23 kDa, όταν αυτές έχουν απομακρυνθεί από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο και είναι ελεύθερες σε διάλυμα. Καμιά νέα μπάντα δεν παρατηρείται, που σημαίνει ότι οι δύο πρωτεΐνες δε συμμετέχουν σε μεταξύ τους cross-linking. Το μόνο, που παρατηρείται, είναι ότι οι μπάντες των 17 και 23 kDa είναι διευρυμένες μετά την επεξεργασία με το EDC, πιθανόν λόγω ενδομοριακού cross-linking.



Σχήμα 55: Ηλεκτροφόρηση

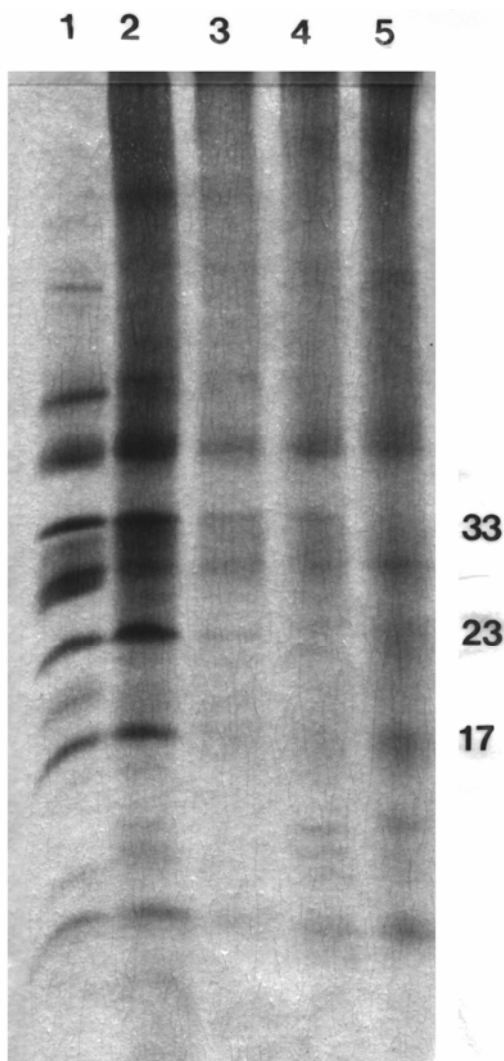
1. 17 kDa, 23 kDa

2. EDC-(17,23)

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα, που προκύπτουν από τα ανοσοαποτυπώματα των 17 και 23 kDa, όταν οι δύο πρωτεΐνες είναι ελεύθερες σε διάλυμα και όταν είναι δεσμευμένες στο σύμπλοκο, μπορεί να θεωρηθεί ότι υπάρχουν διαφορές στη διαμόρφωση των δύο πρωτεϊνών στις δύο περιπτώσεις, κάτι που αναμένεται και ενισχύει την άποψη για πιθανή αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών, όταν είναι δεσμευμένες στο core, όπως προκύπτει από τα Σχ. 54, 55.

Στο Σχ. 56 φαίνονται τα αποτελέσματα της επανασύνδεσης των 17 και 23 kDa σε h.s. core, όταν οι δύο πρωτεΐνες υποστούν επεξεργασία με EDC ή όταν το h.s. core υποστεί την επεξεργασία με το EDC ή όταν προστεθεί EDC κατά την ανάμειξη των 17 και 23 kDa με το h.s. core. Στην 1^η και 3^η περίπτωση, οι δύο πρωτεΐνες φαίνεται να επανασυνδέονται, ενώ

μικρότερο είναι το ποσοστό επανασύνδεσης όταν το h.s. core υποστεί κατεργασία με το EDC. Αυτό μπορεί αποδοθεί σε δομικές αλλαγές στις πρωτεΐνες του πυρήνα μετά την κατεργασία με το EDC, που επηρεάζουν τις θέσεις δέσμευσης των δύο μικρών εξωτερικών πρωτεϊνών στον πυρήνα. Η απουσία μπαντών στα ανοσοαποτυπώματα των 17 και 23 kDa σε μεγάλα μοριακά βάρη, δε σημαίνει απαραίτητα ότι οι δύο πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν με τον πυρήνα, αλλά ίσως να μη βρίσκονται στην κατάλληλη θέση τα αμινοξέα, που χρειάζονται, για την αντίδραση με το EDC.



Σχήμα 56: Ηλεκτροφόρηση

1. *HM-core*
2. *EDC-(HM-core)*
3. *h.s.-core + EDC-(17,23)*
4. *EDC-(h.s.-core) + (17,23)*
5. *h.s.-core + (17,23) + EDC*

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, δεν προκύπτει κανένα συμπέρασμα για αλληλεπίδραση των εξωτερικών πρωτεϊνών 23 και 17 kDa με την εξωτερική πρωτεΐνη 33 kDa. Ωστόσο, μια τέτοια αλληλεπίδραση δε μπορεί να αποκλειστεί, αφού οι εξωτερικές

πρωτεΐνες πιθανόν να βρίσκονται σε άμεση επαφή, αλλά το EDC δε μπορεί να την πιστοποιήσει.

Ένα ελκυστικό μοντέλο για την τοπολογία των εξωτερικών πρωτεϊνών, μπορεί να προκύψει από τα αποτελέσματά μας, προτείνοντας ότι η 23 kDa συνδέεται με τον πυρήνα του PS II, μέσω της α -υπομονάδας του cyt b₅₅₉ και ότι η 17 kDa πιθανόν να αλληλεπιδρά με την 23 kDa. Επίσης, επιβεβαιώνεται η αλληλεπίδραση της 33 kDa με τη μεμβρανική πρωτεΐνη CP 47.

Συμπερασματικά, το EDC είναι ένα καλό cross-linker, αφού μπορεί να δώσει πληροφορίες για την τοπολογία πρωτεϊνών, που βρίσκονται σε van der Waals απόσταση, διατηρώντας τη λειτουργικότητα του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου σε υψηλό ποσοστό. Το γεγονός, όμως, ότι μπορεί να δώσει και πολλά παραπροϊόντα, λόγω μη εξειδικευμένης σύνδεσης, εξηγεί την ύπαρξη των νέων μπαντών που εμφανίζονται στα ανοσοαποτυπώματα κάποιων πρωτεϊνών και δεν επαληθεύονται από αντίστοιχες μπάντες σε ανοσοαποτυπώματα άλλων πρωτεϊνών, που θα μπορούσαν να δίνουν κοινά προϊόντα από το cross-linking. Το πρόβλημα αυτό οδηγεί στη σκέψη ότι ίσως πρέπει να επιλεγεί ένα άλλο cross-linker για μελλοντικές μελέτες, έστω και αν δεν είναι μηδενικού μήκους. Ένα cross-linker με μήκος αλυσίδας μεγαλύτερο των 0 Å, όπως το EDC, και μικρότερο των 10-11 Å, όπως αυτά που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί και αναφέρονται στην Εισαγωγή του κεφαλαίου αυτού, πιθανόν να μπορεί να δώσει περισσότερες πληροφορίες για την τοπολογία των πρωτεϊνών του PS II.

6. ΧΡΗΣΗ LiClO_4 ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΙΟΝΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΣΤΟ PS II ΚΑΙ KNO_2 ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΑΝΙΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΙΟΝΤΑ Cl^- .

6.1 Εισαγωγή

Είναι γνωστό ότι με επίδραση υψηλής ιονικής ισχύος, οι εξωτερικές πρωτεΐνες του Φωτοσυστήματος II μπορούν να απομακρυνθούν από το σύμπλοκο. Η εκλεκτική αφαίρεση των εξωτερικών πρωτεϊνών και η δυνατότητα επανασύνδεσής τους μπορούν να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη θέση και λειτουργία των εξωτερικών πρωτεϊνών στο PS II, όπως και για τη λειτουργία ολόκληρου του πρωτεϊνικού συμπλόκου.

Η πιο συνηθισμένη διαδικασία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, για την απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών 23 και 17 kDa, είναι με επίδραση διαλύματος NaCl 2M [154]. Η απομάκρυνση αυτών των πρωτεϊνών προκαλεί μείωση του ρυθμού έκλυσης O_2 κατά 80%, όταν οι συγκεντρώσεις των ανόργανων συμπαραγόντων είναι χαμηλές. Η ενεργότητα μπορεί να ανακτηθεί με προσθήκη ιόντων Ca^{2+} και Cl^- σε υψηλές συγκεντρώσεις [44]. Η παρουσία της πρωτεΐνης 23 kDa προστατεύει το σύμπλοκο του μαγγανίου από την επίδραση εξωγενών αναγωγικών, όπως η υδροκινόνη [155]. Απουσία της 23 kDa, έχει βρεθεί ότι μειώνεται η ικανότητα σύνδεσης του ζιζανιοκτόνου ατραζίνη στη θέση δέσμευσης της κινόνης Q_B [157] και το κυτόχρωμα $\text{cyt } b_{559}$ μετατρέπεται από τη μορφή υψηλού δυναμικού στην αντίστοιχη χαμηλού δυναμικού [158].

Με έκθεση των PS II παρασκευασμάτων σε διάλυμα 1M CaCl_2 ή 1M MgCl_2 [38] μπορεί να απομακρυνθεί η εξωτερική πρωτεΐνη 33 kDa. Η απομάκρυνση της πρωτεΐνης αυτής οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του συμπλόκου του Mn, σε συνθήκες χαμηλών συγκεντρώσεων χλωρίου (<100mM) [135,136,137]. Δύο από τα 4 μαγγάνια γίνονται παραμαγνητικά ασύζευκτα και χάνονται [138]. Σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου (>100mM), το Mn είναι σταθερό και η έκλυση O_2 διατηρείται σε χαμηλούς ρυθμούς [139]. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, οι οξειδωτικές καταστάσεις S_2 και S_3 φαίνεται να έχουν μικρότερους χρόνους ζωής, συγκριτικά με την περίπτωση που η 33 kDa δεν έχει απομακρυνθεί από το σύμπλοκο και καθυστερεί η μετάβαση $\text{S}_3 \rightarrow (\text{S}_4) \rightarrow \text{S}_0$ [140,141].

