

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΩΝ
ΙΟΝΤΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΣΤΟ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ
II ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΡΙΣΘΕΝΩΝ ΙΟΝΤΩΝ
ΛΑΝΘΑΝΙΔΙΩΝ**

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΜΠΑΚΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1995

Μέλη της εξεταστικής επιτροπής:

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| 1) Βαρώτσης Κων/νος, | Επίκ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης. |
| 2) Γανωτάκης Δημήτριος, | Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης. |
| 3) Καραμπάτσος Γεράσιμος, | Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης. |
| 4) Κοκκινίδης Μιχαήλ, | Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης. |
| 5) Κουτσολέλος Αθανάσιος, | Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης. |
| 6) Ορφανόπουλος Μιχαήλ, | Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης. |
| 7) Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Καλλιόπη, | Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης. |

στην κόρη μου Εύη

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Αλεξάνδρας Μπάκου

Ημερομηνία Γεννήσεως:

Κέρκυρα, 20 Οκτωβρίου 1962.

Σπουδές:

Πτυχίο τμήματος Χημείας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου (1987).

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης (1989-1995) (Επιβλέπων Αν. Καθ. κ. Δημ. Γανωτάκης).

Υποτροφίες:

Ιδρύμα Κρατικών Υποτροφιών, Ι.Κ.Υ. (1989-1991).

Ε.Μ.Υ. του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης (1992-1994).

Βραβείο DIGITAL (1992).

Εκπαιδευτική Εμπειρία:

Βοηθός εκπαιδευτής στα εργαστήρια Γενικής Χημείας (1989-1990),

Φυσικοχημείας (1990-1991) και Αναλυτικής Χημείας (1991-1992),

Βοηθός διδασκαλίας στα μαθήματα Αναλυτικής Χημείας (1992-1993)

και Βιοχημείας (1993-1994).

Ερευνητική Εμπειρία:

Βιοχημική και Βιοφυσική μελέτη μεταλλοπρωτεϊνών.

Απομόνωση πρωτεϊνικών συμπλόκων. Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός πρωτεϊνών με φασματοσκοπία ορατού, υπεριώδους και ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού.

Δημοσιεύσεις:

Calcium binding site(s) of photosystem II as probed by lanthanides.

A. Bakou, C. Buser, G. Dandulakis, G. Brudvig and D.F. Ghanotakis.

Biochimica Biophysica Acta, 1099 (1992) 131-136.

Extrinsic polypeptides and the inorganic cofactors of photosystem II.

D.F. Ghanotakis, A. Bakou and K. Kavelaki. In Regulation of Chloroplasts

Biogenesis (J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, editor), pp 383-390. Plenum Press, New York, 1992.

Paramagnetic lanthanides which substitute for calcium in photosystem II interact magnetically with Tyr Z⁺. A. Bakou and D.F. Ghanotakis.

In Research in Photosynthesis (N. Murata, ed.) Vol.2, 337-340 (1992).

Substitution of lanthanides at the calcium site(s) in photosystem II affects electron transport from tyrosine Z to P680⁺. A. Bakou and D.F. Ghanotakis, Biochim. Biophys. Acta 1141 (1993) 303-308 .

CURRICULUM VITAE

Alexandra Bakou

Birthdate: Corfu, October 20, 1962

Studies:

B.Sc. in Chemistry, University of Thessaloniki (1987)

Graduate Student, Department of Chemistry, University of Crete (1989-1995).

(Research Advisor: Prof. Ghanotakis).

Training and Research Experience:

Biochemical isolation and characterization of PSII.

Biophysical characterization of PSII (EPR spectroscopy, Atomic absorption, Potential determination of oxygen).

Publications:

Calcium binding site(s) of photosystem II as probed by lanthanides. A. Bakou, C. Buser, G. Dandulakis, G. Brudvig and D.F. Ghanotakis. *Biochimica Biophysica Acta*, 1099 (1992) 131-136.

Extrinsic polypeptides and the inorganic cofactors of photosystem II. D.F. Ghanotakis, A. Bakou and K. Kavelaki. In *Regulation of Chloroplasts Biogenesis* (J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, editor), pp 383-390, Plenum Press, New York, 1992.

Paramagnetic lanthanides which substitute for calcium in photosystem II interact magnetically with TyrZ⁺. A. Bakou and D.F. Ghanotakis. In *Research in Photosynthesis* (N. Murata, ed.,) Vol.2, 337-340 (1992).

Substitution of lanthanides at the calcium site(s) in photosystem II affects electron transport from tyrosine Z to P680⁺. A. Bakou and D.F. Ghanotakis. *Biochimica Biophysica Acta*, 1141 (1993) 303-308.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

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

Ευχαριστώ θερμά το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για την τρίχρονη υποτροφία, που μου χορήγησε. Τα τρία τελευταία χρόνια ήμουν Ειδικός Μεταπτυχιακός Υπότροφος (Ε.Μ.Υ.) του τμήματος Χημείας, το οποίο, επίσης, ευχαριστώ για τη χορήγηση αυτής της υποτροφίας.

Επίσης ευχαριστώ :

Τον Καθηγητή G. W. Brudvig και την Dr. C. Buser που με βοήθησαν να ολοκληρώσω μία σειρά πειραμάτων φασματοσκοπίας EPR κατά τη διάρκεια επίσκεψής μου στο Πανεπιστήμιο Yale.

Τον Καθηγητή H. J. van Gorkom για τη δυνατότητα που μου παρείχε να επισκεφτώ το εργαστήριό του στο Πανεπιστήμιο Leiden της Ολλανδίας και να πραγματοποιήσω μία σειρά πειραμάτων οπτικής φασματοσκοπίας. Οι επιστημονικές του συμβουλές βοήθησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια H. Wincencjusz του Πανεπιστημίου Leiden για τη βοήθειά της στην οπτική φασματοσκοπική μελέτη των δειγμάτων.

Τον Dr. B. Πετρουλέα και το μεταπτυχιακό φοιτητή X. Γούσια για την βοήθειά τους στην πραγματοποίηση ορισμένων μετρήσεων EPR στο Ερευνητικό Κέντρο "Δημόκριτος"

Τους Dr. N. Φωτεινού και Γ. Δανδουλάκη για την εκπαιδευτική και τεχνική υποστήριξη που μου πρόσφεραν τα πρώτα χρόνια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τους μεταπτυχιακούς φοιτητές N. Λυδάκη, A. Σπυριδάκη και E. Κουμιτζόγλου για τη φιλία και τη συναδελφικότητά τους, καθώς και όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του τμήματος Χημείας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, για τη συνεχή ηθική και υλική υποστήριξη που μου πρόσφερε, κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και ιδιαίτερα τον Βενέδικτο, που είχε και την επιμέλεια για την καλή εμφάνιση του κειμένου.

A. Μπάκου

13/4/95

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ - ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
SUMMARY	13
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ Ο ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ II ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ Η₂O ΣΤΑ ΑΝΩΤΕΡΑ ΦΥΤΑ	15
1.1 Φωτοσύνθεση.....	15
1.2 Οξυγονική φωτοσύνθεση.....	15
1.3 Φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα II.....	23
1.4 Σύμπλοκο Εκλυσης Οξυγόνου (Oxygen Evolving Complex, O.E.C.).....	26
1.5 Η ταυτότητα των οξειδωτικών καταστάσεων S.....	29
1.6 Φασματοσκοπία EPR.....	30
1.7 Φασματοσκοπία ακτίνων X (X-ray).....	38
1.8 Φασματοσκοπία UV.....	43
1.9 Η θέση δέσμευσης του μαγγανίου.....	44
1.10 Τα πολυπεπίδια του φωτοσυστήματος II	47
1.11 Ο ρόλος του ασβεστίου και χλωρίου στην οξείδωση του Η ₂ O.....	54
1.12 Ο μηχανισμός οξείδωσης του Η ₂ O.....	64
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	69
2.1 ΥΛΙΚΑ	69
2.1.1 Αντιδραστήρια.....	69
2.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα.....	70
2.1.3 Διαλύματα σε διάφορες πειραματικές διαδικασίες.....	70
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	71
2.2.1 Απομόνωση και κατεργασία φωτοσυνθετικών μεμβρανών PS II.....	72
2.2.1.1 Θυλακοειδή- Φωτοσύστημα II.....	72
2.2.1.2 Παρασκευή μεμβρανών Tris-PS II.....	73
2.2.1.3 Κατεργασία μεμβρανών PS II με τρισθενή ιόντα λανθανιδίων	73

2.2.1.4 Κατεργασία παρασκευασμάτων [Ln]-PS II και [Ln/EDTA]-PS II με διάλυμα Tris	75
.....	
2.2.1.5 Μεταφορά των διαφόρων παρασκευασμάτων PS II σε pH 7,5	76
2.2.2 Προσδιορισμός έκλυσης οξυγόνου.....	76
2.2.3	78
Ηλεκτροφόρηση	
2.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χλωροφύλλης.....	78
2.2.5 Φασματοσκοπικές μέθοδοι.....	79
2.2.5.1 Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR)	79
2.2.5.2 Φασματοσκοπία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).....	82
2.2.5.3 Φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης.....	83
3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΣΤΟ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ Π ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΡΙΣΘΕΝΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΛΑΝΘΑΝΙΔΙΩΝ	84
3.1 Εισαγωγή.....	84
3.2 Υλικά και μέθοδοι.....	86
3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	88
4 Η ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΩΝ ΛΑΝΘΑΝΙΔΙΩΝ ΣΤΙΣ ΘΕΣΕΙΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΤΥΡΟΣΙΝΗ Ζ ΣΤΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗ P₆₈₀⁺	103
4.1	103
Εισαγωγή.....	
4.2 Υλικά και μέθοδοι.....	105
4.3 Αποτελέσματα.....	106
4.4 Συζήτηση.....	121
5 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΞΩΓΕΝΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΔΟΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ Ζ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΞΩΤΕΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	125
5.1	125
Εισαγωγή.....	
5.2 Υλικά και μέθοδοι.....	126
5.3	127
Αποτελέσματα.....	
5.4	135
Συζήτηση.....	
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	139

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ - ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ

A	Angstroem
ATP	αδενοσινο-5-τριφωσφορικός εστέρας
BZ	βενζιδίνη
Chl	χλωροφύλλη
cyt. b559	κυτόχρωμα b559
DCBQ	2, 6-διχλωροβενζοκινόνη
DCMU	3-(3, 4-διχλωροφαινυλ)-1, 1-διμεθυλουρία
EDTA	αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
EGTA	αιθυλενο-δι-(οξυαιθυλενονιτριλο)-τετραοξικό οξύ
EPR	ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός
EXAFS	Electron X-ray Absorption Fine Structure
g	σταθερά g του ηλεκτρονίου
H	μαγνητικό πεδίο
Hepes	2-[4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινο]-αιθανο σουλφονικό οξύ
H_f	σήμα EPR της ρίζας Tyr-Z ⁺
H_s	σήμα EPR της ρίζας Tyr-D ⁺
kDa	kilodalton
LCH II	σύμπλοκο συλλογής φωτός του φωτοσυστήματος II
Ln³⁺	τρισθενές ιόν λανθανιδίου
Mes	4-μορφονιλο-αιθανοσουλφονικό οξύ
NADP	νικοτιδαμινο-αδενινο-δινουκλεοτιδο-φωσφορικός εστέρας
O.E.C.	σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου
P	μικροκυματική ισχύς
P_{1/2}	η μισή τιμή της μικροκυματικής ισχύος κορεσμού
P₆₈₀	πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης του φωτοσυστήματος II
P₇₀₀	πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης του φωτοσυστήματος I

PC	πλαστοκυανίνη
Pheo	φαιοφυτίνη
PQ	πλαστοκινόνη
PS I	φωτοσύστημα I
PS II	φωτοσύστημα II
QA	πλαστοκινόνη, πρωτοταγής ηλεκτρονιοδέκτης του φωτοσυστήματος II
QB	πλαστοκινόνη, δευτεροταγής ηλεκτρονιοδέκτης του φωτοσυστήματος II
RC	κέντρο αντίδρασης
SDS	δωδεκυλοθειϊκό νάτριο
Tyr-D	τυροσίνη του φωτοσυστήματος II που δεν συμμετέχει στην οξείδωση του νερού
Tyr-D⁺	ρίζα της τυροσίνης D, σταθερή στο σκοτάδι
Tyr-Z	τυροσίνη που λειτουργεί ως δευτεροταγής ηλεκτρονιοδότης στο PS II
Tyr-Z⁺	ρίζα της τυροσίνης Z
Tris	τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο
XANES	X-ray Absorption Near Edge Structure

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ιόντα Ca^{2+} του φωτοσυστήματος II αντικαταστάθηκαν από διάφορα παραμαγνητικά και διαμαγνητικά ιόντα λανθανιδίων (Ln^{3+}) σε μεμβράνες PS II που απομονώθηκαν από σπανάκι. Η επίδραση των τρισθενών ιόντων λανθανιδίων στις καταλυτικές και δομικές ιδιότητες του φωτοσυστήματος II μελετήθηκε με φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) και οπτική φασματοσκοπία διαφοράς απορρόφησης. Όταν τα ιόντα Ln^{3+} καταλαμβάνουν τις θέσεις δέσμευσης των ιόντων Ca^{2+} στο PS II, η λειτουργία του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου διακόπτεται. Η ενεργότητα της έκλυσης οξυγόνου επαναφέρεται μετά την απομάκρυνση των λανθανιδίων και την προσθήκη εξωγενούς ασβεστίου. Σε μεμβράνες PS II, στις οποίες τα ιόντα Ca^{2+} αντικαθίστανται από Ln^{3+} , δεν παράγονται οι υψηλές οξειδωτικές καταστάσεις του συμπλόκου του μαγγανίου και τα χαρακτηριστικά σήματα EPR που τις συνοδεύουν. Με ακτινοβολία σε θερμοκρασία 200 K των μεμβρανών αυτών δεν παράγεται το σήμα EPR multiline του συμπλόκου του μαγγανίου, αλλά οξειδώνεται ένα μόριο χλωροφύλλης. Μετά την απομάκρυνση των λανθανιδίων και την προσθήκη εξωγενούς ασβεστίου αποκαθίσταται η λειτουργία του συμπλόκου του μαγγανίου και μπορεί να παρατηρηθεί το σήμα multiline. Η μελέτη με φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία ηλίου και κινητική φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία δωματίου των κατεργασμένων με διαμαγνητικά και παραμαγνητικά λανθανίδια μεμβρανών PS II απέδειξε μία ισχυρή μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ των λανθανιδίων, τα οποία καταλαμβάνουν τις θέσεις δέσμευσης του ασβεστίου στο φωτοσύστημα II, και των οξειδοαναγωγικά ενεργών ριζών τυροσίνης Tyr-D^+ και Tyr-Z^+ . Η μελέτη με κινητική φασματοσκοπία EPR απέδειξε ότι η παρουσία των λανθανιδίων στις θέσεις δέσμευσης του ασβεστίου στο φωτοσύστημα II επηρεάζει, εκτός της ηλεκτρονιακής μεταφοράς από το σύμπλοκο του μαγγανίου στη ρίζα Tyr-Z^+ και τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την τυροσίνη Z στην οξειδωμένη χλωροφύλλη P_{680}^+ . Η τελευταία επίδραση εξαρτάται από την ιοντική ακτίνα των ιόντων Ln^{3+} και το pH του

συστήματος. Η επίδραση των λανθανιδίων στην αναγωγή του P_{680}^+ από την τυροσίνη Z παρατηρείται σε pH 6, αλλά όχι σε pH 7,5. Τα πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης με οπτική φασματοσκοπία διαφοράς απορρόφησης θεωρήθηκαν ως ένδειξη ότι το P_{680}^+ ανάγεται από έναν εναλλακτικό δότη σε pH 6. Σε διάφορα παρασκευάσματα PS II μελετήθηκε η επίδραση εξωγενών αναγωγικών στην ταχύτητα αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺. Διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη υδρόφοβων ηλεκτρονιοδοτών σε μεμβράνες PS II, οι οποίες διατηρούν το σύμπλοκο του μαγγανίου και τις εξωτερικές πρωτεΐνες, αλλά τα ιόντα Ca^{2+} αντικαταστάθηκαν από Ln^{3+} , έχει ως αποτέλεσμα την άμεση αναγωγή της ρίζας Tyr-Z⁺ από τον εξωγενή ηλεκτρονιοδότη. Είναι πιθανόν οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa, οι οποίες προστατεύουν το σύμπλοκο του μαγγανίου από την επίδραση εξωγενών αναγωγικών, να μην προστατεύουν τη ρίζα Tyr-Z⁺ από ανάλογη επίδραση. Η προσθήκη ιόντων Mn^{2+} σε μεμβράνες Tris-PS II επηρεάζει με δραστικό τρόπο την αναγωγή της ρίζας Tyr-Z⁺. Αντίθετα, σε μεμβράνες PS II, οι οποίες διατηρούν το σύμπλοκο του μαγγανίου μετά από κατεργασία με λανθανίδια, η προσθήκη ιόντων Mn^{2+} έχει ασήμαντη επίδραση. Η παρατήρηση αυτή θεωρήθηκε ως ένδειξη ότι η αναγωγή της ρίζας Tyr-Z⁺ πραγματοποιείται από ένα τουλάχιστον ιόν Mn^{2+} , που δεσμεύεται σε μία θέση δέσμευσης μαγγανίου του συμπλόκου O.E.C.

SUMMARY

A selective substitution of Ca^{2+} by various paramagnetic and diamagnetic lanthanide ions (Ln^{3+}) was carried out in Photosystem II membranes from spinach. The effect of the trivalent lanthanide ions on the structural and catalytic properties of photosystem II was studied by using electron paramagnetic resonance (EPR) and absorbance difference optical spectroscopy. When the Ln^{3+} ions occupied the calcium binding sites, the function of the oxygen evolving complex was interrupted. The oxygen evolving complex in the lanthanide-treated PS II membranes, was unable to proceed to the higher oxidation states; illumination of the membranes at 200 K, resulted in the photooxidation of a chlorophyll. Removal of the lanthanide ions, followed by addition of exogenous calcium, resulted in the reactivation of the enzyme. Illumination of the reactivated enzyme at 200 K, generated the EPR multiline signal characteristic of the S_2 state. PS II membranes treated with both diamagnetic and paramagnetic lanthanide ions were studied by low temperature EPR and room temperature kinetic EPR spectroscopy. These studies demonstrated a close magnetic interaction between the lanthanides, which substitute for calcium in PS II, and the tyrosine radicals Tyr-D^+ and Tyr-Z^+ . In addition to blocking electron transport from the Mn-complex to Tyr-Z , the presence of lanthanides in the calcium binding sites in PS II affects electron transport from the tyrosine Z to the oxidized chlorophyll P_{680}^+ . The latter effect depends on both the ionic radii of trivalent lanthanide ions and the pH of the system. Although the presence of the lanthanides has a strong influence on the reduction of P_{680}^+ by tyrosine Z at pH 6.0, no such effect is observed at pH 7.5. A study of the lanthanide treated PS II by absorbance difference spectroscopy, implied that P_{680}^+ might be reduced by an alternative donor at pH 6.0. The effect of exogenous reductants on the reduction of Tyr-Z^+ was studied in various PS II preparations. Addition of hydrophobic exogenous donors to lanthanide treated PS II membranes, which retained the Mn-complex and all three extrinsic polypeptides, resulted in a direct reduction of Tyr-Z^+ by the exogenous

donor. It is possible that the 17 and 23 kDa polypeptides, which protect the Mn-complex against reduction by exogenous reductants, do not screen Tyr-Z⁺. Exogenous Mn²⁺, which in Tris-treated PS II effectively reduces TyrZ⁺, had no significant effect on the reduction of TyrZ⁺ in Ln³⁺-treated membranes, which retained the native Mn-complex. This observation was taken as evidence that Mn²⁺ can reduce Tyr-Z⁺ only through native Mn-binding sites.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ II ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ Η₂O ΣΤΑ ΑΝΩΤΕΡΑ ΦΥΤΑ

1.1 Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση είναι χωρίς αμφιβολία η πιο σημαντική χημική διαδικασία πάνω στη γη, από την οποία εξαρτώνται όλες οι μορφές ζωής του πλανήτη μας. Η φωτοσυνθετική ικανότητα, δηλαδή η μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε ελεύθερη χημική ενέργεια που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βιοσύνθεση, αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό των ανώτερων φυτών, ευκαρυωτικών φυκών, κυανοβακτηρίων και φωτοσυνθετικών βακτηρίων.

Οι δύο σπουδαιότερες απαιτήσεις του ανθρώπου για επιβίωση πάνω στη γη είναι η τροφή και τα καύσιμα. Όλες οι οργανικές ουσίες, που καταναλίσκονται από τους ετερότροφους οργανισμούς, παράγονται άμεσα ή έμμεσα αποκλειστικά με τη φωτοσύνθεση. Όλη η ενέργεια που καταναλώνεται από μία σύγχρονη κοινωνία, εκτός από την πυρηνική ενέργεια, προέρχεται από τον ήλιο και αποθηκεύεται με τη φωτοχημεία και τη φωτοβιολογία. Για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών κατά ένα μικρό ποσοστό συμβάλλει και η υδροηλεκτρική ενέργεια. Υπάρχει ένα τεράστιο απόθεμα βιογενών καυσίμων, που έχει συσσωρευθεί τα τελευταία 3×10^6 χρόνια και η πορεία αυτή συνεχίζεται και σήμερα σε μία ανανεώσιμη βάση. Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί ενσωματώνουν ετησίως 2×10^{11} ton υδατανθράκων. Αυτή η ποσότητα αντιστοιχεί στη 10πλάσια ετήσια ενέργεια, που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος και τη 200πλάσια ετήσια κατανάλωση τροφίμων. Ο κύκλος του CO₂ στην ατμόσφαιρα διατηρείται και ανταλλάσσεται κάθε 300 χρόνια, ο κύκλος του O₂ και του H₂O κάθε 2.000 και 2×10^6 χρόνια, αντίστοιχα. Όμως, η συνολική απόδοση της φωτοσύνθεσης είναι πολύ μικρή, μόνο 0,2% [1].

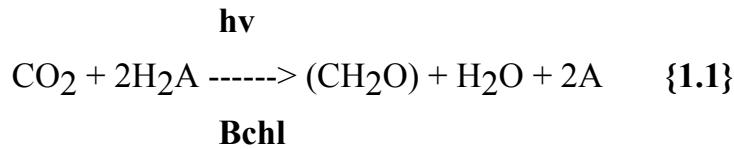
Η γη σχηματίστηκε πριν από 4×10^9 χρόνια και η ζωή εμφανίστηκε κατά τη χρονική περίοδο, που ο ήλιος χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη

της ζωής. Η αρχική φωτοχημική πορεία στην ανώτερη ατμόσφαιρα περιελάμβανε τη φωτοσύνθεση μεγάλων οργανικών μορίων από μικρότερα, όπως H_2O , NH_3 και ίσως CH_4 . Πριν από 3×10^9 χρόνια, αναπτύχθηκαν μόρια χρωστικών, όπως η χλωροφύλλη, που ήταν κατάλληλα να απορροφούν την ορατή ακτινοβολία και έτσι άρχισε η φωτοσυνθετική διαδικασία.

Η αποθήκευση των προϊόντων της φωτοσύνθεσης, όπως το κάρβουνο, το πετρέλαιο και το αέριο, έχει γίνει τα τελευταία 3×10^6 χρόνια και η κατανάλωσή τους σε μεγάλη κλίμακα άρχισε μόνο πριν από μερικές γενιές. Η μεγάλη ταχύτητα κατανάλωσης των βιογενών καυσίμων καθιστά επιτακτική την ανάγκη ανάπτυξης άλλων πηγών ενέργειας. Δύο πηγές ενέργειας έχουν τη δυνατότητα να ικανοποιήσουν τις μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις της εποχής μας. Οι δύο αυτές πηγές είναι οι πυρηνικοί αντιδραστήρες και η φωτοσύνθεση. Η πυρηνική ενέργεια είναι κατάλληλη για την παραγωγή ηλεκτρισμού σε ηλεκτρικό δίκτυο ενώ τα χημικά παράγωγα της φωτοσύνθεσης είναι κατάλληλες μορφές ενέργειας για μεταφορά και αποθήκευση.

Ο τίτλος του πρωτεργάτη της μελέτης της φωτοσύνθεσης αποδίδεται στον van Helmont, ο οποίος γύρω στα 1650 διαπίστωσε τη συμβολή του νερού στην ανάπτυξη των φυτών. Έναν αιώνα αργότερα ο Bonnet, χωρίς βέβαια να αντιλαμβάνεται τη χημική διαδικασία που γινόταν, παρατήρησε ότι τα φυτά, που ήταν εμβαπτισμένα σε νερό, ανέπτυσαν φυσαλλίδες με την έκθεσή τους στον ήλιο. Το 1771 ο Priestley απέδειξε ότι τα φυτά παράγουν οξυγόνο. Το 1779 ο Ingenhousz διαπίστωσε ότι τα φυτά χρειάζονται τα πράσινα μέρη τους και το φως για να ανανεώνουν τον αέρα και ότι κατά τη διάρκεια της νύχτας τον καταναλώνουν με την αναπνοή. Το 1782 ο Senebier παρατήρησε ότι τα φυτά χρειάζονται CO_2 για να εμπλουτίσουν τον αέρα με O_2 και λίγο αργότερα, το 1796, ο Ingenhousz υπέθεσε ότι το CO_2 ήταν η πηγή για όλη την οργανική ύλη στα φυτά. Το 1804 ο de Saussure με βάση το νόμο της διατήρησης της μάζας επιβεβαίωσε τον van Helmont ότι το μεγαλύτερο βάρος του φυτού προέρχεται από CO_2 και H_2O . Ο Mayer, το 1845, απέδειξε ότι η ηλιακή ενέργεια αποθηκεύεται ως χημική ενέργεια με τη μορφή οργανικής ύλης. Στις αρχές

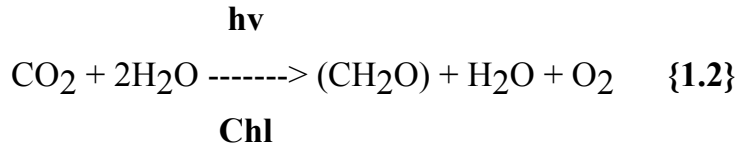
του εικοστού αιώνα χαρακτηρίστηκε η γλωροφύλλη. Ο van Niel, το 1920, διατύπωσε για την βακτηριακή φωτοσύνθεση την ακόλουθη αντίδραση:



Το H₂A συμβολίζει γενικά ένα αναγωγικό και το CH₂O τον ενσωματωμένο υδατάνθρακα.

Η αξιοσημείωτη συνεισφορά του van Niel ήταν η διαπίστωση ότι η φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης είναι ένας διαχωρισμός οξειδωτικών και αναγωγικών συστατικών. Η μοντέρνα θεώρηση του μηχανισμού της φωτοσύνθεσης άρχισε με την ιδέα αυτή [2].

Γιά τους οξυγονικούς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (τα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια) η αντίδραση {1.1} έχει την ακόλουθη μορφή:



Τις τελευταίες δεκαετίες, βιοφυσική και βιοχημική έρευνα με σύγχρονες τεχνικές και μεθόδους οδήγησε στην κατανόηση του μηχανισμού της φωτοσύνθεσης σε μοριακό επίπεδο. Ο προσδιορισμός της δομής του φωτοσυνθετικού κέντρου αντίδρασης των μωβ-μη θειούχων βακτηρίων *Rhodospseudomonas viridis* έδωσε χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή και τη λειτουργία του κέντρου αντίδρασης των οξυγονικών φωτοσυνθετικών οργανισμών [4].

1.2 Οξυγονική Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση αρχίζει με την απορρόφηση ενός φωτονίου από ένα μόριο χρωστικής, όπως η χλωροφύλλη (Chl), και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία της ηλεκτρονικά διεγερμένης κατάστασης της χρωστικής. Στα φυτά, περίπου το 98% των φωτοσυνθετικών χρωστικών λειτουργεί ως κεραία περισυλλογής της ηλιακής ενέργειας και μόνο. Αυτές μεταφέρουν την ενέργεια της διεγερμένης κατάστασης σε ένα γειτονικό μόριο χρωστικής αλλά δε συμμετέχουν στη φωτοχημική διαδικασία. Η ενέργεια μεταφέρεται γρήγορα από τη μία χρωστική στην επόμενη με μηχανισμό μεταφοράς ενέργειας Forster [3] μέχρι να παγιδευτεί στο ονομαζόμενο κέντρο αντίδρασης (Reaction Center, R.C.). Η διεγερμένη κατάσταση κανονικά θα επανερχόταν στη βασική κατάσταση μέσα σε λίγα nsec. Επειδή η βιοχημική σύνθεση των ενεργειακά αποθηκευμένων οργανικών ενώσεων απαιτεί χρόνο της τάξης του msec, η ενέργεια που περιέχεται στη διεγερμένη κατάσταση πρέπει να σταθεροποιηθεί. Το κέντρο αντίδρασης το κατορθώνει αυτό με τον ακόλουθο τρόπο: Η φωτοχημικά ενεργή Chl, P*, δίνει ένα ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο Chl ή φαιοφυτίνης, Pheo (I), που δρα ως πρωτοταγής αποδέκτης και σχηματίζει το πρωτοταγές ζεύγος ριζών, P⁺I⁻. Δευτεροταγείς αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων οδηγούν σε ένα αποτελεσματικό διαχωρισμό θετικών και αρνητικών φορτίων κατά μήκος της φωτοσυνθετικής μεμβράνης. Αντιδράσεις επανασύνδεσης απαγορεύονται, επειδή η δευτεροταγής ηλεκτρονιακή μεταφορά χαρακτηρίζεται από μεγάλες σταθερές ισορροπίας.

Η χρήση του παραγόμενου αναγωγικού συστατικού στην αρνητική πλευρά (n-side) και του οξειδωτικού στη θετική πλευρά (p-side) της μεμβράνης εξαρτάται από το φωτοσυνθετικό οργανισμό. Στα φωτοσυνθετικά μωβ βακτήρια (purple bacteria) η ηλεκτρονιακή μεταφορά είναι κυρίως κυκλική. Στην αρνητική πλευρά, το κέντρο αντίδρασης δίνει ηλεκτρόνια σε μία δεξαμενή μορίων ουβικινόνης, τα οποία μπορούν και κινούνται ελεύθερα στη λιπιδική φάση της μεμβράνης. Οι ουβικινόνες

δεσμεύουν δύο πρωτόνια και ανάγονται σε ουβικινόλες. Στη θετική πλευρά, το κέντρο αντίδρασης οξειδώνει ένα κυτόχρωμα τύπου c (cyt. c). Η ηλεκτρονιακή μεταφορά από την ουβικινόλη στο κυτόχρωμα c καταλύεται από το σύμπλοκο του κυτοχρώματος bc (cyt. bc). Το cyt bc οξειδώνει την κινόλη με απελευθέρωση δύο πρωτονίων στη θετική πλευρά, μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο στο διαλυτό cyt c και ένα κατά μήκος της μεμβράνης στην αρνητική πλευρά. Το τελευταίο ηλεκτρόνιο συμμετέχει στην αναγωγή της κινόνης, που γίνεται με κατανάλωση H^+ από την αρνητική πλευρά της μεμβράνης. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της φωτοσυνθετικής ηλεκτρονιακής μεταφοράς είναι ότι κάθε ηλεκτρόνιο περνώντας από τη δεξαμενή των κινόνων μετακινεί δύο H^+ κατά μήκος της μεμβράνης. Η πρωτονιακή συγκέντρωση και η διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης αποτελούν την κινητήρια δύναμη για τη σύνθεση του συστατικού ATP, του γενικού ενεργειακού μεταφορέα στη βιοχημεία.

Στην οξυγονική φωτοσύνθεση, η ηλεκτρονιακή μεταφορά είναι κυρίως μη κυκλική: ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το H_2O , το οποίο οξειδώνεται παράγοντας O_2 , στη φερρεδοξίνη (Fd), μία υδατοδιαλυτή οξειδοαναγωγική πρωτεΐνη που ανάγει το συνένζυμο $NADP^+$. Το τελικό προϊόν των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης είναι το ισχυρό αναγωγικό $NADPH$ που προσφέρει την απαιτούμενη ενέργεια για τη βιοσύνθεση οργανικού υλικού από CO_2 , NO_3^- και SO_4^{2-} . Δύο είδη φωτοσυστήματος λειτουργούν σε σειρά για να πραγματοποιηθεί αυτή η ηλεκτρονιακή μεταφορά: το φωτοσύστημα I (PS I), το οποίο ανάγει τη Fd και το φωτοσύστημα II (PS II), το οποίο οξειδώνει το H_2O . Η ηλεκτρονιακή μεταφορά από το PS II στο PS I είναι όμοια με την κυκλική μεταφορά στα μωβ βακτήρια και γίνεται με τη συμμετοχή μίας δεξαμενής μορίων πλαστοκινόνης, του συμπλόκου του κυτοχρώματος b_6c (cyt. b_6c) και ενός υδατοδιαλυτού cyt c. Το cyt c στα ανώτερα φυτά και σε ορισμένα φύκη έχει αντικατασταθεί από την πλαστοκυανίνη (PC), μία χαλκο-πρωτεΐνη.

Σχ. 1: Ηλεκτρονιογράφημα χλωροπλάστη ανώτερου φυτού. EM: διπλή εξωτερική μεμβράνη, ΘΣ: θυλακοειδή στρώματος, Σ: στρώμα, GR: grana [331].

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες. Οι χλωροπλάστες είναι κυτταρικά οργανίδια που περιβάλλονται από μία διπλή εξωτερική μεμβράνη και περιέχουν ένα εκτεταμένο σύστημα εσωτερικών μεμβρανών, τα θυλακοειδή (thylakoids), που είναι εμβαπτισμένα σε μία υδατοδιαλυτή φάση, το στρώμα (stroma). Το στρώμα περιέχει τα ένζυμα που καταλύουν την αφομοίωση του CO₂ σε υδατάνθρακες χρησιμοποιώντας την ενέργεια του αναγωγικού συστατικού NADPH και του φωσφορικού δεσμού της ένωσης ATP, που παράγονται κατά τις φωτεινές αντιδράσεις. Τα θυλακοειδή διαπλατώνονται σε μεμβρανώδεις σάκους (θυλακοειδή στρώματος ή lamellae) και σε τακτά διαστήματα επιστιβάζονται σε μορφώματα, τα grana (**Σχ. 1**). Ο διαθυλακοειδής χώρος ονομάζεται lumen. Το PS II βρίσκεται κυρίως στα grana, το PS I και το σύμπλοκο CF₀-F₁ (ATP-συνθεάση), που αποτελεί τη θέση σύνθεσης

του ATP, εντοπίζονται 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 τέτοιο 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. 2).

Σχ. 2: Οργάνωση της θυλακοειδούς μεμβράνης. Στο σχήμα απεικονίζονται τα τέσσερα μεμβρανικά σύμπλοκα: PS I, PS II, cyt. b₆/f και ATP-συνθετάση (CF₀-CF₁), τα οποία κατανέμονται μεταξύ των grana και των θυλακοειδών στρώματος [332].

Η ηλεκτρονιακή αλυσίδα μεταφοράς από το H₂O στη φερρεδοξίνη (Fd) αναπαρίσταται με μία οξειδοαναγωγική κλίμακα δυναμικού, η οποία είναι γνωστή ως σχήμα-Z (Σχ. 3). Η Fd ανάγεται, με μία ακολουθία δευτεροταγών αντιδράσεων σταθεροποίησης φορτίου, από το αναγωγικό που παράγεται κατά το διαχωρισμό φορτίου στο PS I. Ο διαχωρισμός φορτίου στο PS I οξειδώνει τη χλωροφύλλη του κέντρου αντίδρασης, την P700.

Σχ. 3: Το σχήμα Z της φωτοσυνθετικής ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Η κατακόρυφη θέση κάθε ηλεκτρονιακού μεταφορέα αντιστοιχεί στο οξειδοαναγωγικό του δυναμικό E_M (V) σε pH 7. Τα διπλά βέλη δηλώνουν φωτοοξείδωση και τα συμπαγή βέλη δείχνουν την πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Ευέλικτοι ηλεκτρονιακοί μεταφορείς σημειώνονται εκτός του περιγράμματος. Τα περιγράμματα απεικονίζουν τα μεμβρανώδη πρωτεϊνικά σύμπλοκα PS II, PS I και cyt. b_6/f . A_0 και A_1 : ηλεκτρονιακοί αποδέκτες στο PS I, FeS_A , FeS_B και FeS_X : σιδηροθειούχα κέντρα που λειτουργούν ως ηλεκτρονιακοί αποδέκτες στο PS I, FeS_R : σιδηροθειούχο κέντρο "Rieske", F_p : φλαβοπρωτεΐνη της ρεδοκτάσης "φερρεδοξίνη-NADP", Q_A και Q_B : κινόνες που λειτουργούν ως ηλεκτρονιακοί αποδέκτες στο PS II, Z: τυροσίνη Z που λειτουργεί ως ηλεκτρονιακός δότης στο PS II [333].

Η οξειδωμένη $P700^+$, στη συνέχεια, ανάγεται από την πλαστοκυανίνη (PC) στην περιοχή lumen. Το σύμπλοκο του κυτοχρώματος b_6f καταλύει την αναγωγή της οξειδωμένης PC από την πλαστοκινόλη που μετατρέπεται σε πλαστοκινόνη. Η πλαστοκινόνη ανάγεται με κατανάλωση H^+ από το στρώμα με τη μεσολάβηση του PS II, το οποίο χρησιμοποιεί το H_2O ως αρχική πηγή ηλεκτρονίων [5].

1.3 Φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων στο Φωτοσύστημα II

Η φωτεινή ενέργεια, που απορροφάται από τα μόρια των χρωστικών (χλωροφυλλών και καροτενοειδών) της κεραίας περισυλλογής (Light Harvesting Complex, LHC II) του PS II μεταφέρεται σε ένα ειδικό διμερές ή πιθανώς μονομερές μόριο Chl α , το P680, το οποίο βρίσκεται στο ετεροδιμερές των πρωτεϊνών D₁/D₂ και έχει μέγιστο απορρόφησης στα 680 nm. Η απλή διεγερμένη κατάσταση της Chl P680, P*680, χαρακτηρίζεται ως πρωτοταγής δότης ηλεκτρονίων και μεταφέρει το ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο φαιοφυτίνης α , Pheo α , σε χρονικό διάστημα 3 psec [6]. Ο πρωτοταγής αυτός διαχωρισμός φορτίου σταθεροποιείται σε χρονικό διάστημα 200 psec [7] με μεταφορά του ηλεκτρονίου από την Pheo α σε ένα μόριο πλαστοκινόνης (PQ), την κινόνη Q_A, που είναι ισχυρά δεσμευμένο στο κέντρο αντίδρασης [8]. Η ημικινόνη Q_A⁻ οξειδώνεται από ένα δεύτερο μόριο PQ, την κινόνη Q_B, έναν αποδέκτη δύο ηλεκτρονίων [9, 10]. Μετά από ένα νέο διαχωρισμό φορτίου, η ημικινόνη Q_B⁻ παίρνει ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο, πρωτονιώνεται και απελευθερώνεται ως πλαστοκινόλη (Q_BH₂). Η τάση σύνδεσης της πλαστοκινόνης Q_BH₂ στο κέντρο αντίδρασης είναι μικρή, οπότε αντικαθίσταται από ένα μόριο οξειδωμένης κινόνης, το οποίο μεταφέρεται από τη δεξαμενή της πλαστοκινόνης (PQ-pool) [11]. 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 δέσμευση της κινόνης Q_B [12]. Οι δύο ημικινόνες Q_A⁻ και Q_B⁻ αλληλεπιδρούν μαγνητικά με ένα ιόν Fe²⁺ που δεν ανήκει σε αίμη [13, 14]. Το μεταλλικό αυτό ιόν δεν έχει οξειδοαναγωγική λειτουργία αλλά διευκολύνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το μόριο Pheo α στην κινόνη Q_A και ακολούθως στην κινόνη Q_B.

Οι ηλεκτρονιακές αντιδράσεις μεταφοράς από τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη P680 στην PQ παράγουν ένα ισχυρό οξειδωτικό, την οξειδωμένη Chl P680⁺ (E_m : +1,1V). Η οξειδωμένη Chl P680⁺ ανάγεται από μία τυροσίνη, την

τυροσίνη Z (Tyr-Z) που δρα ως δευτεροταγής δότης [15]. Η Tyr-Z ταυτοποιήθηκε με πειράματα μετάλλαξης ότι είναι το αμινοξύ Tyr-161 του πολυπεπτιδίου D₁ του κέντρου αντίδρασης [16]. Η οξείδωση της Tyr-Z παράγει μία ισχυρή οξειδωτική ρίζα, την Tyr-Z⁺, η οποία είναι αναγκαία για την οξείδωση του νερού. Η αντίδραση Tyr-Z+P₆₈₀⁺----> Tyr-Z⁺+P₆₈₀ χαρακτηρίζεται από ετερογενείς κινητικές της τάξης 20-250 nsec [17], οι οποίες εξαρτώνται από την οξειδωτική κατάσταση του συμπλόκου οξείδωσης του νερού [17, 18]. Το φάσμα EPR της ρίζας Tyr-Z⁺ με g=2.0045 έχει την ίδια μορφή σε ανέπαφα δείγματα PS II και δείγματα PS II, που κατεργάζονται με διάλυμα Tris (Tris-PS II) και ονομάζεται σήμα Π_{Vf} και σήμα Π_f, αντίστοιχα [19]. Εκτός από την Tyr-Z, το PS II περιέχει μία δεύτερη τυροσίνη, την τυροσίνη D (Tyr-D) που βρίσκεται στο πολυπεπτίδιο D₂ του κέντρου αντίδρασης (αμινοξύ Tyr-160) [21]. Το φάσμα EPR της οξειδωμένης τυροσίνης D, Tyr-D⁺, παρουσιάζει την ίδια μορφή με το αντίστοιχο της ρίζας Tyr-Z⁺ και ονομάζεται σήμα Π_S [20]. Η ρίζα Tyr-D⁺ είναι σταθερή στο σκοτάδι για ώρες αλλά δεν συμμετέχει στις αντιδράσεις ηλεκτρονιακής μεταφοράς, που οδηγούν στην οξείδωση του H₂O [21, 22]. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η Tyr-D οξειδώνεται από το P₆₈₀⁺ και το σύμπλοκο οξείδωσης του νερού [23, 24]. Σε χαμηλές θερμοκρασίες η ρίζα Tyr-D⁺ ανάγεται από την ημικινόνη Q_A⁻ [25] και πιθανώς από το κυτόχρωμα b₅₅₉ [26]. Οι Tyr-Z⁺ και Tyr-D⁺ θεωρούνται ουδέτερες ρίζες που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με γειτονικά βασικά αμινοξέα [27, 28]. Υπάρχουν δύο εναλλακτικοί δότες ηλεκτρονίων για το P₆₈₀⁺, το κυτόχρωμα b₅₅₉ και μία χλωροφύλλη, Chl, οι οποίοι ανάγουν το P₆₈₀⁺ όταν απαγορεύεται η οξείδωση του H₂O [29].

