



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Συνεργασία μεταλλικού συμπλόκου – ρίζας
κατά τη φωτοσυνθετική διάσπαση του H₂O**

Μαρία Χρυσίνα

Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΪΟΣ 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Συνεργασία μεταλλικού συμπλόκου – ρίζας
κατά τη φωτοσυνθετική διάσπαση του H₂O

Μαρία Χρυσίνα

Α.Μ.: 001103

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Παναγιώτης Κυρίτσης, επίκουρος καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Παναγιώτης Κυρίτσης, επίκουρος καθηγητής ΕΚΠΑ

Βασίλειος Πετρουλέας, τ. διευθυντής ερευνών ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Χριστιάννα Μητσοπούλου, καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παναγιώτης Κυρίτσης, επίκουρος καθηγητής ΕΚΠΑ

Χριστιάννα Μητσοπούλου, καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Μεθενίτης, αναπληρωτής καθηγητής ΕΚΠΑ

Πατρίνα Παρασκευοπούλου, λέκτορας ΕΚΠΑ

Ιωάννης Σανάκης, ερευνητής ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Αικατερίνη Ραπτοπούλου, ερευνήτρια ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Διονύσιος Κουλουγλιώτης, καθηγητής ΤΕΙ Ιονίων νήσων

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 15/5/2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φωτοσύστημα II, είναι μεμβρανικό πολυπρωτεϊνικό συγκρότημα, το οποίο καταλύει την φωτοεπαγόμενη διάσπαση του H_2O . Περιέχει εξειδικευμένες προσθετικές ομάδες, όπως το σύμπλεγμα χλωροφυλλών P680, μεταφορείς ηλεκτρονίων και το σύμπλοκο διάσπασης του H_2O , Mn_4CaO_5 . Ο καταλυτικός κύκλος περιλαμβάνει τέσσερις οξειδωτικές μεταβάσεις: $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$. Κατά την διάρκεια της σταδιακής απορρόφησης 4 φωτονίων, αφαιρούνται τα $4 e^-$ και H^+ δύο μορίων H_2O , οδηγώντας στον σχηματισμό μοριακού οξυγόνου. Σημαντικό ρόλο παίζει η Tyr_Z , λίγα όμως είναι γνωστά για τον τρόπο που συνεργάζεται με το σύμπλοκο Mn_4CaO_5 στην διάσπαση του νερού.

Η εργασία επικεντρώθηκε στην διερεύνηση του ρόλου της Tyr_Z . Παγιδεύτηκαν και μελετήθηκαν με φασματοσκοπία EPR ενδιάμεσα των κρίσιμων μεταβάσεων $S_2 \rightarrow S_3$ και $S_3 \rightarrow S_0$, τα οποία περιλαμβάνουν την ελεύθερη ρίζα Tyr_Z^{\cdot} σε αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο Mn_4CaO_5 . Διαπιστώθηκαν τα εξής: Όταν η κατάσταση $S_2Tyr_Z^{\cdot}$ παγιδεύεται σε θερμοκρασίες $> ca\ 233\ K$, η απόσπαση του πρωτονίου βρίσκεται σε εξέλιξη, σε αντίθεση με την παγίδευση σε κρυογενικές θερμοκρασίες, οπότε το πρωτόνιο παραμένει στην θέση του. Όσον αφορά τον ρόλο της Tyr_Z και το κανάλι διαφυγής των πρωτονίων κατά την μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$, τα αποτελέσματα συγκλίνουν μαζί με αυτά της βιβλιογραφίας, στο ότι η Tyr_Z αποσπά ταυτόχρονα e^- και H^+ από το Mn_4CaO_5 , το δε μονοπάτι διαφυγής του πρωτονίου είναι αυτό της $Asn\ 298$. Κατά την $S_3 \rightarrow S_0$ λειτουργεί το μονοπάτι του $Asp\ 61$. Παρουσία μεθανόλης λειτουργεί το μονοπάτι του $Asp\ 61$ κατά την $S_2 \rightarrow S_3$. Για να προχωρήσει το σύμπλοκο στην S_3 , θα πρέπει η μεθανόλη να δώσει τη θέση της σε μόριο H_2O . Παγιδεύτηκε η κρίσιμη κατάσταση $S_3Tyr_Z^{\cdot}$ και αυτό ανοίγει ιδιαίτερες προοπτικές στην κατανόηση του μηχανισμού σχηματισμού οξυγόνου κατά το στάδιο $S_3 \rightarrow S_0$. Πέρα από τα ανωτέρω, η μεθοδολογία των πειραμάτων, που επιτρέπει την ακινητοποίηση βραχύβιων μεταβατικών καταστάσεων, προσφέρει σημαντικές προοπτικές για την εφαρμογή προηγμένων μεθόδων φασματοσκοπίας.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: φωτοσυνθετική διάσπαση του H_2O

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: φωτοσύνθεση, διάσπαση του H_2O , φωτοσύστημα II, τυροσίνη Z, σύμπλοκο Mn_4CaO_5 , μεταβάσεις S