Τα ιόντα Cl^- μπορεί να αντικατασταθούν από ιόντα F^- [79], CH_3COO^- [79] και ορισμένες πρωτοταγείς αμίνες [74, 79,80]. Τα ιόντα Cl^- απομακρύνονται με επώαση δειγμάτων PS II σε $\text{pH}=9.5$ [81, 82, 83, 84] ή σε διαλύματα που δεν περιέχουν χλώριο [85, 86] ή με κατεργασία με 25-100mM SO_4^{2-} [74, 87, 88]. Με την απομάκρυνση των ιόντων Cl^- με διαλύματα ελεύθερα από Cl^- , επιβραδύνεται η μετάπτωση $\text{S}_3 \rightarrow (\text{S}_4) \rightarrow \text{S}_0$, ενώ με την απομάκρυνση των ιόντων χλωρίου σε αλκαλικό pH ή με SO_4^{2-} , διακόπτεται η λειτουργία του κύκλου των S-καταστάσεων. Ο αριθμός των ιόντων Cl^- , που απαιτείται για την παραγωγή O_2 στο PS II, δεν είναι γνωστός. Σε δείγματα χλωροπλαστών, που δεν περιείχαν ιόντα Cl^- και επώαστηκαν με $^{36}\text{Cl}^-$ κατά τη διάρκεια ακτινοβολήσης, προσδιορίστηκαν 5 $\text{Cl}^-/\text{PS II}$ [82]. Μια θέση δέσμευσης Cl^- προσδιορίστηκε σε δείγματα χλωροπλαστών απουσία ιόντων Cl^- [89], ενώ δύο θέσεις δέσμευσης προσδιορίστηκαν σε δείγματα PSII, που περιείχαν άλλα ανιόντα [85, 88]. Η αντικατάσταση του Cl^- από τη μία θέση επιβραδύνει τη μετάβαση $\text{S}_3 \rightarrow (\text{S}_4) \rightarrow \text{S}_0$, ενώ η αντικατάσταση του Cl^- από την άλλη θέση ανενεργοποιεί πλήρως την έκλυση O_2 [88]. Η ανάκτηση της ενεργότητας επιτυγχάνεται με προσθήκη ανιόντων. Η αποτελεσματικότητα των ανιόντων αυτών στην επανενεργοποίηση των PS II δειγμάτων ακολουθεί τη σειρά $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^-$ [89].

Στην εργασία αυτή έχει χρησιμοποιηθεί α) το άλας LiClO_4 προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της ιονικής ισχύος στις εξωτερικές πρωτεΐνες, αλλά και στη λειτουργία του Φωτοσυστήματος II και β) το άλας KNO_2 προκειμένου να εξεταστεί αν τα ιόντα NO_2^- ανταγωνίζονται τα ιόντα χλωρίου.

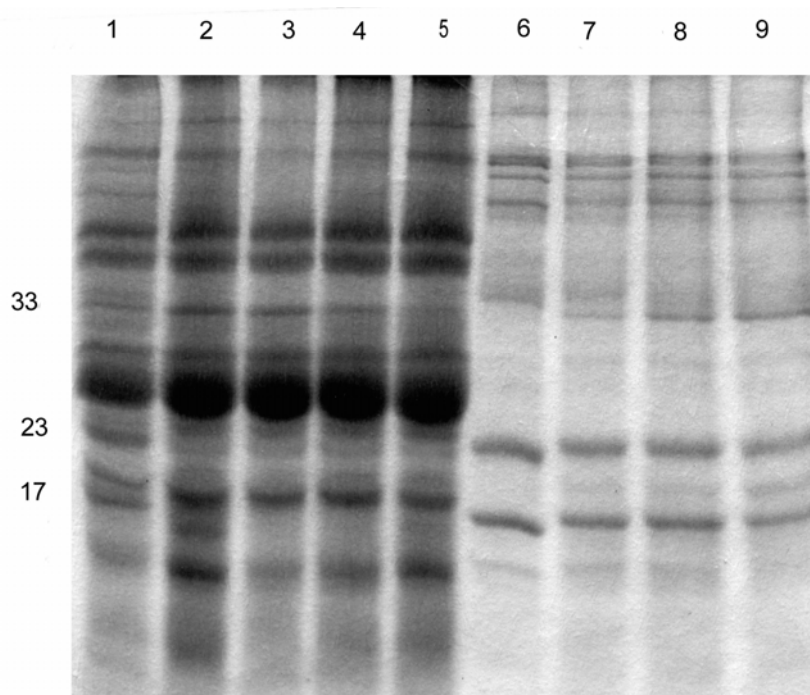
6.2 Υλικά και μέθοδοι

Η κατεργασία με LiClO_4 έχει πραγματοποιηθεί σε PS II-μεμβράνες, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.12, ενώ η κατεργασία με KNO_2 έχει πραγματοποιηθεί σε PS II-μεμβράνες, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.11. Η πρωτεϊνική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, με τη μέθοδο που περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.15. Η ικανότητα έκλυσης O_2 μετρήθηκε με ηλεκτρόδιο O_2 , όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.14. Η μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο του Mn στην Tyr Z^+ και ο αριθμός των ιόντων Mn, ελέγχθηκε με φασματοσκοπία EPR, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.17. Με EPR φασματοσκοπία, σε χαμηλές θερμοκρασίες, εξετάστηκαν τα σήματα της Q_A , του Fe, του cyt b_{559} και το multiline-σήμα για τα δείγματα

που είχαν υποστεί την κατεργασία με το KNO_2 . Τέλος, με οπτική φασματοσκοπία, εξετάστηκε η ηλεκτρονιακή μεταφορά στην οξειδωτική και στην αναγωγική πλευρά στα επεξεργασμένα με KNO_2 δείγματα. Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας EPR πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο του Δρ Πετρουλέα, στο Δημόκριτο. Οι μετρήσεις οπτικής φασματοσκοπίας πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο του καθηγητή van Gorkom, στο Leiden της Ολλανδίας.

6.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Επεξεργασία PS II-μεμβρανών με LiClO_4 και συγκεκριμένα με συγκέντρωση 100mM LiClO_4 , έχει σαν αποτέλεσμα την εκλεκτική απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών 17 και 23 kDa. Δοκιμάζοντας μια σειρά από συγκεντρώσεις, μεγαλύτερες των 100mM, αρχίζει να απομακρύνεται και η 33 kDa, μετά τη συγκέντρωση των 500mM LiClO_4 . Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο Σχ. 57.



Σχήμα 57: Ηλεκτροφόρηση

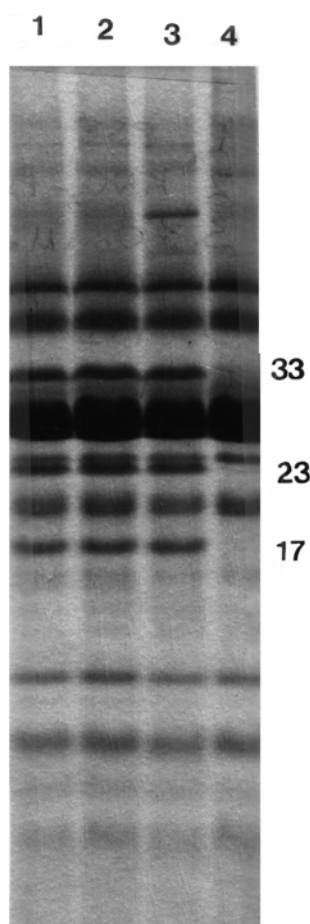
1. PS II
2. (100mM LiClO_4)-PS II
3. (250mM LiClO_4)-PS II
4. (500mM LiClO_4)-PS II
5. (1M LiClO_4)-PS II
6. υπερκείμενο από (100mM LiClO_4)-PS II
7. υπερκείμενο από (250mM LiClO_4)-PS II
8. υπερκείμενο από (500mM LiClO_4)-PS II
9. υπερκείμενο από (1M LiClO_4)-PS II

Η αφαίρεση των δύο μικρών εξωτερικών πρωτεϊνών, μειώνει την ικανότητα έκλυσης O₂, η οποία όμως ανακτάται με την προσθήκη CaCl₂. Η επίδραση των ιόντων Ca²⁺ και Cl⁻ παρουσιάζεται στον Πίνακα IV, όπου φαίνεται ότι η χαμένη ενεργότητα, μετά την επεξεργασία με LiClO₄, ανακτάται με την προσθήκη 10mM CaCl₂ σε ποσοστό 77%, σε σύγκριση με τα ακατέργαστα δείγματα. Η επίδραση του κάθε ιόντος χωριστά, φαίνεται στις περιπτώσεις, όπου στη θέση του CaCl₂ έχει προστεθεί για τις μετρήσεις έκλυσης O₂, 10mM NaCl ή 10mM Ca-gluconate. Έτσι, στην περίπτωση του NaCl, όπως φαίνεται στον Πίνακα IV, η ενεργότητα δεν ανακτάται, ενώ με το Ca-gluconate, η ενεργότητα επανέρχεται στο 61%, σε σύγκριση με τα ακατέργαστα δείγματα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το Ca²⁺ σε συνδυασμό με το Cl⁻ είναι απαραίτητα για υψηλούς ρυθμούς έκλυσης O₂. Επίσης, φαίνεται ότι μόνο το Cl⁻ δεν αρκεί για την ανάκτηση της ενεργότητας, σε αντίθεση με τα ιόντα Ca²⁺ τα οποία μπορούν να επαναφέρουν μεγαλύτερες ταχύτητες παραγωγής O₂.