Σχ. 4: Η ηλεκτρονιακή μεταφορά στο φωτοσύστημα II. Η απορρόφηση ενός φωτονίου από τη χλωροφύλλη P₆₈₀ ακολουθείται από ένα διαχωρισμό φορτίου. Ο διαχωρισμός φορτίου σταθεροποιείται με μία σειρά αντιδράσεων ηλεκτρονιακής μεταφοράς που οδηγεί στο σχηματισμό μίας ακολουθίας ζευγών φορτίου με αυξημένη σταθερότητα. Στο Σχήμα απεικονίζονται η κινητική των αντιδράσεων ηλεκτρονιακής μεταφοράς και των αντιδράσεων επανασύνδεσης. Οι αντιδράσεις επανασύνδεσης σημειώνονται με στικτές γραμμές [249].

Η σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίων και η κινητική των επί μέρους αντιδράσεων μεταφοράς σε θερμοκρασία δωματίου παρουσιάζονται στο **Σχ. 4**. Η σταθερότητα των ζευγών των φορτίων, που σχηματίζονται, αυξάνει προοδευτικά. Αν για κάποια αιτία η κύρια αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων παρεμποδιστεί, αυξάνεται η πιθανότητα πραγματοποίησης των αντιδράσεων επανασύνδεσης. 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 ή να σχηματιστεί η τριπλή κατάσταση ³P₆₈₀ [30] (**Σχ. 4**). Οι αντίστροφες αντιδράσεις σημειώνονται στο **Σχ. 4** με στικτές γραμμές.

1.4. Σύμπλοκο Εκλύσης Οξυγόνου (Oxygen Evolving Complex, O.E.C.)

Είναι γενικά αποδεκτό ότι το σύμπλοκο O.E.C. περιέχει τέσσερα ιόντα μαγγανίου, που δεσμεύονται στις πρωτεΐνες του κέντρου αντίδρασης [31]. Το σύμπλοκο O.E.C. δίνει ηλεκτρόνια στη ρίζα Tyr-Z⁺. Τα τέσσερα ηλεκτρόνια της χημικής διάσπασης του H₂O συνδυάζονται με τη διαδικασία του ενός ηλεκτρονίου της φωτοχημικής αντίδρασης.

Σχ. 5: Η παλμική εξάρτηση της έκλυσης οξυγόνου που παρατηρήθηκε σε δείγμα χλωροπλαστών μετά επώαση στο σκοτάδι. Η μέγιστη παραγωγή οξυγόνου παρατηρείται στον τρίτο παλμό και μετά σε κάθε τέταρτο παλμό ακτινοβολήσης [334].

Σχ. 6: Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου έκλυσης οξυγόνου που προτάθηκε από τον Kok (κύκλος των οξειδωτικών καταστάσεων S). Τέσσερα φωτόνια απαιτούνται για την εξαγωγή τεσσάρων ηλεκτρονίων από δύο μόρια H₂O. Στο σκοτάδι η πλειονότητα των κέντρων αντίδρασης βρίσκεται στην οξειδωτική κατάσταση S₁. Δεν είναι γνωστό σε ποιο στάδιο δεσμεύεται το H₂O αλλά τα στάδια απελευθέρωσης των πρωτονίων (H⁺) και του οξυγόνου θεωρούνται γνωστά. Η κατάσταση S₄ συσσωρεύει τέσσερα θετικά φορτία που οδηγούν στην οξείδωση του νερού με ταυτόχρονη έκλυση οξυγόνου [335].

Γιά να επιτευχθεί αυτή η ένωση το σύμπλοκο O.E.C. πρέπει να αποθηκεύσει τέσσερα θετικά φορτία πριν γίνει η οξείδωση του H₂O. Η τετραδική αυτή λειτουργία παρατηρήθηκε στο κλασσικό πείραμα που έκανε ο Joliot το 1969 [32, 33]. Ο Joliot παρατήρησε ότι το ποσό του οξυγόνου, που παράγεται σε κάθε παλμό ακτινοβολίας αιωρήματος χλωροπλαστών, πάλλεται με περιοδικότητα τέσσερα σε αντιστοιχία με τον αριθμό των παλμών (**Σχ. 5**). Το αιώρημα των χλωροπλαστών ήταν διατηρημένο στο σκοτάδι πριν την ακτινοβολία με τον πρώτο παλμό. Η συσσώρευση των οξειδωτικών ισοδυνάμων και η ακόλουθη απελευθέρωση τους κατά την οξείδωση του H₂O ονομάζεται κύκλος των οξειδωτικών καταστάσεων S (μοντέλο Kok) [34]. Στο μοντέλο Kok κάθε κατάσταση S_n (S_n, n = 0-4)

αντιπροσωπεύει μία οξειδωτική κατάσταση της θετικής πλευράς (p-side) του PS II και ο δείκτης n δηλώνει τον αριθμό των οξειδωτικών ισοδυνάμων που συσσωρεύονται (**Σχ. 6**)

. Η κατάσταση S_4 μετατρέπεται στην κατάσταση S_0 με ταυτόχρονη απελευθέρωση του O_2 μέσα σε χρόνο 1 msec περίπου. Εντούτοις, ο Plijter, χρησιμοποιώντας ένα καθοδικό ηλεκτρόδιο οξυγόνου με πολύ ασθενή πόλωση, διαπίστωσε ότι το οξυγόνο απελευθερώνεται σε χρονικό διάστημα 30-100 msec [35, 36]. Η προτεινόμενη βραδεία απελευθέρωση του οξυγόνου απαιτεί ισχυρή πειραματική επιβεβαίωση πριν εγκαταλειφθεί η ορθόδοξη, ευρέως αποδεκτή, άποψη. Διαπιστώθηκε ότι η οξείδωση του νερού δεν περιλαμβάνει μερικώς οξειδωμένα ενδιάμεσα, σταθερά δεσμευμένα στην κατάσταση S_2 ή S_3 [37]. Στο σκοτάδι η κατάσταση S_0 οξειδώνεται αργά (σε μία ώρα περίπου) στην αντίστοιχη S_1 [38]. Η κατάσταση S_1 παρουσιάζει εξαιρετικά μεγάλης διάρκειας σταθερότητα, ενώ οι καταστάσεις S_2 και S_3 ανάγονται στην κατάσταση S_1 μέσα σε λίγα λεπτά [33]. Η τυροσίνη D οξειδώνεται από τις οξειδωτικές καταστάσεις S_2 και S_3 στο σκοτάδι [19] και η ταχύτητα αυτών των αντιδράσεων εξαρτάται από το pH [23]. Μετά από επώαση στο σκοτάδι τα περισσότερα κέντρα αντίδρασης βρίσκονται στην κατάσταση S_1 , ενώ ένα μικρό κλάσμα των κέντρων (0-25%) βρίσκεται στην κατάσταση S_0 . Το ποσοστό των κέντρων στην κατάσταση S_0 εξαρτάται από την έκταση της οξείδωσης της κατάστασης S_0 από την ρίζα $Tyr-D^+$. Η σταθερότητα της κατάστασης S_1 εξηγεί την παρατήρηση του Joliot ότι η απελευθέρωση οξυγόνου ήταν μέγιστη στον τρίτο και στη συνέχεια σε κάθε τέταρτο παλμό σε μεμβράνες χλωροπλαστών, που ήταν διατηρημένες στο σκοτάδι πριν το πρώτο παλμό. Η φθίνουσα μορφή της 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. Για κορεσμένους παλμούς διάρκειας 10 μ sec, το ποσοστό των εμφανιζόμενων διαρροών είναι 10% μηδενικές μεταπτώσεις (misses) και 5% διπλές μεταπτώσεις (double hits) [39].

Η οξειδωση δύο μορίων H₂O για την παραγωγή ενός μορίου O₂ έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση τεσσάρων πρωτονίων. Τα πρωτόνια απελευθερώνονται στην περιοχή lumen και η απελευθέρωση τους εξαρτάται από τις μεταπτώσεις S: ένα πρωτόνιο απελευθερώνεται κατά τη μετάπτωση S₀ → S₁, κανένα κατά τη μετάπτωση S₁ → S₂, ένα κατά τη μετάπτωση S₂ → S₃ και δύο κατά τη μετάπτωση S₃ → (S₄) → S₀ [40, 41], (Σχ. 6). Πρόσφατα, αναφέρθηκε μία μη ακέραια στοιχειομετρία απελευθέρωσης πρωτονίων (1:0.5:1:1.5) [42], η οποία εξαρτάται ισχυρά από το pH [43]. Σε μικρά υποσύμπλοκα του PS II η πρωτονιακή απελευθέρωση φαίνεται ότι είναι ανεξάρτητη των μεταπτώσεων S [44].

1.5 Η ταυτότητα των οξειδωτικών καταστάσεων S

Οι οξειδωτικές καταστάσεις S στο μοντέλο Kok δηλώνουν τα οξειδωτικά ισοδύναμα, που συσσωρεύονται. Τα εύλογα ερωτήματα που συσσωρεύονται και ποιό μοριακό συστατικό οξειδώνεται δεν έχουν πλήρως απαντηθεί. Υπάρχει πλήθος πειραματικών ενδείξεων σχετικά με τη δομή του συμπλόκου O.E.C, αλλά καμμία δεν προσφέρει μία πλήρη εικόνα και πολλές από αυτές έχουν οδηγήσει σε αντικρουόμενα συμπεράσματα. Είναι κοινά αποδεκτό ότι τέσσερα ιόντα μαγγανίου [45] είναι απαραίτητα για τη φωτοχημική διάσπαση του H₂O σε μοριακό O₂ παρουσία δύο άλλων ανόργανων συμπαραγόντων, των ιόντων Ca²⁺ [31, 46, 47, 48] και Cl⁻ [49, 50, 51]. Τα ιόντα μαγγανίου φαίνεται να μην είναι ισοδύναμα, επειδή απελευθερώνονται και επανασυνδέονται με διαφορετικό τρόπο. Ποσοστό 75-80% του ολικού μαγγανίου μπορεί να απομακρυνθεί με κατεργασία μεμβρανών PS II με 0,8 M Tris σε pH 8,2 [52]. Το ίδιο ποσό μαγγανίου απομακρύνεται με κατεργασία μεμβρανών PS II με 2 M NaCl και προσθήκη κατόπιν ενός αναγωγικού (π.χ. υδροκινόνη, HQ) [53]. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο κατεργασιών είναι ότι με το Tris απομακρύνονται και οι τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες 17, 23 και 33 kDa από το PS II ενώ με το άλας/HQ απομακρύνονται μόνο οι πρωτεΐνες 17 και 23 kDa. Με κατεργασία μεμβρανών PS II με 1 M CaCl₂ απομακρύνονται οι τρεις εξωτερικές

πρωτεΐνες, αλλά όχι τα τέσσερα ιόντα μαγγανίου. Αν τα κατεργασμένα με CaCl_2 δείγματα PS II διατηρηθούν σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης ιόντων Cl^- (<100 mM), δύο ιόντα μαγγανίου απελευθερώνονται [54]. Αυτό θεωρήθηκε ως ένδειξη ότι το ένα ζεύγος ιόντων μαγγανίου δεσμεύεται ασθενέστερα συγκριτικά με το άλλο ζεύγος. Δεν είναι γνωστό αν η ετερογένεια αυτή οφείλεται στην παρουσία διαφορετικών υποκαταστατών ή διαφορετικών οξειδωτικών καταστάσεων στα δύο ζεύγη ιόντων μαγγανίου. Οι Tamura και Cheniae [55] απέδειξαν ότι, κάτω από ορισμένες συνθήκες, είναι δυνατό να δημιουργηθεί ένα λειτουργικό σύμπλοκο μαγγανίου σε δείγματα PS II που δεν περιέχουν μαγγάνιο. Η πορεία αυτή, η οποία απαιτεί φως και την παρουσία ιόντων Ca^{2+} και Cl^- , είναι γνωστή ως φωτοενεργοποίηση (photoactivation).

Ο καταλυτικός ρόλος του μαγγανίου μελετάται με μία ποικιλία φασματοσκοπικών τεχνικών. Οι σπουδαιότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR), η φασματοσκοπία ακτίνων X (X-ray) και η οπτική φασματοσκοπία.

1.6 Φασματοσκοπία EPR

Δύο σήματα EPR αποδίδονται στην κατάσταση S_2 του συμπλόκου του μαγγανίου. Τα σήματα αυτά παρατηρούνται μόνο σε θερμοκρασίες κάτω από 35 K και είναι γνωστά ως σήμα multiline (**Σχ. 7A**) και σήμα $g=4,1$ (**Σχ. 7B**).

Σχ. 7: Τα σήματα EPR multiline (A) και $g=4,1$ (B) που παρατηρήθηκαν σε δείγματα PS II με ακτινοβόληση σε 195 K παρουσία σουκρόζης (0,4 M). (A): Το δείγμα περιείχε 5% αιθανόλη για να απαγορευτεί ο σχηματισμός του σήματος $g=4,1$. (B): Το δείγμα περιείχε 50 mM F^- για να αυξηθεί η απόδοση του σήματος $g=4,1$ σε βάρος του σήματος multiline. Τα φάσματα EPR αντιπροσωπεύουν τη διαφορά μεταξύ των φασμάτων EPR πριν και μετά την ακτινοβόληση και κατεγράφησαν σε θερμοκρασία 8 K. Η μικροκυματική συχνότητα που εφαρμόστηκε ήταν ίση με 9,50 GHz. Το στενό σήμα EPR της ρίζας Tyr-D⁺ ($g=2$) και το σήμα EPR του ρομβικού τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+} υπάρχει ως πρόσμιξη στα δείγματα PS II) με $g=4,3$ παραλήφθηκαν για μεγαλύτερη ευκρίνεια των σημάτων [31].

Το σήμα multiline παράγεται με συνεχή ακτινοβόληση κάτω από συνθήκες που περιορίζουν το κέντρο αντίδρασης σε ένα διαχωρισμό φορτίου (ακτινοβόληση σε 160-200 K [56] ή ακτινοβόληση με ταυτόχρονη ψύξη σε 77 K παρουσία DCMU [57]). Το σήμα αυτό με $g=1,982^{+0.002}$ [58] έχει πλάτος 1.500-1.800 Gs. Στην περιοχή συχνοτήτων 9,1-9,4 GHz (X-band) το σήμα παρουσιάζει 18-20 μερικώς αναλυόμενες υπέρλεπτες γραμμές, που απέχουν μεταξύ τους 85-90 Gs. Η ανισοτροπία του σήματος multiline που παρατηρείται σε προσανατολισμένες μεμβράνες PS II, τόσο σε χαμηλές (3,9 GHz, S-band) [59] όσο και σε υψηλές συχνότητες (9,1-9,4 Gs, X-band) [60], αποδίδεται σε ανισοτροπία της υπέρλεπτης υφής και όχι σε ανισοτροπία του παράγοντα g . Το πλάτος του σήματος multiline πάλλεται με περιοδικότητα τέσσερα μετά από ακτινοβόληση με μία σειρά παλμών που δίνονται πριν την ψύξη του

δείγματος [61]. Επειδή το πλάτος του σήματος είναι μέγιστο μετά τον πρώτο και πέμπτο παλμό, προτάθηκε ότι το σήμα αντιστοιχεί στην κατάσταση S_2 [61, 62]. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι το σήμα multiline παράγεται από μία βασική κατάσταση $S=1/2$ ενός τετραμερούς $Mn(III)_3-Mn(IV)$ [63] ή ενός διμερούς συμπλόκου $\{Mn(II)-Mn(III)$ ή $Mn(III)-Mn(IV)\}$ [64].

Σχ. 8: Σύγκριση του κανονικού (A) και του τροποποιημένου με 100 mM NH_4Cl (B) σήματος multiline σε δείγματα PS II. Τα δείγματα ήταν διατηρημένα σε 30% αιθυλενογλυκόλη και ακτινοβολήθηκαν σε $0^\circ C$ παρουσία 250 μM DCBQ και 50 μM DCMU. Τα φάσματα EPR αντιπροσωπεύουν τη διαφορά μεταξύ των φασμάτων EPR πριν και μετά την ακτινοβολήση και κατεγράφησαν σε θερμοκρασία 8 K. Οι κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις θέσεις των γραμμών της υπέρλεπτης υφής. Η μέση απόσταση μεταξύ των υπέρλεπτων γραμμών σε κάθε φάσμα δηλώνεται με Δ . Το σήμα EPR της ρίζας $Tyr-D^+$ παραλήφθηκε [31].

Η ύπαρξη διμερούς συμπλόκου μαγγανίου αποκλείστηκε μετά την παρατήρηση νέων σημάτων EPR σε δείγματα PS II που απομονώθηκαν με διάφορες κατεργασίες. Σε δείγματα PS II που κατεργάζονται με NH_3 [65] (Σχ. 8) ή τα ιόντα Ca^{2+} αντικαθίστανται από ιόντα Sr^{2+} [66] (Σχ. 9) παρατηρείται ένα τροποποιημένο σήμα multiline, το οποίο περιέχει 21-22 υπέρλεπτες γραμμές με σταθερά υπέρλεπτης διάσπασης 68 Gs.

Σχ. 9: Σύγκριση του κανονικού (A) και του τροποποιημένου με ιόντα Sr^{2+} (B) σήματος multiline σε δείγματα PS II. Τα δείγματα εκπλύθηκαν με 1,2 M NaCl και 50 μM EGTA σε pH: 6,5 παρουσία φωτός και κατόπιν προστέθηκαν 20 mM CaCl_2 (A) ή 20 mM SrCl_2 (B). Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν σε θερμοκρασία 200 K. Οι πρωτεΐνες 17 και 23 kDa δεν επανασυνδέθηκαν στα δείγματα PS II μετά την έκπλυση με NaCl και δεν προστέθηκε κρυοπροστατευτικό συστατικό στα δείγματα. Τα φάσματα EPR αντιπροσωπεύουν τη διαφορά μεταξύ των φασμάτων EPR πριν και μετά την ακτινοβολήση και κατεγράφησαν σε θερμοκρασία 10 K. Το σήμα EPR της ρίζας Tyr-D⁺ παραλήφθηκε [31].

Απουσία των ιόντων Ca^{2+} παρατηρείται ένα τροποποιημένο σήμα multiline (Σχ. 10) με 26 υπέρλεπτες γραμμές και σταθερά διάσπασης 55 Gs [67]. Τα δύο αυτά τροποποιημένα σήματα multiline είναι απίθανο να προέρχονται από ένα διμερές σύμπλοκο [68].

Το δεύτερο σήμα EPR, το $g=4,1$, έχει πλάτος 320-360 Gs και δεν παρουσιάζει υπέρλεπτη υφή. Αρχικά, το σήμα αυτό παρατηρήθηκε σε δείγματα PS II, που ακτινοβολήθηκαν συνεχώς σε 140 K, μία θερμοκρασία χαμηλότερη από τη θερμοκρασία σχηματισμού του σήματος multiline [69]. Μετά το σχηματισμό του σήματος $g=4,1$ σε 140 K, θέρμανση των δειγμάτων σε 200 K έχει ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση του σήματος $g=4,1$ και το σχηματισμό του σήματος multiline [69]. Η παρατήρηση αυτή θεωρήθηκε ως ένδειξη ότι το σήμα $g=4,1$ είναι πρόδρομος του σήματος multiline [69]. Επειδή το πλάτος του σήματος $g=4,1$ παρουσιάζει την ίδια παλμική περιοδικότητα με το πλάτος του σήματος multiline, το σήμα $g=4,1$ αποδόθηκε στην κατάσταση S_2 [70].

Οι δύο μορφές της κατάστασης S_2 οι οποίες παράγουν τα σήματα multiline και $g=4,1$ αντίστοιχα, προτάθηκε ότι βρίσκονται σε μία ισορροπία, η οποία επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες [71]. Τα σχετικά πλάτη των δύο σημάτων επηρεάζονται από το είδος της κατεργασίας των δειγμάτων και το κρυοπροστατευτικό, που χρησιμοποιείται για τη διατήρησή τους. Το κλάσμα των κέντρων αντίδρασης, που παρουσιάζουν το σήμα $g=4,1$ αυξάνει: 1) Όταν η σακχαρόζη χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό [62], 2) όταν διάφορα ιόντα (F^- , NO_3^-) ή αμίνες δεσμεύονται στην πιθανή θέση δέσμευσης του Cl^- [69, 72, 73] και 3) όταν τα ιόντα Ca^{2+} αντικαθίστανται από ιόντα Sr^{2+} [66]. Το σήμα $g=4,1$ δεν παράγεται παρουσία γλυκερόλης, γλυκόλης και αιθανόλης [74].

Δύο μοντέλα έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη σχέση μεταξύ των δύο σημάτων της κατάστασης S_2 . Το πρώτο μοντέλο προτείνει ότι και τα δύο σήματα προέρχονται από το ίδιο τετραπυρηνικό σύμπλοκο μαγγανίου που μπορεί να βρίσκεται σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις στην κατάσταση S_2 [74, 75]. Στο μοντέλο αυτό υποτίθεται ότι η διαμόρφωση $g=4,1$ σχηματίζεται παροδικά σε όλα τα

κέντρα αντίδρασης κατά το σχηματισμό της κατάστασης S_2 . Στα περισσότερα κέντρα η διαμόρφωση $g=4,1$ μετατρέπεται στη διαμόρφωση multiline με μία αντίδραση, η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία και έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή των σταθερών σύζευξης των ιόντων μαγγανίου. Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι εξωγενείς παράγοντες που σταθεροποιούν τη διαμόρφωση $g=4,1$ ευνοούν το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση του σήματος $g=4,1$.

Το δεύτερο μοντέλο προτείνει ότι υπάρχει μία οξειδοαναγωγική ισορροπία μεταξύ ενός μονομερούς ιόντος $Mn(IV)$ που παράγει το σήμα $g=4,1$ και ενός διμερούς με μικτό σθένος [58, 76] ή ενός τριμερούς [77] συμπλόκου μαγγανίου που παράγει το σήμα multiline. Στο μοντέλο αυτό υποτίθεται ότι η αλληλομετατροπή των δύο σημάτων σε 200 K γίνεται με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου κατά το σχηματισμό της κατάστασης S_2 -multiline [58]. Έχει προταθεί ότι και τα δύο μοντέλα μπορούν να περιγραφούν, με την παραδοχή ότι υπάρχει μία ισορροπία διαμόρφωσης στο σκοτάδι (κατάσταση S_1), πριν το σχηματισμό της κατάστασης S_2 , η οποία αντιπροσωπεύει τη δέσμευση ενός ανόργανου παράγοντα, όπως το Cl^- [71].

Μέχρι πρόσφατα, ήταν δύσκολη η εκλογή μεταξύ των δύο μοντέλων. Αλλά η πρόσφατη παρατήρηση ότι το σήμα $g=4,1$ παρουσιάζει υπέρλεπτη υφή σε προσανατολισμένες μεμβράνες PS II, που κατεργάζονται με NH_3 [78], επιβεβαιώνει το πρώτο μοντέλο και αποκλείει το μοντέλο της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, σύμφωνα με το οποίο το σήμα $g=4,1$ παράγεται από ένα μονομερές ιόν $Mn(IV)$.

Ένα τρίτο σήμα EPR αποδίδεται στο σύμπλοκο του μαγγανίου [79]. Το σήμα αυτό είναι παρόν στο σκοτάδι και παρουσιάζει μία ευρεία καμπύλη σιγμοειδούς μορφής με $g=4,8$. Το σήμα $g=4,8$ αποδίδεται στην κατάσταση S_1 και φαίνεται ότι είναι πρόδρομος του σήματος multiline αλλά όχι του σήματος $g=4,1$. Όταν παράγεται το σήμα $g=4,1$, το σήμα $g=4,8$ μένει ανέπαφο, ενώ όταν παράγεται το σήμα multiline, το σήμα $g=4,8$ εξαφανίζεται. Με βάση αυτά τα δεδομένα προτάθηκε ότι διαφορετικά ιόντα μαγγανίου παράγουν τα σήματα $g=4,8$ και multiline και διαφορετικά το σήμα $g=4,1$ [79]. Για να συνδυαστεί το σήμα $g=4,8$ με μία τετραπυρηνική προέλευση του σήματος multiline, προτάθηκε ότι το σήμα $g=4,8$

παράγεται από ένα απομονωμένο ιόν Mn(III), το σήμα $g=4,1$ από ένα τριμερές σύμπλοκο μαγγανίου και το σήμα multiline από ασθενή μαγνητική σύζευξη μεταξύ του μονομερούς ιόντος Mn (III) και του τριμερούς συμπλόκου μαγγανίου [80].

Σχ. 10: Σύγκριση του κανονικού (A) και του σταθερού στο σκοτάδι (B) σήματος multiline που παρατηρήθηκε σε δείγματα PS II απουσία ιόντων Ca^{2+} . Τα δείγματα εκπλύθηκαν με 1,2 M NaCl και 50 μ M EGTA σε pH 6,5 παρουσία φωτός. Οι πρωτεΐνες 17 και 23 kDa δεν επανασυνδέθηκαν στα δείγματα PS II μετά την έκπλυση με NaCl. Το δείγμα (A) ακτινοβολήθηκε σε 198 K παρουσία 10 mM EGTA. Το δείγμα (B) ακτινοβολήθηκε σε 0°C για 2 min παρουσία 10 mM EGTA και κατόπιν επώαστηκε στο σκοτάδι σε 0°C για 60 min πριν την καταγραφή του φάσματος. Τα φάσματα EPR αντιπροσωπεύουν τη διαφορά μεταξύ των φασμάτων EPR πριν και μετά την ακτινοβολήση. Η καταγραφή των φασμάτων έγινε σε θερμοκρασία 10 K. Το σήμα EPR της ρίζας Tyr-D⁺ παραλήφθηκε [31].

Το τροποποιημένο σήμα multiline με 26 γραμμές και σταθερά διάσπασης 55 Gs παράγεται σε δείγματα PS II μετά την απομάκρυνση των ιόντων Ca^{2+} είτε με πλύση με διάλυμα 1-2 M NaCl σε pH: 6,5 παρουσία χηλικών ενώσεων (1-20 mM EDTA ή EGTA) και φωτός [67, 81] είτε με επώαση σε διάλυμα 10-20 mM κιτρικού νατρίου σε pH: 3 στο σκοτάδι [82-84]. Το σήμα παράγεται με ακτινοβολήση των δειγμάτων σε 0°C [82, 85] και είναι σταθερό στο σκοτάδι για μερικές ώρες (**Σχ. 10**).

Προτείνεται ότι οι ιδιότητες του σήματος, το οποίο αποδίδεται σε μία τροποποιημένη κατάσταση S_2 (S_2^*), είναι αποτέλεσμα άμεσης συναρμογής των ευέλικτων πολυκαρβοξυλικών οξέων EDTA, EGTA και κιτρικού στο σύμπλοκο του μαγγανίου [85]. Η παρουσία των εξωτερικών πρωτεϊνών 17 και 23 kDa δεν είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του σήματος, αλλά η παρουσία τους επηρεάζει σε μικρή έκταση την παρατηρούμενη υπέρλεπτη υφή [85]. Απουσία των πρωτεϊνών 17 και 23 kDa το τροποποιημένο σήμα multiline μετατρέπεται γρήγορα στο κανονικό με προσθήκη ιόντων Ca^{2+} [81]. Αντίθετα, παρουσία των εξωτερικών πρωτεϊνών, η επαναφορά του κανονικού σήματος multiline γίνεται πολύ αργά [67]. Θεωρείται ότι οι πρωτεΐνες 17 και 23 kDa σχηματίζουν ένα φαινομενικό φράγμα διάχυσης κατά την επανασύνδεση των ιόντων Ca^{2+} στο σκοτάδι [86].

Το σήμα multiline της κατάστασης S_2^* εξαφανίζεται, είτε με παλμική είτε με συνεχή ακτινοβολία των δειγμάτων σε 0-20°C και αντικαθίσταται από ένα σήμα EPR με $g=2$ και πλάτος 130-164 Gs [67, 83-85], (Σχ. 11). Η δημιουργία του σήματος 130-164 Gs δεν απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις χηλικών ενώσεων και το σήμα μπορεί να παρατηρηθεί σε δείγματα PS II, που κατεργάζονται με NaCl παρουσία μόνο 50 μ M EGTA [85]. Το σήμα 130-164 αποδίδεται σε μία τροποποιημένη κατάσταση S_3 (S_3^*) [67, 83, 85, 87, 88] και προτείνεται ότι παράγεται από ένα οξειδωμένο οργανικό συστατικό, πιθανώς μία ρίζα ιστιδίνης, που αλληλεπιδρά μαγνητικά με το συμπλόκο του μαγγανίου [67, 83, 87]. Εναλλακτικά, προτείνεται ότι το σήμα 130-164 Gs παράγεται με μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ της ρίζας $Tyr-Z^+$ και της τροποποιημένης κατάστασης S_2^* [84]. Σε δείγματα PS II, που κατεργάζονται με NH_3 [84, 88], NH_2OH [89, 90], F^- [91] ή τα ιόντα Cl^- απουσιάζουν [91, 92], παράγεται ένα σήμα EPR με $g=2$ και πλάτος 90-160 Gs. Το σήμα αυτό μοιάζει με το σήμα 130-164 Gs που παράγεται απουσία των ιόντων Ca^{2+} .

Σχ. 11: Το σήμα EPR 164 Gs που παρατηρήθηκε σε δείγματα PS II απουσία ιόντων Ca^{2+} αλλά παρουσία των πρωτεϊνών 17 και 23 kDa. Το δείγμα εκπλύθηκε με 1,2 M NaCl και 20mM EGTA σε pH 6,5 παρουσία φωτός. Το δείγμα ακτινοβολήθηκε με παλμικό φως σε 20°C και κατόπιν ψύχθηκε στο σκοτάδι. Το φάσμα EPR αντιπροσωπεύει τη διαφορά μεταξύ των φασμάτων EPR πριν και μετά την ακτινοβολήση και καταγράφηκε σε θερμοκρασία 15K. Το σήμα EPR της ρίζας Tyr-D⁺ παραλήφθηκε [31].

1.7 Φασματοσκοπία ακτίνων X (X_ray)

Η δεύτερη τεχνική, που είναι σημαντική για τη μελέτη του συμπλόκου του μαγγανίου, είναι η φασματοσκοπία ακτίνων X (φασματοσκοπία EXAFS και XANES). Με φασματοσκοπία EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) εξετάζεται το είδος των υποκαταστατών (ligands) που συναρμόζονται με το κεντρικό μεταλλικό ιόν και προσδιορίζονται οι αποστάσεις μεταξύ τους. Με φασματοσκοπία XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) μελετώνται οι πιθανές οξειδωτικές καταστάσεις του μετάλλου. Και οι δύο τεχνικές χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των οξειδωτικών καταστάσεων S_0 , S_1 , S_2 και S_3 του συμπλόκου του μαγγανίου σε

προσανατολισμένες μεμβράνες χλωροπλαστών και PS II [93, 94]. Η κατάσταση S₄ θεωρείται μεταβατική κατάσταση και δεν έχει απομονωθεί ή χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα.

Με φασματοσκοπική μελέτη EXAFS της κατάστασης S₁ προσδιορίστηκαν δύο άτομα οξυγόνου (O) ή αζώτου (N) ανά άτομο μαγγανίου σε απόσταση 1,8 Å και σε 2-4 άτομα O ή N σε απόσταση 1,9-2,2 Å [95]. Επίσης, προσδιορίστηκαν δύο ή τρεις αλληλεπιδράσεις Mn-Mn σε απόσταση 2,73 Å [95], μία αλληλεπίδραση Mn-Mn ή Mn-Ca σε απόσταση 3,3 Å και μία δεύτερη αλληλεπίδραση Mn-Mn ή Mn-Ca σε απόσταση 4,35 Å [96-98]. Η αλληλεπίδραση, σε απόσταση 3,3 Å, παρουσιάζει ισχυρό διχρωϊσμό και προσανατολίζεται κάθετα στο επίπεδο της θυλακοειδούς μεμβράνης [95]. Η αλληλεπίδραση Mn-Mn σε απόσταση 2,7 Å παρουσιάζει ασθενή διχρωϊσμό και προσανατολίζεται σχεδόν παράλληλα με τη θυλακοειδή μεμβράνη [95]. Οι απορροφήσεις EXAFS δειγμάτων PS II, στα οποία τα ιόντα Cl⁻ αντικαταστάθηκαν από ιόντα F⁻, θεωρήθηκαν ως ένδειξη ότι το Cl⁻ δρα ως τελικός υποκαταστάτης του μαγγανίου [96, 97, 99].

Προτείνεται ότι η αλληλεπίδραση σε απόσταση 2,7 Å αντιπροσωπεύει την αλληλεπίδραση Mn-Mn σε ένα σύμπλοκο με δομή δι-μ₂-οξο ή δι-μ₂-οξο/καρβοξυλο-γέφυρας και γωνία δεσμού Mn-O-Mn ίση με 95-100° [100, 101]. Επίσης, προτείνεται ότι η αλληλεπίδραση σε απόσταση 3,3 Å αντιπροσωπεύει την αλληλεπίδραση Mn-Mn σε ένα σύμπλοκο μαγγανίου που περιλαμβάνει μ₂-οξο, μ₃-οξο ή μ₂-υδροξο-γέφυρες και μία ή δύο καρβοξυλο-γέφυρες [95-97]. Στο Σχ. 12 παρουσιάζονται διάφορες δομές συμπλόκων Mn(III) και Mn(IV) με οξο και αλκοξο-γέφυρες, που έχουν χαρακτηριστεί με φασματοσκοπία ακτίνων-X.

Οι απορροφήσεις EXAFS των οξειδωτικών καταστάσεων S₂ και S₃ δε διαφέρουν δραματικά από τις αντίστοιχες της κατάστασης S₁ [93]. Η παρατήρηση αυτή θεωρείται ως ένδειξη ότι γίνονται μικρές αλλαγές στο περιβάλλον των υποκαταστατών του μαγγανίου κατά τις μεταπτώσεις S₁→S₂ και S₂→S₃. Το φάσμα EXAFS της κατάστασης S₀ παρουσιάζει ικανοποιητικές διαφορές συγκριτικά

με τα φάσματα των άλλων καταστάσεων. Θεωρείται ότι οι διαφορές αυτές οφείλονται στην παρουσία ενός ιόντος Mn(II) στην κατάσταση S_0 [94].

Σχ. 12: Διάφορες δομές συμπλόκων Mn^{III} και Mn^{IV} με οξο και αλκοξο-γέφυρες που έχουν χαρακτηριστεί με φασματοσκοπία ακτίνων-X. **A:** οκταεδρική δομή με απόσταση Mn-Mn ίση με 2,7 Å. **B:** μ-οξο-δι-μ-καρβοξυλο-διμαγγανικό σύμπλοκο με απόσταση Mn-Mn ίση με 3,0-3,5 Å. **Γ:** σκελετός αδαμαντανίου $Mn^{IV}_4(\mu_2-O)_6$. **Δ:** σκελετός κουβανίου $Mn^{IV}_4(\mu_3-O)_4$. **Ε:** σκελετός πεταλούδας $Mn_4(\mu_3-O)_2$. **ΣΤ:** δι-μ-αλκοξο-διμερές με δι-μ-οξο-διμαγγανικές μονάδες. **Z:** διάταξη ανοικτής αλυσίδας τεσσάρων ιόντων Mn^{IV} με έξι οξο-γέφυρες [336].

Διαπιστώθηκε ότι οι διαφωνίες που παρουσιάζονται στα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας EXAFS, σχετικά με την απόσταση των πλησιέστερων σκεδαστών και τις σχετικές εντάσεις των κορυφών, οφείλονται στην παρουσία ιόντων Mn^{2+} ως πρόσμειξη στα εξεταζόμενα δείγματα. Ομως, όλες οι μελέτες EXAFS συμφωνούν ότι δύο τουλάχιστον ιόντα μαγγανίου βρίσκονται σε απόσταση 2,7 Å και ότι τα ιόντα αυτά συνδέονται με περισσότερους από έναν υποκαταστάτες σε δι-μ-οξο γέφυρες. Τα πειραματικά αποτελέσματα της φασματοσκοπίας EXAFS μπορεί να συνδυαστούν με ένα τετραμερές, ένα διμερές διμερών ή ένα τριμερές/μονομερές σύμπλοκο

μαγγανίου παρά με συμμετρικά σύμπλοκα με δομή κουβανίου, αδαμαντανίου ή πεταλούδας, που είχαν προταθεί αρχικά (Σχ. 12).

Στο (Σχ. 13) παρουσιάζονται το δομικό μοντέλο, που προτάθηκε από την ομάδα των Klein και Sauer [95] για το σύμπλοκο του μαγγανίου στο PS II με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα της φασματοσκοπίας EXAFS

Επειδή το σημείο της χαρακτηριστικής γραμμής απορρόφησης (absorption edge) των ακτίνων-X αντανάκλα την ηλεκτρονιακή ένταση γύρω από το μεταλλικό ιόν, η φασματοσκοπία XANES χρησιμοποιείται για τη μελέτη του σθένους των ιόντων μαγγανίου, που συμμετέχουν στη λειτουργία του συμπλόκου O.E.C. Με βάση την απόλυτη τιμή της χαρακτηριστικής γραμμής απορρόφησης-K του μαγγανίου (6551 eV) στην κατάσταση S_1 και τη σύγκριση με συνθετικά μοντέλα ενώσεων μαγγανίου, προτάθηκε ότι η μέση τιμή σθένους των ιόντων μαγγανίου στην κατάσταση S_1 είναι (III) ή (IV) [98]. Η αύξηση της ενέργειας απορρόφησης κατά τη μετάπτωση $S_1 \rightarrow S_2$ (από 6.551 σε 6.552 eV) θεωρείται ως ένδειξη ότι ένα ιόν Mn(III) οξειδώνεται σε Mn(IV) [98, 102]. Κατά τη μετάπτωση $S_2 \rightarrow S_3$ δεν παρατηρείται μεταβολή της ενέργειας απορρόφησης και αυτό θεωρείται ως ένδειξη ότι το μαγγάνιο δεν οξειδώνεται σε αυτό το στάδιο λειτουργίας του συμπλόκου O.E.C. [93, 103]. Προτείνεται ότι ένα αμινοξύ, πιθανώς μία ιστιδίνη, οξειδώνεται κατά τη μετάπτωση $S_2 \rightarrow S_3$ [93].

Σχ. 13: Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου, για την χωρική διάταξη των τεσσάρων ιόντων μαγγανίου στο φωτοσύστημα II. Προτείνεται ότι δύο δι-μ₂-οξο-διμερή σύμπλοκα μαγγανίου συνδέονται μεταξύ τους με μία μονο-μ₂-οξο-γέφυρα και δύο καρβοξυλικές γέφυρες. Η απόσταση Mn-Mn σε κάθε δι-μ₂-οξο-διμερές προτείνεται ότι είναι ίση με 2,7 Å, ενώ η πλησιέστερη απόσταση Mn-Mn μεταξύ των διμερών ίση με 3,3 Å. Η αλληλεπίδραση Mn-Mn σε απόσταση 3,3 Å προτείνεται ότι προσανατολίζεται κάθετα στο επίπεδο της θυλακοειδούς μεμβράνης. Υποτίθεται ότι τα ιόντα Ca²⁺ και Cl⁻ βρίσκονται κοντά στο σύμπλοκο του μαγγανίου ή συνδέονται με ένα ιόν μαγγανίου. Στο προτεινόμενο μοντέλο περιλαμβάνεται, επίσης, η σύνδεση της ιστιδίνης. Η φύση και ο αριθμός των καρβοξυλικών ομάδων που συμμετέχουν στις γέφυρες σύνδεσης είναι άγνωστος [336].

Αντίθετα με τη φασματοσκοπία XANES, η μελέτη με φασματοσκοπία απορρόφησης UV δεν αποκλείει την οξείδωση ενός ιόντος Mn(III) σε Mn(IV) κατά τη μετάπτωση S₂--->S₃ [109]. Η κλίση της χαρακτηριστικής γραμμής απορρόφησης (6.550 eV) της κατάστασης S₀ επιβεβαιώνει την παρουσία ενός ιόντος Mn(II) στην κατάσταση αυτή [94].

1.8 Φασματοσκοπία UV

Οι οξειδωτικές μεταπτώσεις S του συμπλόκου O.E.C. συνοδεύονται από οπτικές αλλαγές απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους [104, 105]. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να χαρακτηριστούν οι αλλαγές αυτές και να αποδοθούν στις ατομικές μεταπτώσεις S [106-111], αλλά τα αποτελέσματά τους δεν συμπίπτουν πάντοτε. Διάφοροι παράγοντες πρέπει να υπολογιστούν για την ερμηνεία και την επεξεργασία των φασμάτων όπως, οι αρχικές κατανομές των κέντρων αντίδρασης στις καταστάσεις S_0 και S_1 στο σκοτάδι, το κλάσμα των κέντρων που υποβάλλονται σε μηδενική ή διπλή μετάπτωση κατά τη διάρκεια ενός παλμού και η αλλαγή απορρόφησης που συνοδεύει το σχηματισμό και την αναγωγή της ημικινόνης QB^- .