ABSTRACT

Photosystem II is a membrane multi - subunit protein complex, which catalyzes the photoinduced water oxidation in plants. When a special cluster of chlorophylls, P680, absorbs a photon, it gives an electron to plastoquinone Q. The positive charge on P680 is compensated by an electron from a Mn_4CaO_5 cluster, which binds substrate H_2O molecules. When four photons are absorbed, four electrons have moved from the Mn_4CaO_5 cluster to quinone and four H^+ have been released to the bulk, then O_2 is formed. Therefore, the catalytic cycle of the Mn_4CaO_5 cluster undergoes four transitions, called S – transitions: $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$, $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$. Tyr_Z , a residue near Mn_4CaO_5 , acts as an intermediate electron carrier between the cluster and P680, and in parallel it influences H^+ removal.

In the present work, low-temperature EPR spectroscopy was employed in order to trap and study intermediates, including the free radical Tyr_Z^\cdot interacting with Mn_4CaO_5 , during the two critical transitions $S_2 \rightarrow S_3$ and $S_3 \rightarrow S_0$. When $S_2\text{Tyr}_Z^\cdot$ is trapped at temperatures $> \text{ca } 233 \text{ K}$, proton abstraction is in progress, in contrast to trapping at cryogenic temperature, at which proton remains at its site. During $S_2 \rightarrow S_3$, Tyr_Z abstracts simultaneously e^- and H^+ from Mn_4CaO_5 and the H bond network including Asn 298 is used for proton extraction. At $S_3 \rightarrow S_0$, the Asp 61 pathway is used. In the presence of methanol, the Asp 61 pathway is used in $S_2 \rightarrow S_3$. In order to proceed to S_3 , methanol has to be exchanged with a H_2O molecule. The critical intermediate $S_3\text{Tyr}_Z^\cdot$ was trapped, and this is important for understanding O_2 formation during $S_3 \rightarrow S_0$. Finally, the methodology used in the present study will be very useful in the trapping of unstable intermediates and related studies by advanced spectroscopic techniques.

SUBJECT AREA: photosynthetic water oxidation

KEYWORDS: photosynthesis, water oxidation, photosystem II, tyrosine Z, Mn_4CaO_5 complex, S - transitions

*Είκοσι τέσσερεις χιλιάδες
επτακόσια σαράντα φεγγάρια πριν:
θυμάμαι... που γεννήθηκα.
Θυμάμαι ότι ξεφύτρωσα αργά από τη μαλακή γη,
δεχόμενη το καλοσώρισμα της μητέρας.
Ήμουν τόσο κοντά στο έδαφος,
και παρ' όλα αυτά
κοιτούσα ήδη ψηλά στον ουρανό
με τα πρώτα μου φυλλαράκια.*

Guido Mina di Sospiro

The story of yew (the story of you)

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	19
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	20
1.1 ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ	20
1.2 Το ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ II	24
1.2.1 Η δομή του φωτοσυστήματος II.....	24
1.2.2 Μεταφορά ηλεκτρονίων στο ΦΣ II.....	30
1.2.3 P680: πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου	31
1.2.4 Ο αποδέκτης των ηλεκτρονίων.....	32
1.2.5 Το σύμπλοκο διάσπασης του νερού	34
1.2.5.1 Η δομή.....	34
1.2.5.2 Ο καταλυτικός κύκλος.....	38
1.2.5.3 Η S ₂ και ο μηχανισμός σχηματισμού του O ₂	41
1.2.5.4 η Τυροσίνη Z	42
1.2.5.5 Απόσπαση πρωτονίων από το Mn ₄ CaO ₅	44
1.2.5.6 Διάλυτοι και δίκτυα δεσμών Η στο ΦΣ II.....	47
1.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ EPR	50
1.3.1 Εισαγωγή.....	50
1.3.2 Σπιν και μαγνητική ροπή.....	50
1.3.3 Το φαινόμενο Zeeman	52
1.3.4 Ο παραμαγνητικός συντονισμός.....	52
1.3.5 Ο παράγοντας g	53
1.3.6 Ενώσεις που δίνουν σήμα EPR.....	55
1.3.7 Διαπλάτυνση των γραμμών απορρόφησης	56
1.3.8 Δυναμική του σπιν	57
1.3.9 Ροή ενέργειας και χρόνοι αποδιέγερσης	58
1.3.10 Υπέρλεπτες αλληλεπιδράσεις.....	60