ΠΙΝΑΚΑΣ IV

Δείγμα:	PSII	LiClO ₄ -PSII
VO₂ (μmoles O₂ / mgr Chl · hr)		
(με την προσθήκη)		
300μM DCBQ	540 (100%)	260 (48%)
300μM DCBQ +10mM CaCl ₂	540 (100%)	415 (77%)
300μM DCBQ +10mM NaCl	520 (96,3%)	260 (48%)
300μM DCBQ +10mM Ca-gluconate	520 (96,3%)	340 (61%)

Ένα άλλο αλάτι, που έχει χρησιμοποιηθεί στην παρούσα εργασία, είναι το KNO₂. Κατεργασία PS II-μεμβρανών με KNO₂ δεν οδηγεί σε απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών του συμπλόκου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχ. 58, όπου παρατηρείται ότι οι εξωτερικές πρωτεΐνες δεν υφίστανται καμιά αλλαγή.



Σχήμα 58: Ηλεκτροφόρηση

1. (10 mM KNO₂)-PS II

2. (50 mM KNO₂)-PS II

3. PS II

4. Tris-PS II

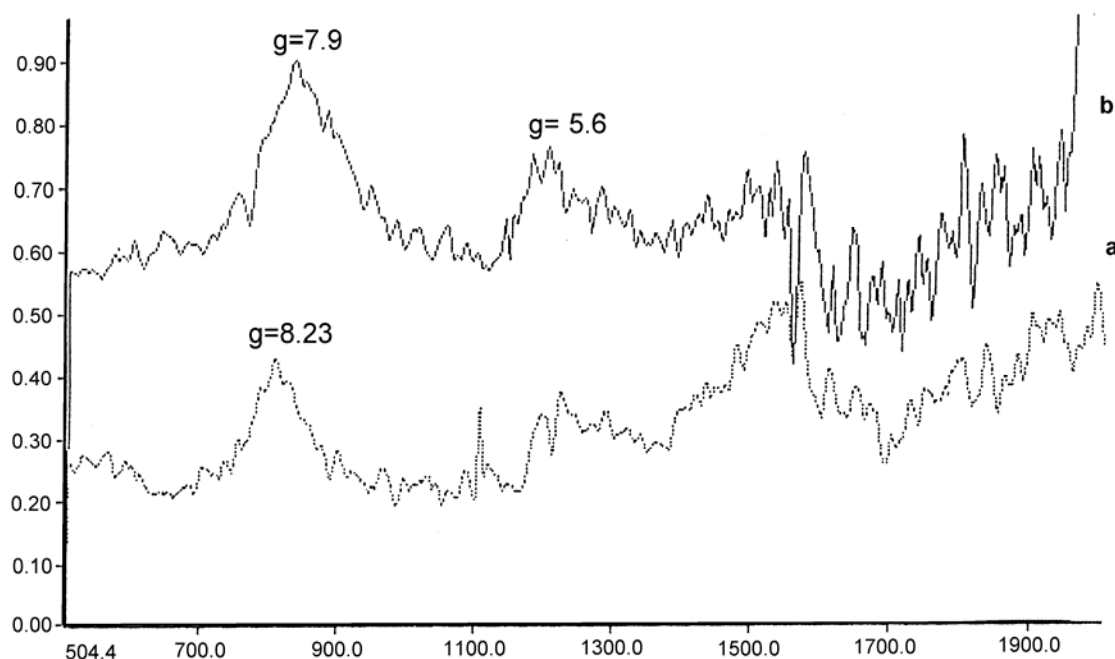
ΠΙΝΑΚΑΣ V

Δείγμα:	PSII	KNO ₂ -PSII
VO₂ (μmoles O₂ / mgr Chl · hr)		
(με την πρόσθήκη)		
300μM DCBQ	600 (97%)	380 (61%)
300μM DCBQ +10mM CaCl ₂	620 (100%)	410 (66%)
300μM DCBQ +10mM MgCl ₂	580 (93,5%)	340 (55%)

Στον Πίνακα V φαίνονται οι ρυθμοί παραγωγής O_2 σε δείγματα, τα οποία είχαν υποστεί επεξεργασία με KNO_2 . Είναι φανερό ότι η ενεργότητα μειώνεται, διατηρώντας ένα ποσοστό 65% σε σύγκριση με τα ακατέργαστα δείγματα

Έλεγχος των δειγμάτων σε περιεκτικότητα Mn, έδειξε ότι τα δείγματα δε χάνουν Mn, μετά την κατεργασία με το KNO_2 .

Προκειμένου να εξηγηθεί η ελάττωση της ενεργότητας, παρά το γεγονός ότι οι εξωτερικές πρωτεΐνες του συμπλόκου και η περιεκτικότητα σε μαγγάνιο παραμένουν ανεπηρέαστες, εξετάστηκαν με φασματοσκοπία EPR η ηλεκτρονιακή μεταφορά από το σύμπλοκο του Mn στην Tyr Z^+ , όπως και τα σήματα της Q_A , του cyt b_{559} , του ανόργανου μη-αιμικού Fe^{2+} και το multiline-σήμα. Το σήμα που φαίνεται να επηρεάζεται από την κατεργασία με KNO_2 , είναι το σήμα του ανόργανου μη-αιμικού Fe^{3+} , αφού παρατηρείται μια μετατόπιση από το $g=8.23$ στα ανέπαφα δείγματα, στο $g=7.91$ στα δείγματα που είχαν υποστεί κατεργασία με KNO_2 . Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο Σχ. 59. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι το NO_2^- συναρμόζεται με τον ανόργανο μη-αιμικό Fe^{3+} . Ο Fe^{3+} αυτός θεωρείται ότι δε συμμετέχει στην ηλεκτρονιακή μεταφορά. Πιθανόν, όμως, με τη συναρμογή του Fe^{3+} με το NO_2^- , να δημιουργούνται δομικές αλλαγές, που οδηγούν στη μείωση της έκλυσης O_2 σε ποσοστό 35%.

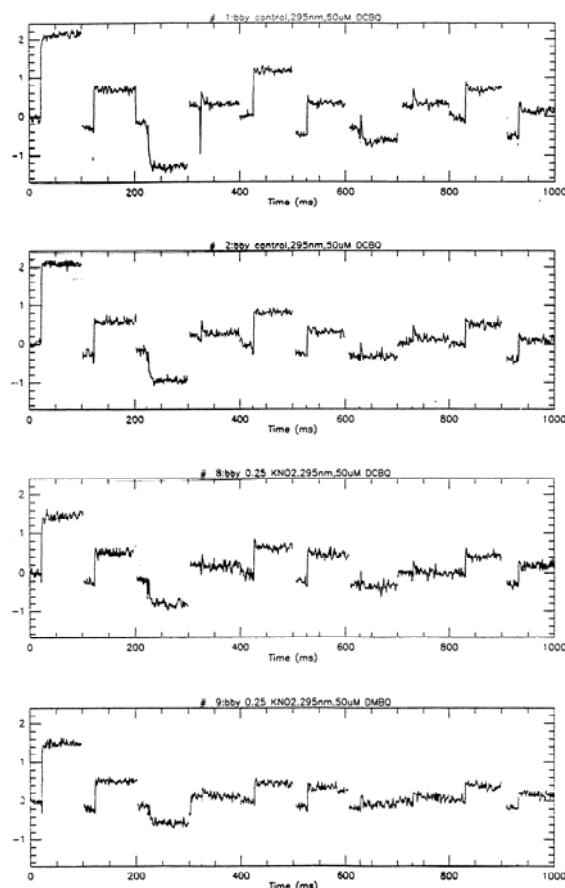


T=4.3K Att=8dB mod.amp. =16.00 Gpp ν =9.429037 GHz

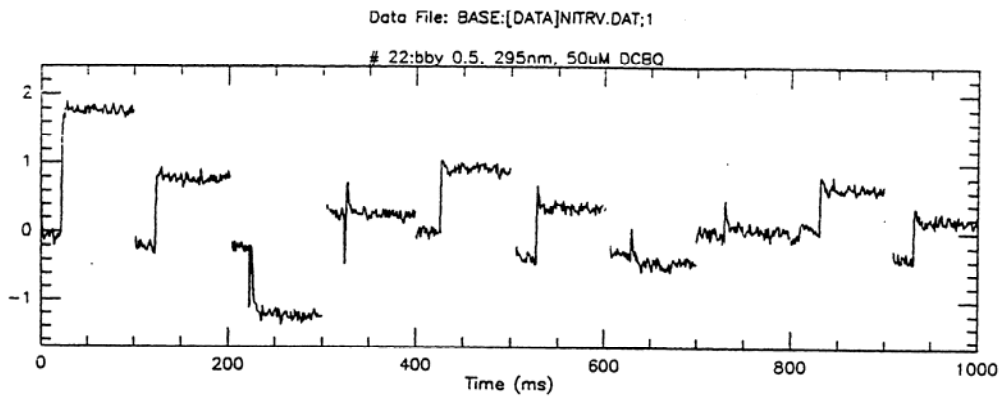
Σχήμα 59: EPR-φάσμα του $Fe^{3+} Q_A$ σε (α) PS II και (β) KNO_2 -PS II

Τα δείγματα που κατεργάστηκαν με KNO_2 εξετάστηκαν και με οπτική φασματοσκοπία. Οι μετρήσεις στα 295nm εξετάζουν μόνο την οξειδωτική πλευρά, ενώ οι μετρήσεις στα 325nm παρουσιάζουν την ηλεκτρονιακή μεταφορά, τόσο στην οξειδωτική όσο και την αναγωγική πλευρά. Ένας τρόπος για να ελεγχθεί η μεταφορά ηλεκτρονίων από την Q_A στην Q_B , είναι η χρήση διαφορετικών δεκτών e^- . Έτσι, το DCBQ δέχεται e^- κυρίως από την Q_A , ενώ το DMBQ από την Q_B . Τα αποτελέσματα, για τα ακατέργαστα και τα κατεργασμένα δείγματα, φαίνονται στα Σχ. 60-α (1,2,8,9), όπου δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά. Μια μικρή διαφορά, που παρατηρείται στα πλάτη, δεν πρέπει να οφείλεται στην κατεργασία, αλλά στο γεγονός ότι στα κατεργασμένα δείγματα εμφανίζονταν συσσωματώματα, επιτρέποντας να περάσει περισσότερο φως. Αυτό επιβεβαιώθηκε, με την αύξηση της συγκέντρωσης KNO_2 , οπότε τα πλάτη στα φάσματα, κατεργασμένων και ακατέργαστων δειγμάτων, ήταν ίδια. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο Σχ. 60-β (22).