Αρχικά, αναφέρθηκε ότι τα φάσματα των μεταπτώσεων $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$ και $S_2 \rightarrow S_3$ έχουν την ίδια μορφή με μέγιστο απορρόφησης στα 305 nm [106, 109]. Οι αυξήσεις απορρόφησης, που συνοδεύουν τις προηγούμενες μεταπτώσεις εξαφανίζονται κατά τη μετάπτωση $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ [107, 109, 110, 112]. Η παρατήρηση αυτή θεωρήθηκε ως επιβεβαίωση του μηχανισμού οξείδωσης του νερού που περιλαμβάνει τη συγκεντρωτική αναγωγή των τεσσάρων οξειδωτικών ισοδυνάμων του συμπλόκου του μαγγανίου με ταυτόχρονη απελευθέρωση O_2 κατά τη μετάπτωση $S_4 \rightarrow S_0$. Μετά από σύγκριση των προηγούμενων φασμάτων UV με τα αντίστοιχα φάσματα συνθετικών ενώσεων μαγγανίου προτάθηκε ότι σε κάθε μετάπτωση οξειδώνεται ένα ιόν $Mn(III)$ σε $Mn(IV)$ [109]. Αργότερα, αναφέρθηκε ότι οι αλλαγές απορρόφησης που συνοδεύουν τη μετάπτωση $S_0 \rightarrow S_1$ είναι αμελητές και ότι τα φάσματα των μεταπτώσεων $S_1 \rightarrow S_2$ και $S_2 \rightarrow S_3$ δεν είναι απόλυτα ίδια [111-114]. Στην περίπτωση αυτή, προτείνεται ότι η μετάπτωση $S_0 \rightarrow S_1$ αντιστοιχεί σε οξείδωση ενός ιόντος $Mn(II)$ σε $Mn(III)$, η μετάπτωση $S_1 \rightarrow S_2$ σε οξείδωση ενός ιόντος $Mn(III)$ σε $Mn(IV)$ και η μετάπτωση $S_2 \rightarrow S_3$ σε οξείδωση ενός αμινοξέος ιστιδίνης ή τρυπτοφάνης (**Σχ. 14**) [111, 113].

Σχ. 14: Τα φάσματα απορρόφησης UV των ατομικών μεταπτώσεων S του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου. Τα φάσματα παρατηρήθηκαν σε δείγματα PS II από σπανάκι. Η στικτή καμπύλη ("c.d.") αντιπροσωπεύει το φάσμα που παρατηρήθηκε με ακτινοβολία μετά το σχηματισμό της σταθερής κατάστασης S^*_2 σε δείγμα PS II απουσία ιόντων Ca^{2+} [337].

Στο **Σχ. 15** παρουσιάζονται οι πιθανότερες οξειδωτικές καταστάσεις των ιόντων μαγγανίου κατά τη λειτουργία του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου σύμφωνα με τις μέχρι σήμερα πληροφορίες.

1.9 Η θέση δέσμευσης του μαγγανίου

Εχουν γίνει πολλές μελέτες για τον προσδιορισμό των θέσεων δέσμευσης του μαγγανίου και το είδος των αμινοξέων που δεσμεύουν το μαγγάνιο. Αποδείχθηκε ότι η απομάκρυνση της πρωτεΐνης 33 kDa μπορεί να γίνει χωρίς ταυτόχρονη απομάκρυνση του μαγγανίου [115-119].

Σχ. 15: Σχηματική αναπαράσταση των πιθανών καταστάσεων σθένους των τεσσάρων ιόντων μαγγανίου που συμμετέχουν στον ενζυμικό κύκλο των οξειδωτικών καταστάσεων S. Για την κατάσταση S₄ δεν υπάρχουν φασματοσκοπικά δεδομένα. A: το σχήμα παρουσιάζει την πιο πιθανή κατανομή των σταδίων οξειδωσης των ιόντων μαγγανίου στις καταστάσεις S₀-S₄ σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα πειραματικά αποτελέσματα. B: στο σχήμα αυτό ο ενζυμικός κύκλος αρχίζει με δύο ισοδύναμα περισσότερα οξειδωμένα. Αν και ο ενζυμικός κύκλος B δεν προτείνεται συχνά, συμφωνεί με πολλά πειραματικά αποτελέσματα. [338].

Αυτό δεν αποκλείει την πιθανότητα ότι η πρωτεΐνη 33 kDa παρέχει κάποιους υποκαταστάτες στο μαγγάνιο, οι οποίοι μπορούν να αντικατασταθούν από H₂O ή άλλα αμινοξέα μετά την απομάκρυνση της πρωτεΐνης. Υπάρχει πλήθος ενδείξεων οι οποίες ενισχύουν την ευρέως αποδεκτή άποψη ότι το μαγγάνιο εντοπίζεται στο διμερές των πολυπεπτιδίων D₁/D₂ του κέντρου αντίδρασης: 1) Ένα μετάλλαγμα του άλγους *Scenedesmus* (γνωστό ως LF₁) περιέχει την πρωτεΐνη D₁ σε μη πρωτεολυτική μορφή. Αν δεν δράσει η φυσική πρωτεάση, το σύμπλοκο του μαγγανίου δεν μπορεί να δημιουργηθεί [120, 121]. 2) Στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο D₁/D₂/cyt. b559 του κέντρου αντίδρασης προσδιορίστηκαν ορισμένες θέσεις δέσμευσης του μαγγανίου, οι μισές από τις οποίες απουσιάζουν από το μετάλλαγμα LF₁ [122]. 3) Απομονώθηκε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, που περιέχει τις πρωτεΐνες

D₁, D₂ και 33 kDa καθώς επίσης και τα τέσσερα ιόντα μαγγανίου. Αυτό δεν αποτελεί απόδειξη της δέσμευσης του μαγγανίου στο διμερές D₁/D₂, επειδή δεν έχει ταυτοποιηθεί ένα τέταρτο πολυπεπίδιο που είναι ενωμένο με το σύμπλοκο [123]. 4) Η φωτοαπαγόρευση (photoinhibition) του κέντρου αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της ηλεκτρονιακής μεταφοράς με ταυτόχρονη απομάκρυνση της πρωτεΐνης D₁ και του μαγγανίου [124]. 5) Διαπιστώθηκε ότι με χημική τροποποίηση των αμινοξέων ιστιδίνης της πρωτεΐνης D₁ απαγορεύεται η φωτοδέσμευση του μαγγανίου σε δείγματα PS II που δεν περιέχουν μαγγάνιο [125].

Υπάρχει διάσταση απόψεων αν το μαγγάνιο εντοπίζεται στο διμερές D₁/D₂ ή μόνο στην πρωτεΐνη D₁. Η φασματοσκοπία EPR προσφέρει ορισμένες ενδείξεις, που ευνοούν τη δεύτερη περίπτωση. Το μαγγάνιο παρουσιάζει ισχυρότερη μαγνητική αλληλεπίδραση με τη ρίζα Tyr-Z⁺ της πρωτεΐνης D₁ παρά με τη ρίζα Tyr-D⁺ της πρωτεΐνης D₂ [126]. Με φασματοσκοπία EPR προσδιορίστηκε ότι η απόσταση μεταξύ του μαγγανίου και των ριζών Tyr-D⁺ και Tyr-Z⁺ είναι 30-40 Å [127] και 10-15 Å [128], αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν μία ασυμμετρία στο περιβάλλον του μαγγανίου, με μεγαλύτερη προσέγγιση του μετάλλου στην πρωτεΐνη D₁ παρά στην D₂.

Ισχυρή επιβεβαίωση της δέσμευσης του μαγγανίου στην πρωτεΐνη D₁ και/ή την πρωτεΐνη D₂ αποτελούν οι μελέτες επιλεκτικής μετάλλαξης των αμινοξέων των δύο πρωτεϊνών. Με πειράματα επιλεκτικής μετάλλαξης τροποποιήθηκαν όλα τα αμινοξέα στη περιοχή lumen των πρωτεϊνών D₁ [129] και D₂ [130]. Με τα πειράματα αυτά ταυτοποιήθηκαν ως πιθανοί υποκαταστάτες του μαγγανίου τα αμινοξέα 59Asp, 61Asp, 65Glu, 170Asp, 332His, 337His, 342Asp 344Ala της πρωτεΐνης D₁ καθώς και το αμινοξύ ⁷⁰Glu της πρωτεΐνης D₂. Υποτίθεται ότι το μαγγάνιο διαθέτει τουλάχιστον 24 υποκαταστάτες συναρμογής. Ο αριθμός των αμινοξέων που παρέχουν οι πρωτεΐνες D₁ και D₂ δεν είναι αρκετός για να καλύψει όλον τον απαιτούμενο αριθμό υποκαταστατών του συμπλόκου του μαγγανίου. Άλλοι υποκαταστάτες μπορεί να παρέχονται στο μαγγάνιο από τις εσωτερικές πρωτεΐνες

(CP 47, CP 43, cyt. b559, πρωτεΐνη psbI κ.ά.) ή από το νερό και τις καρβονυλομάδες του πεπτιδικού σκελετού.

1.10 Τα πολυπεπίδια του φωτοσυστήματος II

Το PS II μπορεί να θεωρηθεί ως ένα πολυ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο που περιέχει δύο διακριτά λειτουργικά ενζυμικά σύμπλοκα: το σύμπλοκο συλλογής της ηλιακής ενέργειας (Light Harvesting Complex II, LHC II) και τον πυρήνα (PS II core). Το σύμπλοκο LHC II περιέχει διάφορες πρωτεΐνες (περίπου έξι) με μοριακά βάρη μεταξύ 25-28 kDa και μόρια χλωροφύλλης α, χλωροφύλλης β και καροτενοειδών μη ομοιοπολικά συνδεδεμένα. 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 [131]. Το σύμπλοκο LHC II περιέχει όλη την ποσότητα της Chl β και το 50% περίπου της Chl α του PS II. Ο πυρήνας του PS II είναι ένα πολυπεπτιδικό, κυρίως υδρόφοβο, σύμπλοκο που οξειδώνει το H₂O και περιλαμβάνει το κέντρο αντίδρασης, όπου πραγματοποιείται η πρωτοταγής αντίδραση φωτοχημείας που οδηγεί στο διαχωρισμό φορτίου, το κέντρο έκλυσης οξυγόνου (Oxygen Evolving Complex, O.E.C.), όπου συσσωρεύονται τα οξειδωτικά ισοδύναμα που δημιουργούνται κατά τις φωτοχημικές αντιδράσεις, και τις υδρόφοβες (εσωτερικές) και υδρόφιλες (εξωτερικές) πρωτεΐνες.

Η απομόνωση μεμβρανών PS II, στις οποίες παρατηρείται έκλυση O₂, αποτέλεσε ένα σταθμό για τη μελέτη του φωτοσυστήματος II. Οι ενεργότητες O₂ του PS II και τα διάφορα φασματοσκοπικά σήματα τα οποία προηγουμένως μπορούσαν να εξεταστούν μόνο σε σχετικά ασταθή θυλακοειδή παρασκευάσματα, μπορούν τώρα να εξεταστούν σε πολύ σταθερά μεμβρανικά παρασκευάσματα που δεν περιέχουν ουσιαστικά PS I και cyt. b₆/f. Οι μεμβράνες PS II απομονώνονται από μεμβράνες χλωροπλαστών με σύντομη επώαση παρουσία του απορρυπαντικού Triton X-100 [132, 133] και κατόπιν με φυγοκέντρηση. Με τη διαδικασία αυτή απομονώνονται μεμβράνες που περιέχουν μόνο το PS II και την περιφερειακή κεραία του συμπλόκου

LHC II. Οι χλωροφύλλες που περιέχονται ανά κέντρο αντίδρασης PS II είναι 225-250 και η αναλογία Chl α/Chl β είναι ίση με 2,15 [134].

Η βιοχημική βελτίωση της απομόνωσης των μεμβρανών PS II είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση διαφόρων υποσυμπλόκων του PS II (σύμπλοκα "cores") [135-137]. Η παρουσία μειωμένων ποσοτήτων χλωροφύλλης και πολυπεπτιδίων ανά κέντρο αντίδρασης σε αυτά τα παρασκευάσματα βοηθά στην καλύτερη κατανόηση των δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών του PS II. Μία τεράστια προσπάθεια καταβάλλεται για την απομόνωση μίας ελάχιστης υπομονάδας PS II, η οποία θα είναι ικανή να σταθεροποιεί τον πρωτοταγή διαχωρισμό φορτίου στο κέντρο αντίδρασης και να οξειδώνει το H₂O. Το μικρότερο υποσύμπλοκο PS II, το οποίο έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα και είναι κατάλληλο για παραγωγή O₂, περιέχει τις πρωτεΐνες 47 kDa (CP 47), 43 kDa (CP 43), 34 kDa (D₂), 32 kDa (D₁), το κυτόχρωμα b₅₅₉, το οποίο περιέχει δύο πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 9 και 4,5 kDa, α και β υπομονάδες αντίστοιχα, την εξωτερική πρωτεΐνη 33 kDa και άλλες τρεις μικρότερες πρωτεΐνες [136]. Το PS II in vivo περιέχει, τουλάχιστον, 20 πρωτεΐνες.

Οι χρωστικές του κέντρου αντίδρασης συνδέονται σε δύο εσωτερικές πρωτεΐνες, τις 32 kDa (D₁) και 34 kDa (D₂). Οι πρωτεΐνες D₁ και D₂ κωδικοποιούνται από τα γονίδια psbA και psbD αντίστοιχα και σχηματίζουν το φωτοχημικό κέντρο, όπου γίνεται ο πρωτοταγής διαχωρισμός φορτίου. Η ακολουθία αμινοξέων των δύο πρωτεϊνών είναι πολύ όμοια και παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τις ακολουθίες των L και M υπομονάδων του κέντρου αντίδρασης των μωβ μη θειούχων βακτηρίων. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε τους Trebst και Derka [138] να υποθέσουν ότι οι πρωτεΐνες D₁ και D₂ σχηματίζουν το κέντρο αντίδρασης του PS II. Η απομόνωση του συμπλόκου του κέντρου αντίδρασης D₁/D₂/cyt. b₅₅₉ /4,2 kDa (psbI) ενίσχυσε την προηγούμενη υπόθεση [139, 140]. Το κυτόχρωμα b₅₅₉ και η πρωτεΐνη psbI απομακρύνονται από το σύμπλοκο του κέντρου αντίδρασης με επιπλέον επεξεργασία με απορρυπαντικό και στο σύμπλοκο D₁/D₂, που απομένει, μπορεί να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός και σταθεροποίηση φορτίου [141].

Οι δύο πρωτεΐνες D₁ και D₂ περιέχουν πέντε διαμεμβρανικές έλικες και θεωρείται ότι σχηματίζουν ένα διμερές με συμμετρία C₂. Προτείνεται ότι το ετεροδιμερές D₁/D₂ δεσμεύει μία ποικιλία παραγόντων, όπως τη χλωροφύλλη του πρωτοταγούς δότη, P₆₈₀, τον πρωτοταγή αποδέκτη, Pheo α, τις κινόνες, Q_A και Q_B, τον μη αιμικό σίδηρο Fe²⁺ και τις ρίζες Tyr-Z⁺ και Tyr-D⁺. Επίσης, το ετεροδιμερές D₁/D₂ δεσμεύει τέσσερις επιπλέον χλωροφύλλες, μία μη φωτοχημική φαιοφυτίνη και ένα έως δύο καροτένια [141, 142]. Είναι πολύ πιθανό οι πρωτεΐνες αυτές να παρέχουν υποκαταστάτες στους ανόργανους παράγοντες του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου (ιόντα μαγγανίου, ασβεστίου και χλωρίου) καθώς επίσης να διαθέτουν θέσεις δέσμευσης για τις εξωτερικές πρωτεΐνες του συμπλόκου O.E.C. Η σύγκριση της ακολουθίας των αμινοξέων των πρωτεϊνών L και M των μωβ βακτηρίων με την αντίστοιχη των πρωτεϊνών D₁ και D₂ του PS II, η κρυστάλλωση του κέντρου αντίδρασης των μωβ βακτηρίων και η επιλεκτική μετάλλαξη αμινοξέων του ετεροδιμερούς D₁/D₂ βοήθησαν στην ταυτοποίηση των πιθανών θέσεων δέσμευσης ορισμένων φωτοσυνθετικών παραγόντων [31].

Το κέντρο αντίδρασης περιέχει μία πρωτεΐνη 4,2 kDa που κωδικοποιείται από το γονίδιο psbI και ένα τουλάχιστον κυτόχρωμα b₅₅₉. Το κυτόχρωμα b₅₅₉ είναι το πιο αινιγματικό συστατικό του PS II. Έχει προταθεί, κατά καιρούς, ότι το κυτόχρωμα b₅₅₉ συμμετέχει στη δημιουργία του PS II, την παραγωγή O₂, την προστασία του PS II από φωτοαπαγόρευση και την κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων. Δύο οξειδοαναγωγικές μορφές του κυτοχρώματος b₅₅₉ μπορεί να παρατηρηθούν. Η μορφή υψηλού δυναμικού με E_m = +370 V [143] και η μορφή χαμηλού δυναμικού με E_m = +60-80 mV [144]. Η μορφή του χαμηλού δυναμικού παρατηρείται όταν διακόπτεται η φυσιολογική λειτουργία του PS II. Το κυτόχρωμα b₅₅₉ είναι ένα ετεροδιμερές δύο υπομονάδων, της πρωτεΐνης 9 kDa, α υπομονάδας, και της πρωτεΐνης 4,5 kDa, β υπομονάδας. Οι υπομονάδες α και β κωδικοποιούνται από τα γονίδια psbE και psbF αντίστοιχα. Κάθε υπομονάδα περιέχει μία διαμεμβρανική έλικα και μία ιστιδίνη. Οι ιστιδίνες των δύο υπομονάδων συναρμολογούνται με την αίμη του κυτοχρώματος b₅₅₉. Εναλλακτικά, προτείνεται ότι το κυτόχρωμα b₅₅₉ περιέχει

ένα ζεύγος ομοδιμερών (α_2) και (β_2), που το καθένα συνδέεται με μία αίμη [145]. Η πρωτεΐνη 4,2 kDa είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου α -έλικας με 31 αμινοξέα. Η βιοχημική απομάκρυνση της πρωτεΐνης δεν επηρεάζει τη σταθερότητα των χρωστικών ή άλλων παραγόντων του κέντρου αντίδρασης [141].

Οι εσωτερικές πρωτεΐνες CP 47 και CP 43 του πυρήνα του PS II κωδικοποιούνται από τα γονίδια *psbB* και *psbC* αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες αυτές δεσμεύουν 15-20 μόρια Chl α και περίπου 5 β -καροτένια, αλλά δεν περιέχουν καθόλου μόρια Chl β ή Pheo α . Οι πρωτεΐνες CP 47 και CP 43 λειτουργούν σαν εσωτερικοί μεταφορείς της ενέργειας ενεργοποίησης από το σύμπλοκο LCH II στο φωτοχημικό κέντρο. Δεν είναι γνωστό αν η μεταφορά ενέργειας είναι γραμμική ή παράλληλη [146, 147]. Η πρωτεΐνη CP 47 περιέχει έξι διαμεμβρανικές έλικες και μία εξωτερική κοιλότητα (loop) με 190 αμινοξέα [148, 149]. Η πρωτεΐνη CP 43 περιέχει και αυτή έξι διαμεμβρανικές έλικες και μία κοιλότητα 134 αμινοξέων, που εκτίθεται στην περιοχή lumen. Η πρωτεΐνη CP 43 είναι ασθενέστερα δεσμευμένη στον πυρήνα του PS II συγκριτικά με την πρωτεΐνη CP 47. Με τη χρήση χαοτροπικών μέσων ή απορρυπαντικών απομακρύνεται εύκολα η πρωτεΐνη CP 43 και απομονώνεται το σύμπλοκο CP 47/D₁/D₂/cyt.b559/*psbI* [150-152]. Προτείνεται ότι η πρωτεΐνη CP 43 είναι απαραίτητη για τη δέσμευση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας LHC II στο σύμπλοκο CP 47/D₁/D₂/cyt.b559/*psbI* [153] και ότι οι δύο πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για τη σταθερότητα του PS II [154, 155] και τη δημιουργία των ενεργών κέντρων αντίδρασης. Η αντικατάσταση του ζεύγους των αμινοξέων ³⁸⁴Gly ³⁸⁵Gly από το ζεύγος ³⁸⁴Arg ³⁸⁵Arg στην πρωτεΐνη CP 47 οδηγεί σε 50% απώλεια της ενεργότητας O₂ in vivo και μείωση της σταθερότητας του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου in vitro [156].

Μία εξωτερική πρωτεΐνη, η 33 kDa, είναι δεσμευμένη ισχυρά στα κέντρα αντίδρασης του PS II. Η πρωτεΐνη 33 kDa περιέχει ένα δισουλφιδικό δεσμό στην εσωτερική πλευρά της, ο οποίος είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της διαμόρφωσης και της ικανότητας επανασύνδεσης της πρωτεΐνης στο PS II [157]. Η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *psbO* και φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο

στην οξείδωση του νερού. Η πρωτεΐνη απομακρύνεται από τον πυρήνα του PS II με κατεργασία των δειγμάτων PS II με 0,8 M Tris σε pH 8,0-8,2 [158], 0,7 M NaSCN [159], 1 M CaCl₂ ή MgCl₂ [115, 160-162] και υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας [163]. Οι περισσότερες από αυτές τις κατεργασίες απομακρύνουν ταυτόχρονα και μαγγάνιο, αλλά η κατεργασία με 2,6 M ουρία παρουσία 200 mM ιόντων Cl⁻ και η κατεργασία με 1 M CaCl₂ ή MgCl₂ δεν καταστρέφουν το σύμπλοκο του μαγγανίου. Ομως, δύο ιόντα μαγγανίου απομακρύνονται απουσία της πρωτεΐνης 33 kDa, αν τα δείγματα PS II δεν διατηρούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Cl⁻ (>100 mM) [164, 165]. Απουσία της πρωτεΐνης 33 kDa απαιτείται η προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης ιόντων Ca²⁺ στα δείγματα PS II για να παρατηρηθεί ικανοποιητική ενεργότητα O₂ [117-119, 149]. Αυτό θεωρήθηκε ως μία ένδειξη του ρόλου της πρωτεΐνης 33 kDa στη συγκέντρωση και/ή τη δέσμευση του ασβεστίου στο PS II. Η πρωτεΐνη 33 kDa προστατεύει το σύμπλοκο του μαγγανίου και το διατηρεί σε μία κατάλληλη διαμόρφωση για την αποτελεσματική οξείδωση του νερού. Η απομάκρυνση του συμπλόκου του μαγγανίου εξασθενεί τη δέσμευση της πρωτεΐνης στο PS II [166, 167]. Προτείνεται ότι η πρωτεΐνη 33 kDa ενώνεται με τη μεγάλη εξωτερική κοιλότητα της πρωτεΐνης CP 47 [168], με το ετεροδιμερές D₁/D₂ [123, 169], την πρωτεΐνη CP 43 [170], τις πρωτεΐνες του κυτοχρώματος b₅₅₉ [171, 172] και την πρωτεΐνη 4,2 kDa [172]. Διαπιστώθηκε ότι τα 16-18 N-τελικά αμινοξέα της πρωτεΐνης απαιτούνται για τη δέσμευσή της και την επαναφορά της ενεργότητας οξυγόνου [173].

Δύο άλλες εξωτερικές πρωτεΐνες, οι 23 και 17 kDa, είναι ενωμένες με τις μεμβράνες PS II, στις οποίες παρατηρείται έκλυση O₂. Οι πρωτεΐνες 23 και 17 kDa κωδικοποιούνται από τα γονίδια psbP και psbQ αντίστοιχα. Απουσία των πρωτεϊνών αυτών η ταχύτητα παραγωγής O₂ απαγορεύεται σε ποσοστό 80% και απαιτείται η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων εξωγενούς CaCl₂ στα δείγματα PS II για να φθάσει η παραγωγή O₂ σε φυσιολογικά επίπεδα. Η παρουσία της πρωτεΐνης 23 kDa μειώνει την απαίτηση σε ασβέστιο [174, 175], ενώ η παρουσία της πρωτεΐνης 17 kDa μειώνει την απαίτηση σε χλώριο [176]. Δεν είναι γνωστό αν οι πρωτεΐνες 17 και 23

kDa δεσμεύουν τα ιόντα Ca^{2+} και Cl^- , ή η δέσμευσή τους προκαλεί δομικές αλλαγές στις εσωτερικές πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να ευνοούνται υψηλές ταχύτητες παραγωγής O_2 παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων Ca^{2+} και Cl^- . Η παρουσία της πρωτεΐνης 23 kDa προστατεύει το σύμπλοκο του μαγγανίου από την επίδραση εξωγενών αναγωγικών, όπως η υδροκινόνη [175]. Απουσία της πρωτεΐνης 23 kDa μειώνεται η ικανότητα σύνδεσης του ζιζανιοκτόνου ατραζίνη στη θέση δέσμευσης της κινόνης Q_B [177] και το κυτόχρωμα b559 μετατρέπεται από τη μορφή υψηλού δυναμικού στην αντίστοιχη χαμηλού δυναμικού [178]. Η δέσμευση της πρωτεΐνης 23 kDa στο PS II απαιτεί τη δέσμευση της πρωτεΐνης 33 kDa και η δέσμευση της πρωτεΐνης 17 kDa απαιτεί τη δέσμευση της πρωτεΐνης 23 kDa [166, 179]. Δεν είναι γνωστό αν η πρωτεΐνη 23 kDa δεσμεύεται στην πρωτεΐνη 33 kDa ή η παρουσία της πρωτεΐνης 33 kDa οδηγεί σε αλλαγές διαμόρφωσης των εσωτερικών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα τη δέσμευση της πρωτεΐνης 23 kDa στο PS II. Ο ίδιος σκεπτικισμός υπάρχει σχετικά με τη δέσμευση της πρωτεΐνης 17 kDa στο PS II. Η δέσμευση των πρωτεϊνών 17 και 23 kDa στο PS II σταθεροποιείται παρουσία του συμπλόκου του μαγγανίου [180, 181].

Το φωτοσύστημα II περιέχει και άλλες εσωτερικές πρωτεΐνες με φαινομενικά βάρη 24 (CP 24) [182], 22 [183], 10 [184], 6,5-7 [185], 3,3 [185], 4,6 [186] και 2 kDa [187]. Η λειτουργία τους είναι προς το παρόν άγνωστη. Πιστεύεται ότι μερικές είναι απαραίτητες για την αποτελεσματική λειτουργία

Σχ. 16: Δομικό μοντέλο του φωτοσυστήματος II των ανώτερων φυτών. Το μοντέλο περιλαμβάνει τα κυριότερα πολυπεπίδια και τους συμπαράγοντες που συμμετέχουν στη φωτοχημεία του φωτοσυστήματος II. Τα πολυπεπίδια χαρακτηρίζονται με το φαινομενικό μοριακό τους βάρος. Το κεντρικό τμήμα αναπαριστά το πρωτεϊνικό ετεροδιμερές D_1/D_2 και τα συνδεδεμένα οξειδοαναγωγικά συστατικά. Τα βέλη δείχνουν τη ροή των ηλεκτρονίων από το νερό στο δευτεροταγή αποδέκτη Q_B . Τα (?) δηλώνουν ότι τα μόρια αυτά έχουν προταθεί εξαιτίας της ύπαρξής τους στα βακτήρια [338].

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 πολυπεπτιδίων D_1 , D_2 , CP 47 και CP 43 στο PS II είναι 1:1:1:1 [188, 189]. Δεν έχει διευκρινιστεί αν ένα [188, 189] ή δύο [190, 191] μόρια του κυτοχρώματος b_559 είναι ενωμένα με το PS II. Η παραγόμενη πρωτεΐνη από το γονιδίο *psbI* είναι παρούσα με στοιχειομετρία 1:1:1 σχετικά με τις υπομονάδες α και β του κυτοχρώματος b_559 [186, 255]. Αρα, υπάρχουν ένα ή δύο μόρια της πρωτεΐνης αυτής ανά κέντρο αντίδρασης PS II.

Θεωρείται ότι στα ανώτερα φυτά οι πρωτεΐνες 33, 23 και 17 kDa είναι παρούσες με στοιχειομετρία 1:1:1 [191]. Δεν έχει διευκρινιστεί αν ένα [172, 191] ή δύο [192] μόρια από κάθε πρωτεΐνη είναι παρόντα ανά κέντρο αντίδρασης. Το **Σχ. 16** παρουσιάζει ένα μοντέλο της δομής του φωτοσυστήματος II σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα πειραματικά αποτελέσματα.

1.11 Ο ρόλος του ασβεστίου και χλωρίου στην οξείδωση του H₂O

Ο ρόλος του ασβεστίου στη λειτουργία του PS II των ανώτερων φυτών αποδείχθηκε, όταν διαπιστώθηκε ότι με προσθήκη ασβεστίου σε μεμβράνες PS II, που δεν περιέχουν τις εξωτερικές πρωτεΐνες 23 και 17 kDa, επαναφέρεται η ικανότητα έκλυσης O₂ [174, 193, 194]. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες 17 και 23 kDa αυξάνουν σημαντικά τη φαινομενική συγγένεια του ασβεστίου για τις θέσεις δέσμευσης στο PS II [195-197].

Με ατομική απορρόφηση προσδιορίστηκε ότι σε μεμβράνες και πυρηνικά υποσύμπλοκα PS II περιέχονται 2-3 [198, 199] ιόντα Ca²⁺ ανά μόριο P₆₈₀. Θεωρείται ότι υπάρχουν 1-2 θέσεις δέσμευσης χαμηλής συγγένειας και μία θέση υψηλής συγγένειας ασβεστίου ανά μόριο P₆₈₀. Το Ca²⁺ από τη θέση υψηλής συγγένειας απομακρύνεται με επώαση (150 min) των μεμβρανών PS II σε διάλυμα 2 M NaCl παρουσία 1 mM EGTA και 20 mM ιονοφόρου A 23187 (pH 5) και κατόπιν με έκπλυση με διάλυμα 1 mM EGTA και 20 μM ιονοφόρου A 23187 (pH 6) [199, 200]. Το Ca²⁺ από τις θέσεις χαμηλής συγγένειας απομακρύνεται με ήπιες συνθήκες, όπως έκπλυση με διάλυμα 1-2 M NaCl παρουσία 1 mM EGTA και 20 μM ιονοφόρου A 23187 (pH 6) [199, 200] ή με επώαση σε διάλυμα 10-20 mM κιτρικού νατρίου (pH 3) [201]. Οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa απομακρύνονται και με τις δύο κατεργασίες, αλλά στην περίπτωση του κιτρικού νατρίου επανασυνδέονται, όταν το pH αυξάνεται σε 6,5 [202]. Η ακτινοβολήση διευκολύνει την εξαγωγή των ιόντων Ca²⁺ [203, 204], συνήθως, σε δείγματα που δεν κατεργάζονται ταυτόχρονα με NaCl και χηλικές ενώσεις. Η συγγένεια του PS II για

το ασβέστιο εξαρτάται από τις οξειδωτικές καταστάσεις του μαγγανίου. Η κατάσταση S₁ παρουσιάζει την υψηλότερη συγγένεια και η κατάσταση S₃ τη μικρότερη [205].

Σε δείγματα PS II core που περιείχαν 0,26 Ca²⁺/P₆₈₀ προσδιορίστηκαν τρεις σταθερές K_m 1-4 μM, 67-97 μM και 2,7-7 mM [200]. Αν και προτείνεται ότι οι σταθερές αυτές αντιστοιχούν σε τρεις διαφορετικές θέσεις δέσμησης ασβεστίου, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα οι σταθερές αυτές να αντανακλούν μία ετερογένεια μικρότερου αριθμού θέσεων δέσμησης. Σε δείγματα PS II που περιείχαν 1 Ca²⁺/P₆₈₀ προσδιορίστηκαν δύο σταθερές K_m, 50-100 μM και 1-7 mM [195, 200, 199]. Προτείνεται ότι οι δύο αυτές ασθενέστερες σταθερές K_m αντιπροσωπεύουν είτε δύο θέσεις δέσμησης ασβεστίου είτε μία θέση ασβεστίου της οποίας η σταθερά K_m εξαρτάται από τις οξειδωτικές καταστάσεις S. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι μελέτες δέσμησης των ιόντων Ca²⁺ έγιναν παρουσία 10-40 mM NaCl και απουσία της πρωτεΐνης 23 kDa, όμως η συγγένεια του ασβεστίου πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερη σε ανέπαφα δείγματα PS II. Προτείνεται ότι η απομάκρυνση της πρωτεΐνης 23 kDa εκθέτει τις θέσεις δέσμησης του Ca²⁺ σε ιόντα Na⁺ και η φαινομενική μείωση της συγγένειας του Ca²⁺ είναι αποτέλεσμα ανταγωνισμού μεταξύ των ιόντων Ca²⁺ και Na⁺ και όχι αποτέλεσμα άμεσης ή έμμεσης επίδρασης της πρωτεΐνης 23 kDa στη διαμόρφωση των θέσεων δέσμησης του ασβεστίου [206]. Παρουσία των εξωτερικών πρωτεϊνών η επανασύνδεση του ασβεστίου στο PS II είναι μία αργή διαδικασία που διαρκεί 40-60 min [86, 201]. Θεωρείται ότι οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa σχηματίζουν ένα φαινομενικό φράγμα διάχυσης κατά την επανασύνδεση των ιόντων Ca²⁺ στο σκοτάδι [86, 201].

Θεωρείται ότι το ασβέστιο στη θέση υψηλής συγγένειας συμμετέχει είτε στην παραγωγή οξυγόνου είτε στη φωτοχημεία του PS II [200]. Η παρουσία του ασβεστίου στις θέσεις δέσμησης χαμηλής συγγένειας είναι απαραίτητη για την παραγωγή O₂ αλλά όχι για τη δημιουργία του συμπλόκου του μαγγανίου [55, 207]. Προτείνεται ότι οι θέσεις χαμηλής συγγένειας του ασβεστίου δημιουργούνται κατά το σχηματισμό του συμπλόκου του μαγγανίου [208].

Αλλα μέταλλα, εκτός του ασβεστίου και του νατρίου, μπορεί να καταλάβουν τις θέσεις χαμηλής συγγένειας του ασβεστίου. Τα ιόντα Sr^{2+} [193] και VO_2^+ [209] διατηρούν την παραγωγή O_2 , αλλά με μικρότερη ταχύτητα. Παρουσία των ιόντων Sr^{2+} παράγεται ένα τροποποιημένο σήμα multiline με στενότερες υπέρλεπτες γραμμές συγκριτικά με το κανονικό σήμα [66, 210], (Σχ. 9). Τα ιόντα K^+ και Cs^+ , όπως το Na^+ , απαγορεύουν την έκλυση οξυγόνου με ασθενή συναγωνισμό με το Ca^{2+} ($K_i = 5-10 \text{ mM}$) [206, 211]. Το Cd^{2+} είναι ισχυρότερος παρεμποδιστής με $K_i = 0,3 \text{ mM}$ [211]. Τα ιόντα Mn^{2+} απαγορεύουν την έκλυση O_2 , με ανταγωνισμό με τα ιόντα Ca^{2+} για τις ίδιες θέσεις δέσμησης στο PS II [207]. Τα ιόντα La^{3+} παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συγγένεια για τις θέσεις δέσμησης του ασβεστίου [212].

Με απομάκρυνση του ασβεστίου από τις θέσεις χαμηλής συγγένειας παρεμποδίζεται αντιστρεπτά η έκλυση O_2 και διακόπτεται η λειτουργία του κύκλου των οξειδωτικών καταστάσεων S. Η ταυτοποίηση της οξειδωτικής μετάπτωσης που παρεμποδίζεται απουσία του ασβεστίου αποτελεί ένα ευρύ πεδίο αμφισβητήσεων και αντικρουόμενων πειραματικών αποτελεσμάτων.

Η παρατήρηση ότι σε δείγματα PS II, από τα οποία απομακρύνεται το ασβέστιο με επώαση στο σκοτάδι σε pH 8,3, δεν παράγεται το σήμα multiline με ακτινοβολία σε 200 K οδήγησε στο συμπέρασμα ότι απουσία του ασβεστίου παρεμποδίζεται η μετάπτωση $S_0 \rightarrow S_1$ [209]. Εντούτοις, αν και σε pH 8,3 η κατάσταση S_1 ανάγεται στην S_0 [209], η απόδοση του κύκλου των οξειδωτικών καταστάσεων S μειώνεται σημαντικά (αυξάνεται το ποσοστό των μηδενικών μεταπτώσεων, misses) και δεν είναι σίγουρο ότι η κατάσταση S_0 παράγεται στην πλειονότητα των κέντρων αντίδρασης [18, 213].

Η παρεμπόδιση της μετάπτωσης $S_1 \rightarrow S_2$ προτάθηκε μετά την παρατήρηση ότι σε δείγματα PS II από τα οποία απομακρύνονται τα ιόντα Ca^{2+} παρουσία 1-10 mM EDTA ή EGTA, δεν παράγεται το σήμα multiline με ακτινοβολία σε 200 K [200, 214-216] ή σε υψηλότερες θερμοκρασίες παρουσία DCMU [214]. Σε ορισμένες περιπτώσεις ένα μόριο χλωροφύλλης οξειδώνεται, αντί του συμπλόκου του

μαγγανίου, με ακτινοβόληση σε 200 K [214]. Η προτεινόμενη παρεμπόδιση της μετάπτωσης $S_1 \rightarrow S_2$ ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η αναγωγή της ρίζας Tyr- Z^+ απουσία του ασβεστίου επιβραδύνεται σημαντικά μετά τον πρώτο διαχωρισμό φορτίου σε δείγματα διατηρημένα στο σκοτάδι [193, 204, 217]. Επειδή η ρίζα Tyr- Z^+ ανάγεται από την κατάσταση S_1 του συμπλόκου του μαγγανίου σε χρονικό διάστημα 100 μ sec, προτείνεται ότι σε περίπτωση παρεμπόδισης της μετάπτωσης $S_1 \rightarrow S_2$ η ρίζα Tyr- Z^+ μπορεί να ανάγεται από την ημικινόνη Q_A^- σε χρονικό διάστημα 80-120 msec [22, 106] ή την ημικινόνη Q_B^- σε 20 sec [218]. Αντίθετα, η εμφάνιση του τροποποιημένου σήματος multiline σε δείγματα PS II τα οποία κατεργάζονται με NaCl και χηλικές ενώσεις [67, 81, 87] ή με κιτρικό νάτριο σε pH: 3 [82, 83], δεν επιβεβαιώνει την προτεινόμενη παρεμπόδιση της μετάπτωσης $S_1 \rightarrow S_2$. Εξαιτίας του σχηματισμού του τροποποιημένου σήματος multiline, θεωρείται ότι το σύμπλοκο του μαγγανίου οξειδώνεται σε μία τροποποιημένη κατάσταση S_2^* .

Σε δείγματα PS II που κατεργάζονται με 50 μ M EGTA παράγεται το κανονικό σήμα multiline [66] και το σήμα EPR 130-164 Gs [85] που αποδίδεται σε μία τροποποιημένη κατάσταση S_3^* . Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η μετάπτωση $S_3 \rightarrow S_4$ παρεμποδίζεται απουσία ασβεστίου [85].

Η πρόταση για παρεμπόδιση της μετάπτωσης $S_4 \rightarrow S_0$ βασίστηκε στην παρατήρηση ότι στα κέντρα αντίδρασης PS II τα οποία βρίσκονται στην τροποποιημένη κατάσταση S_2^* , το σήμα EPR 130-164 Gs παράγεται μετά από δύο διαχωρισμούς φορτίου [219, 220]. Το αποτέλεσμα αυτό εξηγείται με την παραδοχή ενός "κρυφού" αναγωγικού που σχηματίζεται στα κέντρα αντίδρασης κατά την απομάκρυνση του ασβεστίου και οξειδώνεται πριν το σχηματισμό του σήματος 130-164 Gs. Το σήμα 130-164 Gs αποδίδεται σε μία τροποποιημένη μορφή της κατάστασης S_4 [219, 220].

Τα αποτελέσματα μετρήσεων θερμοφωταύγειας σε δείγματα PS II που κατεργάστηκαν με κιτρικό νάτριο σε pH 3 ερμηνεύτηκαν ως ένδειξη ότι απουσία του ασβεστίου παρεμποδίζεται η μετάπτωση $S_2 \rightarrow S_3$ [221, 222]. Ομως, η δημιουργία του σήματος 130-164 Gs, οποιαδήποτε και αν είναι η προέλευσή του, είναι δύσκολο

να συνδυαστεί με τα αποτελέσματα της θερμοφωταύγειας. Αν ένα ηλεκτρόνιο μπορεί να εξαχθεί από την πλευρά του δότη του PS II μετά το σχηματισμό της κατάστασης S_2 , το ποσό της μετρούμενης θερμοφωταύγειας πρέπει να πάλλεται με ακτινοβόληση των δειγμάτων με μία σειρά παλμών [223-225]. Η παραγωγή του σήματος 130-164 Gs ταυτόχρονα με την εξαφάνιση του τροποποιημένου σήματος multiline [67, 83, 85, 87] σημαίνει ότι ένα ηλεκτρόνιο εξάγεται από την πλευρά του δότη του PS II μετά το σχηματισμό της κατάστασης S_2 . Εντούτοις, η μετρούμενη θερμοφωταύγεια σε δείγματα PS II στα οποία παράγεται το σήμα 130-164 Gs, δεν παρουσιάζει καμμία περιοδικότητα μετά το σχηματισμό της κατάστασης S_2 [221, 222]. Ο λόγος της ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της θερμοφωταύγειας και της φασματοσκοπίας EPR δεν είναι γνωστός.

Οι διαφονίες, σχετικά με το ποιά μετάπτωση του συμπλόκου του μαγγανίου παρεμποδίζεται, μπορεί να οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του ασβεστίου. Με απομάκρυνση του ασβεστίου μπορεί να τροποποιείται το περιβάλλον του συμπλόκου του μαγγανίου με αποτέλεσμα το σύμπλοκο να παγιδεύεται σε διάφορες τροποποιημένες καταστάσεις [31].

Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι μετά την απομάκρυνση του ασβεστίου από τις θέσεις χαμηλής συγγένειας επιβραδύνεται η οξείδωση της τυροσίνης Z από το P_{680}^+ [92]. Προτείνεται ότι η παρεμπόδιση της ηλεκτρονιακής μεταφοράς από την τυροσίνη Z στο P_{680}^+ οφείλεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται με την παρουσία ενός επιπλέον θετικού φορτίου στην τροποποιημένη κατάσταση S_3^* [87, 92].