1.3.11 Αλληλεπιδράσεις σπιν - σπιν	62
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	63
2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ II	63
2.1.1 Σύσταση Διαλυμάτων	63
2.1.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης μεμβρανών BBY	64
2.1.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης	65
2.1.4 Αλλαγή του pH των δειγμάτων	65
2.1.5 Προετοιμασία των δειγμάτων	66
2.1.6 Φωτισμός δειγμάτων	67
2.1.7 Παγίδευση καταστάσεων $S_nTyr_z^{\cdot}$	68
2.1.8 Δημιουργία της $S_2Fe^{III}Q_A$ -atr κατάστασης (σταθερή S_2 , χωρίς διαθέσιμη Q_B)	69
2.2 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ EPR	70
2.2.1 Γέφυρα μικροκυμάτων	71
2.2.2 Κοιλότητα συντονισμού	72
2.2.3 Μαγνήτης.....	74
2.2.4 Καταγραφή του σήματος: ανιχνευτής 'Lock in' και υπολογιστής	74
2.2.5 Κρυοστάτης.....	75
2.3 ΣΗΜΑΤΑ EPR ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ II.....	77
2.3.1 Το σήμα της Tyr_D^{\cdot} (σήμα II).....	77
2.3.2 Το σήμα του Fe^{III} της πλευράς του αποδέκτη	78
2.3.3 Τα σήματα της S_2	79
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	81
3.1 $S_2Tyr_z^{\cdot}$ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΜΕΘΑΝΟΛΗ ΣΕ pH = 5.5 – 7.5	83
3.1.1 Εισαγωγικά	83
3.1.2 Σύγκριση διαφορετικών επεξεργασιών των δειγμάτων.....	84
3.1.3 Επίδραση του pH στην ενεργότητα των δειγμάτων καί σε γνωστά σήματα EPR	85
3.1.4 Παγίδευση της $S_2Tyr_z^{\cdot}$ στη θερμοκρασία ημιαναστολής της μετάβασης $S_2 \rightarrow S_3$ σε δείγματα με μεθανόλη	87

3.1.5 Επίδραση του pH στο σήμα μετάλλου – ρίζας της κατάστασης S_2Tyr_z' με μεθανόλη	89
3.1.6 Η εξαιρετική σταθερότητα του φωτοεπαγόμενου σήματος S_2Tyr_z' των 233 K οφείλεται στον σχηματισμό Q_B^-	90
3.1.7 Αύξηση του φωτοεπαγόμενου σήματος στους 10 K στα προ-φωτισμένα δείγματα. Ανάλυση του σήματος σε δύο συνιστώσες,	92
3.1.8 Έμμεσος προσδιορισμός του ποσοστού των κέντρων που παγιδεύονται στην κατάσταση S_2Tyr_z'	95
3.1.9 Πτώση του σήματος σε θερμοκρασίες 150 K - 180 K, διάκριση των δύο συνιστωσών	97
3.1.10 Το φάσμα του παγιδευμένου σήματος σε θερμοκρασίες 150 K -180 K	98
3.1.11 Σύγκριση της κινητικής πτώσης του παγιδευμένου σήματος των 233 K με το σήμα που επάγεται στους 150 K	100
3.1.12 Δότες ηλεκτρονίου προς την Tyr_z κατά την αναγωγή της στους 150 - 180 K	102
3.1.13 Μελέτη του παγιδευμένου σήματος της S_2Tyr_z' στην μικροκυματική ζώνη Q	105
3.2 Η ΜΕΤΑΒΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ S_3TYR_z' : ΤΟ ΤΕΛΕΥΤΑΙΟ ΒΗΜΑ ΠΡΙΝ ΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ O_2	106
3.2.1 Εισαγωγικά	106
3.2.2 Περιορισμοί και πλεονεκτήματα στην παγίδευση της S_3Tyr_z' σε σχέση με την παγίδευση της S_2Tyr_z'	107
3.2.3 Η S_3Tyr_z' σε δείγματα με μεθανόλη	108
3.2.4 Σύγκριση του φάσματος της S_3Tyr_z' και της S_2Tyr_z' με μεθανόλη	110
3.2.5 S_3Tyr_z' σε δείγματα χωρίς μεθανόλη	111
3.3 ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΠΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ Tyr_z' ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ 200 – 230 K	113
3.3.1 Κινητικές σημείου, εισαγωγικά	113
3.3.2 Η S_3Tyr_z' σχηματίζεται μόνο πολύ κοντά στη θερμοκρασία της μετάβασης $S_3 \rightarrow S_0$	117
3.3.3 Κινητική αναγωγής της S_2Tyr_z' και της S_3Tyr_z' από το Mn_4CaO_5	118
3.3.4 Χρόνοι ημιζωής της Tyr_z'	121
3.4 ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΕΩΝ ΤΗΣ S_2	123
ΣΥΝΟΨΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	126
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	134
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	135

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	136
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.....	137
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	138