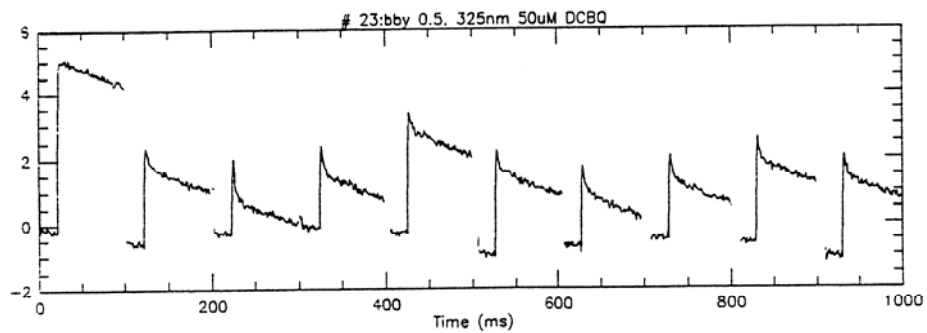
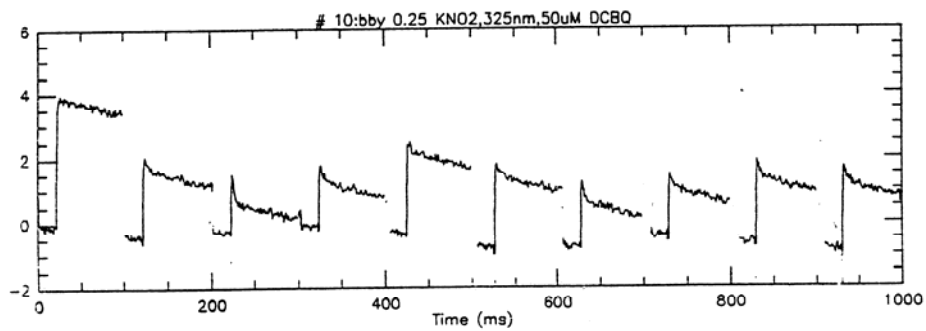
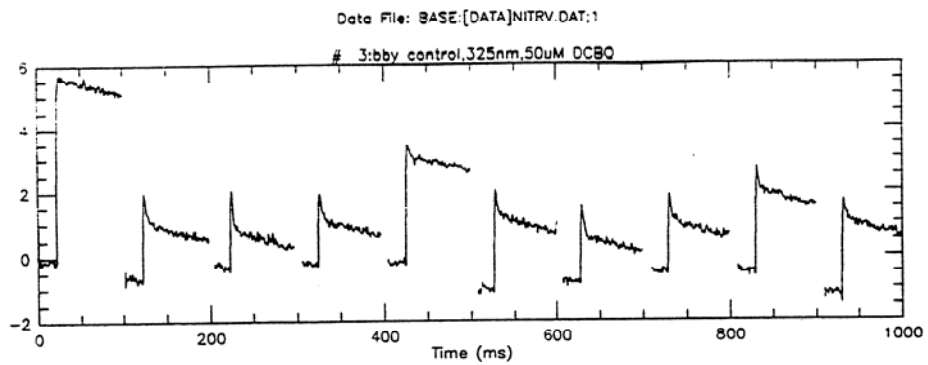
Στα Σχ. 60-γ (3,10,23) παρουσιάζονται οι μετρήσεις στα 325nm. Τα σήματα παρουσιάζουν κάποιες διαφορές, πριν και μετά την κατεργασία με KNO_2 . Συγκεκριμένα τα ανέπαφα δείγματα παρουσιάζουν περιοδικότητα μεγαλύτερη από 2, στην αναγωγική πλευρά. Αυτό ενισχύεται και από τα Σχ. 60-δ (4,11,24) όπου έχει χρησιμοποιηθεί και 1mM υδροξυλαμίνης, για να ελαττωθεί η συνεισφορά από την οξειδωτική πλευρά και χωρίς την παρουσία δεκτών ηλεκτρονίων. Παρατηρείται, λοιπόν, ότι η περιοδικότητα 2 χάνεται στα επεξεργασμένα με KNO_2 δείγματα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί σαν αργή μεταφορά e^- από την Q_A στην Q_B ή μπορεί να θεωρηθεί ότι η Q_B δε μπορεί πλέον να δεχτεί άλλα ηλεκτρόνια. Τα Σχ. 60-ε (6,13) δείχνουν τα σήματα στα 325nm, απουσία ηλεκτρονιοδεκτών. Στα σήματα αυτά φαίνεται καθαρά ότι η περιοδικότητα στα επεξεργασμένα χάνεται εντελώς, που σημαίνει ότι η δεξαμενή πλαστοκινόνης δε λειτουργεί κανονικά. Τέλος, τα Σχ. 60-στ (7,14) δείχνουν το ποσό της φωτοανηγμένης Q_A , το οποίο δε φαίνεται να διαφέρει στα κατεργασμένα με KNO_2 και στα ακατέργαστα δείγματα.



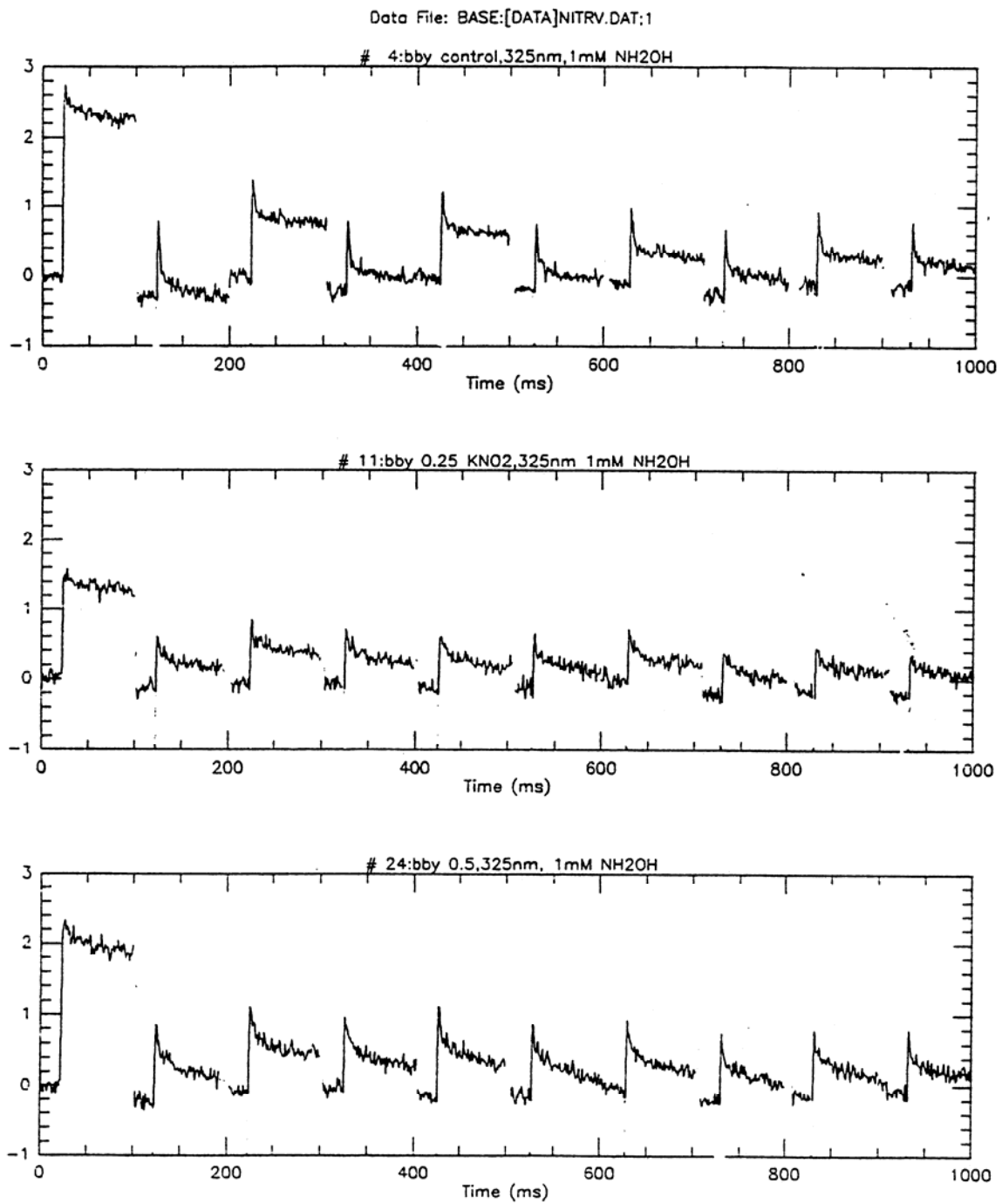
Σχήμα 60 - α: Οπτικά φάσματα σε PS II και KNO_2 -PS II (1,2,8,9): παρουσία DCBQ ή DMBQ στα 295nm