Με απομάκρυνση των ιόντων Cl^- από το PS II ανενεργοποιείται το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου. Διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη ορισμένων ανιόντων σε δείγματα PS II που δεν περιέχουν Cl^- έχει σαν αποτέλεσμα την επαναφορά της ενεργότητας οξυγόνου. Η αποτελεσματικότητα των ανιόντων που μελετήθηκαν ακολουθεί την εξής σειρά: $Cl^- > Br^- > I^- > NO_3^-$ [226].

Εχουν διατυπωθεί, κατά καιρούς, πολλές προτάσεις για το ρόλο των ιόντων Cl^- στην έκλυση O_2 : 1) Τα ιόντα Cl^- δρουν ως υποκαταστάτες γέφυρας μεταξύ των ιόντων μαγγανίου και διευκολύνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των ιόντων [227]. 2) Η δέσμευση και η αποδέσμευση των ιόντων Cl^- στο σύμπλοκο του μαγγανίου μπορεί να ρυθμίζει τις οξειδοαναγωγικές ιδιότητες συγκεκριμένων ιόντων μαγγανίου στο σύμπλοκο [228]. 3) Εξαιτίας της επίδρασης του Cl^- στη διαμόρφωση $g=4,1$ της κατάστασης S_2 , προτείνεται ένας ρυθμιστικός ρόλος του Cl^- κατά το σχηματισμό των οξειδωτικών καταστάσεων S [71]. 4) Η δέσμευση των ιόντων Cl^- κοντά στην ενεργή θέση του ενζύμου εξουδετερώνει και έτσι σταθεροποιεί τα συσσωρευμένα οξειδωτικά ισοδύναμα των καταστάσεων S [229]. 5) Τα ιόντα Cl^- επιταχύνουν την αφαίρεση πρωτονίων από το H_2O με τη δέσμευσή τους σε μία ομάδα ιστιδινών κοντά στην ενεργή θέση του ενζύμου που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των σταθερών pK_a των αμινοξέων [230]. 6) Υπάρχουν ενδείξεις για την παρουσία μίας δεξαμενής ιόντων Cl^- η οποία δεν συνδέεται άμεσα με τις οξειδωτικές καταστάσεις S , αλλά μπορεί να διατηρεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυπεπτιδίων [50]. Εναλλακτικά, προτείνεται ότι η παρουσία της δευτεροταγούς δεξαμενής ιόντων Cl^- ρυθμίζει ένα σύστημα μεταφοράς πρωτονίων [230].

Τα ιόντα Cl^- μπορεί να αντικατασταθούν από ιόντα F^- [231], CH_3COO^- [231] και ορισμένες πρωτοταγείς αμίνες [227, 231, 232]. Τα ιόντα Cl^- απομακρύνονται με επώαση δειγμάτων PS II είτε σε pH 9,5 [233-236] είτε σε διαλύματα που δεν περιέχουν χλώριο [237, 238]. Επίσης, απομακρύνονται με κατεργασία με 25-100 mM SO_4^{2-} [227, 239, 240] Μετά την απομάκρυνση των ιόντων Cl^- με διαλύματα ελεύθερα από χλώριο επιβραδύνεται η μετάπτωση $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ αλλά δεν επηρεάζεται ο σχηματισμός του σήματος multiline [237, 241]. Αντίθετα, μετά την απομάκρυνση των ιόντων Cl^- με αλκαλικό pH ή με SO_4^{2-} διακόπτεται η λειτουργία του κύκλου των οξειδωτικών καταστάσεων S και παρεμποδίζεται ο σχηματισμός του σήματος multiline [73, 92, 214, 242], ακόμα και αν σχηματίζεται μία τροποποιημένη κατάσταση S_2^* [73, 231, 243-247].

Διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη ιόντων Cl^- σε δείγματα PS II, αμέσως μετά την ακτινοβόληση με ένα ή περισσότερους παλμούς, οδηγεί στο σχηματισμό του σήματος multiline στο σκοτάδι [248]. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι απουσία Cl^- σχηματίζεται μία τροποποιημένη κατάσταση S_2^* που δεν δίνει σήμα EPR, αλλά με προσθήκη ιόντων Cl^- ανενεργοποιείται πολύ γρήγορα [248]. Σε δείγματα PS II που δεν περιέχουν ιόντα Cl^- [91, 92] ή τα ιόντα αντικαθίστανται από ιόντα F^- [91] ή μόρια NH_3 [84, 88] παράγεται ένα σήμα EPR με $g=2$ και πλάτος 90-160 Gs. Το σήμα αυτό μοιάζει με το σήμα EPR 130-164 Gs που παράγεται σε δείγματα PS II απουσία ιόντων Ca^{2+} [88, 91, 92]. Παρατηρήθηκε ότι μετά από δύο διαχωρισμούς φορτίου η αναγωγή του P_{680}^+ από την τυροσίνη Z επιβραδύνεται απουσία ιόντων Cl^- [92, 231, 243, 244].

Εχουν διατυπωθεί δύο προτάσεις για την ερμηνεία των σημάτων EPR, που παρατηρούνται σε δείγματα PS II απουσία ιόντων Cl^- . Ο Nugent και οι συνεργάτες του [84] προτείνουν ότι το σήμα 90-160 Gs είναι αποτέλεσμα μαγνητικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της ρίζας Tyr-Z^+ και της τροποποιημένης κατάστασης S_2^* του συμπλόκου του μαγγανίου. Ο Rutherford και οι συνεργάτες του [92] επισημαίνουν την ομοιότητα στη συμπεριφορά των δειγμάτων PS II απουσία ιόντων Ca^{2+} και Cl^- . Οι ίδιοι προτείνουν ότι το σήμα EPR 90-169 Gs (κατάσταση S_3^*) παράγεται μετά από δύο διαχωρισμούς φορτίου και η Tyr-Z δεν οξειδώνεται από το P_{680}^+ μετά το σχηματισμό της κατάστασης S_3^* [92].

Ο αριθμός των ιόντων Cl^- που απαιτείται για την παραγωγή O_2 στο PS II δεν είναι γνωστός. Σε δείγματα χλωροπλαστών, τα οποία δεν περιείχαν ιόντα Cl^- και επώαστηκαν με $^{36}\text{Cl}^-$ κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης, προσδιορίστηκαν 5 $\text{Cl}^-/\text{PS II}$ [234]. Μία θέση δέσμευσης Cl^- προσδιορίστηκε σε δείγματα χλωροπλαστών απουσία ιόντων Cl^- [226], ενώ δύο θέσεις δέσμευσης προσδιορίστηκαν σε δείγματα PS II που περιείχαν ιόντα F^- [237], SO_4^{2-} , CHCOO_3^- ή NO_3^- [240]. Αποδείχθηκε ότι η αντικατάσταση του Cl^- από τη μία θέση επιβραδύνει τη μετάπτωση $\text{S}_3 \rightarrow (\text{S}_4) \rightarrow \text{S}_0$, ενώ η αντικατάσταση του Cl^- από την άλλη θέση ανενεργοποιεί πλήρως την έκλυση O_2 [240]. Τα νιτρικά ιόντα δρουν μόνο στην πρώτη θέση, τα θειικά στη

δεύτερη, ενώ τα οξικά μπορεί να δρουν και στις δύο θέσεις [240]. Προτείνεται ότι οι δύο θέσεις δέσμευσης Cl^- βρίσκονται στα ίδια κέντρα αντίδρασης PS II σε δεδομένη χρονική στιγμή [237, 240]. 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 οξειδωτικών καταστάσεων S ένα Cl^- ανταλλάσσεται μεταξύ του συμπλόκου του μαγγανίου και ενός ιόντος Ca^{2+} [249, 250].

Αν και το ασβέστιο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του κύκλου των οξειδωτικών καταστάσεων S, ο ρόλος του στην έκλυση O_2 δεν έχει διευκρινιστεί. Δύο εναλλακτικοί ρόλοι έχουν προταθεί για τη συμμετοχή του ασβεστίου στην έκλυση οξυγόνου: Ο ρυθμιστικός ρόλος σε πρωτονιώσεις/αποπρωτονιώσεις που συνοδεύουν την οξείδωση του νερού [205] και ο ρυθμιστικός ρόλος στην προσέγγιση του υποστρώματος του νερού στην ενεργή θέση του ενζύμου [230, 249]. Οι δύο αυτές προτεινόμενες λειτουργίες δεν αποκλείουν η μία την άλλη.

Η συμμετοχή του ασβεστίου σε φαινόμενα πρωτονιώσεων και αποπρωτονιώσεων προτάθηκε μετά την παρατήρηση ότι το ασβέστιο απομακρύνεται αντιστρεπτά με κατεργασία των δειγμάτων PS II με κιτρικό νάτριο σε pH 3 [201]. Υποτίθεται ότι το ασβέστιο συναρμόζεται σε καρβοξυλικές ομάδες, όπως ασπαρτικά και γλουταμινικά αμινοξέα, με σταθερά pK_a ίση με τέσσερα [201]. Επειδή η δέσμευση του ασβεστίου εξαρτάται από τις οξειδωτικές καταστάσεις S, προτείνεται ότι η δέσμευσή του επηρεάζει τις σταθερές διάστασης pK_a διάφορων καρβοξυλικών ομάδων και συνεπώς την απελευθέρωση των πρωτονίων κατά τη λειτουργία του κύκλου Kok [205].

Ο δεύτερος εναλλακτικός ρόλος του ασβεστίου είναι ο έλεγχος της συναρμογής του υποστρώματος του νερού στο σύμπλοκο του μαγγανίου. Προτείνεται ότι το ασβέστιο συναρμόζει το H_2O στις χαμηλές οξειδωτικές καταστάσεις S και το ανταλλάσσει με ένα Cl^- στο σύμπλοκο του μαγγανίου πριν την οξείδωση του H_2O [249]. Ο προτεινόμενος ρόλος του ασβεστίου στην προσέγγιση

του νερού στο σύμπλοκο του μαγγανίου βασίστηκε στις ακόλουθες διαπιστώσεις και προτάσεις: 1) Το ασβέστιο βρίσκεται κοντά στη θέση σύνδεσης του υποστρώματος, επειδή η αντικατάσταση των ιόντων Ca^{2+} από ιόντα Sr^{2+} ή μόρια NH_3 τροποποιεί τα σήματα EPR του μαγγανίου [66]. 2) Ο ενζυμικός κύκλος διακόπτεται κατά τη μετάπτωση $\text{S}_3 \rightarrow (\text{S}_4) \rightarrow \text{S}_0$ απουσία ασβεστίου [66]. Η μετάπτωση αυτή αποτελεί το στάδιο οξειδωσης του νερού και πιθανώς το στάδιο, όπου ένα ή περισσότερα μόρια νερού δεσμεύονται στην ενεργή θέση του ενζύμου. 3) Η απομάκρυνση του ασβεστίου επιτρέπει τη δέσμευση καρβοξυλικών ομάδων στη θέση δέσμευσης του νερού κατά το σχηματισμό της κατάστασης S_3 [85]. 4) Η δέσμευση του ασβεστίου εξαρτάται από τις οξειδωτικές καταστάσεις S [205] και η εξάρτηση αυτή αντανακλά αλλαγές στη σφαίρα συναρμογής των υποκαταστατών του ασβεστίου που μπορεί να είναι αποτέλεσμα ανταλλαγής υποκαταστατών με το σύμπλοκο του μαγγανίου στις διάφορες οξειδωτικές καταστάσεις S.

Διαπιστώθηκε ότι το ασβέστιο σταθεροποιεί τη δομή και τη σύνδεση του συμπλόκου του μαγγανίου [251, 252] και απαγορεύει τη συναρμογή χηλικών ενώσεων (EDTA, EGTA και κιτρικό οξύ) στο σύμπλοκο [85].

Επειδή θεωρείται ότι το ασβέστιο και το σύμπλοκο του μαγγανίου εντοπίζονται σε γειτονικές θέσεις, τα πολυπεπίδια D₁ και D₂ μπορεί να παρέχουν κάποιους υποκαταστάτες στο ασβέστιο. Εντούτοις, κανένα από τα εσωτερικά πολυπεπίδια δεν μπορεί να αποκλειστεί ως πιθανή πηγή υποκαταστατών. Ένας αριθμός όξινων αμινοξέων κατάλληλων για συναρμογή με το ασβέστιο εντοπίστηκε στις εκτεθειμένες στο lumen περιοχές των πρωτεϊνών CP 47 [149], CP 43 [149, 253] και της α-υπομονάδας του κυτοχρώματος b₅₅₉ [254] καθώς και στην υδρόφιλη περιοχή του C-τελικού αμινοξέος της πρωτεΐνης 4,2 kDa [255, 256]. Οι εξωτερικές πρωτεΐνες 33 και 23 kDa [48] δεν μπορούν να αποκλειστούν ως πιθανές πηγές υποκαταστατών του ασβεστίου, επειδή η ταχύτητα έκλυσης O_2 επιβραδύνεται σημαντικά απουσία της πρωτεΐνης 33 kDa [160, 164, 165, 216] και οι σταθερές συγγένειας του ασβεστίου υπολογίστηκαν απουσία της πρωτεΐνης 23 kDa. Δεν

υπάρχουν ενδείξεις που να αποκλείουν την πιθανότητα ότι πολικές ομάδες υδατανθράκων ή λιπίδια παρέχουν υποκαταστάτες στο ασβέστιο [48].

Διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί για το δομικό και λειτουργικό ρόλο του ασβεστίου στο PS II. Ένα μοντέλο προτείνει ότι ο ρόλος του ασβεστίου στο PS II είναι ανάλογος με τον αντίστοιχο στη λεκτίνη κονκαναβαλίνη A [48]. Και στα δύο ένζυμα η θέση δέσμευσης του Ca^{2+} δημιουργείται μετά τη σύνδεση του μαγγανίου στο ένζυμο [212]. Ένα άλλο μοντέλο προτείνει ότι το ασβέστιο επηρεάζει την οξειδοαναγωγική συμπεριφορά του συμπλόκου του μαγγανίου. Το μοντέλο αυτό παρομοιάζει τη συμπεριφορά του Ca^{2+} στο PS II με την αντίστοιχη του Zn^{2+} στην υπεροξειδική δισμουτάση του χαλκού/ψευδαργύρου [48, 86]. Το Zn^{2+} της πρωτεΐνης αυτής επηρεάζει τις οξειδοαναγωγικές ιδιότητες του Cu^{2+} με το οποίο μοιράζεται ένα ιμιδαζολικό υποκαταστάτη [257]. Ένα ελκυστικό μοντέλο προτείνει τη λειτουργική συσχέτιση των δύο ανόργανων παραγόντων, ασβεστίου και χλωρίου, επειδή διαπιστώθηκε ότι η δέσμευση του Cl^- στο PS II απαιτεί τη δέσμευση του Ca^{2+} και η ηλεκτρονιακή μεταφορά του ενζυμικού κύκλου απαγορεύεται με ανάλογο τρόπο απουσία ασβεστίου ή χλωρίου [258].

1.12 Ο μηχανισμός οξείδωσης του H_2O

Η φωτοσυνθετική διάσπαση του νερού απαιτεί την εξαγωγή τεσσάρων ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου. Αν και υπάρχουν πολλές πληροφορίες για τις ιδιότητες του ενζύμου PS II, ο μηχανισμός οξείδωσης του νερού είναι ακόμη άγνωστος. Επειδή μία διαδοχική 4-ηλεκτρονίων οξείδωση του νερού δεν ευνοείται θερμοδυναμικά, προτείνεται ότι ο μηχανισμός οξείδωσης του νερού περιλαμβάνει μία συγκεντρωτική οξείδωση 4-ηλεκτρονίων ή δύο διαδοχικές οξειδώσεις 2-ηλεκτρονίων με το σχηματισμό ενός υπεροξειδικού ενδιάμεσου [259-261]. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί οξείδωσης του νερού περιλαμβάνουν οξειδώσεις αποπρωτονιωμένων μορφών του νερού, όπως OH^- ή O^{2-} , που σχηματίζονται με ανταλλαγή των μορίων νερού σε μ_2 -οξο-γέφυρες. Επίσης, οι μηχανισμοί αυτοί

προτείνουν αλλαγές των σταθερών pK_a των μ_2 -οξο γεφυρών ή άλλων πρωτονιωμένων ομάδων του συμπλόκου του μαγγανίου με αποτέλεσμα η οξείδωση του νερού να συνοδεύεται με απελευθέρωση πρωτονίων [250, 259, 262]. Υποτίθεται ότι οι αλλαγές των σταθερών pK_a των μ_2 -οξο γεφυρών προέρχονται από δομικές ανακατατάξεις του συμπλόκου του μαγγανίου κατά τη μετάπτωση $S_4 \rightarrow S_0$ [259, 262-264]. Επίσης, προτείνεται ότι η οξείδωση του νερού ευνοείται θερμοδυναμικά με τη δέσμευση των πρωτονίων τα οποία απελευθερώνονται κατά την οξείδωση του νερού, σε γειτονικά βασικά αμινοξέα [259, 260, 262].

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η οξείδωση του νερού γίνεται κατά τη μετάπτωση $S_4 \rightarrow S_0$. Οι αλλαγές απορρόφησης στην περιοχή UV, που συνοδεύουν τις μεταπτώσεις S, θεωρήθηκαν ως επιβεβαίωση του μηχανισμού που περιλαμβάνει μία συγκεντρωτική οξείδωση του νερού κατά τη μετάπτωση $S_4 \rightarrow S_0$ [107, 109, 110, 112]. Με φασματοσκοπία μάζας εξετάστηκε αν πραγματοποιείται μερική οξείδωση του νερού πριν την κατάσταση S_4 . Όταν ακτινοβολήθηκαν χλωροπλάστες στην κατάσταση S_3 παρουσία $H_2^{18}O$, εκπλύθηκαν με $H_2^{16}O$ και κατόπιν ακτινοβολήθηκαν στην κατάσταση S_4 , παράχθηκε μόνο $^{16}O_2$ [37]. Επίσης, έγινε το αντίστροφο πείραμα: όταν ακτινοβολήθηκαν χλωροπλάστες στην κατάσταση S_3 παρουσία $H_2^{16}O$, αναμίχθηκαν με $H_2^{18}O$ και κατόπιν ακτινοβολήθηκαν στην κατάσταση S_4 , παράχθηκε μόνο $^{18}O_2$ [265]. Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας μάζας θεωρήθηκαν ως απόδειξη ότι η οξείδωση του νερού δεν περιλαμβάνει μερικώς οξειδωμένα ενδιάμεσα, σταθερά συνδεδεμένα στην κατάσταση S_2 ή S_3 [37, 265]. Ομως, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα άτομα οξυγόνου μερικώς οξειδωμένων ενδιάμεσων να ανταλλάσσονται με H_2O στην κατάσταση S_3 [249, 266].

Οι μηχανισμοί που προτείνονται για την οξείδωση του νερού βασίζονται σε τετραπυρηνικά σύμπλοκα μαγγανίου γνωστών ενώσεων. Μερικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν το σχηματισμό δεσμού O-O μεταξύ των ατόμων οξυγόνου που συμμετέχουν σε μ_2 -οξο-γέφυρες και/ή των ιόντων OH^- που λειτουργούν ως υποκαταστάτες του συμπλόκου του μαγγανίου [161, 269-273]. Ορισμένοι μηχανισμοί προβλέπουν ότι το σύμπλοκο του μαγγανίου υποβάλλεται σε σημαντικές δομικές

ανακατατάξεις κατά τις μεταπτώσεις $S_2 \rightarrow S_3$ και $S_4 \rightarrow S_0$ [259, 274-276] ή κατά τις μεταπτώσεις, $S_1 \rightarrow S_2$ και $S_4 \rightarrow S_0$ [276-280]. Εντούτοις, με φασματοσκοπία EXAFS δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές δομικές αλλαγές κατά τις μεταπτώσεις $S_1 \rightarrow S_2$ και $S_2 \rightarrow S_3$ [93-95].

Η πρωτονίωση των υποκαταστατών μίας μ2-οξο-γέφυρας επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα [281-283], τα οξειδοαναγωγικά δυναμικά [284-287], τις μαγνητικές ιδιότητες [288] και τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα [289] των συμπλόκων μαγγανίου. Συνεπώς, παράγοντες που αλλάζουν το pH και τις σταθερές pK_a των μ2-οξο-γεφυρών του συμπλόκου του μαγγανίου αναμένεται να επηρεάζουν δραστικά την οξείδωση του νερού. Ο Pecoraro διαπίστωσε ότι μ2-οξο-διμερή σύμπλοκα Mn(IV)-Mn(IV) καταλύουν την αποπρωτονίωση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 [101, 281]. Η αντίδραση αυτή είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην πρωτονίωση ενός υποκαταστάτη της μ2-οξο-γέφυρας [101, 282]. Οι Boucher και Coe απέδειξαν ότι η οξίνιση μ2-οξο-διμερών συμπλόκων Mn(IV)-Mn(IV) έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση H_2O_2 [290]. Με βάση τις αντιδράσεις αυτές, ο Pecoraro διατύπωσε ένα υποθετικό μοντέλο για το μηχανισμό οξείδωσης του νερού στο φωτοσύστημα II [101]. Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι τα ιόντα μαγγανίου διατάσσονται ως ένα ζεύγος δι-μ2-οξο-διμερών σύμφωνα με το δομικό μοντέλο των Klein και Sauer (**Σχ. 13**). Υποτίθεται ότι η κατάσταση S_2 περιέχει ένα διμερές Mn(III)-Mn(IV) και ένα διμερές Mn(IV)-Mn(IV) σύμπλοκο. Σύμφωνα με το μοντέλο Pecoraro η μετάπτωση $S_2 \rightarrow S_3$ περιλαμβάνει την οξείδωση μίας ιστιδίνης που έχει σαν αποτέλεσμα την πρωτονίωση του διμερούς συμπλόκου Mn(III)-Mn(IV). Η οξείδωση του ιόντος Mn(III) κατά τη μετάπτωση $S_3 \rightarrow S_4$ οδηγεί στην απελευθέρωση ενός μορίου H_2O_2 . Το υπεροξείδιο, πριν διαχυθεί μακριά από το σύμπλοκο οξείδωσης του νερού, αντιδρά με το δεύτερο διμερές Mn(IV)-Mn(IV) και σχηματίζεται O_2 (**Σχ. 17**).

Σχ. 17: Υποθετικός μηχανισμός της οξειδωσης του νερού στο φωτοσύστημα II. Ο μηχανισμός έχει προταθεί από τον Pecoraго [101] και βασίζεται στο δομικό μοντέλο των Klein και Sauer (**Σχ. 13**) και σε γνωστές αντιδράσεις που καταλύονται από δι-μ₂-οξο-[Mn(IV)-Mn(IV)] διμερή σύμπλοκα [281, 282, 290]. Υποτίθεται ότι η κατάσταση S₂ περιλαμβάνει ένα ιόν Mn(III) και τρία ιόντα Mn(IV). Προτείνεται ότι η οξειδωση μίας ιστιδίνης κατά τη μετάπτωση S₂→S₃ οδηγεί στην πρωτονίωση του δι-μ₂-οξο-[Mn(III)_Mn(IV)] διμερούς συμπλόκου. Η οξειδωση του Mn(III) του πρωτονιομένου διμερούς κατά τη μετάπτωση S₃→S₄ οδηγεί στην απελευθέρωση H₂O₂ το οποίο αντιδρά με το δεύτερο διμερές Mn(IV)-Mn(IV) και απελευθερώνεται O₂ [31].

Διαπιστώθηκε ότι κάτω από ορισμένες συνθήκες απελευθερώνεται H₂O₂ από το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου. Οι συνθήκες αυτές περιλαμβάνουν αλκαλικό pH, χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων Cl⁻ απουσία των πρωτεϊνών 17 και 23 kDa [282, 291, 294, 295, 297], απομάκρυνση των ιόντων Cl⁻ σε χαμηλές συγκεντρώσεις σουκρόζης [296], επεξεργασία με αντιδραστήρια που αποσταθεροποιούν τις καταστάσεις S₂ και S₃ [298], οξίνιση και ήπια θέρμανση των δειγμάτων PS II [293]. Στις περιπτώσεις αυτές προτείνεται ότι το H₂O₂ είτε παράγεται με οξειδωση ιόντων

OH⁻ σε μία θέση δέσμευσης του Cl⁻ [291-293, 296, 299] είτε απελευθερώνεται ως ενδιάμεσο συστατικό της οξειδωσης του νερού [295, 296].

Με την παρούσα εργασία θα μελετηθεί ο ρόλος του ασβεστίου και των εξωτερικών πρωτεϊνών 17 και 23 kDa στη λειτουργία του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου. Ο ρόλος του ασβεστίου στη φωτοχημική διάσπαση του H₂O θα διευκρινιστεί, όταν ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες που παρέχουν υποκαταστάτες στο ασβέστιο και προσδιοριστεί η θέση του σε σχέση με άλλα οξειδοαναγωγικά συστατικά του PS II. Επειδή η ηλεκτρονιακή διαμόρφωση του Ca²⁺ καθιστά απαγορευτική την ταυτοποίησή του με φασματοσκοπικές τεχνικές, η μελέτη του λειτουργικού Ca²⁺ στα διάφορα ένζυμα πραγματοποιείται με εκλεκτική αντικατάστασή του από άλλα μεταλλικά ιόντα. Η εκλεκτική αντικατάσταση των ιόντων Ca²⁺ του PS II από τρισθενή ιόντα λανθανιδίων (Ln³⁺), που παρουσιάζουν κοινές ιδιότητες με το Ca²⁺ αλλά μπορούν να ταυτοποιηθούν φασματοσκοπικά, αποτελεί κατάλληλη μέθοδο για τη μελέτη του ρόλου του ασβεστίου στο PS II. Για το σκοπό αυτό θα απομονωθούν και θα χαρακτηριστούν διάφορα παρασκευάσματα μεμβρανών PS II, στα οποία τα ιόντα Ca²⁺ των κέντρων αντίδρασης PS II θα αντικατασταθούν εκλεκτικά από διάφορα παραμαγνητικά και διαμαγνητικά ιόντα Ln³⁺. Η επίδραση των ιόντων Ln³⁺ στις καταλυτικές και δομικές ιδιότητες του PS II, παρουσία ή απουσία των εξωτερικών πρωτεϊνών, θα μελετηθεί με με φασματοσκοπία EPR και οπτική φασματοσκοπία. Η φασματοσκοπική αυτή μελέτη θα δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη δέσμευση του Ca²⁺ σε σχέση με άλλους οξειδοαναγωγικούς παράγοντες του PS II και το ρόλο του στην ηλεκτρονιακή μεταφορά στην οξειδωτική πλευρά του PS II.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Αντιδραστήρια

Τα διάφορα παρασκευάσματα PS II που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν από φρέσκα φύλλα σπανακιού της τοπικής αγοράς. Η ποιότητα των διαφόρων αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν analytical grade. Το νερό ήταν απιονισμένο με στήλη ιοντοανταλλακτικών ρητινών και αποστειρωμένο με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Το pH των διαφόρων διαλυμάτων ρυθμίστηκε με ηλεκτρόδιο WTW pH 530, το οποίο προηγουμένως είχε ρυθμιστεί με ρυθμιστικά διαλύματα τύπου NBS {HI 7006 (pH 6,86)/HI 7004 (pH 4,01), για όξινη περιοχή pH και HI 7006 (pH 6,86)/HI 7009 (pH 9,18) για αλκαλική περιοχή pH}. Όλα τα σκεύη και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C. Οι μεμβράνες PS II, ανέπαφες ή κατεργασμένες, μετά την παρασκευή τους και πριν την πειραματική διαδικασία ήταν αποθηκευμένες σε καταψύκτη σε θερμοκρασία -40°C. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν σε διαδικασίες διαπίδυσης ήταν SPECTRAPOR No 6, σωληνοειδείς, με ικανότητα διαπερατότητας μορίων με μοριακό βάρος μέχρι 8 kDa. Οι μεμβράνες διαπίδυσης πριν τη χρησιμοποίησή τους κατεργάστηκαν με υδατικό διάλυμα 5 mM EDTA για 30 min σε 100°C και διατηρήθηκαν σε διάλυμα 0,5% v/v MeOH/H₂O.

2.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα

Διάλυμα αλέσεως (grinding buffer): 0,4 M NaCl, 20 mM Hepes (pH 7,5), 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA και 0,2% w/v BSA.

1^ο διάλυμα επαναιώρησης (1st resuspention buffer): 0,15 mM NaCl, 4 mM MgCl₂ και 25 mM MES (pH 6).

2^ο διάλυμα επαναιώρησης (2nd resuspention buffer): 25 mM MES (pH 6), 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ και 1 mM AsCH.

Διάλυμα SMN: 0,4 mM sucrose, 25 mM MES (pH 6) και 15 mM NaCl.

Διάλυμα SHN: 0,4 mM sucrose, 25 mM Hepes (pH 7,5) και 15 mM NaCl.

Διάλυμα Triton: 25% w/v Triton στο 2^ο διάλυμα επαναιώρησης.

Διάλυμα Tris: 0,8 mM Tris (pH 8,2)

2.1.3 Διαλύματα σε διάφορες πειραματικές διαδικασίες

Διάλυμα ακετόνης: 80% v/v ακετόνη/H₂O.

Διάλυμα βενζιδίνης: σε μεθανόλη.

Διάλυμα DCBQ: 1% w/v DCBQ σε μεθανόλη

Διάλυμα DCMU: σε 50% αιθανόλη/H₂O.

Διάλυμα EG: 20 mM MES, 15 mM NaCl, 30% αιθυλενογλυκόλη (pH 6).

Διάλυμα NaCl: 4 M NaCl, 25 mM MES (pH 6).

Διάλυμα LnCl₃: υδατικά διαλύματα DyCl₃ 6H₂O, LaCl₃ 6H₂O, PrCl₃ 6H₂O και LuCl₃ 6H₂O.

Πρότυπο διάλυμα DyCl₃: 0,20 mM Dy³⁺, 15 mM NaCl, 20 mM MES (pH 6).

Υδατικά Διαλύματα: CaCl₂, EDTA, EGTA, K₃Fe(CN)₆, K₄Fe(CN)₆, MnCl₂, MgCl₂.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

Η απομόνωση ανέπαφων και κατεργασμένων μεμβρανών PS II πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της φυγοκέντρωσης ενώ ο χαρακτηρισμός τους έγινε με τις μεθόδους της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου, της πολαρογραφικής μέτρησης οξυγόνου, της οπτικής φασματοσκοπίας διαφοράς απορρόφησης και της φασματοσκοπίας ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR).

Οι φυγοκεντρήσεις έγιναν με φυγόκεντρο Heraeus SEPATECH, τύπου Suprafuge 22, χρησιμοποιώντας κεφαλές HFA 2194 ή HFA 14290, ή με φυγόκεντρο SIGMA, τύπου 3K20, με την κεφαλή Nr. 12258.

2.2.1 Απομόνωση και κατεργασία φωτοσυνθετικών μεμβρανών PS II

2.2.1.1 Θυλακοειδή-Φωτοσύστημα II

Οι θυλακοειδείς μεμβράνες απομονώθηκαν με την ακόλουθη μέθοδο:

Τα κύρια τμήματα από φρέσκα φύλλα σπανακιού πλύθηκαν με απιονισμένο νερό και αφού αναμίχθηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα άλεσης (grinding buffer) αλέστηκαν σε μίξερ για 30 sec. Χρησιμοποιήθηκαν 250 ml ρυθμιστικού διαλύματος για ποσότητα 300 gr φύλλων. Το μίγμα διηθήθηκε από οκταπλό φύλλο γάζας και το διήθημα φυγοκεντρήθηκε σε 7.500 g για 15 min. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στο πρώτο διάλυμα επαναιώρησης (1st buffer) και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε σε 7.500 g για 10 min. Το ίζημα που καταβυθίστηκε ήταν θυλακοειδείς μεμβράνες [300].

Οι μεμβράνες PS II απομονώθηκαν από τις θυλακοειδείς μεμβράνες με τον ακόλουθο τρόπο: Το ίζημα των θυλακοειδών μεμβρανών διαλυτοποιήθηκε με το δεύτερο διάλυμα επαναιώρησης (2nd buffer), ομογενοποιήθηκε με μηχανικό ομογενοποιητή και μετρήθηκε η περιεκτικότητά του σε χλωροφύλλη. Η συγκέντρωση χλωροφύλλης ρυθμίστηκε με την προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος (2nd buffer) ώστε η τελική συγκέντρωση παρουσία του απορρυπαντικού να είναι 2 mg/ml. Στη συνέχεια στο ομογενοποιημένο διάλυμα προστέθηκε στάγδην διάλυμα απορρυπαντικού Triton X-100 25% w/w, έτσι ώστε στο τελικό διάλυμα να υπάρχει αναλογία Chl:Triton ίση με 25:1 w/w. Το διάλυμα θυλακοειδών μεμβρανών και απορρυπαντικού επώαστηκε με ανάδευση για μισή ώρα στο σκοτάδι σε 4°C και μετά φυγοκεντρήθηκε σε 48.000 g για μισή ώρα. Το ίζημα που καταβυθίστηκε ήταν εμπλουτισμένο σε μεμβράνες PS II. Το ίζημα εκπλύθηκε με διάλυμα SMN και φυγοκεντρήθηκε σε 48.000 g για μισή ώρα. Το τελικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιήθηκε, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητά του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύτηκε σε -40°C [132, 301].

2.2.1.2 Παρασκευή μεμβρανών Tris-PS II

Ϊζημα μεμβρανών PS II γνωστής περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη διαλυτοποιήθηκε με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος Tris (0,8 M, pH 8,2) ώστε η τελική συγκέντρωση χλωροφύλλης να είναι 0,4-0,5 mg/ml. Το διάλυμα μεμβρανών PS II και Tris επώαστηκε για μισή ώρα σε 4°C κάτω από φως δωματίου και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε σε 48.000 g για μισή ώρα. Το ίζημα εκπλύθηκε με διάλυμα SMN και φυγοκεντρήθηκε σε 48.000 g για μισή ώρα. Ακολούθησε μία δεύτερη έκπλυση με διάλυμα SMN και ημίωρη φυγοκέντριση σε 48.000 g. Το τελικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η συγκέντρωσή του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύτηκε σε -40°C. Η παρασκευή PS II που απομονώθηκε με κατεργασία διαλύματος Tris δεν περιείχε τις εξωτερικές πρωτεΐνες 17, 23 και 33 kDa και τα τέσσερα ιόντα μαγγανίου. Η παρασκευή αυτή αναφέρεται στην παρούσα εργασία ως Tris-PS II.

2.2.1.3 Κατεργασία μεμβρανών PS II με τρισθενή ιόντα λανθανιδίων (Ln³⁺) (Ln: συμβολίζει γενικά τα λανθανίδια).

Η αντικατάσταση των ιόντων ασβεστίου από τρισθενή ιόντα διαφόρων λανθανιδίων σε μεμβράνες PS II έγινε με τον ακόλουθο τρόπο: Ϊσος όγκος αιωρήματος μεμβρανών PS II σε SMN με συγκέντρωση χλωροφύλλης 2 mg/ml αναμίχθηκε με ίσο όγκο διαλύματος NaCl (4 M, pH 6) που περιείχε 2 mM LnCl₃ και ακολούθησε επώαση για 45 min. Η διαδικασία αυτή είχε ως αποτέλεσμα να αντικατασταθούν όλα τα ιόντα ασβεστίου στα κέντρα αντίδρασης PS II από τρισθενή ιόντα λανθανιδίων και επιπλέον να απομακρυνθούν οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa.

Ένα παρασκεύασμα PS II απομονώθηκε με φυγοκέντριση (48.000 g, 30 min) του διαλύματος μεμβρανών PS II μετά την 45-λεπτη επώαση με διάλυμα NaCl

παρουσία LnCl_3 . Το ίζημα που καταβυθίστηκε περιείχε μεμβράνες PS II στις οποίες τα ιόντα Ca^{2+} αντικαταστάθηκαν από ιόντα Ln^{3+} ενώ το αιώρημα περιείχε τις εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa σε διάλυμα υψηλής ιονικής ισχύος (2M NaCl). Το ίζημα εκπλύθηκε δύο φορές με διάλυμα SMN και φυγοκεντρήθηκε σε 48.000 g για μισή ώρα. Το τελικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιήθηκε, μετρήθηκε η περιεκτικότητά του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύτηκε σε -40°C . Το παρασκεύασμα PS II που απομονώθηκε με την προηγούμενο μέθοδο αναφέρεται στην παρούσα εργασία ως [Ln]*-PS II.

Ενα δεύτερο παρασκεύασμα PS II απομονώθηκε με τεχνική επανασύνδεσης των εξωτερικών πρωτεϊνών 17 και 23 kDa και φυγοκέντρωση. Μετά την 45-λεπτη επώαση, το διάλυμα μεμβρανών PS II και NaCl/LnCl_3 τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης. Η μεμβράνη με το δείγμα τοποθετήθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο που περιείχε διάλυμα SMN και ακολούθησε διαπίδυση συνολικής διάρκειας οκτώ ωρών. Κατά τη διάρκεια της οκτάωρης διαπίδυσης το εξωτερικό διάλυμα SMN ανανεωνόταν κάθε δύο ώρες. Με τη διαδικασία της διαπίδυσης, η ιονική ισχύς του δείγματος (2M) μειώθηκε σε χαμηλά επίπεδα (15 mM NaCl) με αποτέλεσμα την επανασύνδεση των εξωτερικών πρωτεϊνών 17 και 23 kDa στα κέντρα αντίδρασης PS II. Μετά την ολοκλήρωση της διαπίδυσης το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 48.000 g για μισή ώρα. Το ίζημα που καταβυθίστηκε εκπλύθηκε δύο φορές με διάλυμα SMN, φυγοκεντρήθηκε (48.000 g, 30 min), διαλυτοποιήθηκε σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιήθηκε, προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύτηκε σε -40°C . Το παρασκεύασμα PS II, που απομονώθηκε με την προηγούμενη διαδικασία, αναφέρεται στην παρούσα εργασία ως [Ln]-PS II.

Ενα τρίτο παρασκεύασμα PS II απομονώθηκε με την ίδια διαδικασία παρασκευής, που ακολούθηθηκε για τις μεμβράνες [Ln]-PS II, αλλά η επανασύνδεση των εξωτερικών πρωτεϊνών έγινε παρουσία 2 mM EDTA. Στο συνολικό διάλυμα, που τοποθετήθηκε στη μεμβράνη διαπίδυσης, προστέθηκαν 2mM EDTA και κατά τα

δύο πρώτα δίωρα στάδια της διαπίδυσης το εξωτερικό διάλυμα διαπίδυσης SMN περιείχε 1 mM και 0,5 mM EDTA αντίστοιχα. Το παρασκεύασμα PS II που απομονώθηκε με αυτή τη διαδικασία περιείχε τις εξωτερικές πρωτεΐνες αλλά δεν περιείχε ιόντα Ca^{2+} ή Ln^{3+} στις θέσεις δέσμευσης του ασβεστίου και αναφέρεται ως [Ln/EDTA]-PS II. Τα στάδια της διαδικασίας παρασκευής και απομόνωσης των μεμβρανών [Ln/EDTA]-PS II επαναλήφθηκαν για την απομόνωση ενός τέταρτου παρασκευάσματος PS II, αλλά με τη διαφορά ότι κάθε στάδιο της διαδικασίας παρασκευής και η τελική επαναιώρηση έγινε παρουσία 100 μM EGTA. Το παρασκεύασμα PS II που απομονώθηκε με τον τρόπο αυτό αναφέρεται ως [Ln/EDTA, EGTA]-PS II.

2.2.1.4 Κατεργασία παρασκευασμάτων [Ln]-PS II και [Ln/EDTA]-PS II με διάλυμα Tris

Δείγματα μεμβρανών [Ln]-PS II και [Ln/EDTA]-PS II επεξεργάστηκαν με διάλυμα Tris σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.1.2 και τα αντίστοιχα παρασκευάσματα PS II που απομονώθηκαν αναφέρονται ως Tris[Ln]-PS II και Tris[Ln/EDTA]-PS II.

2.2.1.5 Μεταφορά των διαφόρων παρασκευασμάτων PS II σε pH 7,5

Ο βιοχημικός και φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των διαφόρων παρασκευασμάτων PS II που απομονώθηκαν μετά από κατεργασία με λανθανίδια ή/και διάλυμα Tris έγινε σε δύο pH, στο αρχικό pH επαναιώρησης που ήταν 6 και σε pH 7,5. Η μεταφορά των διαφόρων παρασκευασμάτων PS II από pH 6 σε 7,5 έγινε με τον ακόλουθο τρόπο: Μεμβράνες PS II που ήταν διαλυτοποιημένες σε

SMN (pH 6) φυγοκεντρήθηκαν σε 48.000 g για μισή ώρα. Το ίζημα που καταβυθίστηκε εκπλύθηκε με διάλυμα SHN (pH 7,5) και φυγοκεντρήθηκε σε 48.000 g για μισή ώρα. Ακολούθησε μία δεύτερη έκπλυση με διάλυμα SHN και ημίωρη φυγοκέντρηση σε 48.000 g. Το τελικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος SHN, ομογενοποιήθηκε, προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του σε χλωροφύλλη και διατηρήθηκε σε -40°C .

2.2.2 Προσδιορισμός έκλυσης οξυγόνου

Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου ανέπαφων και κατεργασμένων μεμβρανών PS II μετρήθηκε πολαρογραφικά με ένα ηλεκτρόδιο τύπου Clark της εταιρείας YSI. Το ηλεκτρόδιο αυτό αποτελείται από κάθοδο λευκοχρύσου και άνοδο αργύρου με διαφορά δυναμικού 0,8 V. Το σύστημα των ηλεκτροδίων απομονώνεται από το μελετούμενο δείγμα με μία λεπτή μεμβράνη που είναι εκλεκτικά διαπερατή σε μικρά μόρια και ιόντα. Όταν η κατάλληλη πολαρογραφική τάση εφαρμοστεί κατά μήκος των ηλεκτροδίων, το οξυγόνο που παράγεται κατά την οξείδωση του νερού αντιδρά στην κάθοδο παράγοντας ηλεκτρικό ρεύμα. Το ηλεκτρικό ρεύμα, που παράγεται, είναι ανάλογο με το ποσό του οξυγόνου που διέρχεται από τη μεμβράνη. Στην πραγματικότητα αυτό που μετράται είναι η πίεση του παραγόμενου οξυγόνου. Επειδή το παραγόμενο οξυγόνο καταναλώνεται γρήγορα στην κάθοδο, 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 που διέρχεται από τα ηλεκτρόδια είναι γραμμική.