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1.1: Η ροή ενέργειας στον βιολογικό κόσμο	21
Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση κάθετης τομής φύλλου, χλωροπλάστη και θυλακοειδούς	22
Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων των θυλακοειδών.....	23
Εικόνα 1.4: Μοριακή οργάνωση των μεμβρανών των θυλακοειδών.	24
Εικόνα 1.5: Το φυτικό ΦΣ II όπως φαίνεται από την πλευρά του στρώματος	25
Εικόνα 1.6: Το φωτόςύστημα II των κυανοβακτηρίων, όπως φαίνεται από την πλευρά του κυτταροπλάσματος.....	26
Εικόνα 1.7: Δομή του ΦΣ II.	27
Εικόνα 1.8: Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του ΦΣ II: εικόνα κάθετα στο επίπεδο της μεμβράνης.....	28
Εικόνα 1.9: Το σύμπλοκο της σιδηροκινόνης.....	32
Εικόνα 1.10: Η δομή του συμπλόκου Mn_4CaO_5	35
Εικόνα 1.11: Συσσώρευση οξειδωτικών ισοδυνάμων κατά την οξείδωση δύο μορίων H_2O σε O_2 χωρίς καταλύτη (κύκλοι) και με καταλύτη το ΦΣ II (τετράγωνα)	39
Εικόνα 1.12: Ο κύκλος των S – καταστάσεων.....	40
Εικόνα 1.13: Οι δύο πιθανοί μηχανισμοί για τον σχηματισμό του O_2	41
Εικόνα 1.14: Ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίου προς το $P680^+$ και πρωτονίου προς την ιστιδίνη 190, κατά την οξείδωση της τυροσίνης Z.....	43
Εικόνα 1.15: Τα δύο πιθανά μοντέλα για την απόσπαση H^+ από το Mn_4CaO_5	45
Εικόνα 1.16: Κανάλια του ΦΣ II	48
Εικόνα 1.17: Το δίκτυο των δεσμών H που συνδέει το σύμπλοκο Mn_4CaO_5 με την Tyr _Z , την His 190 και την Asn 298	49

Εικόνα 1.18: Μαγνητικό πεδίο, σπιν και μαγνητική ροπή.....	51
Εικόνα 1.19: Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο προσανατολισμένο παράλληλα στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο προσανατολίζεται αντιπαράλληλα με απορρόφηση ακτινοβολίας κατάλληλου μήκους κύματος.	53
Εικόνα 1.20: Διάγραμμα ενέργειας για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο ($S = \frac{1}{2}$) συναρτήσει του μαγνητικού πεδίου, που δείχνει την απορρόφηση EPR.....	54
Εικόνα 1.21: Η επίδραση του μαγνητικού πεδίου στις ενεργειακές καταστάσεις του σπιν.	55
Εικόνα 1.22: Μορφές της γραμμής απορρόφησης: λορεντζιανή και γκαουσιανή.....	57
Εικόνα 1.23: Ροή ενέργειας ανάμεσα στην μικροκυματική ακτινοβολία, το σύστημα σπιν και το πλέγμα.....	59
Εικόνα 1.24: Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων σε ένα σύστημα με $S = I = \frac{1}{2}$	61
Εικόνα 2.1: Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την παγίδευση των καταστάσεων $S_nY_z^{\cdot}$	69
Εικόνα 2.2: Σχηματική απεικόνιση του φασματομέτρου EPR.....	71
Εικόνα 2.3: Σχηματική απεικόνιση της γέφυρας μικροκυμάτων.	72
Εικόνα 2.4: η κοιλότητα συντονισμού Bruker 4102ST	73
Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση του κρουστάτη φασματομέτρου EPR σε μικροκυματική ζώνη X.	76
Εικόνα 2.6: Το σήμα της Tyr_D^{\cdot} ή σήμα II	77
Εικόνα 2.7: Τα φωτοεπαγόμενα σήματα του Fe^{III}	78
Εικόνα 2.8: Τα δύο χαρακτηριστικά σήματα EPR της S_2	79
Εικόνα 2.9: (α) Η κρυσταλλική δομή του Mn_4CaO_5 , (β) οι υπολογισμένες θεωρητικά δομές του Mn_4CaO_5 στην S_2	80
Εικόνα 3.1: Τα χαρακτηριστικά σήματα μετάλλου - ρίζας των καταστάσεων $S_0Tyr_z^{\cdot}$, $S_1Tyr_z^{\cdot}$, $S_2Tyr_z^{\cdot}$ και $S_2Tyr_z^{\cdot} + CH_3COO^-$	82