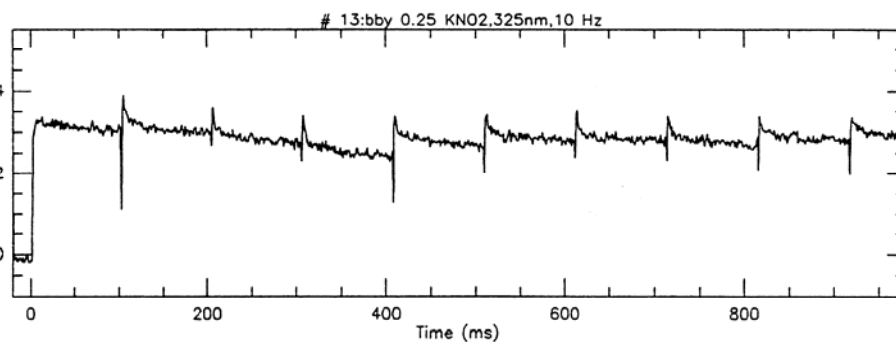
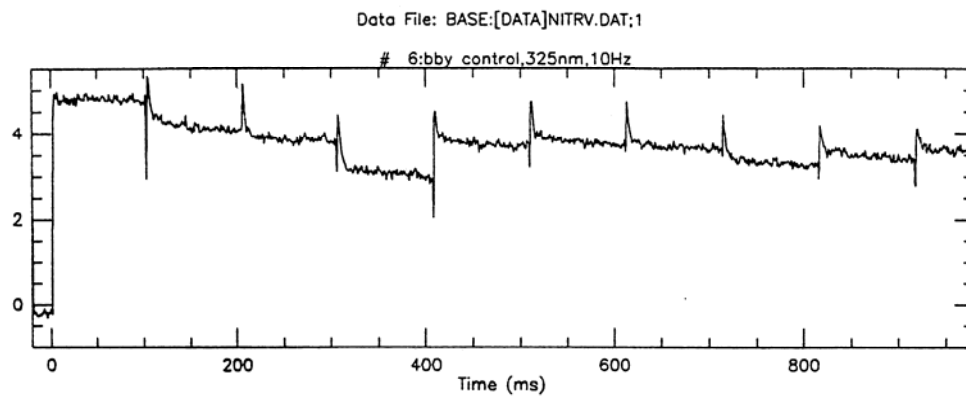
Σχήμα 60 - β: Οπτικά φάσματα σε PS II και KNO₂-PS II (22): ίδιο με το (8), αλλά μεγαλύτερη συγκέντρωση KNO₂



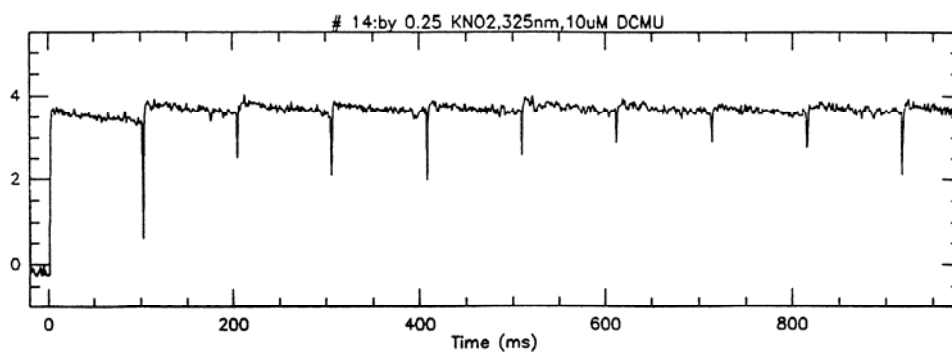
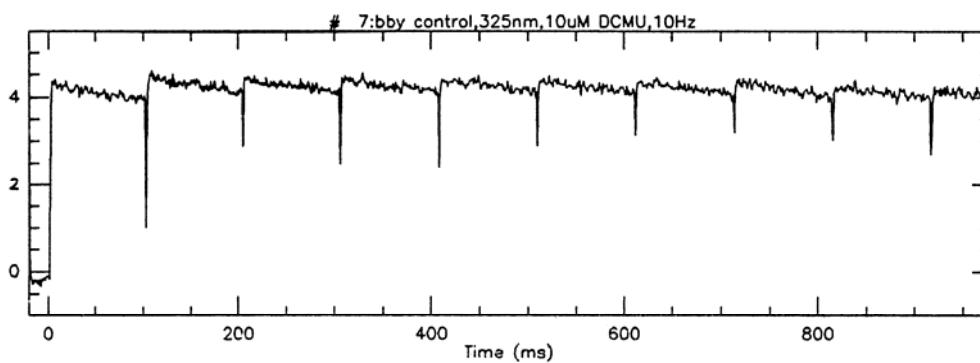
Σχήμα 60 - γ: Οπτικά φάσματα σε PS II και KNO₂-PS II (3,10,23): παρουσία DCBQ στα 325nm



*Σχήμα 60 – δ: Οπτικά φάσματα σε PS II και KNO₂-PS II
(4,11,24): παρουσία 1mM NH₂OH*



Σχήμα 60 - ε: Οπτικά φάσματα σε PS II και KNO₂-PS II (6,13): απουσία ηλεκτρονιοδεκτών στα 325nm



Σχήμα 60 - στ: Οπτικά φάσματα σε PS II και KNO₂-PS II (7,14): παρουσία 10μM DCMU στα 325nm.

Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η επίδραση του κάθε άλατος στο PS II, έχει διαφορετικές συνέπειες. Το LiClO_4 είναι ένα αλάτι, το οποίο ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις οδηγεί σε εκλεκτική απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών, χωρίς να εισάγει επιπλέον Cl^- , όπως συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται NaCl ή CaCl_2 για την απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών. Η διαφορετική επίδραση του άλατος αυτού είναι πιθανό να οφείλεται στις χαοτροπικές ιδιότητες του LiClO_4 , το οποίο μπορεί να επηρεάσει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Έτσι η αλληλεπίδραση των εξωτερικών πρωτεϊνών δεν αποδίδεται αποκλειστικά σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις αλλά και σε υδρόφοβες. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με την άποψη ότι η 33 kDa πρωτεΐνη αν και υδρόφιλη, ο πυρήνας της είναι υδρόφοβος.

Τέλος, το KNO_2 αν και δεν απομακρύνει τις εξωτερικές πρωτεΐνες, προκαλεί ελάττωση της ενεργότητας. Η ελάττωση αυτή πιθανόν να οφείλεται στην αναγωγική πλευρά, η οποία δε φαίνεται να λειτουργεί κανονικά, μετά την επεξεργασία των PS II-μεμβρανών με KNO_2 . Μια άλλη εκδοχή είναι ότι τα NO_2^- ανταγωνίζονται για τις θέσεις του Cl^- , οπότε ίσως να προκαλούνται τέτοιες δομικές αλλαγές, που οδηγούν σε μείωση της ικανότητας έκλυσης O_2 .

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa δεν επηρεάζουν τη στοιχειομετρία έκλυσης H^+ στον πυρήνα του Φωτοσυστήματος II.

2. Επεξεργασία του πυρήνα του Φωτοσυστήματος II με χαμηλή συγκέντρωση θρυψίνης, οδηγεί σε θραυσματοποίηση της D1 πρωτεΐνης, με παράλληλη μείωση της ενεργότητας, διατηρώντας τις εξωτερικές πρωτεΐνες 33, 23 και 17 kDa, το σύμπλοκο του μαγγανίου και τη στοιχειομετρία έκλυσης H^+ ανεπηρέαστα. Η ελάττωση της ενεργότητας σχετίζεται με την ευαισθησία του κατεργασμένου πυρήνα στην αύξηση της θερμοκρασίας, σε σύγκριση με τον μη κατεργασμένο πυρήνα.

3. Η στοιχειομετρία έκλυσης H^+ σε πυρήνα Φωτοσυστήματος II δεν επηρεάζεται από την ήπια κατεργασία με θρυψίνη.

4. Με χρήση EDC, ενός cross-linker που μπορεί να δώσει πληροφορίες για την τοπολογία πρωτεϊνών ενός συμπλόκου, που βρίσκονται σε van der Waals απόσταση μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των εξωτερικών πρωτεϊνών του πυρήνα του Φωτοσυστήματος II μεταξύ τους και με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες. Προτείνεται ότι η 33 kDa και η 23 kDa εξωτερικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τον πυρήνα μέσω των μεμβρανικών πρωτεϊνών CP 47 και cyt b_{559} , αντίστοιχα.

5. Η έλλειψη προϊόντων cross-linking των μικρών εξωτερικών πρωτεϊνών 23 και 17 kDa με την 33 kDa δε σημαίνει απαραίτητα ότι οι πρωτεΐνες αυτές δεν αλληλεπιδρούν, αφού μπορεί τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, που απαιτούνται για να δώσουν προϊόν cross-linking, να μη βρίσκονται στην κατάλληλη θέση για να αντιδράσουν με το EDC.

6. Χαμηλές συγκεντρώσεις $LiClO_4$ που είναι ένα αλας γνωστό για τις χαοτροπικές του ιδιότητες, οδηγούν σε απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών 23 και 17 kDa, ενώ αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος αυτού οδηγεί στην απομάκρυνση και της 33 kDa εξωτερικής πρωτεΐνης, δείχνοντας ότι οι αλληλεπιδράσεις των εξωτερικών πρωτεϊνών με τον πυρήνα δεν είναι μόνο ηλεκτροστατικής φύσης αλλά και υδρόφοβες.

7. Επεξεργασία του PS II με KNO_2 οδηγεί σε ελάττωση της ενεργότητας, χωρίς να επηρεάζονται οι εξωτερικές πρωτεΐνες. Η μείωση της ενεργότητας μπορεί να οφείλεται στην αναγωγική πλευρά, η οποία επηρεάζεται από την κατεργασία με το άλας αυτό, αφού παρατηρείται καθυστέρηση στη μεταφορά ηλεκτρονίων από την Q_A στην Q_B .