Η ρύθμιση του ηλεκτροδίου έγινε σε 25°C με απιονισμένο νερό που ήταν κορεσμένο σε οξυγόνο. Η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε για την τοποθέτηση του δείγματος ήταν γυάλινη με πρόσθετο εξωτερικό γυάλινο περίβλημα για να διέρχεται νερό σε σταθερή θερμοκρασία 25°C . Το ακτινικό φως, που παραγόταν από δύο

λάμπες βολφραμίου ισχύος 250 W, εστιαζόταν στο δείγμα έτσι ώστε να δημιουργούνται συνθήκες φωτοκορεσμού. Το φως, πριν εισέλθει στο δείγμα, διερχόταν πρώτα από μία γυάλινη κυψελίδα μήκους 5 cm, που περιείχε διάλυμα 0,2% w/v CuSO₄. Το διάλυμα CuSO₄ προστάτευε το δείγμα και το ηλεκτρόδιο από γρήγορη θέρμανση απορροφώντας τα μεγάλα μήκη κύματος. Στη συνέχεια το φως διερχόταν από κόκκινο πλαστικό φίλτρο, που απορροφούσε τα μικρά μήκη κύματος για προστασία των πρωτεϊνικών δεσμών. Με τους δύο αυτούς προστατευτικούς τρόπους το φως, που διερχόταν από την κυψελίδα με το δείγμα, περιείχε μήκη κύματος μεταξύ 500-700 nm. Για τη μέτρηση της έκλυσης οξυγόνου το διάλυμα στην κυψελίδα περιείχε 3 ml SMN, 290 μM DCBQ ως ηλεκτρονιοδέκτη και 50μM συνολική συγκέντρωση χλωροφύλλης του εξεταζόμενου δείγματος. Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου των διαφόρων παρασκευασμάτων PS II προσδιορίστηκε με μέτρηση της κλίσης της καμπύλης παραγωγής οξυγόνου που καταγράφηκε για 30 sec σε καταγραφικό χαρτί. Η ταχύτητα παραγωγής οξυγόνου εκφράζεται σε μmoles O₂/[(mg Chl) hr]. Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου ανέπαφων μεμβρανών PS II ήταν 650-750 μmoles O₂/[(mg Chl) hr] και οι αντίστοιχες ταχύτητες των κατεργασμένων μεμβρανών PS II εκφράστηκαν επί τοις εκατό της τιμής αυτής.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση

Η ανάλυση της πρωτεϊνικής σύστασης των διαφόρων παρασκευών PS II έγινε με ηλεκτροφόρηση σε σύστημα ασυνεχούς πηκτώματος (gel) δωδεκυλοθειϊκού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου (SDS-polyacrylamide). Τα σύμπλοκα των αποδιατασσόμενων πρωτεϊνών με το απορρυπαντικό SDS ηλεκτροφορήθηκαν με τη χρησιμοποίηση ρυθμιστικών διαλυμάτων τύπου Neville [302] και τη διέλευσή τους πρώτα από το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) με συγκέντρωση 6% πολυακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου και κατόπιν από το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel) με συγκέντρωση 13,5% πολυακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου. Τα δύο πηκτώματα περιείχαν 6,5 M ουρία. Με τη μέθοδο αυτή αναλύθηκαν πρωτεΐνες σε

ένα εύρος μοριακής κλίμακας μεταξύ 90-10 kDa. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες σταθεροποιήθηκαν με διάλυμα 50% MeOH/10% CH₃OOH και εμφανίστηκαν μετά από χρώση με διάλυμα Coomassie Blue R-250.

2.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χλωροφύλλης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της χλωροφύλλης έγινε φασματοσκοπικά σύμφωνα με τη μέθοδο Arnon [303]. Για τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης κάθε δείγματος PS II προστέθηκαν 25 μl δείγματος σε 5ml υδατικού διαλύματος ακετόνης 80% v/v για να εκπλυθούν οι χλωροφύλλες από τις πρωτεΐνες. Το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε 15.000 στροφές/λεπτό για να απομακρυνθούν οι αδιάλυτες πρωτεΐνες. Η απορρόφηση του διαλύματος χλωροφύλλης προσδιορίστηκε σε δύο μήκη κύματος, 663 και 645 nm. Για τον υπολογισμό της συνολικής ποσότητας χλωροφύλλης (Chl α + Chl β) χρησιμοποιήθηκαν συντελεστές απορρόφησης 8 και 20 mg/(ml cm) αντίστοιχα για τα δύο μήκη κύματος 663 και 645 nm.

2.2.5 Φασματοσκοπικές μέθοδοι

2.2.5.1 Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR)

Η φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία δωματίου και αζώτου καθώς και η κινητική μελέτη της ρίζας Tyr-Z⁺ σε θερμοκρασία δωματίου έγινε με φασματόμετρο EPR της εταιρείας BRUCKER, τύπου ER 200D (X-band, συχνότητα=9,5 GHz). Σε θερμοκρασία δωματίου χρησιμοποιήθηκε μία κοιλότητα συντονισμού (cavity) τύπου ER 4103 TM (Nr. 9007) που προσαρμόστηκε σε γέφυρα μικροκυματικής ισχύος τύπου ER 040 XR. Σε θερμοκρασία αζώτου η κοιλότητα συντονισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου 4102 ST (Nr. 9128). Η πηγή της μικροκυματικής ισχύος ήταν ένας δονητής klystron. Η ένταση της μικροκυματικής ισχύος πριν την

εισαγωγή της στην κοιλότητα συντονισμού ρυθμιζόταν με ένα κατάλληλο σύστημα απόσβεσης (attenuator). Η ρύθμιση της ισχύος με το σύστημα attenuator γίνονταν σε decibels:

$$db=100 \log(P_{out}/P_{in})$$

όπου,

P_{in} : η εισερχόμενη μικροκυματική ισχύς στο σύστημα attenuator, 200 mW.

P_{out} : η εξερχόμενη μικροκυματική ισχύς, η οποία εξαρτόταν από την εκλεγόμενη τιμή των decibels.

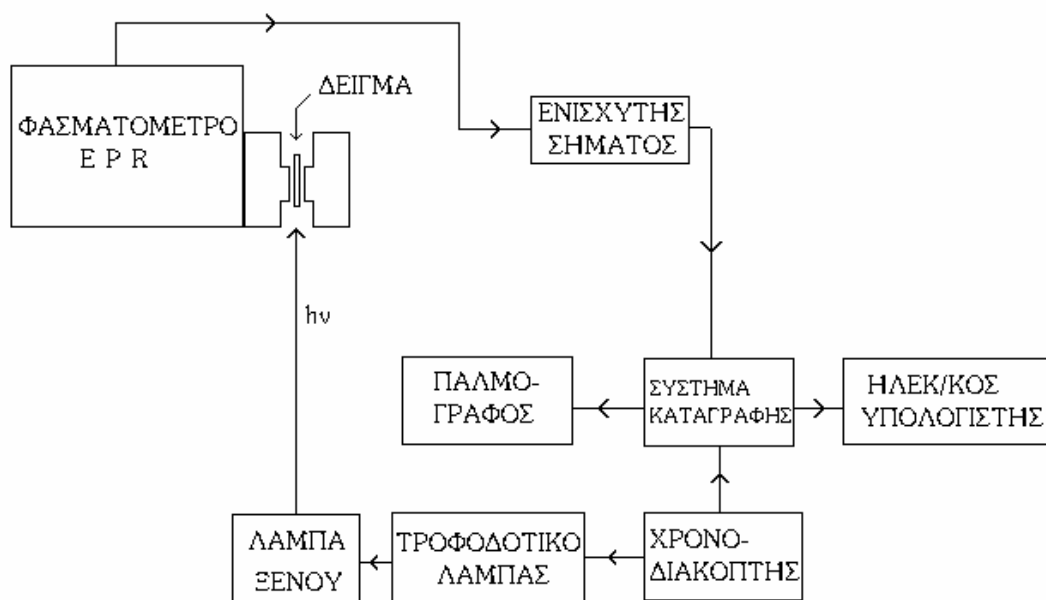
Μία γυάλινη κυψελίδα χρησιμοποιήθηκε για την τοποθέτηση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου και αζώτου. Όλα τα πειραματικά δεδομένα της φασματοσκοπίας EPR, που παρουσιάζονται σε αυτή την εργασία, πραγματοποιήθηκαν με τη εφαρμογή ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου 100 kHz. Το παραγόμενο σήμα EPR, μετά τη διέλευσή του από τον ενισχυτή σήματος (EG&G, μοντέλο 113 PRE-AMP), συλλεγόταν από το σύστημα καταγραφής (transient recorder/signal averager, DSP, μοντέλο 2824 SA) και επεξεργαζόταν με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Σχ.18: Το σήμα EPR της ρίζας Tyr-D⁺ στο σκοτάδι (σήμα Π_g). Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,052 GHz, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=3,2 Gs, θερμοκρασία=22°C [304].

Εξαιτίας της σχετικά χαμηλής συγκέντρωσης της παραμαγνητικής ρίζας Tyr-Z⁺ (8 μM) στο αιώρημα των μεμβρανών PS II, η ανίχνευση του σήματος EPR της ρίζας Tyr-Z⁺ (σήμα Π_f) έγινε με επαναλαμβανόμενα πειράματα παλμών μικρής διάρκειας που είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου σήματος/θορύβου (S/N). Με την τεχνική αυτή καταγραφόταν τελικά ο μέσος όρος των σημάτων. Η φωτοοξείδωση του δείγματος με κορεσμένους παλμούς ($t_{1/2}=10$ μsec) έγινε με ένα σύστημα παλμικής λάμπας Xe EG&G (λάμπα τύπου FX 200, τροφοδοτικό ισχύος τύπου PS 350 με εξωτερικό πυκνωτή 3,5 μF). Ένα ηλεκτρονικό κύκλωμα με χρονοδιακόπτη επέτρεπε την έναρξη λειτουργίας της λάμπας αμέσως μετά την έναρξη λειτουργίας του φασματομέτρου EPR. Ο χρόνος καθυστέρησης ήταν 25 msec, ώστε να καταγραφεί μία κατάλληλη γραμμή εξισορρόπησης (baseline) στο σκοτάδι. Πριν τη φωτοοξείδωση του δείγματος γινόταν καταγραφή του σταθερού στο σκοτάδι

σήματος EPR της ρίζας Tyr-D⁺ (σήμα Π_S). Το μαγνητικό πεδίο, που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση του σήματος της ρίζας Tyr-Z⁺, αντιστοιχούσε στο μέγιστο σημείο της πρώτης κορυφής του σήματος Π_S (κεντρική τιμή πεδίου), όπως δηλώνεται με το βέλος A στο Σχ. 18. Το σήμα EPR της ρίζας Tyr-Z⁺ μετά τη διέλευση από τον ενισχυτή σήματος (EG&G, 113 PRE-AMP), συλλεγόταν με το σύστημα καταγραφής (transient record/signal averager, DSP, 2824 SA) και επεξεργαζόταν με τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ένα διάγραμμα με τα κύρια λειτουργικά συστήματα της κινητικής φασματοσκοπίας EPR παρουσιάζεται στο Σχ. 19.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ EPR



Σχ.19: Διάγραμμα των κύριων λειτουργικών συστημάτων της κινητικής φασματοσκοπίας EPR.

Η φασματοσκοπία EPR και η μέθοδος ανάκτησης κορεσμού (saturation recovery) σε θερμοκρασία ηλίου έγινε με φασματόμετρο EPR JOEL ME-3X (X-band) εφοδιασμένο με κρυοστάτη της εταιρείας Oxford, τύπου ESR-900 και κυλινδρική κοιλότητα συντονισμού ($Q_u=8.200$, Q_u : παράγοντας ακρίβειας της κοιλότητας συντονισμού), όπως αναφέρεται στην αναφορά [304]. Οι μετρήσεις των μεταπτώσεων αποδιέγερσης με τη μέθοδο ανάκτησης κορεσμού

πραγματοποιήθηκαν με συνεχή μέτρηση της απορρόφησης EPR ως συνάρτηση του χρόνου μετά από ένα κορεσμένο παλμό μικροκυματικής ισχύος. Τα σήματα της ανάκτησης κορεσμού ανιχνεύτηκαν σε χαμηλή μικροκυματική ισχύ (παρατηρούμενη φάση), 4×10^{-4} mW και χωρίς εφαρμογή ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου. Η φάση του κορεσμένου παλμού μικροκυματικής ισχύος ρυθμίστηκε σε 90° σχετικά με την παρατηρούμενη μικροκυματική φάση και το μαγνητικό πεδίο που εφαρμόστηκε αντιστοιχούσε στο σημείο B του φάσματος της ρίζας Tyr-D^+ , όπως δηλώνεται με το βέλος στο **Σχ. 18**. Τα πειραματικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

2.2.5.2 Φασματοσκοπία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)

Οι κινητικές μετρήσεις της οπτικής φασματοσκοπίας διαφοράς απορρόφησης έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου με μία συσκευή απλής δέσμης και τη χρησιμοποίηση μίας αλογονούχου λάμπας βολφραμίου, όπως περιγράφεται στην αναφορά [106]. Το οπτικό μήκος διαδρομής ήταν 1,2 mm, οι κορεσμένοι παλμοί διέγερσης παρήχθησαν με ένα σύστημα laser Nd-YAG (532 nm, 25 nsec, 150 mJ) με συχνότητα 0,3 Hz και ο φωτοπολλαπλασιαστής προστατεύτηκε από τους παλμούς διέγερσης με κατάλληλο συνδυασμό φίλτρων. Τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

2.2.5.3 Φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης

Οι μετρήσεις της ατομικής απορρόφησης έγιναν με φασματόμετρο PERKIN-ELMER 4000 και φούρνο γραφίτη GFA-400 σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην αναφορά [305]. Η θερμική κατεργασία του δείγματος (20 μl) περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια:

α. εξάτμιση (90°C), β. αφυδάτωση (130°C), γ. θερμική διάσπαση πτητικών οργανικών συστατικών (500°C), δ. θερμική διάσπαση σταθερών ενώσεων (1100°C), ε. ατομοποίηση (2.600°C), στ. καθαρισμός φούρνου (20°C) και ζ. καθαρισμός φούρνου (2.650°C).

Ως χαρακτηριστικό μήκος κύματος απορρόφησης του ασβεστίου χρησιμοποιήθηκε το μήκος κύματος $239,9\text{ nm}$.

3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΣΤΟ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ Π ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΡΙΣΘΕΝΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΛΑΝΘΑΝΙΔΙΩΝ.

3.1 Εισαγωγή

Το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (O.E.C.) του PS II αποτελεί μία πολυπεπτιδική δομή με υψηλή διάταξη, που περιέχει τις θέσεις δέσμευσης για τους ανόργανους συμπράγοντες, που απαιτούνται για την καταλυτική δραστηριότητά του [306]. Αν και είναι ευρέως αποδεκτό ότι ιόντα μαγγανίου, ασβεστίου και χλωρίου είναι απαραίτητα για τη διαδοχική 4-ηλεκτρονίων οξειδωση του νερού σε μοριακό οξυγόνο, η καταλυτική τους δράση δεν είναι πλήρως κατανοητή. Από τα τρία είδη ιόντων που συμμετέχουν στη φωτοσυνθετική διάσπαση του νερού, τα ιόντα μαγγανίου έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί σε μεγαλύτερη έκταση. Προσδιορίστηκε η παρουσία τεσσάρων ιόντων μαγγανίου ανά κέντρο αντίδρασης PS II [45] και αποδείχθηκε η άμεση συμμετοχή τους στη λειτουργία του συμπλόκου O.E.C. [262]. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει επικεντρωθεί στη δράση του χλωρίου [230, 232, 233, 262, 307]. Ο ρόλος του ασβεστίου στην ανάπτυξη των οξειδωτικών καταστάσεων S κατά τη λειτουργία του συμπλόκου O.E.C μελετάται με διάφορες τεχνικές [174, 193]. Αν και έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες για το ρόλο του ασβεστίου, οι θέσεις δέσμευσής του δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί. Η λειτουργία του ασβεστίου στο σύμπλοκο O.E.C. θα διευκρινιστεί όταν ταυτοποιηθούν τα πολυπεπίδια που παρέχουν υποκαταστάτες στο ασβέστιο και προσδιοριστεί η θέση του σε σχέση με τα άλλα οξειδοαναγωγικά συστατικά του PS II.

Το Ca^{2+} αλληλεπιδρά με εξειδικευμένο τρόπο με μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, σχεδόν 100 [308, 309]. Η ηλεκτρονική διαμόρφωση του Ca^{2+} καθιστά απαγορευτική την ταυτοποίησή του με τεχνικές οπτικής απορρόφησης και

μαγνητικού συντονισμού. Η μελέτη του λειτουργικού ασβεστίου στα διάφορα βιολογικά ένζυμα πραγματοποιείται με εκλεκτική αντικατάστασή του από άλλα μεταλλικά ιόντα, που μπορούν να ανιχνευθούν με φασματοσκοπικές τεχνικές. Τρισθενή ιόντα λανθανιδίων (Ln^{3+}) και δισθενή ιόντα σπάνιων γαιών ανταγωνίζονται με τα ιόντα Ca^{2+} για την ίδια θέση δέσμευσης σε βιολογικά ένζυμα. Τα τρισθενή ιόντα λανθανιδίων παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με το Ca^{2+} : 1) Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση στη θέση δέσμευσης, 2) συγκεκριμένο λόγο φορτίου-ακτίνας, 3) προσαρμογή κυρίως με οξυγονούχους υποκαταστάτες και 4) γεωμετρία προσαρμογής αρκετά παραμορφωμένη. Αν και το φορτίο των ιόντων Ln^{3+} και Ca^{2+} διαφέρει κατά μία μονάδα, η ομοιότητα των ιοντικών τους ακτίνων φαίνεται ότι αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα στα πειράματα εκλεκτικής αντικατάστασης. Η δέσμευση των ιόντων Ln^{3+} στη θέση δέσμευσης των ιόντων Ca^{2+} προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών και επηρεάζει τη δραστηριότητά τους. Η ομάδα των ιόντων Ln^{3+} παρουσιάζει ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Ορισμένα ιόντα Ln^{3+} είναι παραμαγνητικά (όπως, Dy^{3+} και Gd^{3+}), άλλα περιέχουν πυρήνες ανιχνεύσιμους με φασματοσκοπία NMR (όπως, Eu^{3+} και Yb^{3+}) [310] και ένα ιόν, το Tb^{3+} , μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μετρήσεις φθορισμομετρίας [311].

Αποδείχθηκε ότι τα ιόντα Ca^{2+} και Ln^{3+} ανταγωνίζονται για τις ίδιες θέσεις δέσμευσης στην οξειδωτική πλευρά του PS II [212]. Η αξιοσημείωτη αυτή ανακάλυψη οδήγησε στην υπόθεση μίας δομής τύπου κονκαναβαλίνης A, στην οποία το ασβέστιο δεσμεύεται κοντά στο σύμπλοκο του μαγγανίου και επηρεάζει τη δομή του [212]. Η προτεινόμενη αυτή δομή επιβεβαιώθηκε με πρόσφατα πειραματικά αποτελέσματα φασματοσκοπίας EPR. Αποδείχθηκε ότι η απαγόρευση της έκλυσης οξυγόνου με απομάκρυνση του ασβεστίου από τα κέντρα αντίδρασης PS II προκαλεί δομικές ανακατατάξεις στο σύμπλοκο του μαγγανίου με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός τροποποιημένου σήματος multiline. Το σήμα αυτό αποδίδεται σε μία τροποποιημένη κατάσταση S_2 (S_2^*) του συμπλόκου O.E.C. Οι δομικές ανακατατάξεις, οι οποίες δημιουργούνται με απομάκρυνση του ασβεστίου είτε με

κατεργασία μεμβρανών PS II με κιτρικό οξύ σε pH 3.0 [82, 83] είτε με έκπλυση με διάλυμα NaCl παρουσία χηλικής ένωσης (EDTA ή EGTA) [67], αυξάνουν τη σταθερότητα του συμπλόκου του μαγγανίου στην κατάσταση S_2^* .

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα εκλεκτικής αντικατάστασης των ιόντων Ca^{2+} από παραμαγνητικά ιόντα Dy^{3+} και διαμαγνητικά ιόντα La^{3+} και μελετήθηκε η επίδρασή τους στις δομικές και καταλυτικές ιδιότητες του φωτοσυστήματος II. Η φασματοσκοπία EPR έδωσε χρήσιμες πληροφορίες για τις θέσεις δέσμευσης του ασβεστίου σε σχέση με άλλα οξειδοαναγωγικά συστατικά της οξειδωτικής πλευράς του φωτοσυστήματος II.

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

Μεμβράνες PS II απομονώθηκαν, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.1. Η αντικατάσταση των ιόντων Ca^{2+} από ιόντα Dy^{3+} ή La^{3+} έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.3. Η επεξεργασία των διαφόρων παρασκευσμάτων PS II με διάλυμα Tris έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στις παράγραφους 2.2.1.2 και 2.2.1.4. Τα δείγματα που προορίζονταν για μελέτη με φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία ηλίου διαλυτοποιήθηκαν μετά την τελευταία φυγοκέντρηση της διαδικασίας παρασκευής τους σε διάλυμα αιθυλενογλυκόλης (διάλυμα EG). Η πρωτεϊνική ανάλυση των διαφόρων παρασκευασμάτων PS II έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου με τη μέθοδο που περιγράφηκε προηγουμένως [53]. Η ενεργότητα της έκλυσης οξυγόνου των διαφόρων φωτοσυνθετικών παρασκευασμάτων μετρήθηκε με ηλεκτρόδιο οξυγόνου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.

Ο αριθμός των ιόντων Ca^{2+} ανά κέντρο αντίδρασης PS II σε ανέπαφες μεμβράνες PS II προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης (φασματόμετρο Perkin-Elmer, τύπου 4000), όπως περιγράφεται στην αναφορά [305]. Ο αριθμός των ιόντων μαγγανίου στα διάφορα παρασκευάσματα PS II προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία δωματίου και οι μετρήσεις

έγιναν με φασματόμετρο EPR τύπου ER 200D της εταιρείας Bruker. Τα δείγματα (0,4 ml) επώαστηκαν (37°C, 5 min) με 5 ml πυκνού HCl οξέος με αποτέλεσμα την καταστροφή του συμπλόκου του μαγγανίου και την απελευθέρωσή του με τη μορφή ενυδατωμένου συμπλόκου $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ που δίνει χαρακτηριστικό σήμα EPR με έξι κορυφές. Οι φασματοσκοπικές συνθήκες EPR που εφαρμόστηκαν για τον προσδιορισμό των ιόντων Mn^{2+} ήταν οι ακόλουθες: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς=144 mW, συχνότητα ρυθμιστικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού πεδίου=10 Gs, πλάτος παρατηρούμενου μαγνητικού πεδίου=2.200-4.200 Gs, θερμοκρασία=20°C.

Ο αριθμός των ιόντων Dy^{3+} ανά κέντρο αντίδρασης PS II υπολογίστηκε με φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία ηλίου. Το σήμα EPR ($g=17$) των ιόντων Dy^{3+} που περιέχονταν στα παρασκευάσματα $[\text{Dy}]\text{-PS II}$, $[\text{Dy}/\text{EDTA}]\text{-PS II}$ και $\text{Tris}[\text{Dy}]\text{-PS II}$ συγκρίθηκε με το αντίστοιχο σήμα πρότυπου διαλύματος Dy^{3+} (0,2 mM) για το προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ιόντων Dy^{3+} στα παρασκευάσματα αυτά. Οι φασματοσκοπικές μετρήσεις EPR σε θερμοκρασία ηλίου έγιναν με φασματόμετρο JEOL ME-3X (X-band), εφοδιασμένο με κρυοστάτη ηλίου (Oxford ESR-900). Για τον προσδιορισμό των ιόντων Dy^{3+} εφαρμόστηκαν οι ακόλουθες φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,05 GHz, μικροκυματική ισχύς=11,4 μW, συχνότητα ρυθμιστικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=20 Gs, θερμοκρασία=7 K.

3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα ακόλουθα παρασκευάσματα μεμβρανών PS II: ανέπαφες μεμβράνες PS II (αναφέρονται ως $[\text{Ca}]\text{-PS II}$), $[\text{La}]\text{-PS II}$, $[\text{Dy}]^*\text{-PS II}$, $[\text{Dy}]\text{-PS II}$, $[\text{Dy}/\text{EDTA}]\text{-PS II}$, $\text{Tris}[\text{Dy}]\text{-PS II}$, $\text{Tris}[\text{Dy}/\text{EDTA}]\text{-PS II}$ και $[\text{La}/(\text{EDTA}, \text{EGTA})]\text{-PS II}$. Τα παρασκευάσματα αυτά μελετήθηκαν με

φασματοσκοπικές και πολαρογραφικές τεχνικές, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Χαρακτηρισμός διαφόρων παρασκευσμάτων PS II

Παρ/σμα	Εξωτερικές πρωτεΐνες ^(α)	Ca/ PS II	Mn/ PS II	Ln/ PS II	V _{O₂}		κατάσταση S ₂ multiline ^(β)		P _{1/2} ^(γ) (μW) Tyr ⁺ D
					-CaCl ₂ ^(δ)	+CaCl ₂ ^(ε)	-CaCl ₂	+CaCl ₂	
[Ca]-PS II	+17/+23/+33	15	4	-	100%	100%	100%	δ.π.	8
[La]-PS II	+17/+23/+33	0	4	δ.π. ^(στ)	0	0	0	0	7
[Dy]-PS II	+17/+23/+33	0	4	14-15	0	0	0	0	>97
[Dy]'-PS II	-17/-23/+33	0	4	13-14	0	0	0	0	-
[Dy/EDTA]-PS II	+17/+23/+33 πλύση-EDTA	0	4	0	0	43%	0	54% ^(ζ)	-
Tris[Dy]-PS II	-17/-23/-33	0	0	1-3	0	0	0	0	97
Tris[Dy/EDTA]-PS II	-17/-23/-33	0	0	0	0	0	0	0	3

α: Αναφέρεται στην παρουσία (+) ή στην απουσία (-) των πρωτεϊνών 17, 23 και 33 kDa, αντίστοιχα.

β: Το ποσοστό του σήματος EPR multiline που παράγεται με ακτινοβολία (5 min, 200 K) της παρασκευής [Ca]-PS II θεωρείται ότι είναι 100%.

γ: P_{1/2} η μισή τιμή της μικροκυματικής ισχύος κορεσμού του σήματος EPR II_s της ρίζας Tyr-D⁺.

δ: Η ενεργότητα O₂ ήταν ίση με 720 μmoles O₂ / (mgr Chl, h), χωρίς την προσθήκη εξωγενούς CaCl₂.

ε: Τα παρασκευάσματα PS II (5 mgr Chl / ml) επώστηκαν (10 min, 25°C) με 10 mM CaCl₂ στο σκοτάδι, πριν τη μέτρηση της έκλυσης O₂. Ποσότητα δείγματος 50 μg Chl τοποθετήθηκε σε κυψελίδα που περιείχε 3 ml διαλύματος SMN και 250 μM DCBQ ως ηλεκτρονιοδέκτη.

στ: Δεν προσδιορίστηκε.

ζ: Μετά την απομάκρυνση των ιόντων Dy³⁺ με κατεργασία EDTA, το παρασκεύασμα [Dy/EDTA]-PS II επώστηκε (90 min, 4°C) με 10 mM CaCl₂ στο σκοτάδι και κατόπιν ακτινοβολήθηκε (5 min, 200 K) για την παραγωγή του σήματος multiline.

Το παρασκεύασμα [Dy]-PS II στο οποίο όλα τα ιόντα Ca^{2+} αντικαταστάθηκαν από ιόντα Ln^{3+} , διατηρεί και τις τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες 17, 23 και 33 kDa (**Σχ. 20**).

Σχ. 20: Ανάλυση της πρωτεϊνικής σύστασης διαφόρων δειγμάτων PS II με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου/ουρίας. **1:** [Dy]-PS II, **2:** [Dy]^{*}-PS II, **3:** [Dy/EDTA]-PS II, **4:** Tris[Dy/EDTA]-PS II, **5:** [Ca]-PS II.

Τα παρασκευάσματα [Ln]-PS II (Ln: La^{3+} ή Dy^{3+}) και [Dy/EDTA]-PS II διατηρούν και τα τέσσερα ιόντα μαγγανίου (**Σχ. 21**) αλλά δεν έχουν την ικανότητα να οξειδώσουν το νερό. Όταν δείγματα των παρασκευασμάτων αυτών επώαστηκαν με 10 mM CaCl_2 δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των δειγμάτων [Ln]-PS II, αλλά το δείγμα [Ln/EDTA]-PS II επανέκτησε την ικανότητα έκλυσης οξυγόνου σε ποσοστό 43% συγκριτικά με δείγμα ανέπαφων μεμβρανών PS II. Στο δείγμα [Ln/EDTA]-PS II η έκλυση οξυγόνου παρατηρήθηκε μετά από επώαση του δείγματος με CaCl_2 , τουλάχιστον για 10 min σε 25°C. Η παρατήρηση ότι η προσθήκη εξωγενούς CaCl_2 δεν ενεργοποιεί τα δείγματα [Ln]-PS II συμφωνεί με τα αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας [212] με την οποία διαπιστώθηκε ότι τα ιόντα Ln^{3+}

δεσμεύονται πιά ισχυρά από τα ιόντα Ca^{2+} στα κέντρα αντίδρασης PS II. Επίσης, η αργή ενεργοποίηση με εξωγενές CaCl_2 του παρασκευάσματος $[\text{Ln}/\text{EDTA}]\text{-PS II}$, το οποίο διατηρεί τις πρωτεΐνες 17 και 23 kDa (**Σχ. 20**), δεν αποτελεί έκπληξη. Έχει διαπιστωθεί ότι η επαναφορά της ενεργότητας οξυγόνου με εξωγενές CaCl_2 απαιτεί ορισμένο χρονικό διάστημα επώασης, όταν είναι παρούσες οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa [86].

Σχ. 21: Το σήμα EPR του δισθενούς μαγγανίου, $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, σε διάφορα παρασκευάσματα PS II που κατεργάστηκαν με HCl. **A:** $[\text{Ca}]\text{-PS II}$, **B:** $[\text{Dy}]\text{-PS II}$, **Γ:** $[\text{Dy}]^*\text{-PS II}$, **Δ:** $[\text{La}]\text{-PS II}$, **Ε:** $[\text{Dy}/\text{EDTA}]\text{-PS II}$. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς=144 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=10 Gs, παρατηρούμενο μαγνητικό πεδίο=2.200-4.200 Gs, θερμοκρασία 20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.

Τα διάφορα παρασκευάσματα PS II μελετήθηκαν με φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία ηλίου για να εξεταστεί η ικανότητα ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Στα παρασκευάσματα [Ln]-PS II ([La]-PS II και [Dy]-PS II) δεν παράγεται η κατάσταση S_2 , όπως αποδεικνύεται από την απουσία είτε του σήματος multiline είτε του σήματος $g=4,1$ (Σχ. 22).

Σχ. 22: Η επίδραση της αντικατάστασης των ιόντων Ca^{2+} από ιόντα Dy^{3+} και της επανασύνδεσης των ιόντων Ca^{2+} στο σήμα EPR της κατάστασης S_2 σε δείγματα μεμβρανών PS II. **A:** Το φάσμα EPR στο σκοτάδι (πάνω) και το φάσμα διαφοράς μεταξύ του φάσματος EPR μετά από ακτινοβόληση (200 K, 5 min) και του φάσματος EPR στο σκοτάδι (κάτω) του δείγματος [Dy]-PS II. **B:** Το φάσμα διαφοράς μεταξύ του φάσματος EPR μετά από ακτινοβόληση (200 K, 5 min) και του φάσματος EPR στο σκοτάδι του δείγματος [Dy/EDTA]-PS II που επώαστηκε με 10 mM $CaCl_2$ (πάνω) και του δείγματος [Ca]-PS II (κάτω). Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,05 GHz, μικροκυματική ισχύς=7,2 μW (A) και 18,1 μW (B), συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=20 Gs, θερμοκρασία=7 K. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 5 mg/ml.

Επειδή το κυτόχρωμα b559 βρισκόταν στην κατάσταση χαμηλού δυναμικού στα παρασκευάσματα [La]-PS II και [Dy]-PS II και συνεπώς ήταν οξειδωμένο στο σκοτάδι (Σχ. 22), ακτινοβόληση των παρασκευασμάτων αυτών σε θερμοκρασία 200 K είχε ως αποτέλεσμα την φωτοοξείδωση μίας χλωροφύλλης, Chl (Σχ. 23). Η ρίζα χλωροφύλλης παράγεται, επίσης, με

Σχ. 23: Σύγκριση του σήματος EPR της ρίζας Tyr-D⁺ (σήμα II_S) σε δείγματα μεμβρανών [La]-PS II και [Dy]-PS II. **A:** Το φάσμα EPR στο σκοτάδι του δείγματος [La]-PS II. **B:** Το φάσμα EPR στο σκοτάδι του δείγματος [Dy]-PS II. **Γ:** Το φάσμα διαφοράς μεταξύ του φάσματος EPR μετά από ακτινοβόληση (200 K, 3 min) και του φάσματος EPR στο σκοτάδι του δείγματος [La]-PS II. **Δ:** Το φάσμα διαφοράς μεταξύ του φάσματος EPR μετά από ακτινοβόληση (200 K, 3 min) και του φάσματος EPR στο σκοτάδι του δείγματος [Dy]-PS II. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,05 GHz, μικροκυματική ισχύς=0,72 μW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=15 K. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 5 mg/ml.

ακτινοβόληση σε 200 K του παρασκευάσματος [Dy/EDTA]-PS II (**Σχ. 24**). Επειδή παρατηρήθηκε ότι το παρασκεύασμα [Dy/EDTA]-PS II επανακτά ένα κλάσμα της ενεργότητας οξυγόνου με προσθήκη εξωγενούς CaCl₂, μελετήθηκε το παρασκεύασμα αυτό με φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία ηλίου. Μετά από επώαση δείγματος μεμβρανών [Dy/EDTA]-PS II με 10 mM CaCl₂ για 90 min σε 4°C παράγεται η κατάσταση S₂, όπως αποδεικνύεται από το σχηματισμό του σήματος multiline σε ποσοστό 54% συγκριτικά με δείγμα ανέπαφων μεμβρανών PS

II (**Σχ. 22**). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η απομάκρυνση όλων των ιόντων Ca^{2+} από τα κέντρα αντίδρασης PS II οδηγεί σε ένα ενζυμικό σύστημα στο οποίο παρεμποδίζεται η λειτουργία του κύκλου των οξειδωτικών καταστάσεων S.

Σχ. 24: Σχηματισμός της ρίζας Chl^+ μετά από ακτινοβόληση σε 200 K του δείγματος μεμβρανών [Dy/EDTA]-PS II. **A:** Φάσμα EPR στο σκοτάδι. **B:** Φάσμα EPR μετά από ακτινοβόληση (200 K, 3 min). **Γ:** Φάσμα διαφοράς μεταξύ A και B. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,05 GHz, μικροκυματική ισχύς=0,72 μW , συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=15 K Συγκέντρωση χλωροφύλλης του δείγματος: 5 mg/ml.

Ενώ το La^{3+} είναι διαμαγνητικό και δεν ταυτοποιείται με φασματοσκοπία EPR, το Dy^{3+} είναι παραμαγνητικό και δίνει ένα χαρακτηριστικό σήμα EPR (**Σχ. 25**). Με τη βοήθεια του σήματος αυτού υπολογίστηκε ότι στο παρασκεύασμα [Dy]-PS II περιέχονται 14-15 ιόντα Dy^{3+} ανά κέντρο αντίδρασης PS II. Οπως φαίνεται στον **Πίνακα 1**, στο παρασκεύασμα [Dy]-PS II όλα τα ιόντα Ca^{2+} αντικαταστάθηκαν από ιόντα Dy^{3+} . Είναι αξιοσημείωτο ότι στα παρασκευάσματα [Dy]-PS II (με τις πρωτεΐνες 17 και 23 kDa) και $[\text{Dy}]^*$ -PS II (χωρίς τις πρωτεΐνες 17 και 23 kDa) υπολογίστηκε ο ίδιος αριθμός ιόντων Dy^{3+} ανά κέντρο αντίδρασης PS

II (Πίνακας 1). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες 17 και 23 kDa δεν δεσμεύουν ιόντα Ca^{2+} .

Σχ. 25: Σύγκριση του σήματος EPR ($g=17$) του ιόντος Dy^{3+} στο σκοτάδι σε δείγματα μεμβρανών PS II στις οποίες τα ιόντα Ca^{2+} αντικαταστάθηκαν από ιόντα Dy^{3+} . **A:** Δείγμα μεμβρανών [Dy]-PS II με 14-15 ιόντα Dy^{3+} /PS II. **B:** Δείγμα μεμβρανών Tris[Dy]-PS II με 1-3 ιόντα Dy^{3+} /PS II. **Γ:** Δείγμα μεμβρανών Tris[Dy/EDTA]-PS II με 0 Dy^{3+} /PS II. **Δ:** Πρότυπο διάλυμα 0,2 mM Dy^{3+} . Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,05 GHz, μικροκυματική ισχύς=11,4 μW , συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=20 Gs, θερμοκρασία=7 K. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 5 mg/ml.

Τα παρασκευάσματα [La]-PS II και [Dy]-PS II παρουσιάζουν τις ίδιες βασικές ιδιότητες αλλά παρατηρείται μία σημαντική διαφορά στο σήμα EPR (σήμα II_S) της σταθερής στο σκοτάδι ρίζας Tyr-D⁺ [15]. Η παρουσία των ιόντων La^{3+} δεν επηρεάζει το σήμα II_S και η μορφή του σήματος είναι ίδια με αυτή που παρατηρείται

σε παρασκευάσματα [Ca]-PS II. Αντίθετα, όταν τα ιόντα Ca^{2+} αντικατασταθούν από ιόντα Dy^{3+} , η υπέρλεπτη υφή του σήματος P_{S} χάνεται (Σχ. 23). Η αλλαγή στη μορφή του σήματος EPR της ρίζας Tyr-D⁺ παρουσία των ιόντων Dy^{3+} σημαίνει ότι υπάρχει μία ισχυρή μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραμαγνητικών ιόντων Dy^{3+} και της ρίζας Tyr-D⁺ [312]. Είναι γνωστό ότι ο κορεσμός του σήματος P_{S} επιτυγχάνεται σε υψηλότερη μικροκυματική ισχύ παρουσία άλλων παραμαγνητικών συστατικών. Όπως είναι αναμενόμενο, η κατάσταση κορεσμού του σήματος P_{S} επηρεάζεται από την παρουσία των παραμαγνητικών ιόντων Dy^{3+} . Στο παρασκεύασμα [Dy]-PS II ο κορεσμός του σήματος P_{S} παρατηρείται σε υψηλότερη μικροκυματική ισχύ ($P_{1/2} > 97 \mu\text{W}$) συγκριτικά με αυτή που παρατηρείται στα παρασκευάσματα [Ca]-PS II ($P_{1/2} = 8 \mu\text{W}$) και [La]-PS II ($P_{1/2} = 7 \mu\text{W}$) (Πίνακας 1). Προφανώς, τα ιόντα Dy^{3+} διευκολύνουν το μηχανισμό αποδιέγερσης spin-πλέγματος και έτσι επηρεάζουν τη μικροκυματική ισχύ κορεσμού ($P_{1/2}$) της γειτονικής ρίζας Tyr-D⁺. Μία ανάλογη επίδραση έχει παρατηρηθεί στη μικροκυματική ισχύ κορεσμού της ρίζας Tyr-Z⁺ σε ανέπαφες μεμβράνες PS II εξαιτίας της μαγνητικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της ρίζας Tyr-Z⁺ και του συμπλόκου του μαγγανίου [313].

Αν και προτείνεται ότι μόνο δύο ιόντα Ca^{2+} ανά κέντρο αντίδρασης PS II είναι απαραίτητα για την ενεργότητα έκλυσης οξυγόνου [199], μεμβράνες PS II που δεν επεξεργάζονται με χηλικές ενώσεις, όπως EDTA ή EGTA, περιέχουν υψηλό αριθμό ιόντων Ca^{2+} (10-15 Ca^{2+} ανά κέντρο αντίδρασης PS II). Ετσι, δεν αποτελεί έκπληξη ότι το παρασκεύασμα [Dy]-PS II περιέχει 14-15 ιόντα Dy^{3+} ανά κέντρο αντίδρασης PS II. Ο αριθμός των ιόντων Dy^{3+} μειώθηκε δραστικά, όταν δείγμα μεμβρανών [Dy]-PS II επεξεργάστηκε με διάλυμα Tris. Η επεξεργασία με διάλυμα Tris όχι μόνο καταστρέφει το σύμπλοκο του μαγγανίου και απομακρύνει τις τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες, αλλά συγχρόνως απομακρύνει και το μεγαλύτερο ποσό των ιόντων Dy^{3+} .

Σχ. 26: Σύγκριση των καμπυλών κορεσμού του σήματος EPR της ρίζας Tyr-D⁺ (σήμα Π_S) σε δείγματα μεμβρανών: Tris[Dy]-PS II με 1-3 ιόντα Dy³⁺/PS II (ανοικτά τετράγωνα) και Tris[Dy/EDTA]-PS II με 0 Dy³⁺/PS II (κλειστά τετράγωνα). Τα πειραματικά αποτελέσματα χαρακτηρίστηκαν, όπως περιγράφεται στην αναφορά [312]. Η ένταση του σήματος Π_S στις διάφορες τιμές μικροκυματικής ισχύος εκφράστηκε σε σχέση με την ένταση του σήματος Π_S στη χαμηλότερη μικροκυματική ισχύ. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,05 kHz, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία 15 K. *Ενθετο σχήμα:* Σύγκριση του παραγόμενου σήματος EPR Π_S στο σκοτάδι σε δείγματα μεμβρανών PS II στις οποίες τα ιόντα Ca²⁺ αντικαταστάθηκαν από ιόντα Dy³⁺: **A:** Δείγμα μεμβρανών [Dy]-PS II με 14-16 ιόντα Dy³⁺/PS II. **B:** Δείγμα μεμβρανών Tris[Dy]-PS II με 1-3 ιόντα Dy³⁺/PS II. **Γ:** Δείγμα μεμβρανών Tris[Dy/EDTA]-PS II με 0 Dy³⁺/PS II. Ως ένταση του σήματος Π_S θεωρήθηκε το ύψος της κορυφής του σήματος από τη γραμμή baseline, όπως υποδεικνύουν τα βέλη. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,05 GHz, μικροκυματική ισχύς=0,72 μW, συχνότητα ρυθμιζόμενου μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιζόμενου μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=15 K. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 5 mg/ml.