Εικόνα 3.2: Το παγιδευμένο σήμα της S_2Tyrz'	85
Εικόνα 3.3: Επίδραση της αλλαγής του pH σε δύο χαρακτηριστικά σήματα	86
Εικόνα 3.4: Παγίδευση της S_2Tyrz' σε δείγματα με 5% v/v μεθανόλη και pH = 5.5, 6.5 και 7.5, με παλμό στους 233 K και γρήγορη κατάψυξη	88
Εικόνα 3.5: S_2Yz' (233 K) σε δείγματα με 5% v/v μεθανόλη και pH = 5.5, 6.5 και 7.5.	89
Εικόνα 3.6: Η σταθερότητα του σήματος S_2Tyrz' (233 K) οφείλεται στον σχηματισμό της Q_B^-	91
Εικόνα 3.7: Φωτοεπαγόμενο σήμα των 10 K στην S_2 (α), μετά τον σχηματισμό της σταθερής S_2Tyrz' (β) και μετά το τελικό σκοτάδι (γ)	93
Εικόνα 3.8: Διαφορά του φωτοεπαγόμενου σήματος σε ψηλή θερμοκρασία μείον ένα πολλαπλάσιο του σήματος των 10 K, για τα τρία διαφορετικά pH.	94
Εικόνα 3.9: Με την δημιουργία της ρίζας μειώνεται το πολυγραμμικό και με την πτώση της, αυξάνεται.....	96
Εικόνα 3.10: Πτώση του σταθερού σήματος της S_2Tyrz' με επώαση στους 150 K – 180 K	97
Εικόνα 3.11: Πτώση του σήματος της S_2Tyrz' (233 K) στους 150 K	99
Εικόνα 3.12: Το φάσμα της S_2Tyrz' σε θερμοκρασία 150 K.....	100
Εικόνα 3.13: Κινητική πτώσης της S_2Tyrz' που παγιδεύεται με παλμό στους 233 K και γρήγορο πάγωμα	101
Εικόνα 3.14: Σε pH = 5.5, η αναγωγή της σταθερής S_2Tyrz' με επώαση του δείγματος στους 150 K συνοδεύεται από εμφάνιση σήματος της chl^+	103
Εικόνα 3.15: Διαφορετική συμπεριφορά του δείγματος κατά την επώαση στους 150 K, ανάλογα με το pH στο οποίο βρίσκεται	104
Εικόνα 3.16: Η παγιδευμένη S_2Tyrz' επανασυνδέεται οξειδώνοντας την χλωροφύλλη με επώαση στους 144 K.....	105
Εικόνα 3.17: Φάσμα της S_2Tyrz' στη ζώνη Q σε σύγκριση με το φάσμα σε ζώνη X..	106

Εικόνα 3.18: Παγίδευση της S_3Tyr_Z' σε δείγματα με 5% v/v μεθανόλη με παλμό στους 250 K και ταχεία ψύξη.....	109
Εικόνα 3.19: Σύγκριση του φάσματος της S_3Tyr_Z' με το φάσμα της S_2Tyr_Z' με 5% v/v μεθανόλη και pH = 6.5.....	111
Εικόνα 3.20: Παγίδευση της S_3Tyr_Z' σε μη τροποποιημένα δείγματα με παλμό στους 250 K και γρήγορο πάγωμα.	112
Εικόνα 3.21: Το αρχικό σκοτάδι πριν τον παλμό και το σημείο στο οποίο καταγράφεται η κινητική της οξειδωσης της S_2Tyr_Z' και της αναγωγής της στη συνέχεια από το Mn_4CaO_5	115
Εικόνα 3.22: Σύγκριση μεθόδων για την κατασκευή της κινητικής πτώσης της S_2Tyr_Z'	116
Εικόνα 3.23: Δημιουργία και πτώση της Tyr_Z' με παλμό στους 223 K μέσα στην κοιλότητα	117
Εικόνα 3.24: Κινητική πτώσης του σήματος της S_2Tyr_Z' στους 225 K.....	118
Εικόνα 3.25: Κινητική πτώσης της " S_3Tyr_Z' " μετά από παλμό στους 246 K	119
Εικόνα 3.26: Κινητική πτώσης της " S_3Tyr_Z' " σε δείγμα με μεθανόλη στους 250 K..	120
Εικόνα 3.27: Ένταση της S_2Tyr_Z' που σχηματίζεται με παλμό μέσα στην κοιλότητα συναρτήσει της θερμοκρασίας.....	121
Εικόνα 3.28: Χρόνοι ημιζωής των δύο φάσεων της κινητικής πτώσης της S_2Tyr_Z' (και της S_3Tyr_Z') συναρτήσει της θερμοκρασίας.....	122
Εικόνα 3.29: Ποσοστά κέντρων που ακολουθούν τις δύο φάσεις της κινητικής συναρτήσει της θερμοκρασίας.....	122
Εικόνα 3.30: Σύγκριση του περιβάλλοντος του Mn_4CaO_5 στα κυανοβακτήρια.....	123
Εικόνα 3.31: Το Cl^- συνδέεται μέσω δεσμού H με τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ του Glu 333 και της His 332, που είναι υποκαταστάτες του Mn4 και Mn1 αντίστοιχα. .	124
Εικόνα 3.32: Αν δεν σχηματιστεί Tyr_Z' δεν γίνεται η μετατροπή του $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό σήμα κατά την μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$	125

Εικόνα 4.1: το μόριο του νερού και της μεθανόλης.....	131
Εικόνα 4.2: Το Mn_4CaO_5 και η Tyr_z	132

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο EPR του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» από τον Σεπτέμβριο του 2011 μέχρι τον Μάιο του 2015, σε συνεργασία με το εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, και ιδιαιτέρως τον κ. Βασίλειο Πετρουλέα που με καθοδήγησε όλα αυτά τα χρόνια. Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Παναγιώτη Κυρίτση για το συνεχές ενδιαφέρον για την πρόοδο της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κ. Χριστιάννα Μητσοπούλου.