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pierson B.K. & Olson J.M. (1987) **New Comprehensive Biochemistry: Photosynthesis** (Amesz, J., Ed.), pp 21, Elsevier, Amsterdam.
2. Mathis P. & Rutherford A.W. (1987) **New Comprehensive Biochemistry: Photosynthesis** (Amesz, J., Ed.), pp 63, Elsevier, Amsterdam.
3. Cloud D. & Gitor A. (1970) **Sci. Am.** 223 (3), 111.
4. Wasielewski, M.R., Johnson, D.G., Seibert, M. and Govindjee (1989) **Proc. Natl. Acad. Sci.** (u.S.A) 85, 524-528.
5. Nuijs, A.M., van Gorkom, H.J., Plijter, J.J. and Duysens, L.M.N. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 848, 167-175.
6. Brettel, K., Schlopper, E. and Witt, H.T. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 766, 403-415.
7. Meyer, B., Schlopper, E., Dekker, J.P. and Witt, H.T. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 974, 35-43.
8. Velthuys, B.R. (1981) **FEBS Lett.** 126, 277-281.
9. Vermaas, W.F.J. and Arntzen, C.J. (1983) **Biochim. Biophys. Acta** 725, 483-491.
10. Nugent, J.H.A., Diner, B.A. and Evans, M.C.W. (1981) **FEBS Lett.** 124, 241-244.
11. Zimmermann, J.-L. and Rutherford, A.W. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 851, 416-423.
12. Rutherford, A.W., Paterson, D.R. and Mullet, J.E. (1981) **Biochim. Biophys. Acta** 635, 205-214.
13. Babcock G.T. (1987) **New Comprehensive Biochemistry: Photosynthesis** (Amesz, J., Ed.) pp 125, Elsevier, Amsterdam.
14. Joliot, P., Barbieri, G. and Chabaud, R. (1969) **Photochem. Photobiol.** 10, 309-329.
15. Strying, S. and Rutherford, W.A. (1987) **Biochemistry** 26, 2401-2405.

16. Joliot, P. and Kok, B. (1975) In: **Bioenergetics of Photosynthesis** (Govindjee, ed.), pp. 387-412, Academic Press, New York.
17. Kok, B., Forbush, B. and McGloin, M. (1970) **Photochem. Photobiol.** 11, 457-475.
18. Eyster et al., (1958) **Plant Physiol.** 33, 235.
19. Cheniae, G.M. (1970) **Ann. Rev. Plant Physiol.** 21, 467.
20. Yocum, C.F., Yerkes, C.T., Blankenship, R.E., Sharp, R.R. and Babcock, G.T. (1981) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 78, 7507-7511.
21. Tamura, N. and Cheniae, G. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 890, 179-194.
22. Ghanotakis, D.F., Topper, J. and Yocum, C.F. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 524-531.
23. Ono, T. and Inoue, Y. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 806, 331-340.
24. Tamura, N. and Cheniae, G. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 890, 179-194.
25. Pulles, M.P.J., van Gorkom, H.J. and Willemsen, J.G. (1976) **Biochim. Biophys. Acta** 449, 536-540.
26. Mathis, P. and Haveman, J. (1977) **Biochim. Biophys. Acta** 461, 167-181.
27. Dekker, J.P., Plitjer, J.J., Ouwehand, L. and van Gorkom, H.J. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 176-179.
28. Lavergne, J. (1986) **Photochem. Photobiol.** 43, 311-317.
29. Saygin, O. and Witt, H.T. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 893, 452-469.
30. Sauer, K., Yachandra, V.K., Britt, R.D. and Klein, M.P. (1992) In: **Manganese Redox Enzymes** (Pecoraro, V.L., ed.), pp. 141-175, VCH Publishers, Inc., New York.
31. George, G.N., Prince, R.C. and Cramer, S.P. (1989) **Science** 243, 789-791.
32. Yachandra, V.K., Guiles, R.D., McDermott, A.E., Cole, J.L., Britt, R.D., Dexheimer, S.L., Sauer, K. and Klein, M.P. (1987) **Biochemistry** 26, 5974-5981.

33. Yachandra, V.K., DeRose, V.L., Latimer, M.J., Mukerji, I., Sauer, K. and Klein, M.P. (1991) **Photochem. Photobiol.** 53, 98-99.
34. Kusunoki, M., Ono, T., Suzuki, M., Uehara, A., Matsushita, T., Oyanagi, H. and Inoue, Y. (1990) In: **Current Research in Photosynthesis** (Baltscheffsky, M., ed.), pp. 801-804, Kluwer, Dordrecht.
35. Guiles, R.D., Zimmermann, J.-L., McDermott, A.E., Yachandra, V.K., Cole, J.L., Dexheimer, S.L., Britt, R.D., Weighardt, K., Bossek, U., Sauer, K. and Klein, M.P. (1990) **Biochemistry** 29, 471-485.
36. Goodin, D.B., Yachandra, V.K., Britt, R.D., Sauer, K. and Klein, M.P. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 209-216.
37. Guiles, R.D., Yachandra, V.K., McDermott, A.E., Cole, J.L., Dexheimer, S.L., Britt, R.D., Sauer, K. and Klein, M.P. (1990) **Biochemistry** 29, 485-492.
38. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1983) **FEBS Lett.** 164, 255-260.
39. Miyao, M. and Murata, N. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 765, 253-257.
40. Styring, S., Miyao, M. and Rutherford, A.W. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 890, 32-38.
41. Miller, A.-F., de Paula, J.C. and Brudvig, G.W. (1987) **Photosynthesis Res.** 12, 205-218.
42. Miyao, M., Murata, N., Lavorel, J., Maison, B., Boussac, A. and Etienne, A.-L. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 890, 151-159.
43. Miyao, M. and Murata, N. (1984) **FEBS Lett.** 168, 118-120.
44. Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T. and Yocum, C.F. (1984) **FEBS Lett.** 167, 127-130.
45. Nakatani, H.Y. (1984) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 120, 299-304.
46. Boussac, A., Maison-Peteri, B., Etienne, A.-L. and Vernotte, C. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 808, 231-234.

47. Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T. and Yocum, C.F. (1985) **FEBS Lett.** 192, 1-3.
48. Miyao, M. and Murata, N. (1986) **Photosynthesis Res.** 10, 489-496.
49. Shen, J.-R., Satoh, K. and Satoh, S. (1988) **Biochim. Biophys. Acta** 933, 358-364.
50. Cammarata, K. and Cheniae, G. (1987) **Plant Physiol.** 84, 587-595.
51. Kalosaka, K., Beck, W.F., Brudvig, G.W. and Cheniae, G. (1990) In: **Current Research in Photosynthesis** (Baltscheffsky, M., ed.), Vol. I, pp. 721-724, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
52. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1998) **FEBS Lett.** 227, 147-152.
53. Boussac, A., Maison-Peteri, B., Vernotte, C. and Etienne, A.-L. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 808, 225-230.
54. Dekker, J.P., Ghanotakis, D.F., Plitjer, J.J., van Gorkom, H.J. and Babcock, G.T. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 515-523.
55. Boussac, A. and Rutherford, A.W. (1988) **FEBS Lett.** 236, 432-436.
56. Miller, A.-F. and Brudvig, G.W. (1989) **Biochemistry** 28, 8181-8190.
57. Tamura, N. and Cheniae, G. (1988) In: **Light-Energy Transduction in Photosynthesis: Higher Plant and Bacterial Models** (Stevens, S.E., Jr. and Bryant, D.A., ed.), pp. 227-242, American Society of Plant Physiologists, **Rockville**.
58. Locket, C.J., Demetriou, C., Bowden, S.J. and Nugent, J.H.A. (1990) **Biochim. Biophys. Acta** 1016, 13-218.
59. Waggoner, C.M., Pecoraro, V.L. and Yocum, C.F. (1989) **FEBS Lett.** 244, 237-240.
60. Waggoner, C.M. and Yocum, C.F. (1990) In: **Current Research of Photosynthesis** (Baltscheffsky, M., ed.), Vol. I, pp. 733-736, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
61. Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T. and Yocum, C.F. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 809, 173-180.

62. Coleman, W.J. and Govindjee (1987) **Photosynthesis Res.** 13, 199-223.
63. Rutherford, A.W. (1989) **Trends Biochem. Sci.** 14, 227-232.
64. Tamura, N., Inoue, H. and Inoue, Y. (1990) **Plant Cell Physiol.** 31, 469-477.
65. Mei, R. and Yocum, C.F. (1991) **Biochemistry** 30, 7836-7842.
66. Bricker, T.M. (1990) **Photosynthesis Res.** 24, 1-13.
67. Sayre, R.T. and Wrobel-Boerner, E. (1990) **Plant Cell Physiol.** 93, 22a.
68. Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1988) **FEBS Lett.** 241, 99-104.
69. Webber, A.N., Packman, L., Chapman, D.J., Barber, J. and Grey, J.C. (1989) **FEBS Lett.** 242, 259-262.
70. Kuwabara, T., Miyao, M., Murata, T. and Murata, N. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 806, 283-289.
71. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1984) **FEBS Lett.** 168, 281-286.
72. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 806, 331-340.
73. Miller, A.-F., de Paula, J.C. and Brudvig, G.W. (1987) **Photosynthesis Res.** 12, 205-218.
74. Sandusky, P.O. and Yocum, C.F. (1983) **FEBS Lett.** 162, 39-343.
75. Dismukes, G.C. (1986) **Photochem. Photobiol.** 43, 99-115.
76. Beck, W.F. and Brudvig, G.W. (1988) **Chem. Scripta** 28A, 93-98.
77. Govindjee, Baiann, I.C., Critchley, C. and Gutowsky, H.S. (1983) In: **The Oxygen Evolving System of Photosynthesis** (Inoue, Y., Crofts, A.R., Govindjee, Murata, N., Renger, G. and Satoh, K., ed.), pp. 303-315, Academic Press Japan, Tokyo.
78. Homann, P.H. (1987) **J. Bioenerg. Biomembr. Acta** 19, 105-123.
79. Sandusky, P.O. and Yocum, C.F. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 849, 85-93.