Με φασματοσκοπία EPR προσδιορίστηκε ότι το παρασκεύασμα Tris[Dy]-PS II περιέχει 1-3 ιόντα Dy³⁺ ανά κέντρο αντίδρασης PS II. Δεν είναι σαφές, αν η μείωση του αριθμού των ιόντων Dy³⁺/PS II οφείλεται στην απομάκρυνση των εξωτερικών πρωτεϊνών ή στην καταστροφή του συμπλόκου του μαγγανίου.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων Dy^{3+} και της ρίζας $Tyr-D^+$ παρατηρείται και στο παρασκεύασμα $Tris[Dy]-PS II$ (Σχ. 26). Στο παρασκεύασμα αυτό η υπέρλεπτη υφή του σήματος II_S τροποποιείται και ο κορεσμός του σήματος παρατηρείται σε υψηλότερη μικροκυματική ισχύ ($P_{1/2}=97 \mu W$) συγκριτικά με αυτή που παρατηρείται στο παρασκεύασμα $Tris[Dy/EDTA]-PS II$ ($P_{1/2}=3 \mu W$), που δεν περιέχει ιόντα Dy^{3+} ή Ca^{2+} στις θέσεις δέσμευσης του ασβεστίου. Αν και δεν μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα ποιά θέση δέσμευσης του ασβεστίου είναι υπεύθυνη για την επίδραση πάνω στη ρίζα $Tyr-D^+$, τα προηγούμενα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι υπάρχει μία θέση δέσμευσης Ca^{2+}/Dy^{3+} υψηλής συγγένειας στο παρασκεύασμα $Tris[Ln]-PS II$. Έχει αποδειχθεί ότι η απομάκρυνση του συμπλόκου του μαγγανίου καταστρέφει τις θέσεις δέσμευσης χαμηλής συγγένειας του ασβεστίου [208]. Επειδή η επίδραση των ιόντων Dy^{3+} στο σήμα EPR της ρίζας $Tyr-D^+$ διατηρείται και στο παρασκεύασμα $Tris[Dy]-PS II$, είναι πολύ πιθανό η επίδραση αυτή να οφείλεται στη δέσμευση ενός ιόντος Dy^{3+} στη θέση δέσμευσης υψηλής συγγένειας του ασβεστίου.

Η μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ του Dy^{3+} και της ρίζας $Tyr-D^+$ θα μπορούσε να παρατηρείται σε απόσταση τουλάχιστον 37 Å. Η απόσταση αυτή προσδιορίστηκε με εφαρμογή της θεωρίας, που διατυπώθηκε από τους Hyde και Rao [314], για τη διπολική αποδιέγερση spin-πλέγματος (spin-lattice) σε βιολογικά συστήματα παρουσία παραμαγνητικών μετάλλων. Ένα προσεγγιστικό μοντέλο της προηγούμενης θεωρίας διατυπώθηκε από τον Brudvig και τους συνεργάτες του [312]. Το μοντέλο αυτό μελετά την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο παραμαγνητικών συστατικών σε ορισμένη απόσταση, αλλά τυχαίο προσανατολισμό, σε μαγνητικό πεδίο. Το ένα ηλεκτρονικό spin του ζεύγους χαρακτηρίζεται από αργό χρόνο αποδιέγερσης (T_1) και το άλλο από γρήγορο χρόνο αποδιέγερσης (T_{1k}). Ο χρόνος αποδιέγερσης spin-lattice, T_1 , μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοσκοπία EPR ανάκτησης κορεσμού και με εφαρμογή της εξίσωσης {3.1} υπολογίζεται η απόσταση r μεταξύ των δύο spins. Με την τεχνική της ανάκτησης κορεσμού (Σχ.27) υπολογίστηκε ο χρόνος αποδιέγερσης, T_1 ($T_1=1/k_d$), της ρίζας $Tyr-D^+$ στο

παρασκεύασμα Tris[Dy]-PS II. Με τη βοήθεια της εξίσωσης **{3.1}** υπολογίστηκε η απόσταση μεταξύ της ρίζας Tyr-D⁺ και του ιόντος Dy³⁺:

$$(1/T_1) = \{(3\gamma_e^2 \mu_k^2)/r^6\} \{ T_{1k}/(1+\omega^2 T_{1k}^2) \} \quad \{3.1\}$$

όπου γ_e : ο γυρομαγνητικός λόγος του ηλεκτρονίου, $1,761 \times 10^7 \text{ rad (sec Gs)}^{-1}$,

μ_k : η μαγνητική ροπή του ιόντος Dy³⁺, $9,7642 \times 10^{-20} \text{ erg/Gs}$,

ω : η συχνότητα EPR, $9,05 \times 10^9 \text{ rad/sec}$,

T_{1k} : ο χρόνος αποδιέγερσης spin-lattice του ιόντος Dy³⁺, $1,759 \times 10^{-11} \text{ sec}$, θεωρώντας $\omega = (T_{1k})^{-1}$,

T_1 : ο χρόνος αποδιέγερσης spin-lattice της ρίζας Tyr-D⁺, $3,2272 \times 10^{-5} \text{ sec}$.

Ο προσδιορισμός της απόστασης μεταξύ της ρίζας Tyr-D⁺ και του Dy³⁺ έγινε με την παραδοχή ότι υπάρχει ένα μόνο ιόν Dy³⁺ δεσμευμένο σε ορισμένη θέση σε κάθε κέντρο αντίδρασης PS II. Η παραδοχή αυτή μειώνει την αξιοπιστία της υπολογιζόμενης απόστασης, αφού το παρασκεύασμα Tris[Dy]-PS II περιέχει 1-3 ιόντα Dy³⁺/PS II.

Στο παρασκεύασμα [La/(EDTA, EGTA)]-PS II το οποίο διατηρεί τις εξωτερικές πρωτεΐνες και τα τέσσερα ιόντα μαγγανίου αλλά δεν περιέχει ιόντα La³⁺ ή Ca²⁺, δεν παράγεται το σήμα multiline με ακτινοβολήση σε 200 K (**Σχ. 28**). Ομως, με ακτινοβολήση σε 4°C και άμεση ψύξη σε 77 K παράγεται το σήμα EPR 164 Gs (**Σχ. 29**).

Σχ. 27: Καμπύλη ανάκτησης κορεσμού (saturation recovery) που παρατηρήθηκε σε δείγμα μεμβρανών Tris[Dy]-PS II μετά από επώαση στο σκοτάδι (5 min, 273 K) και ακτινοβολία σε 273 K (5 min). Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,05 GHz, μικροκυματική ισχύς= 5×10^{-4} mW, τιμή μαγνητικού πεδίου=3.289 Gs, μικροκυματική ισχύς παλμού=31,6 μW, ταχύτητα παλμού=497,53 Hz, διάρκεια παλμού= 2×10^{-4} sec, θερμοκρασία=15 K. Η καμπύλη της ανάκτησης κορεσμού χαρακτηρίζεται από την εξίσωση: $y = A \sum_{\theta} \eta_{\mu\theta} [e^{-\{k_s + k_d(1 - 3\cos\theta)\}t}] d\theta + C$ **{3.2}** όπου A και C είναι σταθερές, k_s είναι η σταθερά ταχύτητας ανταλλαγής (scalar exchange) και k_d είναι η σταθερά ταχύτητας της διπολικής αλληλεπίδρασης. Το ολοκλήρωμα της εξίσωσης **{3.2}** είναι ίσο με το άθροισμα είκοσι διαφορετικών εκθετικών συναρτήσεων με τιμές $\cos\theta$ από 0 έως 1. Οι τιμές των σταθερών ταχύτητας k_s ($493,7 \text{ s}^{-1}$) και k_d ($3,0986 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) υπολογίστηκαν με ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων της ανάκτησης κορεσμού με ηλεκτρονικό υπολογιστή και με τη βοήθεια της εξίσωσης **{3.2}**.

Σχ. 28: Το φάσμα EPR της κατάστασης S₂ σε δείγματα μεμβρανών PS II. **A:** Το φάσμα διαφοράς μεταξύ του φάσματος EPR στο σκοτάδι και του φάσματος EPR μετά από ακτινοβόληση (200 K, 5 min) του δείγματος [Ca]-PS II. **B:** Το φάσμα διαφοράς μεταξύ του φάσματος EPR στο σκοτάδι και του φάσματος EPR μετά από ακτινοβόληση (200 K, 5 min) του δείγματος [La/(EDTA, EGTA)]-PS II. **Γ:** Το φάσμα διαφοράς μεταξύ του φάσματος EPR στο σκοτάδι και του φάσματος EPR μετά από ακτινοβόληση (200 K, 5 min) του δείγματος [La/(EDTA, EGTA)]-PS II μετά από επώαση (δύο ώρες, 4°C) με 20 mM CaCl₂. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,42 GHz, μικροκυματική ισχύς=31 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=16 Gs, θερμοκρασία=11 K. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 4 mg/ml.

Το σήμα αυτό δεν παράγεται σε παρασκευάσματα PS II που περιέχουν ιόντα Ln³⁺. Μετά από επώαση (δύο ώρες, 4°C) δείγματος μεμβρανών [La/(EDTA, EGTA)]-PS II με 20 mM CaCl₂ στο σκοτάδι παράγεται το κανονικό σήμα multiline (**Σχ. 28**). Τα προηγούμενα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η απουσία των ιόντων Ca²⁺ καθιστά απαγορευτικό το σχηματισμό του σήματος multiline αλλά όχι του σήματος 164 Gs.

Το σήμα 164 Gs που παράγεται σε παρασκευάσματα PS II απουσία του ασβεστίου αποδίδεται σε μία τροποποιημένη κατάσταση S_3 (S_3^*) στην οποία μία ελεύθερη οργανική ρίζα, πιθανώς ένα οξειδωμένο αμινοξύ ιστιδίνης, αλληλεπιδρά μαγνητικά με το σύμπλοκο του μαγγανίου [87, 220]. Έχει προταθεί ότι η λειτουργία του συμπλόκου O.E.C. απαγορεύεται κατά τη μετάπτωση $S_3 \rightarrow S_0$ απουσία του ασβεστίου [66].

Σχ. 29: Το σήμα EPR 164 Gs που παρατηρήθηκε σε δείγμα μεμβρανών [La/(EDTA, EGTA)]-PS II μετά από ακτινοβολία σε 4°C και άμεση ψύξη σε 77 K. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,42 GHz, μικροκυματική ισχύς=5 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=13 K. Συγκέντρωση χλωροφύλλης του δείγματος: 4 mg/ml.

Η χρήση των τρισθενών ιόντων λανθανιδίων για τη μελέτη των θέσεων δέσμευσης των ιόντων ασβεστίου στο PS II έδωσε νέες πληροφορίες σχετικά με τη συμμετοχή του ασβεστίου στη φωτοσυνθετική διαδικασία. Τα κυριότερα συμπεράσματα της παρούσας πειραματικής εργασίας είναι τα ακόλουθα:

- 1) Αν και τα τρισθενή ιόντα λανθανιδίων δεσμεύονται πολύ ισχυρά στις θέσεις δέσμευσης των ιόντων ασβεστίου στο PS II, το σύμπλοκο του μαγγανίου δεν απομακρύνεται.
- 2) Μετά την αντικατάσταση των ιόντων Ca^{2+} στο PS II από ιόντα Ln^{3+} προκύπτει ένα ένζυμο που δεν μπορεί να παράγει οξυγόνο, αλλά η ικανότητα έκλυσης οξυγόνου μπορεί να επανακτηθεί με απομάκρυνση των ιόντων Ln^{3+} και προσθήκη εξωγενούς ασβεστίου.
- 3) Σε παρασκευάσματα PS II δεν παράγεται το σήμα multiline της κατάστασης S_2 απουσία του ασβεστίου, αλλά μόνο το σήμα 164 Gs της κατάστασης S_3^* .
- 4) Αν και έχει αποδειχθεί ότι άλλα δισθενή ιόντα, όπως τα ιόντα Sr^{2+} , μπορούν να αντικαταστήσουν τα ιόντα Ca^{2+} με διατήρηση κάποιας ενεργότητας O_2 [86], τα ιόντα Ln^{3+} δεσμεύονται αποτελεσματικά στις θέσεις δέσμευσης του ασβεστίου και παρεμποδίζουν τη λειτουργία του ενζυμικού συμπλόκου O.E.C. από την κατάσταση S_1 σε υψηλότερες οξειδωτικές καταστάσεις. Αυτή η παρεμπόδιση μπορεί να είναι αποτέλεσμα της επίδρασης των ιόντων Ln^{3+} στη δομή του συμπλόκου του μαγγανίου ή στις οξειδοαναγωγικές ιδιότητες της ρίζας Tyr-Z⁺.

4. Η ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΩΝ ΛΑΝΘΑΝΙΔΙΩΝ ΣΤΙΣ ΘΕΣΕΙΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΤΥΡΟΣΙΝΗ Ζ ΣΤΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗ P⁺680

4.1 Εισαγωγή

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το ασβέστιο είναι απαραίτητο για τη διαδοχική 4-ηλεκτρονίων οξειδωση του νερού σε μοριακό οξυγόνο στο PS II [48]. Αν και διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για να διευκρινιστεί ο ρόλος του ασβεστίου στο ενζυμικό σύμπλοκο O.E.C., ο τρόπος δράσης του παραμένει αμφιλεγόμενος. Οι Boussac και Rutherford [66] έχουν προτείνει ότι η λειτουργία του συμπλόκου O.E.C. απουσία του ασβεστίου παρεμποδίζεται κατά τη μετάπτωση $S_3 \rightarrow S_0$. Ο σχηματισμός της κατάστασης S_3 σε παρασκευάσματα PS II που δεν περιέχουν ασβέστιο έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός σήματος EPR με $g=2$ και πλάτος γύρω στα 164 Gs. Το σήμα αυτό αποδίδεται σε μία ελεύθερη οργανική ρίζα, πιθανώς ένα οξειδωμένο αμινοξύ ιστιδίνης, που αλληλεπιδρά μαγνητικά με το μαγγάνιο [87, 220]. Τα τρισθενή ιόντα λανθανιδίων (Ln^{3+}) και τα ιόντα Ca^{2+} ανταγωνίζονται για τις ίδιες θέσεις δέσμευσης στην οξειδωτική πλευρά του PS II. Όταν τα ιόντα Ln^{3+} αντικαταστήσουν τα ιόντα Ca^{2+} , το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου δεν μπορεί να μεταβεί από την κατάσταση S_1 σε υψηλότερες οξειδωτικές καταστάσεις [315, Κεφ. 3].

Η μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο O.E.C. στη χλωροφύλλη P₆₈₀⁺, πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση μίας τυροσίνης, Tyr-Z, που ανάγει άμεσα το P₆₈₀⁺ [15, 128, 316]. Η Tyr-Z είναι η τυροσίνη-161 της πρωτεΐνης D₁ [16, 22]. Η οξειδωτική πλευρά του PS II περιέχει μία δεύτερη οξειδοαναγωγικά ενεργή τυροσίνη, την Tyr-D, η οποία είναι η τυροσίνη-160 της πρωτεΐνης D₂ [21, 317]. Η οξειδωμένη μορφή των αμινοξέων Tyr-Z και Tyr-D, ρίζες Tyr-Z⁺ και Tyr-D⁺

αντίστοιχα, έχουν ένα χαρακτηριστικό σήμα EPR με $g=2,0045$ [20, 318]. Η ταχύτητα αναγωγής του P_{680}^+ παρουσιάζει ισχυρή εξάρτηση από την κατάσταση του PS II. Σε ανέπαφες μεμβράνες PS II η αναγωγή του P_{680}^+ από την Tyr-Z μετά από ένα παλμό πραγματοποιείται σε χρονικό διάστημα 10-100 nsec, το οποίο εξαρτάται από τις οξειδωτικές καταστάσεις S [17]. Σε μεμβράνες PS II, που κατεργάζονται με διάλυμα Tris (μεμβράνες Tris-PS II), η Tyr-Z ανάγει την οξειδωμένη χλωροφύλλη P_{680}^+ σε χρονικό διάστημα 5-50 μ sec, το οποίο εξαρτάται από το pH [319]. Παρατηρήθηκε ότι σε μεμβράνες Tris-PS II η αναγωγή του P_{680}^+ από την Tyr-Z παρουσία εξωγενών ιόντων Mn^{2+} πραγματοποιείται σε χρονικό διάστημα 5-40 μ sec, το οποίο εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ιόντων Mn^{2+} [320]. Προτείνεται ότι στην προηγούμενη περίπτωση ένα ιόν Mn^{2+} δεσμεύεται σε μία θέση που, πιθανώς, αντιστοιχεί σε θέση δέσμευσης του μαγγανίου στο σύμπλοκο O.E.C. [320]. Σε μεμβράνες PS II, που κατεργάζονται με NH_2OH , η μεταφορά ηλεκτρονίων από την Tyr-Z στο P_{680}^+ απαγορεύεται και η αναγωγή του P_{680}^+ πραγματοποιείται σε 200 μ sec από την αναγμένη ημικινόνη Q_A^- με μία αντίστροφη αντίδραση (back reaction) [301]. Οι διαφορετικές ταχύτητες αναγωγής του P_{680}^+ είναι πολύ πιθανό να είναι αποτέλεσμα διαφόρων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται στην οξειδωτική πλευρά του PS II μετά την κατεργασία με διάφορα μέσα των ανέπαφων μεμβρανών PS II [17, 320].

Στην παρούσα μελέτη έγινε ένας λεπτομερέστερος χαρακτηρισμός των μεμβρανών PS II, που επεξεργάστηκαν με τρισθενή ιόντα λανθανιδίων. Με κινητική φασματοσκοπία EPR και οπτική φασματοσκοπία διαφοράς απορρόφησης εξετάστηκε αν η παρουσία των λανθανιδίων επηρεάζει, εκτός από την ηλεκτρονιακή μεταφορά από το σύμπλοκο του μαγγανίου στη ρίζα Tyr-Z⁺, και την αντίστοιχη μεταφορά από την Tyr-Z στην οξειδωμένη χλωροφύλλη P_{680}^+ . Για την κατανόηση της επίδρασης των λανθανιδίων στην αναγωγή του P_{680}^+ από την Tyr-Z εξετάστηκε η επίδραση της ιοντικής ακτίνας των Ln^{3+} και η επίδραση του pH.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

Μεμβράνες PS II απομονώθηκαν από φρέσκα φύλλα σπανακιού, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.1. Η αντικατάσταση των ιόντων Ca^{2+} από τρισθενή ιόντα Ln^{3+} έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.3. Οι κατεργασμένες με λανθανίδια μεμβράνες PS II διατηρήθηκαν σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα SMN (pH 6). Η μεταφορά των διαφόρων παρασκευασμάτων PS II από pH 6 σε pH 7,5 έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.5 και τα παρασκευάσματα διατηρήθηκαν σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα SHN (pH 7,5). Κάθε άλλη αλλαγή pH έγινε με εκτεταμένη έκπλυση των μεμβρανών PS II με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να απομακρυνθούν αδέσμευτα ή απελευθερωμένα ιόντα Ln^{3+} . Η επεξεργασία με διάλυμα Tris των ανέπαφων και των κατεργασμένων με λανθανίδια μεμβρανών PS II έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται στις παραγράφους 2.2.1.2 και 2.2.1.4, αντίστοιχα. Η επεξεργασία με λανθανίδια των μεμβρανών Tris-PS II έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.3 για τις ανέπαφες μεμβράνες PS II.

Οι μετρήσεις της φασματοσκοπίας EPR σε θερμοκρασία αζώτου και της κινητικής φασματοσκοπίας EPR σε θερμοκρασία δωματίου έγιναν με φασματόμετρο Bruker ER 200D (X-band), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.1. Οι μετρήσεις οπτικής φασματοσκοπίας διαφοράς απορρόφησης έγιναν με τον τρόπο που αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.5.2. Οι πειραματικές φασματοσκοπικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν αναφέρονται λεπτομερώς στα αντίστοιχα σχήματα.

4.3 Αποτελέσματα

Αποδείχθηκε στο Κεφ. 3 ότι τα λανθανίδια αντικαθιστούν εκλεκτικά το ασβέστιο στο PS II και το αποτέλεσμα της αντικατάστασης αυτής είναι η απαγόρευση έκλυσης οξυγόνου [315]. Μεμβράνες PS II κατεργάστηκαν με μία σειρά τρισθενών ιόντων λανθανιδίων (La^{3+} , Dy^{3+} , Pr^{3+} και Lu^{3+}) και μελετήθηκαν με κινητική φασματοσκοπία EPR και οπτική φασματοσκοπία διαφοράς απορρόφησης.

Σε μεμβράνες PS II, που επεξεργάστηκαν με λανθανίδια σε pH 6, παρατηρείται μόνο ένα κλάσμα του σήματος της ρίζας Tyr-Z^+ (σήμα II ϵ), όταν συγκρίνεται με το αντίστοιχο σήμα σε μεμβράνες Tris-PS II (Σχ. 30). Ειδικότερα, μόνο 10-20% του συνόλου των spins της ρίζας Tyr-Z^+ παρατηρούνται παρουσία των ιόντων Dy^{3+} , ενώ 70-80% του συνόλου των spins της ρίζας Tyr-Z^+ παρατηρούνται παρουσία των ιόντων La^{3+} (Σχ. 30). Στα προηγούμενα παρασκευάσματα παρατηρείται το ίδιο κλάσμα spins της ρίζας Tyr-Z^+ είτε χρησιμοποιείται ισομοριακό διάλυμα $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (3 mM) είτε διάλυμα $\{\text{DCBQ} (500 \mu\text{M})\}/\{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} (3\text{mM})\}$ ως ηλεκτρονιοδέκτης.

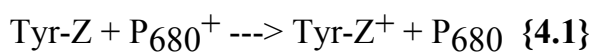
Η διαφορετική συμπεριφορά των δύο ιόντων θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι το ένα είναι παραμαγνητικό (Dy^{3+}) και το άλλο διαμαγνητικό (La^{3+}). Ένα επιπλέον στοιχείο είναι ότι τα δύο ιόντα έχουν διαφορετικές ιοντικές ακτίνες. Η ιοντική ακτίνα του Dy^{3+} (0,908 Å) είναι μικρότερη από την ακτίνα του Ca^{2+} (0,99 Å), ενώ η ιοντική ακτίνα του La^{3+} (1,061 Å) είναι μεγαλύτερη. Για να ερευνηθεί λεπτομερέστερα η προηγούμενη παρατήρηση μελετήθηκαν μεμβράνες PS II με δύο άλλα ιόντα λανθανιδίων (Pr^{3+} και Lu^{3+}), τα οποία παρουσιάζουν διαφορές στις μαγνητικές ιδιότητες και την ιοντική ακτίνα. Το Pr^{3+} είναι παραμαγνητικό και μεγαλύτερο από το Ca^{2+} , ενώ το Lu^{3+} είναι διαμαγνητικό και μικρότερο από το Ca^{2+} . Παρουσία των ιόντων Lu^{3+} παρατηρείται μόνο ένα μικρό κλάσμα (20%) του συνόλου των spins της ρίζας Tyr-Z^+ , όπως και στην περίπτωση των ιόντων Dy^{3+} ,

ενώ παρουσία των ιόντων Pr^{3+} παρατηρείται ένα μεγαλύτερο κλάσμα (53%), όπως στην περίπτωση των ιόντων La^{3+} (Σχ.30).

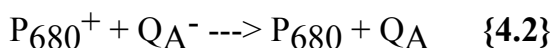
Σχ. 30: Τα κινητικά φάσματα EPR της αναγωγής της ρίζας Tyr-Z^{\cdot} σε δείγματα μεμβρανών PS II που κατεργάστηκαν με διάφορα λανθανίδια σε pH:6. **A:** Tris-PS II, **B:** [Dy]-PS II, **Γ:** [La]-PS II, **Δ:** [Pr]-PS II, **E:** [Lu]-PS II. Ισομοριακό μίγμα 3mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού πεδίου=4 Gs, μικροκυματική ισχύς=20 mW, θερμοκρασία=20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.

Το κοινό χαρακτηριστικό των ιόντων λανθανιδίων, που παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά ($\text{Dy}^{3+}/\text{Lu}^{3+}$ και $\text{La}^{3+}/\text{Pr}^{3+}$), είναι το μέγεθός τους (μικρότερο ή μεγαλύτερο από το μέγεθος του Ca^{2+}) παρά οι μαγνητικές τους ιδιότητες (κάθε ζεύγος περιέχει ένα διαμαγνητικό και ένα παραμαγνητικό ιόν). Το γεγονός ότι στην περίπτωση των ιόντων Ln^{3+} , που είναι μικρότερα από το Ca^{2+} , παρατηρείται μόνο

ένα μικρό κλάσμα του συνόλου των spins της ρίζας Tyr-Z⁺ θα μπορούσε να οφείλεται σε επίδραση των λανθανιδίων στην κινητική της αντίδρασης:



Μία ικανοποιητική μείωση της ταχύτητας της αντίδρασης {4.1} θα μπορούσε να επιτρέψει την αναγωγή του P680⁺ διαμέσου της αντίστροφης αντίδρασης:



σε συναγωνισμό με την αντίδραση αναγωγής του P680⁺ από την τυροσίνη Z.

Αν και η άμεση επίδραση των ιόντων Ln³⁺ στην ηλεκτρονιακή μεταφορά από την τυροσίνη Z στην οξειδωμένη χλωροφύλλη P680⁺ φαίνεται ότι είναι η πιο πιθανή εξήγηση για τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχ. 30, τα ίδια αποτελέσματα θα προέκυπταν αν τα ιόντα Ln³⁺ απαγόρευαν τον πρωτοταγή διαχωρισμό φορτίου (P680⁺ Q_A⁻) ή τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την ημικινόνη Q_A⁻ στην κινόνη Q_B. Όταν το παρασκεύασμα [Dy]-PS II ακτινοβολήθηκε σε 200 K, παρατηρήθηκε μία ρίζα χλωροφύλλης, Chl⁺ (Σχ. 31). Η δημιουργία της ρίζας Chl⁺ ήταν μία αντιστρεπτή πορεία, όπως επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι η ρίζα αναγόταν μετά από επώαση (5 min, 4°C) του δείγματος [Dy]-PS II στο σκοτάδι. Η παρατήρηση αυτή αποδεικνύει ότι τα ιόντα Ln³⁺ δεν επηρεάζουν τον πρωτοταγή διαχωρισμό φορτίου.

Μία πιθανή απαγόρευση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από την ημικινόνη Q_A⁻ στην κινόνη Q_B εξαιτίας της παρουσίας των λανθανιδίων θα είχε, επίσης, ως αποτέλεσμα την απαγόρευση της οξείδωσης της τυροσίνης Z σε ένα πείραμα επαναλαμβανόμενων παλμών με τεχνητό ηλεκτρονιοδέκτη [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻. Για να εξεταστεί η πιθανότητα αυτή τα πειράματα επαναλήφθηκαν σε συνθήκες που επέτρεπαν την οξείδωση της ημικινόνης Q_A⁻ παρουσία DCMU. Έχει αποδειχθεί σε προηγούμενη μελέτη [321] ότι κάτω από ορισμένες συνθήκες η οξείδωση της ημικινόνης Q_A⁻ παρουσία DCMU μπορεί να πραγματοποιηθεί από το [Fe(CN)₆]³⁻.

Σχ. 31: Σύγκριση του σήματος Π_S της ρίζας Tyr-D⁺ στο σκοτάδι και μετά από ακτινοβόληση σε δείγμα μεμβρανών [Dy]-PS II. **A:** Φάσμα EPR μετά από ακτινοβόληση (200 K, 3 min). **B:** Φάσμα EPR στο σκοτάδι, το δείγμα μετά την ακτινοβόληση (200 K, 3 min) επώαστηκε (4°C, 5 min) στο σκοτάδι και κατόπιν ψύχθηκε σε 77 K. **Γ:** Η διαφορά των φασμάτων A και B. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς=3,2 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=77 K. Συγκέντρωση χλωροφύλλης του δείγματος: 2,5 mg/ml.

Όπως φαίνεται στο **Σχ. 32**, όταν η ημικιόνη Q_A^- οξειδώνεται άμεσα από το $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ή πιθανώς διαμέσου του ανόργανου ιόντος σιδήρου (Fe^{2+}), που υπάρχει στα κέντρα αντίδρασης PS II [322], δεν παρατηρείται πλήρης ανάπτυξη του σήματος της ρίζας Tyr-Z⁺ παρουσία των ιόντων Dy³⁺. Από τα αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στο **Σχ. 32**, συμπεραίνεται ότι η επίδραση των ιόντων λανθανιδίων είναι συνέπεια μίας τροποποίησης της οξειδωτικής πλευράς του PS II. Η πιθανότητα ότι ο ελαττωμένος αριθμός spins της ρίζας Tyr-Z⁺ που παρατηρείται παρουσία των λανθανιδίων οφείλεται στη σταθερά χρόνου (time constant) του οργάνου, που

χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της ρίζας αποκλείστηκε, διότι δεν παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού spins της ρίζας Tyr-Z⁺ στα διάφορα παρασκευάσματα PS II, όταν η σταθερά χρόνου του φασματομέτρου μειώθηκε από 1 msec σε 100 μsec.

Σχ. 32: Τα κινητικά φάσματα EPR της αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺ σε δείγματα μεμβρανών PS II που κατεργάστηκαν με λανθανίδια σε pH: 6. **A:** Tris-PS II, **B:** [Dy]-PS II, **Γ:** [La]-PS II. Τα δείγματα περιείχαν 150 μM DCMU, 40 mM MgCl₂ και 3 mM K₃[Fe(CN)₆]. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς=20 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.

Σχ. 33: Τα κινητικά φάσματα EPR της αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺ σε δείγματα μεμβρανών [Ln]-PS II (pH 7,5). **A:** Tris-PS II, **B:** [Dy]-PS II, **Γ:** [La]-PS II. Ισομοριακό μίγμα 3mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5GHz, μικροκυματική ισχύς=20mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20° C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.

Η απαγορευτική επίδραση των ιόντων Dy³⁺, στην ανάπτυξη του σήματος Πf σε pH 6, εξαφανίζεται όταν το pH αυξάνεται σε 7,5 (**Σχ. 33**). Πλήρης ανάπτυξη του σήματος Πf σε pH 7,5 παρατηρείται και στα παρασκευάσματα [La]-PS II (**Σχ. 33**), [Lu]-PS II και [Pr]-PS II (**Σχ. 34**). Η επίδραση του pH στην ανάπτυξη του σήματος της ρίζας Tyr-Z⁺ θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα αλλαγής του φορτίου ορισμένων ομάδων γύρω από την Tyr-Z και/ή το P₆₈₀⁺. Η αλλαγή αυτή θα μπορούσε είτε να επηρεάσει την κινητική της αντίδρασης {4.1} είτε να απομακρύνει τα ιόντα

λανθανιδίων που είναι υπεύθυνα για την επίδραση στην ανάπτυξη του σήματος Πf. Από τις δύο πιθανότητες η δεύτερη αποκλείεται, επειδή δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του σήματος Πf στο παρασκεύασμα [Dy]-PS II, όταν το pH μειώθηκε από 7,5 σε 6 (Σχ. 35). Η επίδραση των λανθανιδίων στη μεταφορά ηλεκτρονίων από την Tyr-Z στο P₆₈₀⁺ παρατηρείται και στο παρασκεύασμα [Dy]^{*}-PS II, το οποίο δεν διατηρεί τις εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa (Σχ. 36). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η επίδραση των λανθανιδίων στην ανάπτυξη του σήματος της ρίζας Tyr-Z⁺ σε pH 6 και 7,5. Η μελέτη της επίδρασης των λανθανιδίων σε διάφορα pH (Σχ. 37a) είχε ως αποτέλεσμα τον προσδιορισμό μίας ομάδας με σταθερά pK_a μεταξύ 6,5 και 7 (Σχ. 37β).

Η επεξεργασία των μεμβρανών [Ln]-PS II με διάλυμα Tris έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός ικανοποιητικού αριθμού ιόντων λανθανιδίων, όπως αποδείχθηκε στο Κεφ. 3 [318]. Στο παρασκεύασμα Tris[Dy]-PS II σε pH 6, το οποίο δεν διατηρεί το σύμπλοκο του μαγγανίου, δεν παρατηρείται καμμία επίδραση στη μεταφορά ηλεκτρονίων από την τυροσίνη Z στην οξειδωμένη χλωροφύλλη P₆₈₀⁺ (Σχ. 35). Επίσης, και σε μεμβράνες Tris-PS II που κατεργάστηκαν με ιόντα Dy³⁺ σε pH 6 δεν παρατηρείται καμμία επίδραση και η ανάπτυξη του σήματος της ρίζας Z⁺ είναι πλήρης (Σχ. 38).

Τα παρασκευάσματα [La]-PS II και [Dy]-PS II σε pH 6 και 7,5 μελετήθηκαν με κινητική φασματοσκοπία διαφοράς απορρόφησης σε δύο μήκη κύματος, 295 και 325 nm. Σε μήκος κύματος 295 nm μπορεί να μελετηθούν κινητικά μόνο συστατικά που λειτουργούν ως ηλεκτρονιοδότες του P₆₈₀⁺ (μαγγάνιο, ιστιδίνη, τυροσίνη Z και D), ενώ σε μήκος κύματος 325 nm μπορεί να παρατηρηθούν οι ηλεκτρονιοδέκτες Q_A⁻ και Q_B⁻ και ένα μικρό κλάσμα ηλεκτρονιοδοτών (μαγγάνιο ή ιστιδίνη αλλά όχι τυροσίνες). Στο παρασκεύασμα [Dy]-PS II το σήμα του δότη (295 nm) και του αποδέκτη (325 nm) ακολουθεί την ίδια κινητική στο αντίστοιχο pH (Σχ. 39 και 40). Η ίδια συμπεριφορά στην κινητική του σήματος δότη και αποδέκτη παρατηρείται και στο παρασκεύασμα [La]-PS II (Σχ. 41 και 42). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η επανοξείδωση του δότη και της ημικινόνης Q_A⁻ πραγματοποιείται

με μία αντίστροφη αντίδραση ή με κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου των παραγόντων $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Η ταχύτητα αναγωγής του δότη σε pH 7,5 στα παρασκευάσματα [Dy]-PS II (**Σχ. 40**) και [La]-PS II (**Σχ. 42**) είναι ίδια με αυτή που παρατηρείται σε παρασκευάσματα Tris-PS II (**Σχ. 44**). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας EPR με τα οποία διαπιστώθηκε ότι παρουσία των λανθανιδίων η αναγωγή του P680^+ σε pH 7,5 πραγματοποιείται από την Tyr-Z. Στο παρασκεύασμα [Dy]-PS II σε pH 6 η επανοξείδωση της ημικινόνης Q_A^- φαίνεται ότι είναι διφασική με μία γρήγορη φάση ίση με 5 msec και μία αργή φάση ίση με 40 msec (**Σχ. 39**). Επειδή η γρήγορη φάση απουσιάζει στα κινητικά σήματα EPR, ο δότης στην περίπτωση αυτή δεν μπορεί να είναι η τυροσίνη Z, αλλά κάποιο άλλο συστατικό, πιθανώς ένα αμινοξύ ιστιδίνης. Το σύμπλοκο του μαγγανίου πρέπει να αποκλειστεί ως πιθανός δότης, επειδή η κινητική του σήματος στην περίπτωση αυτή θα χαρακτηριζόταν από ταχύτερη φάση.

Σχ. 34: Τα κινητικά φάσματα EPR της αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺ σε δείγματα μεμβρανών [Ln]-PS II (pH 7,5). **A:** Tris-PS II, **B:** [Lu]-PS II, **Γ:** [Pr]-PS II. Ισομοριακό μίγμα 3 mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς=20 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.

Σχ. 35: Η επίδραση του pH στην αναγωγή της ρίζας Tyr-Z⁺ σε δείγματα μεμβρανών PS II που κατεργάστηκαν με ιόντα Dy³⁺. **A:** [Dy]-PS II (pH 6), **B:** [Dy]-PS II (pH 7,5), **Γ:** [Dy]-PS II (εκτέθηκε σε pH 7,5 και κατόπιν διαλυτοποιήθηκε σε SMN, pH 6), **Δ:** Tris[Dy]-PS II (pH 6). Ισομοριακό μίγμα 3 mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς=20 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Η επίδραση των λανθανιδίων στο σήμα EPR της ρίζας Tyr-Z⁺

Ln ³⁺	Μαγνητικές ιδιότητες ^(α)	Ιοντική ακτίνα (Å ^ο)	% αριθμός spins της Tyr-Z ⁺ (β)	
			pH 6.0	pH 7.5
La ³⁺	δ	1,061	70	100
Pr ³⁺	π	1,013	53	100
Dy ³⁺	π	0,908	20	100
Lu ³⁺	δ	0,850	20	100

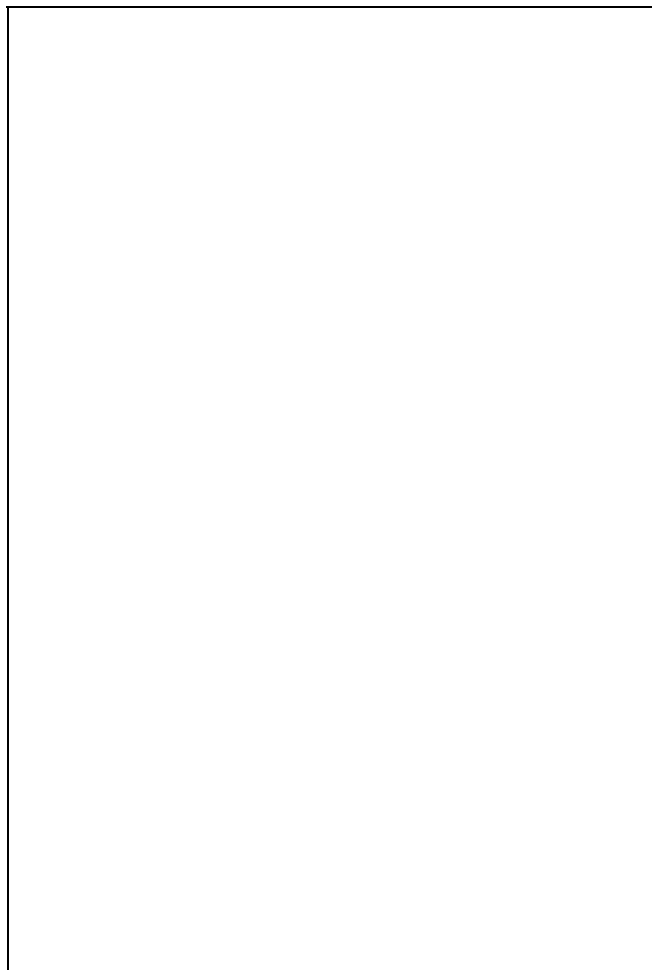
α: δ=διαμαγνητικό, π=παραμαγνητικό. β: Το % ποσοστό spins της ρίζας Tyr-Z⁺ προσδιορίστηκε με σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό στην παρασκευή Tris-PS II.

Σχ. 36: Η επίδραση των λανθανιδίων στην αναγωγή της ρίζας Tyr-Z⁺ σε δείγματα μεμβρανών [Dy]^{*}-PS II. **A:** [Dy]^{*}-PS II (pH 6), **B:** [Dy]^{*}-PS II (pH 7,5), **Γ:** Tris-PS II. Ισομοριακό μίγμα ιόντων 3 mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς=20 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20 °C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.

Σχ. 37(α): Τα κινητικά φάσματα EPR της αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺ σε δείγματα μεμβρανών [Dy]-PS II σε διάφορες τιμές pH. **A:** [Dy]-PS II (pH 5,5), **B:** [Dy]-PS II (pH 6), **Γ:** [Dy]-PS II (pH 6,5), **Δ:** [Dy]-PS II (pH 7), **Ε:** [Dy]-PS II (pH 7,5) και **ΣΤ:** [Dy]-PS II (pH 8). Ισομοριακό μίγμα 3 mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς=20 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.

Σχ. 37(β): Επίδραση του pH στην ανάπτυξη του σήματος EPR της ρίζας Tyr-Z⁺ σε δείγματα μεμβρανών [Dy]-PS II. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών πειραματικών μετρήσεων.

Σχ. 38: Η επίδραση των λανθανιδίων στην αναγωγή της ρίζας Tyr-Z⁺ σε δείγματα μεμβρανών Tris-PS II. **A:** Tris-PS II (pH 6), **B:** Tris-PS II (pH 6) που κατεργάστηκε με ιόντα Dy³⁺. Ισομοριακό μίγμα 3mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς= 20 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου= 4 Gs, θερμοκρασία=20° C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.



Σχ. 39: Τα κινητικά φάσματα φασματοσκοπίας διαφοράς απορρόφησης σε δείγματα μεμβρανών [Dy]-PS II (pH 6). **A:** 325 nm, **B:** 295 nm. Ισομοριακό μίγμα 3 mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 0,2 mg/ml.

Σχ. 40: Τα κινητικά φάσματα φασματοσκοπίας διαφοράς απορρόφησης σε δείγματα μεμβρανών [Dy]-PS II (pH 7,5). **A:** 325 nm, **B:** 295 nm. Ισομοριακό μίγμα 3 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 0.2 mg/ml.

Σχ. 41: Τα κινητικά φάσματα φασματοσκοπίας διαφοράς απορρόφησης σε δείγματα μεμβρανών [La]-PS II (pH 6). **A:** 295 nm, **B:** 325 nm. Ισομοριακό μίγμα 3 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 0,2 mg/ml.