Ακόμη, ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Κωνσταντίνο Μεθενίτη, την κ. Πατρίνα Παρασκευοπούλου, τον κ. Ιωάννη Σανάκη, την κ. Αικατερίνη Ραπτοπούλου και τον κ. Διονύσιο Κουλουγλιώτη για το χρόνο που διέθεσαν για την εργασία μου και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους.

Ιδιαιτέρως ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου EPR, τον κ. Νικόλαο Ιωαννίδη και την κ. Γεωργία Ζαχαρίου για την πολύτιμη βοήθειά τους και το χρόνο που αφιέρωσαν για μένα. Ακόμη, ευχαριστώ πολύ τον κ. Μιχάλη Τζίφα, τον τεχνικό του υγροποιητή ηλίου του Δημοκρίτου, που παρείχε το υγρό ήλιο για τα πειράματα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Τέλος, ευχαριστώ το ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την χορήγηση της υποτροφίας για την εκπόνηση της διατριβής.

Η προσπάθεια αυτή αφιερώνεται στους γονείς, που μου χάρισαν την ζωή, στους δασκάλους, που μου έδειξαν την ομορφιά της ζωής, και ιδιαίτερα στον κ. Βασίλη Πετρουλέα που με μύησε στα μυστικά της Φωτοσύνθεσης, καθώς και στους φίλους που γεμίζουν με χαρά τη ζωή!

1. Εισαγωγή

Αρχικά, περιγράφεται το πρωτεϊνικό σύμπλοκο που μελετήθηκε, το Φωτοσύστημα II των φυτών και, ιδιαίτερα, το σύμπλοκο Mn_4CaO_5 όπου γίνεται η διάσπαση του H_2O , ενώ παρουσιάζονται τα ανοιχτά ερωτήματα σχετικά με τον μηχανισμό διάσπασης του H_2O . Στη συνέχεια, περιγράφονται οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας EPR, της πειραματικής μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.

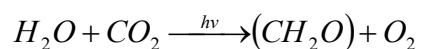
1.1 Φωτοσύνθεση

εἶπεν ὁ Θεός· γενηθήτω φῶς· καὶ ἐγένετο φῶς

... καὶ εἶπεν ὁ Θεός· βλαστησάτω ἡ γῆ βοτάνην χόρτου

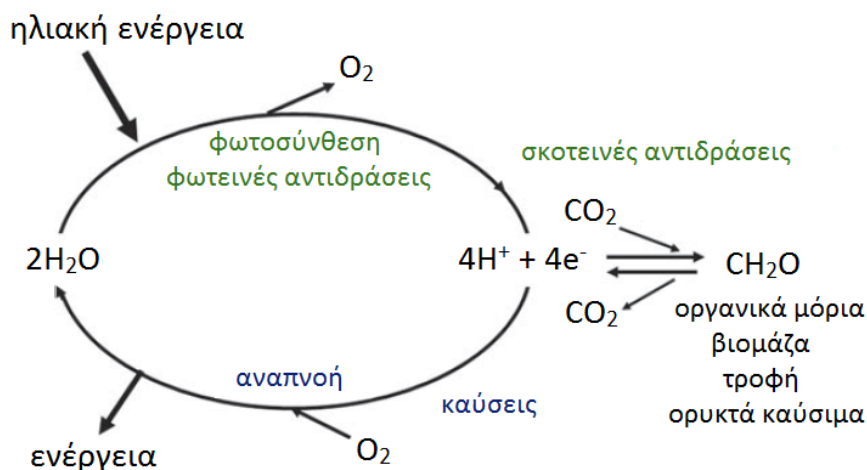
Γεν. Α', 3, 11

Φωτοσύνθεση είναι η αναγωγή του CO_2 της ατμόσφαιρας σε υδατάνθρακες από τους φυτικούς οργανισμούς και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια. Η ενέργεια προσφέρεται από τον ήλιο και ως αναγωγικό χρησιμοποιείται το H_2O . Η γενική αντίδραση της φωτοσύνθεσης είναι:

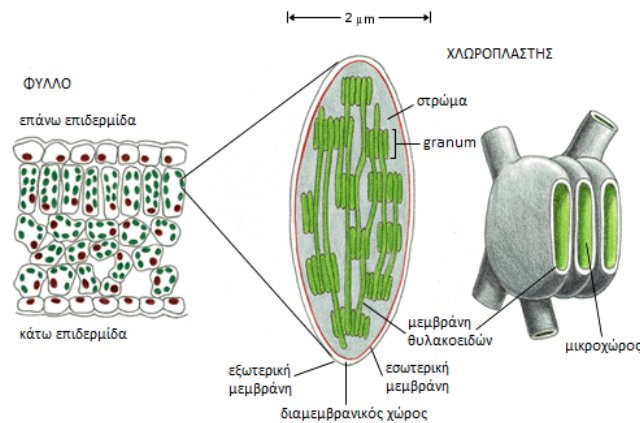


Οργανισμοί που φωτοσυνθέτουν είναι τα φυτά, τα φύκη, τα κυανοβακτήρια (ή κυανοφύκη) και ορισμένα βακτήρια. Τα βακτήρια δεν χρησιμοποιούν ως δότη ηλεκτρονίου το νερό και δεν παράγουν οξυγόνο (Γαλάτης και λοιποί, Εισαγωγή στη Βοτανική 1998).