80. Sandusky, P.O. and Yocum, C.F. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 766, 603-611.
81. Hind, G., Nakatani, H.Y. and Izawa, S. (1969) **Biochim. Biophys. Acta** 172, 277-289.
82. Theg, S.M. and Homann, P.H. (1982) **Biochim. Biophys. Acta** 679, 221-234.
83. Izawa, S., Muallem, A. and Ramaswamy, N.K. (1983) In: **The Oxygen Evolving System of Photosynthesis** (Inoue, Y., Crofts, A.R., Govindjee, Murata, N., Renger, G. and Satoh, K., ed.), pp. 293-302, Academic Press, Inc., Tokyo.
84. Homann, P.H. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 809, 311-319.
85. Damoder, R., Klimov, V.V. and Dismukes, G.C. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 848, 378-391.
86. Wydrzynski, T., Baumgart, F., McMillan, F. and Renger, G. (1990) **Photosynthesis Res.** 25, 59-72.
87. Itoh, S., Yerkes, C.T., Koike, H., Robinson, H.H. and Crofts, A.R. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 766, 612-622.
88. Sinclair, J. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 764, 247-252.
89. Kelly, P.M. and Izawa, S. (1978) **Biochim. Biophys. Acta** 502, 198-210.
90. Bricker, T.M. and Ghanotakis, D.F. (1994) In: **Introduction to Oxygen Evolution and Oxygen-Evolving Complex**.
91. Baumgarten, M., Philo, J.S. and Dismukes, G.C. (1990) **Biochemistry** 29, 10814-10822.
92. Boussac, A., Setif, P. and Rutherford, A.W. (1991) **Biochemistry** 31, 1224-1234.
93. Berthold, D.A., Babcock, G.T. and Yocum, C.F. (1981) **FEBS Lett.** 134, 231-234.
94. Kuwabara, T. and Murata, N. (1982) **Plant Cell Physiol.** 23, 533-539.
95. Yamamoto, Y., Ueda, T., Shinkai, H. and Nishimura, M. (1982) **Biochim. Biophys. Acta** 679, 347-350.

96. Yocum, C.F. et al. (1981) **FEBS Lett.** 134, 231-234.
97. Briantais, J.-M., Vernotte, C., Krause, G. and Weis, E. (1986) In: **Light Emission by Plants and Bacteria** (Govindjee, Ames, J. and Fork, D.C., ed.), pp. 540-586, Academic Press, New York.
98. Ikeuchi, M., Yuasa, M. and Inoue, Y. (1985) **FEBS Lett.** 197, 316-322.
99. Haag, E., Irrgang, K.D., Boekema, E.J. and Renger, G. (1990) **Eur. J. Biochem.** 189, 47-53.
100. Ghanotakis, D.F. and Yocum, C.F. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 891, 15-21.
101. Nakatani, H.Y., Ke, B., Dolan, E. and Arntzen, C.J. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 765, 347-352.
102. Pakrasi, H.B., Riethaman, H.C. and Sherman, L.A. (1985) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 82, 6903-6907.
103. Vermaas, W.F.J., Williams, J.G.K. and Arntzen, C.J. (1987) **Plant Mol. Biol.** 8, 317-326.
104. Bricker, T.M. (1990) **Photosynthesis Res.** 24, 1-13.
105. Shen, G., Eaton-Rye, J.J. and Vermaas, W.F.J. (1993) **Biochemistry** 32, 5109-5115.
106. Tang, X.S. and Satoh, K. (1984) **Plant Cell Physiol.** 25, 935-945.
107. Barbato, R., Race, H.L., Friso, G. and Barber, J. (1991) **FEBS Lett.** 286, 86-90.
108. de Vitry, C., Wollmann, F.-A. and Delepelaire, P. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 415-422.
109. Yamaguchi, N., Takahashi, Y. and Satoh, K. (1988) **Plant Cell Physiol.** 29, 123-129.
110. Akabori, K., Tsukamoto, H., Tsukihara, J., Nagatsuka, T., Motokawa, O. and Toyoshima, Y. (1988) **Biochim. Biophys. Acta** 932, 345-357.

111. 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, 44-53.
112. Yamaguchi, N., Takahashi, Y. and Satoh, K. (1988) **Plant Cell Physiol.** 29, 123-129.
113. Bassi, R., Hoyer-Hansen, G., Barbato, R., Giacometti, G.M. and Simpson, D.J. (1987) **J. Biol. Chem.** 262, 13333-13341.
114. Ghanotakis, D.F. and Yocum, C.F. (1985) **Photosynthesis Res.** 7, 97-114.
115. Alfonso, M., Gulliermo, M., Cases, R., Rodriguez, R. and Picorel, R. (1994) **Biochemistry** 33, 10494-10500.
116. Petersen, J., Dekker, J.P., Bowlby, N.R., Ghanotakis, D.F., Yocum, C.F. and Babcock, G.T. (1990) **Biochemistry** 29, 3226-3231.
117. Vermaas, W.F.J., Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1988) **Photosynthesis Res.** 17, 97-113.
118. Eaton-Rye, J.J. and Vermaas, W.F.J. (1992) **Plant Mol. Biol.** 17, 1165-1177.
119. Putnam-Evans, C. and Bricker, T.M. (1992) **Biochemistry** 31, 11482-11488.
120. Trebst, A. and Depka, B. (1985) In: **Antennas and Reaction Centers in photosynthetic Bacteria-Interactions and Dynamics** (Beyerle, M.E., ed.), pp. 216-224, Springer-Verlag, Berlin.
121. Namba, O. and Satoh, K. (1987) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 84, 109-112.
122. Fotinou, C. and Ghanotakis, D.F. (1990) **Photosynthesis Res.** 25, 141-145.
123. Tang, X.-S., Fushimi, K. and Satoh, K. (1990) **FEBS Lett.** 273, 257-260.
124. Kobayashi, M., Maeda, H., Watanabe, T., Nakane, H. and Satoh, K. (1990) **FEBS Lett.** 260, 138-140.
125. Ikeuchi, M., Plumley, G., Inoue, Y. and Schmidt, G.W. (1987) **Plant Cell Physiol.** 85, 638-642.
126. Sayre, R.T., Andersson, B. and Bogorad, L. (1986) **Cell** 47, 601-608.

127. Tang, X.-S., Diner, B.A., Larsen, B.S., Gilchrist, Jr. M.L., Lorigan, G.A. and Britt, R.D. (1994) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 91, 704-708.
128. Debus, R.J., Barry, B.A., Sithole, I., Babcock, G.T. and McIntosh, L. (1988) **Biochemistry** 27, 9071-9074.
129. Debus, R.J., Barry, B.A., Babcock, G.T. and McIntosh, L. (1988) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 85, 427-430.
130. Bendall, D.S. (1968) **Biochem. J.** 109, 46-47.
131. Fan, H.N. and Cramer, W.A. (1970) **Biochim. Biophys. Acta** 267, 375-382.
132. Pakrasi, H.B. and Vermaas, W.F.J. (1992) In: **Structure Function and Molecular Biology** (Barber, J., ed.), pp. 231-258, Elsevier, Science Publishers B.V., Amsterdam.
133. Tomo, T., Enami, I. and Satoh, K. (1993) **FEBS Lett.** 323, 15-18.
134. Shen, J.-R. and Inoue, Y. (1993) **Biochemistry** 32, 1825-1832.
135. Miyao, M. and Murata, N. (1984) **FEBS Lett.** 168, 281-286.
136. Miyao, M. and Murata, N. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 765, 253-257.
137. Kuwabara, T., Miyao, M, Murata, T. and Murata, N. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 806, 283-289.
138. Mavankal, G.,McCain, D.C. and Bricker, T.M. (1986) **FEBS Lett.** 202, 235-239.
139. Bricker, T.M. (1992) **Biochemistry** 31, 4623-4628.
140. Miyao, M., Murata, N., lavorel, J., Maison-Peteri, B., Boussac, A. and Etienne, A.-L. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 890, 151-159.
141. Vass, I. and Inoue Y. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 892, 224-235.
142. Kuwabara, T. and Murata, N. (1983) **Plant Cell Physiol.** 24, 741-747.
143. Armsrong, W.H. (1992) In: **Manganese Redox Enzymes** (Pecoaro, V.L., ed.), pp. 261-268, VCH Publishers, Inc., New York.

144. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1984) **FEBS Lett.** 166, 381-384.
145. Murata, N., Miyao, M. and Kuwabara, T. (1983) In: **The Oxygen Evolving System Of Photosynthesis** (Inoue, Y., Crofts, A.R., Govindjee, Murata, N, Renger, G. and Satoh, K.,ed.), pp.213-222, Academic Press, Inc., Tokyo.
146. Miyao, M. and Murata, N. (1983) **FEBS Lett.** 164, 375-378.
147. Hutchison, R.S., Betts, S.D., Yocum, C.F. and Barry, B.A. (1998) **Biochemistry** 37, 5643-5653.
148. Odom, W.R. and Bricker, T.M. (1992) **Biochemistry** 31, 5616, 5620.
149. Mei, R., Green, J.P., Sayre, R.T. and Frasch, W. (1989) **Biochemistry** 28,5560-5567.
150. Kavelaki, K. and Ghanotakis, D.F. (1991) **Photosynthesis Res.** 29, 149-155.
151. Isogai, Y. Yamamoto, Y. and Nishimura, M. (1985) **FEBS Lett.** 187, 240-244.
152. Takahashi, M.-A. and Asada, K. (1991) **Biochim. Biophys. Acta** 1059, 361-364.
153. Enami, I., Ohta, S., Mitsuhashi, S., Takahashi, S., Ikeuchi, M. and Katoh, S. (1992) **Plant Cell Physiol.** 33, 291-297.
154. Boussac, A. et al. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 890, 151-159.
155. Waggoner, C.M. and Yocum, C.F. (1987) In: **Progress in Photosynthesis Research** (Biggins, J., ed.), Vol.I, pp. 685-688, Martinus Nijhoff, Dordrecht.
156. Miyao, M. and Murata, N. (1985) **FEBS Lett.** 180, 303-308.
157. Rashid, A. and Carpentier, R. (1990) **Photosynthesis Res.** 24, 221-227.
158. Briantais, J.M., Vernotte, C., Miyao, M, Murata, N. and Picaud, M. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 808, 348-351.
159. Miyao, M. and Murata, N. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 977, 315-321.
160. Miyao, M. and Murata, N. (1983) **Biochim. Biophys. Acta** 725, 87-93.