Σχ. 42: Τα κινητικά φάσματα φασματοσκοπίας διαφοράς απορρόφησης σε δείγματα μεμβρανών [La]-PS II (pH 7,5). **A:** 295 nm, **B:** 325 nm. Ισομοριακό μίγμα 3 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 0,2 mg/ml.

Σχ. 43: Τα κινητικά φάσματα φασματοσκοπίας διαφοράς απορρόφησης σε δείγματα μεμβρανών Tris-PS II (pH 6). **A:** 295 nm, **B:** 325 nm. Ισομοριακό μίγμα 3 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 0,2 mg/ml.

Σχ. 44: Τα κινητικά φάσματα φασματοσκοπίας διαφοράς απορρόφησης σε δείγματα μεμβρανών Tris-PS II (pH 7,5). **A:** 295 nm, **B:** 325 nm. Ισομοριακό μίγμα 3 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 0,2 mg/ml.

4.4 Συζήτηση

Αποδείχθηκε, προηγουμένως, [315, Κεφ. 3] ότι τα λανθανίδια μπορούν να αντικαταστήσουν αποτελεσματικά το ασβέστιο στο PS II με ταυτόχρονη απαγόρευση της ικανότητας έκλυσης οξυγόνου. Αν και η κύρια επίδραση των λανθανιδίων είναι η απαγόρευση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο του μαγγανίου στη ρίζα Tyr-Z^+ , η παρούσα μελέτη αποκαλύπτει ότι τα λανθανίδια επηρεάζουν και την οξείδωση της Tyr-Z από την οξειδωμένη χλωροφύλλη P_{680}^+ . Τα πειραματικά αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο αυτό, αποδεικνύουν ότι όταν τα ιόντα Ln^{3+} καταλαμβάνουν τις θέσεις δέσμησης των ιόντων Ca^{2+} , η αναγωγή του P^+_{680} σε pH 6 δεν πραγματοποιείται αποκλειστικά με την αντίδραση {4.1}.

Αν και δε μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι η παρουσία ιόντων, όπως Dy^{3+} και Lu^{3+} , παρεμποδίζει πλήρως την αντίδραση {4.1} σε ένα κλάσμα των

κέντρων PS II, είναι πιθανότερο ότι η παρουσία των τρισθενών ιόντων λανθανιδίων επιβραδύνει δραστικά την ταχύτητα της αντίδρασης {4.1} σε όλα τα κέντρα PS II. Όταν η ταχύτητα αναγωγής του P_{680}^+ από την Tyr-Z επιβραδύνεται ή παρεμποδίζεται, το P_{680}^+ μπορεί να αναχθεί από την ημικινόνη Q_A^- ή άλλους εναλλακτικούς δότες.

Σε ανέπαφες μεμβράνες PS II η αναγωγή του P_{680}^+ από την Tyr-Z είναι πολύ ταχύτερη από την αντίστροφη αντίδραση διαμέσου της ημικιόνης Q_A^- ($t_{1/2}=150-200$ μsec) και συνεπώς η κύρια πορεία αναγωγής του P_{680}^+ είναι η αντίδραση {4.1}. Σε μεμβράνες Tris-PS II η ταχύτητα της αντίδρασης {4.1} επιβραδύνεται, αλλά επειδή είναι ακόμη ταχύτερη από την αντίστροφη αντίδραση {4.2}, η Tyr-Z είναι το κύριο συστατικό που ανάγει το P_{680}^+ . Παρουσία σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων NH_2OH , η αντίδραση {4.1} παρεμποδίζεται πλήρως και η αναγωγή του P_{680}^+ πραγματοποιείται με την αντίστροφη αντίδραση {4.2}.

Επειδή έχει αποδειχθεί ότι η ταχύτητα αναγωγής του P_{680}^+ σε ανέπαφες μεμβράνες PS II εξαρτάται από τις οξειδωτικές καταστάσεις S [17], ενώ σε μεμβράνες Tris-PS II εξαρτάται από το pH [322], δεν είναι απίθανη η επίδραση των τρισθενών ιόντων λανθανιδίων στην ταχύτητα της αντίδρασης {4.1}. Η επίδραση των λανθανιδίων στην αντίδραση {4.1} σε pH 6 θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα του επιπλέον φορτίου, το οποίο δημιουργείται με την αντικατάσταση των ιόντων Ca^{2+} από Ln^{3+} . Η αύξηση του pH από 6 σε 7,5 στα εξεταζόμενα παρασκευάσματα PS II, είναι πιθανό να προκαλεί την αποπρωτονίωση ενός αμινοξέος που μπορεί να δεσμευτεί στο Ln^{3+} ή να ευνοεί τη δέσμευση μίας υδροξυλομάδας, OH^- . Και στις δύο περιπτώσεις θα μπορούσε να εξουδετερωθεί το επιπλέον φορτίο του Ln^{3+} . Αν και το προτεινόμενο αυτό μοντέλο είναι πολύ ελκυστικό, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα να δημιουργούνται αλλαγές διαμόρφωσης στο περιβάλλον των θέσεων δέσμευσης των ιόντων Ca^{2+} με τη δέσμευση των ιόντων Ln^{3+} . Οι αλλαγές αυτές διαμόρφωσης θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ταχύτητα αναγωγής του P_{680}^+ από την Tyr-Z. Ο διαφορετικός βαθμός επίδρασης των λανθανιδίων στην αντίδραση {4.1} μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα μικρότερα ιόντα (Dy^{3+} , Lu^{3+})

επηρεάζουν σε μεγαλύτερη έκταση τη διαμόρφωση του συμπλόκου O.E.C. συγκριτικά με τα μεγαλύτερα ιόντα (Pr^{3+} , La^{3+}).

Οι διαφορές της ταχύτητας αναγωγής της οξειδωμένης χλωροφύλλης P680^+ που παρατηρούνται σε δείγματα PS II, που κατεργάζονται με διάφορα μέσα, έχουν ερμηνευτεί ως αποτέλεσμα ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στην οξειδωτική πλευρά του PS II [17, 320]. Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι σε μεμβράνες PS II παρεμποδίζεται η φωτοοξείδωση της Tyr-Z απουσία του ασβεστίου [92]. Επειδή η παρεμπόδιση παρατηρείται μετά το σχηματισμό της κατάστασης S_3 , θεωρείται ότι οφείλεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, που δημιουργούνται κατά το σχηματισμό της κατάστασης S_3 . Είναι πολύ πιθανό, με τη δέσμευση των τρισθενών ιόντων λανθανιδίων, να δημιουργούνται ανάλογες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η λειτουργία του συμπλόκου O.E.C.

Επειδή με οπτική φασματοσκοπία διαπιστώθηκε η συμμετοχή ενός εναλλακτικού δότη στην αναγωγή του P680^+ σε pH 6 και με μελέτη της επίδρασης του pH στη δράση των λανθανιδίων προσδιορίστηκε μία ομάδα με σταθερά pK_a 6,5-7, είναι πιθανό ένα αμινοξύ ιστιδίνης να περιλαμβάνεται στη θέση δέσμευσης των ιόντων $\text{Ca}^{3+}/\text{Ln}^{3+}$. Μία εναλλακτική πιθανότητα είναι το συγκεκριμένο αμινοξύ ιστιδίνης να αλληλεπιδρά μαγνητικά με την τυροσίνη Z της πρωτεΐνης D1 [323, 324]. Οι δομικές αλλαγές που, πιθανώς, δημιουργούνται με τη δέσμευση των λανθανιδίων, μπορεί να τροποποιούν την αλληλεπίδραση μεταξύ της ιστιδίνης και της τυροσίνης Z, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες της τυροσίνης.

Επειδή παρατηρήθηκε πλήρης ανάπτυξη του σήματος της ρίζας Tyr-Z⁺ σε μεμβράνες [Ln]-PS II που κατεργάστηκαν με διάλυμα Tris και σε μεμβράνες Tris-PS II που κατεργάστηκαν με λανθανίδια, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συμπλόκου του μαγγανίου και του επιπλέον θετικού φορτίου του Dy^{3+} να επηρεάζουν την δράση των λανθανιδίων στην οξείδωση της Tyr-Z από το P680^+ .

Τα ιόντα Ca^{2+} θεωρούνται ως απαραίτητος παράγοντας για τη δημιουργία των οξειδωτικών καταστάσεων S και την αναγωγή της οξειδωμένης χλωροφύλλης P680^+ από την τυροσίνη Z [92, 200, 203, 214, 222]. Η εκλεκτική αντικατάσταση των ιόντων Ca^{2+} από ιόντα Ln^{3+} αποδεικνύει ότι οι θέσεις δέσμησης των ιόντων $\text{Ca}^{2+}/\text{Ln}^{3+}$ επηρεάζουν και την ανάπτυξη των οξειδωτικών καταστάσεων S και την αναγωγή του P680^+ από την τυροσίνη Z.

5. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΞΩΓΕΝΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΔΟΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ Ζ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΞΩΤΕΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

5.1 Εισαγωγή

Η οξείδωση του νερού στο PS II πραγματοποιείται από το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (O.E.C.), το οποίο περιέχει ένα πολυπυρηνικό σύμπλοκο μαγγανίου [262], ιόντα Ca^{2+} [48] και Cl^- [49] και τις τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες 17, 23 και 33 kDa. Κατά τη λειτουργία του κύκλου των οξειδωτικών καταστάσεων S, τα θετικά φορτία που παράγονται με φωτοοξείδωση της ειδικής χλωροφύλλης P₆₈₀ μεταφέρονται στο σύμπλοκο του μαγγανίου, διαμέσου της οξειδοαναγωγικά ενεργής τυροσίνης Z [15], και τελικά στο νερό. Η οξειδωμένη τυροσίνη Z, Tyr-Z⁺, μπορεί να ταυτοποιηθεί από το χαρακτηριστικό της σήμα EPR. Το σήμα EPR (g=2,0045) της ρίζας Tyr-Z⁺ σε ανέπαφες και κατεργασμένες με διάλυμα Tris μεμβράνες PS II έχει την ίδια μορφή και ονομάζεται σήμα Π_{vf} και σήμα Π_f αντίστοιχα [19]. Έχει παρατηρηθεί ότι σε ανέπαφες μεμβράνες PS II, ο κορεσμός της ρίζας Tyr-Z⁺ επιτυγχάνεται σε υψηλή μικροκυματική ισχύ εξαιτίας της μαγνητικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του συμπλόκου μαγγανίου και της ρίζας Tyr-Z⁺ [313].

Όταν οι μεμβράνες PS II περιέχουν τις εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa, εξωγενείς ηλεκτρονιοδότες δεν μπορούν να αντιδράσουν με το σύμπλοκο του μαγγανίου [325]. Αντιδρούν, όμως, όταν απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες 17 και 23 kDa με έκπλυση με διάλυμα 2 M NaCl [325]. Μετά την απομάκρυνση του συμπλόκου του μαγγανίου και των τριών εξωτερικών πρωτεϊνών, εξωγενείς ηλεκτρονιοδότες μπορούν να αντιδράσουν με τη ρίζα Tyr-Z⁺ [325]. Η αναγωγή της ρίζας Tyr-Z⁺ ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξης και η ταχύτητα αναγωγής εξαρτάται από τη χημική φύση του δότη [326]. Αρνητικά φορτισμένοι δότες (Γ^- , $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) ανάγουν τη ρίζα Tyr-Z⁺ με μικρότερη ταχύτητα, συγκριτικά με ουδέτερους δότες (βενζιδίνη, υδροκινόνη, διφαινυλκαρβαζίδιο). Η δραστηριότητα των ουδέτερων αναγωγικών είναι ανάλογη με τη λιποφιλική τους φύση [326].

Διαπιστώθηκε ότι σε μεμβράνες Tris-PS II, δισθενή ιόντα μαγγανίου ανάγουν τη ρίζα Tyr-Z⁺ [327]. Η ταχύτητα αναγωγής εξαρτάται από το pH και είναι μεγαλύτερη σε pH 7,5. Επειδή η κινητική αναγωγής της

ρίζας Tyr-Z⁺ σε pH 7,5 παρουσία ιόντων Mn²⁺ είναι διφασική με μία γρήγορη φάση ίση με 400 μsec, προτάθηκε ότι ένα ιόν Mn²⁺ δεσμεύεται κοντά στην τυροσίνη Z σε θέση, που αντιστοιχεί σε μία από τις λειτουργικές θέσεις δέσμευσης του μαγγανίου [327]. Η μελέτη της επίδρασης του pH στη δέσμευση του Mn²⁺ είχε ως αποτέλεσμα τον προσδιορισμό ενός πρωτονιωμένου υποκαταστάτη με σταθερά pK_a μεταξύ 6 και 7,5 [327].

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η κινητική συμπεριφορά της ρίζας Tyr-Z⁺ παρουσία εξωγενών αναγωγικών (βενζιδίνης και δισθενών ιόντων μαγγανίου) σε μεμβράνες PS II που κατεργάστηκαν με τρισθενή ιόντα λανθανιδίων και εξετάστηκε αν η δράση των αναγωγικών επηρεάζεται από την παρουσία ή μη του συμπλόκου του μαγγανίου και των εξωτερικών πρωτεϊνών 17, 23 και 33 kDa. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της μικροκυματικής ισχύος στην ένταση του σήματος Π_f της ρίζας Tyr-Z⁺ παρουσία των λανθανιδίων.

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

Μεμβράνες PS II απομονώθηκαν από φρέσκα φύλλα σπανακιού, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.1. Η αντικατάσταση των ιόντων Ca²⁺ από ιόντα Ln³⁺ έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο, που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.3. Η μεταφορά των διαφόρων παρασκευασμάτων PS II από pH 6 σε 7,5 έγινε με τον τρόπο που αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.1.5. Η κατεργασία με διάλυμα Tris των ανέπαφων μεμβρανών PS II και των μεμβρανών [Ln]-PS II έγινε με έκθεση των μεμβρανών σε διάλυμα Tris (0,8 M, pH 8,2), όπως περιγράφεται αντίστοιχα στις παραγράφους 2.2.1.2 και 2.2.1.4. Όλα τα παρασκευάσματα PS II, που μελετήθηκαν, ήταν διατηρημένα σε pH 7,5.

Η ένταση και ο χρόνος ημιζωής (t_{1/2}) του σήματος EPR της ρίζας Tyr-Z⁺ (σήμα Π_f) προσδιορίστηκαν με κινητική φασματοσκοπία EPR σε θερμοκρασία δωματίου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.1. Οι πειραματικές συνθήκες EPR, που εφαρμόστηκαν, αναφέρονται λεπτομερώς στα αντίστοιχα Σχήματα.

5.3 Αποτελέσματα

Αποδείχθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια, ότι παρουσία των λανθανιδίων απαγορεύεται η ηλεκτρονιακή μεταφορά από το σύμπλοκο του μαγγανίου στη ρίζα Tyr-Z⁺ [315] και επηρεάζεται η ηλεκτρονιακή μεταφορά από την τυροσίνη Z στην οξειδωμένη χλωροφύλλη P₆₈₀⁺ [328]. Η τελευταία επίδραση εξαρτάται από την ιοντική ακτίνα των ιόντων Ln³⁺ και το pH του συστήματος. Ένα αμινοξύ, πιθανώς μία ιστιδίνη, μπορεί να συμμετέχει στην αναγωγή της οξειδωμένης χλωροφύλλης P₆₈₀⁺ σε pH 6 [328].

Η επίδραση της μικροκυματικής ισχύος στην ένταση του σήματος Π_f παρουσία των ιόντων Ln³⁺, μελετήθηκε με φασματοσκοπία EPR. Όταν τα ιόντα Dy³⁺ καταλαμβάνουν τις θέσεις δέσμευσης των ιόντων Ca²⁺, παρατηρείται ισχυρή μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ τη ρίζας Tyr-Z⁺ και των παραμαγνητικών ιόντων Dy³⁺ (Σχ. 45). Αντίθετα, παρουσία των ιόντων La³⁺ δεν παρατηρείται καμμία επίδραση στην ένταση του σήματος Π_f (Σχ. 45).

Σχ. 45: Επίδραση της μικροκυματικής ισχύος στο κινητικό σήμα EPR της ρίζας Tyr-Z⁺ σε δείγματα μεμβρανών [Ln]-PS II (pH 7,5). **A:** [Dy]-PS II (μικροκυματική ισχύς=20 mW). **B:** [Dy]-PS II (μικροκυματική ισχύς=126 mW). **Γ:** [La]-PS II (μικροκυματική ισχύς=20 mW). **Δ:** [La]-PS II (μικροκυματική ισχύς=126 mW). Ισομοριακό μίγμα 1 mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 200 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική ισχύς=9,5 GHz, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.

Σχ. 46: Επίδραση της μικροκυματικής ισχύος στην ένταση του σήματος EPR της ρίζας Tyr-Z⁺ (σήμα Πf) σε μεμβράνες PS II και Tris-PS II (pH 7,5) παρουσία ιόντων Ln³⁺. Ισομοριακό μίγμα 3 mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20°C. Η ένταση του σήματος Πf σε κάθε τιμή μικροκυματικής ισχύος αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 250 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών πειραματικών μετρήσεων. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων Tris-PS II και Tris[La]-PS II: 2 mg/ml Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων [Dy]-PS II, [La]-PS II και Tris[Dy]-PS II: 2,3 mg/ml

Όπως φαίνεται στο **Σχ. 46**, όταν τα ιόντα Dy³⁺ είναι παρόντα στα κέντρα αντίδρασης PS II, ο κορεσμός του σήματος Πf παρατηρείται σε πολύ υψηλή μικροκυματική ισχύ (P>158 mW). Η κατεργασία μεμβρανών [Dy]-PS II με διάλυμα Tris έχει σαν αποτέλεσμα όχι μόνο την καταστροφή του συμπλόκου του μαγγανίου και την απομάκρυνση όλων των εξωτερικών πρωτεϊνών, αλλά και την ταυτόχρονη απομάκρυνση του μεγαλύτερου αριθμού των δεσμευμένων ιόντων Dy³⁺ [315, Κεφ. 3]. Στο παρασκεύασμα Tris[Dy]-PS II προσδιορίστηκε με

φασματοσκοπία EPR η παρουσία 1-3 ιόντων Dy^{3+} ανά κέντρο αντίδρασης PS II [318, Κεφ. 3]. Στο παρασκευάσμα αυτό ο κορεσμός του σήματος II_F παρατηρείται σε σχετικά υψηλή μικροκυματική ισχύ ($P=100$ mW) (Σχ. 46). Αντίθετα με τα ιόντα Dy^{3+} , τα διαμαγνητικά ιόντα La^{3+} που καταλαμβάνουν τις θέσεις δέσμησης των ιόντων Ca^{2+} δεν επηρεάζουν τον κορεσμό του σήματος II_F . Στα παρασκευάσματα [La]-PS II και Tris[La]-PS II ο κορεσμός του σήματος II_F πραγματοποιείται σε χαμηλή μικροκυματική ισχύ ($P=32$ mW), όπως και σε παρασκευάσματα Tris-PS II (Σχ. 46).

Σχ. 47: Επίδραση της βενζιδίνης (BZ) στην ταχύτητα αναγωγής της ρίζας $Tyr-Z^+$ σε δείγματα μεμβρανών Tris-PS II και [Dy]-PS II (pH 7,5). **A:** Tris-PS II (0 μ M BZ, $t_{1/2}=50$ msec), **B:** Tris-PS II (50 μ M BZ, $t_{1/2}=5$ msec), **Γ:** [Dy]-PS II (0 μ M BZ, $t_{1/2}=62$ msec), **Δ:** [Dy]-PS II (50 μ M BZ, $t_{1/2}=7$ msec). Ισομοριακό μίγμα 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 250 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική ισχύ=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς=20 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου 100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.

Όταν αιώρημα μεμβρανών Tris-PS II (pH 7,5) ακτινοβοληθεί με επαναλαμβανόμενους κορεσμένους παλμούς μικρής διάρκειας, το κινητικό σήμα EPR της $Tyr-Z^+$ αντιπροσωπεύει τη μέγιστη συγκέντρωση spins της ρίζας που μπορεί να παρατηρηθεί. Στην περίπτωση αυτή, το σήμα της ρίζας $Tyr-Z^+$ έχει ένα χαρακτηριστικό χρόνο ημιζωής ($t_{1/2}$) ίσο με 50 msec

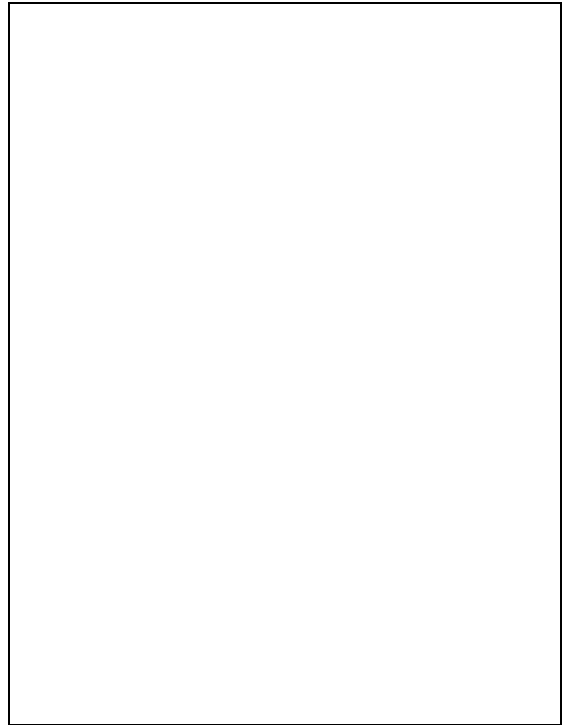
(Σχ. 47A). Η προσθήκη 50 μM βενζιδίνης σε αιώρημα μεμβρανών Tris-PS II (pH 7,5) μειώνει το χρόνο ημιζωής του σήματος ($t_{1/2}=5$ msec) αλλά δεν επηρεάζει τον αριθμό των παρατηρούμενων spins της ρίζας Tyr-Z⁺ (Σχ. 47B). Η προσθήκη της ίδιας ποσότητας βενζιδίνης σε αιώρημα μεμβρανών [Dy]-PS II (pH 7,5), οι οποίες διατηρούν τις εξωτερικές πρωτεΐνες και τα τέσσερα ιόντα μαγγανίου, επηρεάζει την ταχύτητα αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺ με ανάλογο τρόπο, όπως και στην περίπτωση των μεμβρανών Tris-PS II (Σχ. 47A).

Σχ. 48: Η επίδραση των ιόντων Mn²⁺ στην ταχύτητα αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺ σε δείγματα μεμβρανών Tris-PS II (pH 7,5). **A:** Tris-PS II (0 μM MnCl₂, $t_{1/2}=47$ msec) **B:** Tris-PS II (25 μM MnCl₂, $t_{1/2}=4$ msec). Διάλυμα 1 mM [Fe(CN)₆]³⁻ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 250 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς=20 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.

Η επίδραση εξωγενών ηλεκτρονιοδοτών στην ταχύτητα αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺ εξετάστηκε με την προσθήκη ιόντων Mn²⁺ (MnCl₂) σε αιωρήματα μεμβρανών Tris-PS II και [Dy]-PS II σε pH 7,5. Στα δύο αυτά είδη μεμβρανών PS II η προσθήκη ιόντων Mn²⁺ επηρεάζει την ταχύτητα αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺ με διαφορετικό τρόπο. Σε μεμβράνες Tris-PS II η προσθήκη ιόντων Mn²⁺ μέχρι 25 μM μειώνει το χρόνο ημιζωής της ρίζας Tyr-Z⁺ χωρίς αλλαγή της έντασης του σήματος Π_f (Σχ. 48B). Η προσθήκη υψηλότερων συγκεντρώσεων Mn²⁺ επιταχύνει πολύ περισσότερο την αναγωγή της ρίζας Tyr-Z⁺ και μειώνει τον αριθμό των ανιχνεύσιμων spins στις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται. Η μείωση του σήματος της ρίζας Tyr-Z⁺ παρουσία των ιόντων

Mn^{2+} πραγματοποιείται σε μικρότερο χρόνο από 1 msec που χρησιμοποιείται ως σταθερά χρόνου του οργάνου για την ανίχνευση του σήματος. Η απώλεια του σήματος είναι πλήρης με προσθήκη 50 μM Mn^{2+} . Αντίθετα, σε μεμβράνες [Dy]-PS II η προσθήκη ιόντων Mn^{2+} μέχρι 100 μM έχει ασήμαντη επίδραση στην ταχύτητα αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺ (Σχ. 49B).

Σχ. 49: Η επίδραση των ιόντων Mn^{2+} στην ταχύτητα αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺ σε δείγματα μεμβρανών [Dy]-PS II (pH 7,5). **A:** [Dy]-PS II (0 μM $MnCl_2$, $t_{1/2}=60$ msec). **B:** [Dy]-PS II (100 μM $MnCl_2$, $t_{1/2}=54$ msec). Διάλυμα ιόντων 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρ/δέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 250 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, μικροκυματική ισχύς=126 mW, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης των δειγμάτων: 2 mg/ml.



Δυστυχώς, η προσθήκη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων $MnCl_2$ δεν επιτρέπει την καταγραφή του σήματος H_f εξαιτίας της παρουσίας του ισχυρού σήματος EPR (εξαπλή κορυφή) των ιόντων Mn^{2+} .

Σε μεμβράνες Tris [Dy]-PS II η επίδραση των ιόντων Mn^{2+} στην ταχύτητα αναγωγής της ρίζας Tyr-Z⁺ είναι διαφορετική συγκριτικά με αυτή που παρατηρείται σε μεμβράνες Tris-PS II και [Dy]-PS II. Η προσθήκη 100 μM $MnCl_2$ σε μεμβράνες Tris[Dy]-PS II επιταχύνει την αναγωγή της ρίζας Tyr-Z⁺, αλλά η ανίχνευση του σήματος H_f είναι δυνατή έστω και σε περιορισμένο βαθμό (Σχ. 50B).

Σχ. 50: Η επίδραση των ιόντων Mn^{2+} στην ταχύτητα αναγωγής της ρίζας $Tyr-Z^+$ σε δείγματα μεμβρανών Tris[Dy]-PS II (pH 7,5). **A:** Tris-[Dy]-PS II (0 μM $MnCl_2$), **B:** Tris-[Dy]-PS II (100 μM $MnCl_2$). Διάλυμα 1mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 250 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, μικροκυματική ισχύς=126 mW, θερμοκρασία=20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης: 2 mg/ml.

Σε μεμβράνες Tris-PS II, οι οποίες επώαστηκαν με 0,5 mM Dy^{3+} για μία ώρα και αμέσως μετά μελετήθηκαν με φασματοσκοπία EPR, η ταχύτητα αναγωγής της ρίζας $Tyr-Z^+$ παρουσιάζει ανάλογη συμπεριφορά με αυτή που παρατηρείται σε μεμβράνες Tris[Dy]-PS II. Η προσθήκη 100 μM $MnCl_2$ επιταχύνει την αναγωγή της ρίζας $Tyr-Z^+$ και μειώνει τον αριθμό των ανιχνεύσιμων spins (**Σχ. 51Γ**). Στο παρασκεύασμα αυτό μπορεί να παρατηρηθεί, επίσης, η μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ της ρίζας $Tyr-Z^+$ και των παραμαγνητικών ιόντων Dy^{3+} (**Σχ. 51B**).

Σχ. 51: Η επίδραση των ιόντων Mn^{2+} στην ταχύτητα αναγωγής της ρίζας $Tyr-Z^+$ σε δείγματα μεμβρανών Tris-PS II (pH 7,5) που επώστηκαν με 0,5 mM Dy^{3+} για μία ώρα πριν την καταγραφή του σήματος EPR. A: Tris-PS II (0 μM $MnCl_2$, μικροκυματική ισχύς=20 mW). B: Tris-PS II (0 μM $MnCl_2$, μικροκυματική ισχύς=126 mW). Γ: Tris-PS II (100 μM $MnCl_2$, μικροκυματική ισχύς=126 mW). Διάλυμα 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$ χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρονιοδέκτης. Κάθε σήμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 250 επαναλαμβανόμενων παλμών με ταχύτητα 0,3 Hz. Φασματοσκοπικές συνθήκες EPR: μικροκυματική συχνότητα=9,5 GHz, συχνότητα ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=100 kHz, πλάτος ρυθμιστικού μαγνητικού πεδίου=4 Gs, θερμοκρασία=20°C. Συγκέντρωση χλωροφύλλης: 2 mg/ml.

5.4 Συζήτηση

Αν και τα παρασκευάσματα [La]-PS II σε pH 7,5 διατηρούν τις εξωτερικές πρωτεΐνες (17, 23 και 33 kDa) και τα τέσσερα ιόντα μαγγανίου, η μικροκυματική ισχύς κορεσμού της ρίζας $Tyr-Z^+$ είναι όμοια, με αυτή που παρατηρείται σε παρασκευάσματα Tris-PS II (**Σχ. 46**). Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι σε παρασκευάσματα [La]-PS II η ρίζα $Tyr-Z^+$ δεν αλληλεπιδρά μαγνητικά με το σύμπλοκο του μαγγανίου. Αποδείχθηκε στο Κεφ. 3 ότι παρουσία των ιόντων Ln^{3+} απαγορεύεται η μετάπτωση $S_1 \rightarrow S_2$. Συνεπώς, η απουσία μαγνητικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του συμπλόκου του μαγγανίου και της ρίζας $Tyr-Z^+$ σημαίνει ότι είτε η κανονική κατάσταση S_1 του συμπλόκου του μαγγανίου είναι διαμαγνητική είτε η δέσμευση των

ιόντων Ln^{3+} τροποποιεί την κατάσταση S_1 και την καθιστά διαμαγνητική, έτσι ώστε να μην παρατηρείται μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ του συμπλόκου του μαγγανίου και της ρίζας Tyr-Z^+ . Η ισχυρή μαγνητική αλληλεπίδραση που παρατηρείται μεταξύ των ιόντων Dy^{3+} και της ρίζας Tyr-Z^+ οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κάποια θέση δέσμησης $\text{Dy}^{3+}/\text{Ca}^{2+}$ βρίσκεται κοντά στην τυροσίνη Z.

Η επίδραση της βενζιδίνης, που παρατηρείται στην ταχύτητα αναγωγής της ρίζας Tyr-Z^+ στο παρασκεύασμα $[\text{Dy}]\text{-PS II}$, το οποίο διατηρεί τις εξωτερικές πρωτεΐνες και το σύμπλοκο του μαγγανίου, σημαίνει ότι είτε οι εξωτερικές πρωτεΐνες δεν προστατεύουν την Tyr-Z^+ από εξωγενή αναγωγικά είτε η δέσμηση των ιόντων Ln^{3+} στις θέσεις των ιόντων Ca^{2+} τροποποιεί το περιβάλλον της τυροσίνης Z, με αποτέλεσμα εξωγενή αναγωγικά να αντιδρούν με την ρίζα Tyr-Z^+ . Η πιθανότητα ότι οι εξωτερικές πρωτεΐνες 17 και 23 kDa δεν επανασυνδέονται στις μεμβράνες $[\text{Dy}]\text{-PS II}$ στην φυσιολογική τους θέση αποκλείστηκε, διότι παρατηρήθηκε ότι μετά την απομάκρυνση των ιόντων Dy^{3+} η προσθήκη εξωγενούς ασβεστίου έχει ως αποτέλεσμα την επαναφορά της ικανότητας έκλυσης οξυγόνου [315, Κεφ. 3].

Το Mn^{2+} αποτελεί τη σταθερή και διαλυτή μορφή του μαγγανίου σε κανονική τιμή οξειδοαναγωγικού δυναμικού και είναι αποδεκτό ότι συμμετέχει στη διαδικασία φωτοενεργοποίησης του συμπλόκου O.E.C. [45, 329]. Οι Tamura και Cheniae [330] έχουν προτείνει ότι η φωτοοξείδωση του Mn^{2+} από τη ρίζα Tyr-Z^+ αποτελεί ένα αρχικό αναγκαίο στάδιο της διαδικασίας της φωτοενεργοποίησης.

Εχει προταθεί σε προηγούμενη μελέτη [327], ότι σε μεμβράνες Tris-PS II η αναγωγή της ρίζας Tyr-Z^+ παρουσία ιόντων Mn^{2+} πραγματοποιείται από ένα ιόν Mn^{2+} που καταλαμβάνει μία από τις τέσσερις θέσεις μαγγανίου του λειτουργικού συμπλόκου O.E.C. Η διαφορετική κινητική αναγωγής της ρίζας Tyr-Z^+ , που παρατηρείται παρουσία ιόντων Mn^{2+} σε παρασκευάσματα Tris-PS II και $[\text{Dy}]\text{-PS II}$ ενισχύει την προηγούμενη πρόταση. Σε παρασκευάσματα Tris-PS II , τα οποία δεν περιέχουν τα τέσσερα ιόντα μαγγανίου, ένα τουλάχιστον ιόν Mn^{2+} μπορεί να καταλαμβάνει μία θέση δέσμησης μαγγανίου στο σύμπλοκο O.E.C. και να επιταχύνει την αναγωγή της ρίζας Tyr-Z^+ . Αντίθετα, σε παρασκευάσματα $[\text{Dy}]\text{-PS II}$, τα οποία περιέχουν το σύμπλοκο μαγγανίου, το εξωγενές Mn^{2+} δεν μπορεί να δεσμευτεί στην λειτουργική θέση του συμπλόκου του μαγγανίου και να επιταχύνει την αναγωγή της ρίζας Tyr-Z^+ .

Η ταχύτητα της ηλεκτρονιακής μεταφοράς σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα είναι ευαίσθητη σε μεγάλο αριθμό παραγόντων, ένας από τους οποίους είναι η κατανομή ηλεκτρικών φορτίων κοντά στα αντιδρώντα. Η ύπαρξη ηλεκτρικών φορτίων επηρεάζει την ταχύτητα μεταφοράς ηλεκτρονίων μετατοπίζοντας τα ενεργειακά επίπεδα των αντιδρώντων και των μεταβατικών καταστάσεων. Στις περισσότερες αντιδράσεις η παρουσία

θετικών φορτίων κοντά στον ηλεκτρονιοδότη επιβραδύνει την ταχύτητα της αντίδρασης. Τα παρασκευάσματα Tris[Dy]-PS II δεν περιέχουν τις τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες και τα ιόντα μαγγανίου, αλλά περιέχουν 1-3 ιόντα Dy^{3+} /PS II [315, Κεφ. 3]. Η παρουσία των ιόντων Dy^{3+} στις παρασκευές Tris[Dy]-PS II είναι αναμενόμενο να επιβραδύνει την ταχύτητα αναγωγής της ρίζας $Tyr-Z^+$ από το Mn^{2+} . Η επίδραση των ιόντων Mn^{2+} στην ταχύτητα αναγωγής της ρίζας $Tyr-Z^+$ σε παρασκευάσματα Tris-PS II τα οποία επωάστηκαν με 0,5 mM Dy^{3+} , είναι ίδια με αυτή που παρατηρείται σε παρασκευάσματα Tris[Dy]-PS II. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την πρόταση ότι ένα τουλάχιστον ιόν Mn^{2+} δεσμεύεται σε μία θέση δέσμευσης μαγγανίου στο σύμπλοκο O.E.C. και ανάγει την ρίζα $Tyr-Z^+$. Και στην περίπτωση αυτή, η ταχύτητα αναγωγής επηρεάζεται από το επιπλέον θετικό φορτίο του Dy^{3+} . Επίσης, η διατήρηση της μαγνητικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των ιόντων Dy^{3+} και της ρίζας $Tyr-Z^+$ δηλώνει ότι κάποια θέση δέσμευσης των ιόντων Dy^{3+}/Ca^{2+} υπάρχει κοντά στην τυροσίνη Z.

Η μελέτη της επίδρασης των εξωγενών αναγωγικών σε μεμβράνες PS II και Tris-PS II που επεξεργάστηκαν με λανθανίδια οδήγησε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- 1) Παρουσία των λανθανιδίων οι εξωτερικές πρωτεΐνες δεν προστατεύουν την ρίζα $Tyr-Z^+$ από την επίδραση εξωγενών αναγωγικών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι είτε οι εξωτερικές πρωτεΐνες δεν προστατεύουν την $Tyr-Z^+$ σε ανέπαφα ένζυμα είτε η παρουσία του ασβεστίου είναι απαραίτητη για τη δομική ακεραιότητα του περιβάλλοντος της τυροσίνης Z.
- 2) Απουσία του συμπλόκου του μαγγανίου, η προσθήκη ιόντων Mn^{2+} έχει ως αποτέλεσμα η ρίζα $Tyr-Z^+$ να ανάγεται από ένα τουλάχιστον ιόν Mn^{2+} , που δεσμεύεται σε μία θέση δέσμευσης μαγγανίου στο σύμπλοκο O.E.C. Η ταχύτητα αναγωγής επηρεάζεται από το επιπλέον θετικό φορτίο του Ln^{3+} , που δεσμεύεται σε μία θέση ασβεστίου κοντά στην τυροσίνη Z.

Η μελέτη της επίδρασης της μικροκυματικής ισχύος στην ένταση του σήματος H_f της ρίζας $Tyr-Z^+$ οδήγησε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- 1) Η οξειδωτική κατάσταση S_1 του συμπλόκου του μαγγανίου είτε είναι διαμαγνητική είτε η παρουσία του ασβεστίου επηρεάζει τις μαγνητικές ιδιότητες της κατάστασης S_1 με αποτέλεσμα αυτές να τροποποιούνται με τη δέσμευση των ιόντων Ln^{3+} στις θέσεις των ιόντων Ca^{2+} .
- 2) Η ισχυρή μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ της ρίζας $Tyr-Z^+$ και των ιόντων Dy^{3+} σημαίνει ότι κάποια θέση δέσμευσης των ιόντων Ca^{2+} βρίσκεται κοντά στην τυροσίνη Z.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα πειραματικά αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία αποδεικνύουν, ότι η χρήση των τρισθενών ιόντων λανθανιδίων (Ln^{3+}) αποτελεί κατάλληλη προσέγγιση για την κατανόηση του δομικού και λειτουργικού ρόλου των ιόντων Ca^{2+} στο PS II. Η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμαγνητικών και διαμαγνητικών ιόντων Ln^{3+} στις καταλυτικές και δομικές ιδιότητες του PS II έδωσε νέες πληροφορίες για τη συμμετοχή του ασβεστίου στη φωτοσυνθετική πορεία και τον εντοπισμό των θέσεων δέσμευσης των ιόντων Ca^{2+} , σε σχέση με άλλα οξειδοαναγωγικά συστατικά της οξειδωτικής πλευράς του PS II.

Τα κυριότερα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας είναι τα ακόλουθα:

- A. Τα τρισθενή ιόντα λανθανιδίων δεσμεύονται πολύ ισχυρά στις θέσεις δέσμευσης των ιόντων Ca^{2+} στο PS II χωρίς να καταστρέφουν το σύμπλοκο του μαγγανίου.
- B. Οι μεμβράνες PS II, στις οποίες τα ιόντα ασβεστίου των κέντρων αντίδρασης αντικαθίστανται από τρισθενή ιόντα λανθανιδίων, δεν παρουσιάζουν ενεργότητα O_2 . Η απομάκρυνση των λανθανιδίων και η προσθήκη εξωγενούς ασβεστίου επαναδραστηριοποιεί την έκλυση οξυγόνου.
- Γ. Τα ιόντα Ca^{2+} είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία των οξειδωτικών καταστάσεων S. Η παρουσία των λανθανιδίων απαγορεύει την ηλεκτρονιακή μεταφορά από το σύμπλοκο του μαγγανίου στη ρίζα Tyr-Z⁺. Σε μεμβράνες PS II που κατεργάζονται με λανθανίδια δεν παράγεται το σήμα EPR multiline, αλλά οξειδώνεται ένα μόριο χλωροφύλλης με ακτινοβολία σε 200 K. Η απομάκρυνση των λανθανιδίων και η προσθήκη εξωγενούς ασβεστίου επαναφέρει τη λειτουργία του συμπλόκου του μαγγανίου, όπως αποδεικνύεται από το σχηματισμό του σήματος multiline της οξειδωτικής κατάστασης S₂.
- Δ. Το ασβέστιο είναι απαραίτητο για την αναγωγή της οξειδωμένης χλωροφύλλης P₆₈₀⁺. Η παρουσία των λανθανιδίων επηρεάζει την ηλεκτρονιακή μεταφορά από την τυροσίνη Z στη χλωροφύλλη P₆₈₀⁺. Η επίδραση αυτή εξαρτάται από δύο παράγοντες: 1) Την ιοντική ακτίνα του Ln^{3+} : ιόντα με μικρότερη ακτίνα από την

ακτίνα του Ca^{2+} επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό τη διαμόρφωση του ενζύμου. υ) Το pH του συστήματος: η επίδραση των λανθανιδίων παρατηρείται σε pH 6 αλλά όχι σε pH 7,5.

Ε. Παρουσία των λανθανιδίων, η αναγωγή της οξειδωμένης χλωροφύλλης P680^+ σε pH 6 πραγματοποιείται από έναν εναλλακτικό δότη, πιθανώς μία ιστιδίνη. Η μελέτη της επίδρασης των λανθανιδίων σε διάφορα pH είχε ως αποτέλεσμα τον προσδιορισμό μία ομάδας με σταθερά pK_a μεταξύ 6,5 και 7.

ΣΤ. Η απουσία ιόντων Ca^{2+} ή Ln^{3+} από τις θέσεις δέσμησης του ασβεστίου στο PS II καθιστά απαγορευτική την εμφάνιση του σήματος multiline της κατάστασης S_2 αλλά όχι του σήματος EPR 164 Gs της τροποποιημένης κατάστασης S_3^* .

Ζ. Μία τουλάχιστον από τις θέσεις δέσμησης των ιόντων ασβεστίου βρίσκεται κοντά στις τυροσίνες Z και D, όπως αποδεικνύεται από την παρατηρούμενη μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραμαγνητικών ιόντων Ln^{3+} και των ριζών Tyr-Z^+ και Tyr-D^+ .

Η. Παρουσία των λανθανιδίων οι εξωτερικές πρωτεΐνες δεν προστατεύουν την ρίζα Tyr-Z^+ από εξωγενή αναγωγικά. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι είτε οι εξωτερικές πρωτεΐνες δεν προστατεύουν την Tyr-Z^+ σε ανέπαφα ένζυμα είτε η παρουσία του ασβεστίου είναι απαραίτητη για τη δομική ακεραιότητα της τυροσίνης Z.