Με την φωτοσύνθεση η ηλιακή ενέργεια μετατρέπεται σε μορφή αξιοποιήσιμη από τους ζωντανούς οργανισμούς. Μέσω αυτής, παράγονται όλα τα δομικά και λειτουργικά συστατικά των φυτών και στη συνέχεια όλων των υπόλοιπων ζωντανών οργανισμών. Το οξυγόνο που ελευθερώνεται ως παραπροϊόν, χρησιμοποιείται από τους ετερότροφους οργανισμούς για την καύση των υδατανθράκων της τροφής τους στα μιτοχόνδρια. Οι υδατάνθρακες αυτοί έχουν παραχθεί μέσω της φωτοσύνθεσης. Στα μιτοχόνδρια γίνεται η αντίστροφη αντίδραση της φωτοσύνθεσης και παράγεται η αναγκαία για τον οργανισμό ενέργεια. Το οξυγόνο που ελευθερώνεται κατά την φωτοσύνθεση, δημιουργεί επίσης το προστατευτικό για τη ζωή στρώμα του όζοντος. Είναι αμφίβολο εάν θα υπήρχε ζωή επάνω στη γη χωρίς την φωτοσύνθεση και εάν υπήρχε, θα ήταν εξαιρετικά πρωτόγονη.



Εικόνα 1.1: Η ροή ενέργειας στον βιολογικό κόσμο: (Από Barber & Tran 2013, τροποποιημένο). Η ενέργεια του ήλιου μέσω της φωτοσύνθεσης μετατρέπεται σε τροφή όλων των οργανισμών καθώς και σε βιομάζα και μέσω της αντίστροφης πορείας της αναπνοής ελευθερώνεται στο περιβάλλον ως θερμότητα.

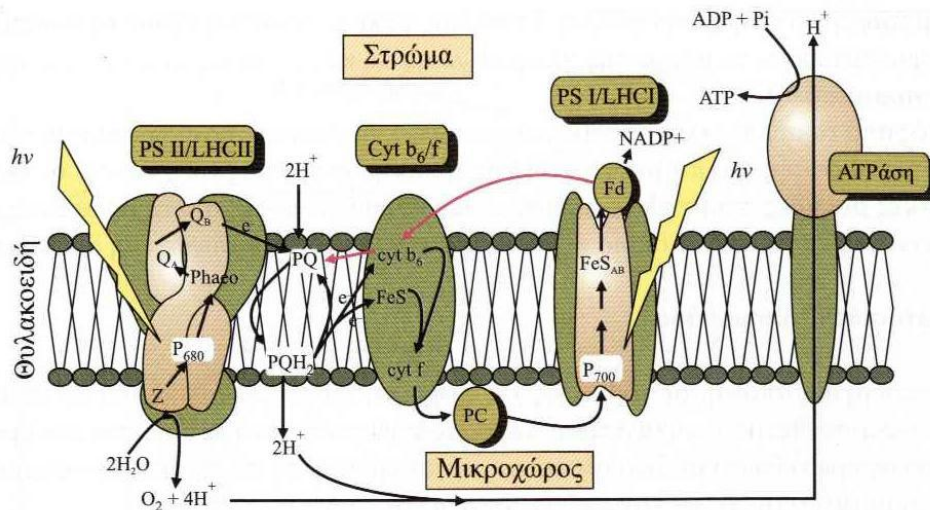


Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση κάθετης τομής φύλλου, χλωροπλάστη και θυλακοειδούς (Από *Alberts, Molecular Biology of the Cell*).

Στα φυτά, η φωτοσύνθεση γίνεται στους χλωροπλάστες. Οι χλωροπλάστες περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη. Η εσωτερική μεμβράνη περιβάλλει το στρώμα. Στο στρώμα υπάρχει ένα δίκτυο μεμβρανών, που αποτελείται από θυλακοειδείς μεμβράνες που σχηματίζουν σωρούς που ονομάζονται grana (εικόνα 1.2). Το εσωτερικό των θυλακοειδών ονομάζεται αυλός (lumen) ή μικροχώρος.

Οι αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης χωρίζονται σε φωτεινές και σκοτεινές, οι πρώτες απαιτούν φως για να γίνουν, ενώ οι δεύτερες όχι. Κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις, παράγεται γλυκόζη από το CO_2 . Για να γίνει αυτό απαιτείται ενέργεια (ATP) και αναγωγική ισχύς (NADPH), τα οποία παράγονται κατά τις φωτεινές αντιδράσεις. Τα περισσότερα ένζυμα που παίρνουν μέρος στις σκοτεινές αντιδράσεις βρίσκονται στο στρώμα των χλωροπλάστων.