161. Ono, T.-A., Kajikawa, H. and Inoue, Y. (1986) **Plant Cell Physiol.** 80, 85-90.
162. Becker, B., Callahan, F. and Cheniae, G. (1985) **FEBS Lett.** 192, 209-214.
163. Debus, R.J. (1992) **Biochim. Biophys. Acta** 1102, 269-352.
164. Miyazaki, A., Shina, T., Toyoshima, Y., Gounaris, K. and Barber, J. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 975, 142-147.
165. Buser, C.A., Diner, B.A. and Brudvig, G.W. (1992) **Biochemistry** 31, 11441-11448.
166. Barry, B.A. and Babcock, G.T. (1987) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 84, 7099-7103.
167. Kuwabara, T. and Suzuki, K. (1994) **Plant Cell Physiol.** 35, 665-675.
168. Blankeship, R.E., Babcock, G.T., Warden, J.T. and Sauer, K. (1975) **FEBS Lett.** 51, 287-293.
169. Babcock, G.T. and Sauer, K. (1973) **Biochim. Biophys. Acta** 325, 504-519.
170. Kuwabara, T. and Suzuki, K. (1995) **Plant Cell Physiol.** 36, 495-504.
171. Metz, J.G., Nixon, P.J., Nonger, M., Brudvig, G.W. and Diner, B.A. (1989) **Biochemistry** 28, 6960-6969.
172. Vass, I. and Styring, S. (1991) **Biochemistry** 30, 830-839.
173. Buser, C.A., Thompson, L.K., Diner, B.A. and Brudvig, G.W. (1990) **Biochemistry** 29, 8977-8985.
174. Inui, T., Kawamori, A., Kuroda, G., Ono, T.-A., Inoue, Y. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 973, 147-152.
175. Vass, I., Deak, Z., Jegerschold, C. and Styring, S. (1990) **Biochim. Biophys. Acta** 1018, 41-46.
176. Babcock, G.T., Barry, B.A., Debus, R.J., Hoganson, C.W., Atamian, M., McIntosh, L., Sithole, I. and Yocum, C.F. (1989) **Biochemistry** 28, 9557-9565.
177. Evelo, R.G., Dikanov, S.A. and Hoff, A.J. (1986) **Chem. Phys. Lett.** 157, 25-30.

178. Brudvig, G.W., Casey, J.L. and Sauer, K. (1983) **Biochim. Biophys. Acta** 723, 366-371.
179. Andreasson, L.-E. and Hansson, O. (1982) **Biochim. Biophys. Acta** 679, 261-268.
180. Hansson, O., Aasa, R. and Vannigird, T. (1987) **Biophys. J.** 51, 825-832.
181. Dismukes, G.C. and Siderer, Y. (1981) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 78, 274-278.
182. Zimmermann, J.-L. and Rutherford, A.W. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 160-167.
183. Casey, J.L. and Sauer, K. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 21-28.
184. de Paula, J.C., Innes, J.B. and Brudvig, G.W. (1985) **Biochemistry** 24, 8114-8120.
185. Beck, W.F. and Brudvig, G.W. (1988) **Chem. Scripta** 28A, 93-98.
186. Stryer, L. , Vol. I, Textbook.
187. Volker, M. et al. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 440, 278-286.
188. Methods in Enzymology (M.P. Duetscher).
189. Volker, M., Ono, T., Inoue, Y. and Renger, G. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 806, 25-34.
190. Bricker, T.M. and Frankel, L.K. (1987) **Arch. Bioch. Bioph.** 256, 295-301.
191. Isogai, Y, Yamamoto, Y. and Nishimura, M. (1985) **FEBS Lett.** 187, 240-244.
192. Enami, I., Tohri, A., Kamo, M., Ohta, H. and Shen, J.-R. (1997) **Biochim. Biophys. Acta** 1320, 17-26.
193. Kouimtzoglou, E., Mishra, R.K., Haumann, M., Junge, W. and Ghanotakis, D.F. (1995)
In: **Photosynthesis: from Light to Biosphere** (Mathis, P. ed.), Vol. II, pp. 305-308,
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
194. Garman, A. In: **Non-Radiative Labelling** , Textbook.

195. Enami, I., Ohta, S., Mitsuhashi, S., Takahashi, S., Ikeuchi, M. and Katoh, S. (1992) **Plant Cell Physiol.** 33, 291-297.
196. Tomo, T., Enami, I. and Satoh, K. (1993) **FEBS Lett.** 323, 15-18.
197. Enami, I., Mochizuki, Y., Takahashi, S., Kakuno, T., Horio, T., Satoh, K. and Katoh, S. (1990) **Plant Cell Physiol.** 31, 725-729.
198. Enami, I., Miyaoka, T., Mochizuki, Y., Shen, J.-R., Satoh, K. and Katoh, S. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 973, 35-40.M
199. Bricker, T.M., Odom, W.R. and Queirolo, C.B. (1988) **FEBS Lett.** 231, 111-117.
200. Ohta, H., Yoshida, N., Sano, M., Hirano, M., Nakazato, K. and Enami, I. (1995) In: **Photosynthesis: From Light to Biosphere** (Mathis, P., ed.), Vol. II, pp. 361-364, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
201. Odom, W.R. and Bricker, T.M. (1992) **Biochemistry** 31, 5616-5620.
202. Seidler, A. (1996) **Eur. J. Bioch.** 176, 1-6.
203. Enami, I., Kamo, M., Ohta, H., Takahashi, S., Miura, T., Kusayanagi, M., Tanabe, S., Kamei, A., Motoki, A., Hirano, M., Tomo, T. and Satoh, K. (1998) **J. Biol. Chem.** 273, 4629-4634.
204. Haumann, M and Junge, W. (1999) **Biochim. Biophys. Acta** 1411, 86-91.
205. Haumann, M. and Junge, W. (1999) **Biochim. Biophys. Acta** 1411, 121-133.
206. Lavergne, J. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 894, 91-107.
207. Saygin, O. and Witt, H.T. (1985) **FEBS Lett.** 187, 224-226.
208. Fowler, C.F. (1977) **Biochim. Biophys. Acta** 462, 414-421.
209. Foerster, V. and Junge, W. (1988) **Chem. Scripta** 28A, 111-116.
210. Renger, G, Wacker, U. and Volker, M. (1987) **Photosynthesis Res.** 13, 167-189..
211. Wille, B. and Lavergne, J. (1982) **Photochem. Photobiophys.** 4, 131-144.

212. Rappaport, F. and Lavergne, J. (1991) **Biochemistry** 30, 10004-10012.
213. Jahns, P., Lavergne, J., Rappaport, F. and Junge, W. (1991) **Biochim. Biophys. Acta** 1057, 313-319.
214. Jahns, P. and Junge, W. (1992) **Biochemistry** 31, 7398-7403.
215. Haumann, M. and Junge, W. (1993) **Biochemistry**
- 216.** Lavergne, J. and Junge, W. (1993) **Photosynthesis Res.**
217. Lubbers, K., Haumann, M. and Junge, W. (1993) **Biochim. Biophys. Acta** 1183, 210-214.
218. Maroti, P. et al. (1988) **Biochim. Biophys. Acta** 934, 329-347.
219. Velthuys, B.R. (1980) **FEBS Lett.** 115, 167-170.
220. Witt, H.T. et al. (1986) **Photosynthesis Res.** 10, 453-471.
221. Kretschmann, h., Pauly, S. and Witt, H.T. (1991) **Biochim. Biophys. Acta** 1059, 208-214.
222. Dekker, J.P., Plijter, J.J., Ouwehand, L. and van Gorkom (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 176-179.
223. Renger, G. and Weiss, W. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 850, 184-196.
224. Wacker, U., Haag, E. and Renger, G. (1990) In: **Current Research in Photosynthesis** (Baltscheffsky, M., ed.), Vol. I., pp.869-872, Kluwer, Dordrecht.
225. Jahns, P. and Junge, W. (1992) **Biochemistry** 31, 7390-7397.
226. Zimmermann, J.-L. and Rutherford, A.W. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 851, 416-423.
227. Petrouleas, V. and Diner, B.A. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 893, 107-125.
228. Petrouleas, V. and Diner, B.A. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 849, 264-275.

229. Bowlby, N., Petersen, J., Babcock, G.T. and Yocum, C.F. (1989) **Physiol. Plant** 76, A114.
230. Miller, A.-F. and Brudvig, G.W. (1991) **Biochim. Biophys. Acta** 1056, 1-18.
231. Itoh, S., Tang, X.-S. and Satoh, K. (1986) **FEBS Lett.** 205, 275-281.
232. Aasa, R., Andreasson, L.-E., Styring, S. and Vanngard, T. (1989) **FEBS Lett.** 243, 156-160.
233. Petrouleas, V. and Diner, B.A. (1990) **Biochim. Biophys. Acta** 1015, 131-140.
234. Robinson, H.H., Sharp, R.R. and Yocum, C.F. (1981) **Arch. Biochem. Biophys.** 207, 1-8.
235. Ghanotakis, D.F. and Babcock, G.T. (1983) **FEBS Lett.** 153, 231-234.
236. Arnon, D. (1949) **Plant Physiol.** 24, 1-15.
237. Dekker, J.P., van Gorkom, H.J., Brok, M. and Ouwehand, L. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 764, 301-309.
238. Mishra, R.K. and Ghanotakis, D.F. (1993) **Photosynthesis Res.** 36, 11-16.
239. Mishra, R.K. and Ghanotakis, D.F. (1994) **Photosynthesis Res.** 42, 37-42.
240. Laemmli, U.K., (1970) **Nature** 227, 680-685.
241. Sumbrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., (1989), **Molecular Cloning**, Vol. 3, 2nd ed. CSH Press.
242. Haumann, M., Hundelt, M., Jahns, P., Chroni, S., Boegershausen, O., Ghanotakis, D. and Junge, W. (1997) **FEBS Lett.** 410, 243-248.
243. Haumann, M. and Junge, W. (1999) **Biochim. Biophys. Acta** 1411, 121-133.