Θ. Απουσία του συμπλόκου του μαγγανίου, η προσθήκη ιόντων Mn^{2+} έχει ως αποτέλεσμα η ρίζα Tyr-Z^+ να ανάγεται από ένα τουλάχιστον ιόν Mn^{2+} που δεσμεύεται σε μία θέση δέσμησης μαγγανίου στο σύμπλοκο O.E.C. Η ταχύτητα αναγωγής επηρεάζεται από το επιπλέον θετικό φορτίο του Ln^{3+} που δεσμεύεται σε μία θέση ασβεστίου κοντά στην τυροσίνη Z.

Ι. Η οξειδωτική κατάσταση S_1 του συμπλόκου του μαγγανίου είτε είναι διαμαγνητική είτε η παρουσία του ασβεστίου επηρεάζει τις μαγνητικές ιδιότητες της κατάστασης αυτής.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. Porter, G. (1983) **J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2.** 79, 473-482
- [2]. Clayton, R. K. (1980) **Photosynthesis: physical mechanisms and chemical patterns**, Cambridge University Press, Cambridge.
- [3]. Sauer, K. (1978) **Acc. Chem. Res.** 11, 257.
- [4]. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. and Michel, H. (1985) **Nature** 318, 618-624.
- [5]. Amesz, J. (ed) **Photosynthesis** (1987), Elsevier, Amsterdam.
- [6]. Wasielewski, M. R., Johnson, D. G., Seibert, M. and Govindjee (1989) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 85, 524-528.
- [7]. Nuijs, A. M., van Gorkom, H. J., Plijter, J. J and Duysens, L. M. N. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 848, 167-175.
- [8]. Van Gorkom, H. J. (1974) **Biochim. Biophys. Acta** 347, 439-442.
- [9]. Bouges-Bocquet, B. (1973) **Biochim. Biophys. Acta** 324, 250-256.
- [10]. Velthuys, B. R. and Amesz, J. (1974) **Biochim. Biophys. Acta** 333, 85-94.
- [11]. Velthuys, B. R. (1981) **FEBS Lett.** 126, 277-281.
- [12]. Vermaas, W .F. J. and Arntzen, C. J. (1983), **Biochim. Biophys. Acta** 725, 483-491.
- [13]. Nugent, J. H. A., Diner, B.A. and Evans, M .C. W. (1981) **FEBS Lett.** 124, 241-244.
- [14]. Zimmermann, J.-L. and Rutherford, A. W. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 851, 416-423.
- [15]. Barry, B. A. and Babcock, G. T. (1987) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 84, 7099-7103.
- [16]. Debus, R. J., Barry, B. A., Sithole, I., Babcock, G. T. and McIntosh, L. (1988) **Biochemistry** 27, 9071-9074.
- [17]. Brettel, K., Schlodder, E. and Witt, H. T. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 766, 403-415.

- [18]. Meyer, B., Schlodder, E., Dekker, J. P. and Witt, H. T. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 974, 36-43.
- [19]. Blankenship, R. E., Babcock, G.T., Warden, J. T. and Sauer, K. (1975) **FEBS Lett.** 51, 287-293.
- [20]. Babcock, G. T. and Sauer, K. (1973) **Biochim. Biophys. Acta** 325, 504-519.
- [21]. Debus, R. J., Barry, B. A., Babcock, G. T. and McIntosh, L. (1988) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 85, 427-430.
- [22]. Metz, J. G., Nixon, P. J., Ronger, M., Brudvig, G. W. and Diner, B. A. (1989) **Biochemistry** 28, 6960-6969.
- [23]. Vass, I. and Styring, S. (1991) **Biochemistry** 30, 830-839.
- [24]. Buser, C. A., Thompson, L. K., Diner, B. A. and Brudvig, G. W. (1990) **Biochemistry** 29, 8977-85.
- [25]. Inui, T., Kawamori, A., Kuroda, G. Ono, T.-A., Inoue, Y. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 973, 147-152.
- [26]. Vass, I., Deak, Z., Jegerschold C., Styring S. (1990) **Biochim. Biophys. Acta** 1018, 41-46.
- [27]. 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.
- [28]. Evelo, R. G., Dikanov, S. A. and Hoff, A. J. (1986) **Chem. Phys. Lett.** 157, 25-30.
- [29]. Thompson, L. K. and Brudvig, G. W. (1988) **Biochemistry** 27, 6653-6658.
- [30]. Rutherford, A. W., Paterson, D. R. and Mullet, J. E. (1981) **Biochim. Biophys. Acta** 635, 205-214.
- [31]. Dubes, R. J. (1992) **Biochim. Biophys. Acta** 1102, 269-352.
- [32]. Joliot, P., Barbieri, G. and Chabaud, R. (1969) **Photochem. Photobiol.** 10, 309-329.
- [33]. Joliot, P. and Kok, B. (1975) In: **Bioenergetics of Photosynthesis** (Govindjee, ed.), pp. 387-412, Academic Press, New York.

- [34]. Kok, B., Forbush, B. and McGloin, M. (1970) **Photochem. Photobiol.** 11, 457-475.
- [35]. Plijter, J. J., Aalbers, S. E., Barends, J. P. F., Vos, M. H. and van Gorkom, H. J. (1988) **Biochim. Biophys. Acta** 935, 299-311.
- [36]. Van Gorkom, H. J., van Leeuwen, P. J., Vos, M. H. and Barends, J. P. F (1990) In: **Current Research in Photosynthesis** (Baltscheffsky, M., ed.), pp. 693-700, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [37]. Radmer, R. and Ollinger, O. (1986) **FEBS Lett.** 195, 285-289.
- [38]. Styrvig, S. and Rutherford, W. A. (1987) **Biochemistry** 26, 2401-2405.
- [39]. Dekker, J. P. (1992) In: **Manganese Redox Enzymes** (Pecoraro, V. L., ed.), pp. 85-104 VCH Publishers, New York.
- [40]. Saphon, S. and Crofts, A. R. (1977) **Z. Naturforsch.** 32c, 617-626.
- [41]. Forster, V. and Junge, W. (1985) **Photochem. Photobiol.** 41, 183-190.
- [42]. Lavergne, J. and Rappaport, F. (1990) In: **Current Research in Photosynthesis** (Baltscheffsky, M., ed.), pp. 873-876, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [43]. Rappaport, F. and Lavergne, J. (1991) **Biochemistry** 30, 10004-10012.
- [44]. Jahns, P., Haumann, M., Bogershausen, O. and Junge, W. (1992) In: **Research in Photosynthesis** (Murata, N. ed.), pp. 333-336, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [45]. Radmer, R. and Cheniae, G. M. (1977) In: **Primary Processes in Photosynthesis** (Barber, J., ed.), pp. 308-348, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- [46]. Brand, J. J. and Backer, D. W. (1989) **J. Bioenerg. Biomembr.** 16, 239-249
- [47]. Homann, P. H. (1989) In: **The Role of Calcium in Biological Systems**, Vol. 5, (I. J. Anghileri, ed.), pp. 79-96, C.R.C. Press, Boca Raton, FL.
- [48]. Yocum, C. F. (1991) **Biochim. Biophys. Acta** 1059, 1-15.
- [49]. Critchley, C. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 811, 33-46.
- [50]. Homann, P. H. (1987) **J. Bioenerg. Biomembr. Acta** 19, 105-123.

- [51]. Coleman, W. J. (1990) **Photosynth. Res.** 23, 1-22.
- [52]. 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.
- [53]. Chanotakis, D. F., Topper, J. and Yocum, C. F. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 524-531.
- [54]. Ono, T. and Inoue, Y. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 806, 331-340.
- [55]. Tamura, N. and Cheniae, G. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 890, 179-194.
- [56]. Brudvig, G. W., Casey, J. L. and Sauer, K. (1983) **Biochim. Biophys. Acta** 723, 366-371.
- [57]. Andreasson, L.-E. and Hansson, O (1982) **Biochim. Biophys. Acta** 679, 261-268.
- [58]. Hansson, O, Aasa, R. and Vanngird, T. (1987) **Biophys. J.** 51, 825-832.
- [59]. Haddy, A., Aasa, R. and Andreasson, L.-E. (1989) **Biochemistry** 28, 6954-6959.
- [60]. Rutherford, A. W. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 807, 189-201.
- [61]. Dismukes, G. C. and Siderer, Y. (1981) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 78, 274-278.
- [62]. Zimmermann, J.-L. and Rutherford, A. W. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 160-167.
- [63]. Dismukes, G. C., Ferris, K. and Watnick, P. (1982) **Photobiochem. Photobiophys.** 3, 243-256.
- [64]. Andreasson, L.-E., Hansson, O and Vanngird, T. (1983) **Chem. Scripta** 21, 71-74.
- [65]. Beck W. F. and Brudvig, G. W. (1986) **Biochemistry** 25, 6479-6486.
- [66]. Boussac, A. and Rutherford, A. W. (1988) **Biochemistry** 27, 3476-3483.
- [67]. Boussac, A., Zimmermann, J.-L. and Rutherford, A. W. (1989) **Biochemistry** 28, 8984-8989.

- [68]. Boussac, A., Zimmermann, J.-L. and Rutherford, A. W. (1990) In: **Current Research in Photosynthesis** (M. Baltscheffsky, ed.), Vol. I, pp. 713-716, Kluwer, Dordrecht.
- [69]. Casey, J. L. and Sauer, K. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 21-28.
- [70]. de Paula, J. C., Innes, J. B. and Brudvig, G. W. (1985) **Biochemistry** 24, 8114-8120.
- [71]. Beck, W. F. and Brudvig, G. W. (1988) **Chem. Scripta** 28A, 93-98.
- [72]. Beck, W. F., de Paula, J. C. and Brudvig, G. W. (1986) **J. Am. Chem. Soc.** 108, 4018-4022.
- [73]. Ono, T.-A., Nakayama, H., Gleiter, H., Inoue, Y. and Kawamori, A. (1987) **Arch. Biochem. Biophys.** 256, 618-624.
- [74]. Zimmermann, J.-L. and Rutherford, A. W. (1986) **Biochemistry** 25, 4609-4615.
- [75]. de Paula, J. C., Beck, W. F. and Brudvig, G. W. (1986) **J. Am. Chem. Soc.** 108, 4002-4009.
- [76]. Aasa, R., Andreasson, L.-E., Lagenfelt, G. and Vanngird, T. (1987) **FEBS Lett.** 221, 245-248.
- [77]. Pecoraro, V. L. (1988) **Photochem. Photobiol.** 48, 249-264.
- [78]. Kim, D. H., Britt, R. D., Klein, M. P. and Sauer, K. (1990) **J. Am. Chem. Soc.** 112, 9389-9391.
- [79]. Dexheimer, S. L., Sauer, K. and Klein, K. (1990) In: **Current Research in Photosynthesis** (M. Baltscheffsky, ed.), Vol. I, pp. 761-764, Kluwer, Dordrecht.
- [80]. Rutherford, A. W., Boussac, A. and Zimmermann, J.-L. (1991) **New J. Chem.** 15, 491-500.
- [81]. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1990) **Biochim. Biophys. Acta** 1020, 269-277.
- [82]. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1990) **Biochim. Biophys. Acta** 1015, 373-377.
- [83]. Sivaraja, M., Tso, J. and Dismukes, G.C. (1989) **Biochemistry** 28, 9459-9464.
- [84]. Hallahan, B. J., Nugent, J. H. A., Warden, J. T. and Evans, M. C. W. (1992) **Biochemistry** 31, 4562-4573.

- [85]. Boussac, A., Zimmermann, J.-L. and Rutherford, A. W. (1990) **FEBS Lett.** 277, 69-74.
- [86]. Ghanotakis, D. F, Topper, J. N., Babcock, G. T. and Yocum, C. F. (1984) **FEBS Lett.** 170, 169-173.
- [87]. Boussac, A., Zimmermann, J.-L., Rutherford, A. W. and Lavergne, J. (1990) **Nature** 347, 303-306.
- [88]. Andreasson, L.-E. and Lindberg, K. (1992) **Biochim. Biophys. Acta** 1100, 177-183.
- [89]. Sivaraja, M. and Dismukes, G. C. (1988) **Biochemistry** 27, 3467-3475.
- [90]. Sivaraja, M. and Dismukes, G. C. (1988) **Biochemistry** 27, 6297-6306.
- [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]. 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.
- [94]. 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.
- [95]. 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.
- [96]. George, G. N., Prince, R. C. and Cramer, S. P. (1989) **Science** 243, 789-791.
- [97]. Penner-Hahn, J. E., Fronko, R. M., Pecoraro, V. L., Yocum, C. F., Betts, S. D. and Bowlby, N. R. (1990) **J. Am. Chem. Soc.** 112, 2549-2557.
- [98]. 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.
- [99]. Yachandra, V. K, DeRose, V. L., Latimer, M. J., Mukerji, I., Sauer, K. and Klein, M. P. (1991) **Photochem. Photobiol.** 53, 98s-99s.

- [100]. Larson, E., Lah, M. S., Li, X., Bonadies, J. A. and Pecoraro, V. L. (1992) **Inorg. Chem.** 31, 373-378.
- [101]. Pecoraro, V. L. (1992) In: **Manganese Redox Enzymes** (Pecoraro, V.L., ed.), pp. 197-231, VCH Publishers, Inc., New York.
- [102]. 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
- [103]. Goodin, D. B., Yachandra, V. K., Britt, R. D., Sauer, K. and Klein, M. P. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 209-216.
- [104]. Pulles, M. P. J., van Gorkom, H. J. and Willemsen, J. G. (1976) **Biochim. Biophys. Acta** 449, 536-540.
- [105]. Mathis, P. and Haveman, J. (1977) **Biochim. Biophys. Acta** 461, 167-181.
- [106]. Dekker, J. P., van Gorkom, H. J., Brok, M. and Ouwehand, L. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 764, 301-309.
- [107]. Saygin, O and Witt, H. T. (1985) **Photobiochem. Photobiophys.** 10, 71-82.
- [108]. Renger, G. and Weiss, W. (1983) **Biochim. Biophys. Acta** 722, 1-11.
- [109]. Dekker, J. P., van Gorkom, H. J., Wensink, J. and Ouwehand, L. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 1-9.
- [110]. Dekker, J. P., Plitjer, J. J., Ouwehand, L. and van Gorkom, H. J. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 176-179.
- [111]. Lavergne, J. (1986) **Photochem. Photobiol.** 43, 311-317.
- [112]. Saygin, O and Witt, H. T. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 893, 452-469.
- [113]. Lavergne, J. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 894, 91-107.
- [114]. Witt, H. T., Schlodder, E., Brettel, K. and Saygin, O. (1986) **Photosynth. Res.** 10, 453-471.
- [115]. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1983) **FEBS Lett.** 164, 255-260.
- [116]. Miyao, M. and Murata, N. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 765, 253-257.

- [117]. Styring, S., Miyao, M. and Rutherford, A. W. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 890, 32-38.
- [118]. Miller, A.-F., de Paula, J. C. and Brudvig, G. W. (1987) **Photosynth. Res.** 12, 205-218.
- [119]. Miyao, M., Murata, N., Lavorel, J., Maison, B., Boussac, A. and Etienne, A.-L. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 890, 151-159.
- [120]. Metz, J. G. and Bishop, N. I. (1980) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 94, 560-566.
- [121]. Rutherford, A. W., Seibert, M. and Metz, J. G. (1988) **Biochim. Biophys. Acta** 932, 171-176.
- [122]. Seibert, M., Tamura, N. and Inoue, Y. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 974, 185-191.
- [123]. Mei, R., Green, J. P., Sayre, R. T. and Frasch, W. (1989) **Biochemistry** 28, 5560-5567.
- [124]. Virgin, I., Styring, S. and Andreasson, B. (1988) **FEBS Lett.** 233, 408-412.
- [125]. Tamura, N., Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 973, 281-289.
- [126]. Warden, J. T., Blankenship, R. E. and Sauer, K. (1976) **Biochim. Biophys. Acta** 423, 462-478.
- [127]. Evelo, R. G., Styring, S., Rutherford, A. W. and Hoff, A. J. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 973, 428-442.
- [128]. Hoganson, C. W. and Babcock, G. T. (1988) **Biochemistry** 27, 5848-5855.
- [129]. Diner, B. A., Nixon, P. J., Metz, J. G., Ronger, M. and Chisholm, D. (1990) **Biophys. J.** 57, 405a.
- [130]. Vermaas, W., Charite, J. and Shen, G. (1990) **Biochemistry** 29, 5325-5332.
- [131]. 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., eds.), pp. 540-586, Academic Press, New York.
- [132]. Berthold, D. A., Babcock, G. T. and Yocum, C. F. (1981) **FEBS Lett.** 134, 231-234.

- [133]. Kuwabara, T. and Murata, N. (1982) **Plant Cell Physiol.** 23, 533-539.
- [134]. Plijter, J. J. (1988) **Thesis**, University of Leiden.
- [135]. Ikeuchi, M., Yuasa, M. and Inoue, Y. (1985) **FEBS Lett.** 197, 316-322.
- [136]. Ghanotakis, D. F. and Yocum, C. F. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 891, 15-21.
- [137]. Haag, E., Irrgang, K. D., Boekema, E. J. and Renger, G. (1990) **Eur. J. Biochem.** 189, 47-53.
- [138]. 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.
- [139]. Nanba, O. and Satoh, K. (1987) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 84, 109-112.
- [140]. Fotinou, C. and Ghanotakis, D. F. (1990) **Photosynth. Res.** 25, 141-145.
- [141]. Tang, X.-S., Fushimi, K. and Satoh, K. (1990) **FEBS Lett.** 273, 257-260.
- [142]. Kobayashi, M., Maeda, H., Watanabe, T., Nakane, H. and Satoh K. (1990) **FEBS Lett.** 260, 138-140.
- [143]. Bendall, D. S. (1968) **Biochem. J.** 109, 46-47.
- [144]. Fan, H. N. and Cramer, W. A. (1970) **Biochim. Biophys. Acta** 267, 375-382.
- [145]. 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.
- [146]. Nakatani, H. Y. Ke, B., Dolan, E. and Arntzen, C. J. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 765, 347-352.
- [147]. Pakrasi, H. B., Riethaman, H. C. and Sherman, L. A. (1985) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)** 82, 6903-6907.
- [148]. Vermaas, W. F. J., Williams, J. G. K. and Arntzen, C. J. (1987) **Plant Mol. Biol.** 8, 317-326.
- [149]. Bricker, T. M. (1990) **Photosynth. Res.** 24, 1-13.

- [150]. Akabori, K., Tsukamoto H., Tsukihara, J., Nagatsuka, T., Motokawa, O. and Toyoshima, Y. (1988) **Biochim. Biophys. Acta** 932, 345-357.
- [151]. 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.
- [152]. Yamaguchi, N., Takahashi, Y. and Satoh, K. (1988) **Plant Cell Physiol.** 29, 123-129.
- [153]. Bassi, R., Hoyer-Hansen, G., Barbato, R., Giacometti, G. M. and Simpson, D. J. (1987) **J. Biol. Chem.** 262, 13333-13341.
- [154]. Vermaas, W. F. J., Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1988) **Photosynth. Res.** 17, 97-113.
- [155]. Eaton-Rye, J. J. and Vermaas, W. F. J. (1992) **Plant Mol. Biol.** 17, 1165-1177.
- [156]. Putnam-Evans, C. and Bricker, T. M. (1992) **Biochemistry** 31, 11482-11488.
- [157]. Tanaka, S. and Wada, K. (1988) **Photosynth. Res.** 17, 255-266.
- [158]. Kuwabara, T. and Murata, N. (1983) **Plant Cell Physiol.** 24, 741-747.
- [159]. 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., eds.), pp. 213-222, Academic Press, Inc., Tokyo.
- [160]. Kuwabara, T., Miyao, M., Murata, T. and Murata, N. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 806, 283-289.
- [161]. Armstrong, W. H. (1992) In: **Manganese Redox Enzymes** (Pecoraro, V. L., ed.), pp. 261-268, VCH Publishers, Inc., New York
- [162]. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1984) **FEBS Lett.** 166, 381-384.
- [163]. Miyao, M. and Murata, N. (1983) **FEBS Lett.** 164, 375-378.
- [164]. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1984) **FEBS Lett.** 168, 281-286.
- [165]. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 806, 331-340.
- [166]. Miyao, M. and Murata, N. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 977, 315-321.
- [167]. Kavelaki, K. and Ghanotakis, D. F. (1991) **Photosynth. Res.** 29, 149-155.

- [168]. Odom, W. R. and Bricker, T. M. (1992) **Biochemistry** 31, 5616-5620.
- [169]. Sayre, R. T., Andersson, B. and Bogorad, L. (1986) **Cell** 47, 601-608.
- [170]. Isogai, Y., Yamamoto, Y. and Nishimura, M. (1985) **FEBS Lett.** 187, 240-244.
- [171]. Takahashi, M.-A. and Asada, K. (1991) **Biochim. Biophys. Acta** 1059, 361-364.
- [172]. Enami, I., Ohta, S., Mitsuhashi, S. Takahashi, S., Ikeuchi, M. and Katoh, S. (1992) **Plant Cell Physiol.** 33, 291-297.
- [173]. Eaton-Rye, J. J. and Murata, N. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 977, 219-226.
- [174]. Miyao, M. And Murata, N. (1984) **FEBS Lett.** 168, 118-120.
- [175]. Waggoner, C. M. and Yocum, C. F. (1987) In: **Progress in Photosynthesis Research** (Biggins, J., ed.), Vol. I, pp. 685-688, Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- [176]. Miyao, M. and Murata, N. (1985) **FEBS Lett.** 180, 303-308.
- [177]. Rashid, A. and Carpentier, R. (1990) **Photosynth. Res.** 24, 221-227.
- [178]. Briantais, J. M., Vernotte, C. Miyao, M. Murata, N. and Picaud M. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 808, 348-351.
- [179]. Miyao, M. and Murata, N. (1983) **Biochim. Biophys. Acta** 725, 87-93.
- [180]. Ono, T.-A., Kajikawa, H. and Inoue, Y. (1986) **Plant Physiol.** 80, 85-90.
- [181]. Becker, B. Callahan. F. and Cheniae G. (1985) **FEBS Lett.** 192, 209-214.
- [182]. Ljungberg, U., Akerlund, H.-E., Larsson, C. and Andersson, B. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 145-152.
- [183]. Ljungberg, U., Akerlund, H.-E. and Andersson, B. (1986) **Eur. J. Biochem.** 158, 477-482.
- [184]. Lautner, A., Klein, R., Ljungberg, U., Reilander, H., Bartling, D., Andersson, B., Reinke, H., Beyreuther, K. and Herrmann, R. G. (1988) **J. Biol. Chem.** 263, 10077-10081.

- [185]. Schroder, W.P., Henrysson, T. and Akerlund, H.-E. (1988) **FEBS Lett.** 235, 289-292.
- [186]. Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1988) **Plant Cell Physiol.** 29, 1233-1239.
- [187]. Murata, N., Miyao, M., Hayashida, N., Hidaka, T. and Sugiura, M. (1988) **FEBS Lett.** 235, 283-288.
- [188]. Miyazaki, A., Shina, T., Toyoshima, Y., Gounaris, K. and Barber, J. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 975, 142-147.
- [189]. Buser, C. A., Diner, B. A. and Brudvig G. W. (1992) **Biochemistry** 31, 11441-11448.
- [190]. Lam, E., Baltimore, B., Ortiz, W., Chollar, S., Melis, A. and Malkin, R. (1983) **Biochim. Biophys. Acta** 724, 201-211.
- [191]. Murata, N., Miyao, M., Omata, T., Matsunami, H. and Kuwabara, T. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 765, 363-369.
- [192]. Xu, Q.A. and Bricker, T. M. (1992) **J. Biol. Chem.** 267, 25816-25821.
- [193]. Ghanotakis, D. F., Babcock, G. T. and Yocum, C. F. (1984) **FEBS Lett.** 167, 127-130.
- [194]. Nakatani, H. Y. (1984) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 120, 299-304.
- [195]. Boussac, A., Maison-Peteri, B., Etienne, A.-L. and Vernotte, C. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 808, 231-234.
- [196]. Ghanotakis, D. F., Babcock, G. T. and Yocum, C. Y. (1985) **FEBS Lett.** 192, 1-3.
- [197]. Miyao, M. and Murata, N. (1986) **Photosynth. Res.** 10, 489-496.
- [198]. Shen, J. R., Satoh, K. and Satoh, S. (1988) **Biochim. Biophys. Acta** 933, 358-354.
- [199]. Cammarata, K. and Cheniae, G. (1987) **Plant Physiol.** 84, 587-595.
- [200]. 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.
- [201]. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1988) **FEBS Lett.** 227, 147-152.

- [202]. Shen, J.-R. and Katoh, S. (1991) **Plant Cell Physiol.** 32, 439-446.
- [203]. Boussac, A., Maison-Peteri, B., Vernotte, C. and Etienne, A.-L. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 808, 225-230.
- [204]. Dekker, J. P., Ghanotakis, D. F., Plitjer, J. J., van Gorkom, H. J. and Babcock, G. T. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 515-523.
- [205]. Boussac, A. and Rutherford, A. W. (1988) **FEBS Lett.** 236, 432-436.
- [206]. Waggoner, C. M., Pecoraro, V. L. and Yocum, C. F. (1989) **FEBS Lett.** 244, 237-240.
- [207]. Miller, A.-F. and Brudvig, G. W. (1989) **Biochemistry** 28, 8181-8190.
- [208]. 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., eds.), pp. 227-242, American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- [209]. Lockett, C. J., Demetriou, C., Bowden, S. J. and Nugent, J. H. A. (1990) **Biochim. Biophys. Acta** 1016, 213-218.
- [210]. Boussac, A. and Rutherford, A. W. (1988) **Chem. Scripta** 28A, 123-126.
- [211]. 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.
- [212]. Ghanotakis, D. F., Babcock, G. T. and Yocum, C. F. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 809, 173-180.
- [213]. Renger, G. and Hanssum, B. (1988) **Photosynth. Res.** 16, 243-259.
- [214]. de Paula, J. C., Li, P. M., Miller, A.-F., Wu, B. W. and Brudvig, G. W. (1986) **Biochemistry** 25, 6487-6494.
- [215]. Blough, N. V. and Sauer, K. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 377-381.
- [216]. Miller, A.-F., de Paula, J. C. and Brudvig, G. W. (1987) **Photosynth. Res.** 12, 205-218.
- [217]. Cole, J. and Sauer, K. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 891, 40-48.

- [218]. Robinson, H. H. and Crofts, A. R. (1983) **FEBS Lett.** 153, 221-226.
- [219]. Tso, J., Sivaraja, M. and Dismukes, G. C. (1991) **Biochemistry** 30, 4734-4739.
- [220]. Tso, J. Sivaraja, M., Philo, J. S. and Dismukes, G. C. (1991) **Biochemistry** 30, 4740-4747.
- [221]. Ono, T.-A. and Inoue, Y.(1989) **Arch. Biochem. Biophys.** 275, 440-448.
- [222]. Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 973, 443-449.
- [223]. Koike, H., Siderer, Y., Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 850, 80-89.
- [224]. Rutherford, A. W., Crofts, A. R. and Inoue, Y (1982) **Biochim. Biophys. Acta** 682, 457-465.
- [225]. Rutherford, A. W., Renger, G., Koike, H. and Inoue, Y. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 767, 548-556.
- [226]. Kelly, P. M and Izawa, S. (1978) **Biochim. Biophys. Acta** 502, 198-210.
- [227]. Sandusky, P. O. and Yocum, C. F. (1983) **FEBS Lett.** 162, 339-343.
- [228]. Dismukes, G. C. (1986) **Photochem. Photobiol.** 43, 99-115.
- [229]. 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., eds.), pp. 303-315, Academic Press Japan, Tokyo.
- [230]. Coleman, W. J. and Govindjee (1987) **Photosynth. Res.** 13, 199-223.
- [231]. Sandusky, P. O. and Yocum, C. F. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 849, 85-93.
- [232]. Sandusky, P. O. and Yocum, C. F. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 766, 603-611.
- [233]. Hind, G., Nakatani, H. Y. and Izawa, S. (1969) **Biochim. Biophys. Acta** 172, 277-289.
- [234]. Theg, S. M. and Homann, P. H. (1982) **Biochim. Biophys. Acta** 679, 221-234.

- [235]. 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., eds.), pp. 293-302, Academic Press, Inc., Tokyo.
- [236]. Homann, P. H. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 809, 311-319.
- [237]. Damoder, R., Klimov, V. V. and Dismukes, G. C. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 848, 378-391.
- [238]. Wydrzynski, T., Baumgart, F., MacMillan, F. and Renger, G. (1990) **Photosynth. Res.** 25, 59-72.
- [239]. Itoh, S., Yerkes, C. T., Koike, H., Robinson, H. H. and Crofts, A. R. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 766, 612-622.
- [240]. Sinclair, J. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 764, 247-252.
- [241]. Franzen, L.-G., Hansson, O. and Andreasson, L.-E. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 808, 171-179.
- [242]. Imaoka, A., Akabori, K., Yanagi, M., Izumi, K., Toyoshima, Y., Kawamori, A., Nakayama, H. and Sato, J. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 848, 201-211.
- [243]. Theg, S. M., Jursinic, P. A. and Homann, P. H. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 766, 636-646.
- [244]. Ono, T.-A., Conjeaud, H., Gleiter, H., Inoue, Y. and Mathis, P. (1986) **FEBS Lett.** 203, 215-219.
- [245]. Rozsa, Z. and Demeter, S. (1987) **Photochem. Photobiol.** 45, 525-528.
- [246]. Vass, I., Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 892, 224-235.
- [247]. Homann, P. H., Gleiter, H., Ono, T.-A. and Inoue, Y. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 850, 10-20.
- [248]. Ono, T. A. Zimmermann, J.-L., Inoue, Y. and Rutherford, A. W. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 851, 193-201.
- [249]. Rutherford, A. W. (1989) **Trends Biochem. Sci.** 14, 227-232.

- [250]. Rutherford, A. W. Zimmermann, J.-L. and Boussac, A. (1992) In: **The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology** (Barber, J., ed.), pp. 179-229, Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam.
- [251]. Tamura, N., Inoue, H. and Inoue, Y. (1990) **Plant Cell Physiol.** 31, 469-477.
- [252]. Mei, R. and Yocum, C. F. (1991) **Biochemistry** 30, 7836-7842.
- [253]. Sayre, R. T. and Wrobel-Boerner, E. (1990) **Plant Physiol.** 93, 22a.
- [254]. Tae, G.-S., M.T., Cramer, W. A. (1989) **FEBS Lett.** 259, 161-164.
- [255]. Ikeuchi, M. and Inoue, Y (1988) **FEBS Lett.** 241, 99-104.
- [256]. Webber, A. N., Packman, L., Chapman, D. J., Barber, J. and Gray, J. C. (1989) **FEBS Lett.** 242, 259-262.
- [257]. Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (1983) **Nature** 306, 284-287.
- [258]. Carpentier, R. and Natakani, H. Y. (1985) **Biochim. Biophys. Acta** 808, 288-292.
- [259]. Brudvig, G. W. and de Paula, J. C. (1987) In: **Progress in Photosynthesis Research** (Biggins, J., ed.), Vol. I, pp. 491-498, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- [260]. Krishtalik, L. I. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 849, 162-171.
- [261]. Krishtalik, L. I. (1990) **Bioelectrochem. Bioenerg.** 23, 249-263.
- [262]. Brudvig, G. W., Beck, W. F. and de Paula, J. C. (1989) **Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.** 18, 25-46.
- [263]. Brudvig, G. W., Thorp, H. H. and Crabtree, R. H. (1991) **Acc. Chem. Res.** 24, 311-316.
- [264]. Thorp, H. H. and Brudvig, G. W. (1991) **New J. Chem.** 15, 479-490.
- [265]. Bader, K. P., Thibault, P. and Schmid, G. H. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 893, 564-571.
- [266]. Renger, G. (1987) **Photosynthetica** 21, 203-224.
- [267]. Renger, G. (1987) **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 26, 643-660.

- [268]. Renger, G. (1988) **Chem. Scripta** 28A, 105-109.
- [269]. Micklitz, W., Bott, S.G., Bentsen, J. G. and Lippard, S. J. (1989) **J. Am. Chem. Soc.** 111, 372-374.
- [270]. Chan, M. K. and Armstrong, W. H. (1990) **J. Am. Chem. Soc.** 112, 4985-4986.
- [271]. Stibrany, R. T. and Corun, S. M. (1990) **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 29, 1156-1158.
- [272]. Proserpio, D. M., Hoffmann, R. and Dismukes, G. C. (1992) **J. Am. Chem. Soc.** 114, 4374-4382.
- [273]. Bhula, R., Gainsford, G. J. and Weatherburn, D. C. (1988) **J. Am. Chem. Soc.** 110, 7550-7552.
- [274]. Brudvig, G. W. and Crabtree, R. H. (1986) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 83, 4586-4588.
- [275]. Vincent, J. B. and Christou, G. (1987) **Inorg. Chim. Acta** 136, L41-L43.
- [276]. Christou, G. and Vincent, J. B. (1988) **Biochim. Biophys. Acta** 895, 259-274.
- [277]. Christou, G. (1989) **Acc. Chem. Res.** 22, 328-335.
- [278]. Vincent, J. B. and Christou, G. (1989) **Adv. Inorg. Chem.** 33, 197-257.
- [279]. Wang, S., Folting, K., Streib, W. E., Schmitt, E. A., McCusker, J. K., Hendrickson, D. N. and Christou, G. (1991) **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 30, 305-306.
- [280]. Libby, E., McCusker, J. K., Schmitt, E. A., Folting, K., Hendrickson, D. N. Christou, G. (1991) **Inorg. Chem.** 30, 3846-3895.
- [281]. Larson, E. J. and Pecoraro, V. L. (1991) **J. Am. Chem. Soc.** 113, 7809-7810.
- [282]. Larson, E. J., Riggs, P. J., Penner-Hahn, J. E. and Pecoraro, V. L. (1992) **J. Chem. Soc., Chem. Commun.** 102-103.
- [283]. Larson, E. J. and Pecoraro, V. L. (1991) **J. Am. Chem. Soc.** 113, 3810-3818.
- [284]. Thorp, H. H., Sarneski, J. E., Brudvig, G. W. and Crabtree, R. H. (1989) **J. Am. Chem. Soc.** 111, 9249-9250.

- [285]. Thorp, H. H., Brudvig, G. W. and Bowden, E. F. (1990) **J. Electroanal. Chem.** 290, 293-301.
- [286]. Manchanda, R., Thorp, H. H., Brudvig, G. W. and Crabtree, R. H. (1991) **Inorg. Chem.** 30, 494-497.
- [287]. Kalsbeck, W. A., Thorp, H. H., Brudvig, G. W. and Crabtree, R. H. (1991) **J. Electroanal. Chem.** 314, 335-343.
- [288]. Hagen, K. S., Westmoreland, T. D., Scott, M. J. and Armstrong, W. H. (1989) **J. Am. chem. Soc.** 111, 1907-1909.
- [289]. Sarneski, J. E., Thorp, H. H., Brudvig, G. W., Crabtree, R. H. and Schulte, G. K. (1990) **J. Am. Chem. Soc.** 112, 7255-7260.
- [290]. Boucher, L. J. and Coe, C. G. (1975) **Inorg. Chem.** 14, 1289-1295.
- [291]. Fine, P. L. and Frasch, W. D. (1990) In: **Current Research in Photosynthesis** (Baltscheffsky, M., ed.), Vol. I, pp. 905-908, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [292]. Frasch, W. D. (1992) In: **Manganese Redox Enzymes** (Pecoraro, V. L., ed.), pp. 47-70, VCH Publishers, New York.
- [293]. Thompson, L. K, Blaylock, R., Sturtevant, J. M. and Brudvig, G. W. (1989) **Biochemistry** 28, 6686-6695.
- [294]. Schroder, W. P. and Akerlund, H.-E. (1986) **Biochim. Biophys. Acta** 848, 359-363.
- [295]. Schroder, W. P. and Akerlund, H.-E. (1987) In: **Progress in Photosynthesis** (Biggins, J., ed.), Vol. I, pp. 665-668, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- [296]. Wydrzynski, T., Angstrom, J. and Vannigird, T. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 973, 23-28.
- [297]. Schroder, W. P. And Akerlund, H.-E. (1990) In: **Current Research in Photosynthesis** (Baltscheffsky, M., ed.), Vol. I, pp. 901-904, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [298]. Sayre, R. T. and Homann, P. H. (1979) **Arch. Biochem. Biophys.** 196, 525-533.

- [299]. Brudvig, G. W. and Beck, W. F. (1992) In: **Manganese Redox Enzymes** (Pecoraro, V. L., ed.), VCh Publishers, Inc., New York.
- [300]. Robinson, H. H., Sharp, R. R. and Yocum, C. F. (1981) **Archiv. Biochem. Biophys.** 207, 1-8.
- [301]. Ghanotakis, D. F. and Babcock, G. T. (1983) **FEBS Lett.** 153, 231-234.
- [302]. Neville, D. M. Jr. (1971) **J. Biol. Chem.** 246, 6328-6334.
- [303]. Arnon, D. (1949) **Plant Phys.** 24, 1-15.
- [304]. Beck, W. F., Innes, J. B., Lynch, J. B. and Brudvig, G. W. (1991) **J. of Magnetic Res.** 91, 12-29.
- [305]. Δανδουλάκης, Γ. (1989) "**Επίδραση των Λανθανιδίων και άλλων Μεταλλοκατιόντων στη Φωτοσυνθετική παραγωγή Οξυγόνου.**", σελ. 42-46, Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης.
- [306]. Ghanotakis, D. F. and Yocum, C. F. (1990) **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 41, 255-276.
- [307]. Homman, P. H. (1988) **Biochim. Biophys. Acta** 934, 1-13.
- [308]. Kretsinger, R. H. and Nelson, D. J. (1976) **Coord. Chem. Rev.** 18, 29.
- [309]. Kretsinger, R. H. (1976) **Annu. Rev. Biochem.** 45, 239.
- [310]. Martin, R. B. (1983) In: **Metal Ions in Biology**, Vol. 6, **Calcium in Biology** (Spiro, T. G., ed.), Ch.6, Wiley, New York.
- [311]. Epstein, M., Reuben, J. and Levitzki, A. (1977) **Biochemistry** 11, 2449-2457.
- [312]. Innes, J. and Brudvig, G. W. (1989) **Biochemistry** 28, 1116-1125.
- [313]. Ghanotakis, D. F., O'Malley, P. J., Babcock, G. T. and Yocum, C. F. (1983) In: **Evolving System of Photosynthesis** (Inoue, Y., Crofts, A. R., Govindjee, Murata, N., Renger, G. and Satoh, K., eds.), pp. 91-101, Academic Press, Japan, Tokyo.
- [314]. Hyde, J. S. and Rao, K. V. S. (1978) **J. of Magn. Res.** 29, 509-516.
- [315]. Bakou, A., Buser, C., Dandulakis, G., Brudvig, G. W. and Ghanotakis, D. F. (1992) **Biochim. Biophys. Acta** 1099, 131-136.

- [316]. Gerken, S., Brettel, K., Schlodder, E. and Witt, H. T. (1988) **FEBS Lett.** 237, 69-75.
- [317]. Vermaas, W. F., Rutherford, A. W. and Hansson, O. (1988) **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)** 85, 8477-8481.
- [318]. Blankenship, R. E., Babcock, G. T. and Yocum, C. F. (1981) **FEBS Lett.** 61, 231-234.
- [319]. Conjeaud, H. and Mathis, P. (1980) **Biochim. Biophys. Acta** 590, 353-359.
- [320]. Hoganson, C. W., Casey, P. A. and Hansson, O. (1991) **Biochim. Biophys. Acta** 1057, 399-406.
- [321]. Ghanotakis, D. F., Babcock, G. T. and Yerkes, C. T. (1983) **Arch. Biochem. Biophys.** 225, 248-255.
- [322]. Petrouleas, V. and Diner, B. A. (1987) **Biochim. Biophys. Acta** 893, 126-137.
- [323]. Andersson, B. and Styring, S. (1991) **Curr. Topics Bioenerg.** 16, 1-81.
- [324]. Svensson, B., Vass, I., Cedergren, E. and Styring, S. (1990) **EMBO J.** 9, 2051-2059.
- [325]. Ghanotakis, D. F., Babcock, G. T. and Yocum, C. F. (1984) **Biochim. Biophys. Acta** 765, 388-398.
- [326]. Yerkes, C. T. and Babcock, G. T. (1980) **Biochim. Biophys. Acta** 590, 360-372.
- [327]. Hoganson, C. W., Ghanotakis, D. F., Babcock, G. T. and Yocum, C. F. (1989) **Photosynth. Res.** 22, 285-293.
- [328]. Bakou, A. and Ghanotakis, D. F. (1993) **Biochim. Biophys. Acta** 1141, 303-308.
- [329]. Tamura, N. and Cheniae, G. (1986) **FEBS Lett.** 200, 231-236.
- [330]. Tamura, N. and Cheniae, G. (1987) In: **Photoactivation of the Water-Oxidizing Complex by Photosystem II Membranes**, VIIth International Congress on Photosynthesis (Biggins, J., ed.), Dordrecht, Martinus Nijhoff.
- [331]. Anderson, J. M. and Andersson, B., 1988, **Trends Biochem. Sci.** 13, 351-355.

- [332]. Marder, J. B. and Barber, J., 1989, **Plant, Cell and Environment** 12, 595-614.
- [333]. de Paula, J. C., 1987, **Ph.D. Thesis**, Yale University.
- [334]. Ghanotakis, D. F., 1983, **Ph.D. Thesis**, Michigan State University.
- [335]. Nicholss, D. G. and Ferguson, S. J., 1992, In: **Bionergetics 2**, Academic Press Inc., San Diego.
- [336]. Yachandra, V. K., De Ross, V. J., Latimer, M. J., Mukerji, I., Sauer, K. and Klein, M. P., 1993, **Science** 260, 675.
- [337]. Lavergne, J., 1991, **Biochim. Biophys. Acta** 1060, 175-188.
- [338]. Rutherford, A. W., Zimmermann J.-L. and Boussac A., 1992, In: **The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology** (Barber, J., ed.), pp. 179-229, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.