Οι φωτεινές αντιδράσεις πραγματοποιούνται στις μεμβράνες των θυλακοειδών των χλωροπλάστων και σε αυτές συμμετέχουν τέσσερα διαμεμβρανικά σύμπλοκα πρωτεϊνών: το φωτοσύστημα II (ΦΣ II), το σύμπλοκο κυτοχρωμάτων b_6f , το φωτοσύστημα I (ΦΣ I), η συνθετάση του ATP και δύο διαλυτές πρωτεΐνες: η πλαστοκυανίνη και η αναγωγάση του ζεύγους φερρεδοξίνης – NADP^+ . Διαμέσου αυτών των πρωτεϊνών γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων από το H_2O προς το NADP^+ .



Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων των θυλακοειδών. [Από Φυσιολογία Φυτών, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Κεφάλαιο 5, Γανωτάκης, Κοτζαμπάσης].

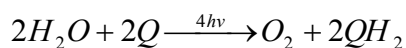
Το H_2O συνδέεται στο σύμπλοκο διάσπασης του νερού (ΣΔΝ), το Mn_4CaO_5 , του ΦΣ II και ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω του ΦΣ II προς την πλαστοκινόνη, η οποία μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο κυτόχρωμα b_6/f . Στη συνέχεια, μέσω της πλαστοκυανίνης τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο ΦΣ I και από εκεί στη φερρεδοξίνη και με τη βοήθεια της αναγωγάσης $Fd - NADP^+$, στο $NADP^+$. Η ενέργεια που απαιτείται για την μεταφορά των ηλεκτρονίων παρέχεται από το φως που απορροφάται από τις χλωροφύλλες των ΦΣ I και ΦΣ II. Ταυτόχρονα με την κίνηση των ηλεκτρονίων, μετακινούνται H^+ προς το εσωτερικό των θυλακοειδών και έτσι δημιουργείται βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων. Στη συνέχεια, λόγω της διαφοράς συγκέντρωσης, τα H^+ μεταφέρονται μέσω της ATP – συνθετάσης στο στρώμα, ενεργοποιώντας, με αυτό τον τρόπο, την φωσφορυλίωση του ADP (εικόνα 1.3).

1.2 Το φωτοσύστημα II

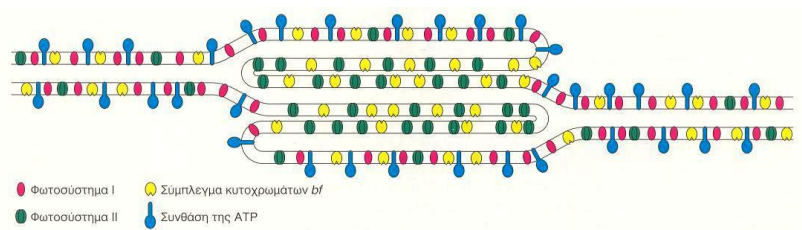
αγαπώ τα μικρά ανοιξιάτικα φυλλαράκια,
τα νωπά ακόμα...

Φ. Ντοστογιέβσκη, αδελφοί Καραμαζωφ

Το ΦΣ II διασπά το H₂O και αποδίδει ηλεκτρόνια στην πλαστοκινόνη Q, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για να αναχθεί το CO₂ σε γλυκόζη. Επίσης, παράγονται H⁺ τα οποία ελευθερώνονται στον αυλό, ώστε να δημιουργηθεί βαθμίδωση συγκέντρωσης H⁺ και να λειτουργήσει η συνθετάση του ATP. Η αντίδραση που επιτελείται στο ΦΣ II είναι η παρακάτω:



Το ΦΣ II εντοπίζεται στις μεμβράνες των grana, στα σημεία τα οποία δεν έρχονται σε επαφή με το στρώμα του χλωροπλάστη (εικόνα 1.4). Λειτουργεί σε όλους τους οργανισμούς που φωτοσυνθέτουν διασπώντας H₂O: στα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια. Η γενική δομή είναι η ίδια σε όλους τους οργανισμούς, καθώς και η λειτουργία του.



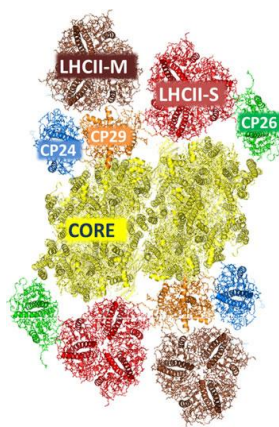
Εικόνα 1.4: Μοριακή οργάνωση των μεμβρανών των θυλακοειδών. Το φωτοσύστημα II εντοπίζεται κυρίως στα grana. (Από Βιοχημεία I, J.M.Berg, J.L.Tymoczko, L.Stryer).

1.2.1 Η δομή του φωτοσυστήματος II

Το ΦΣ II έχει μοριακό βάρος 350 kDa και αποτελείται από 20 υπομονάδες, 17 διαμεμβρανικές και 3 διαλυτές (εικόνες 1.6 και 1.7). Η δομή του στα θερμόφιλα

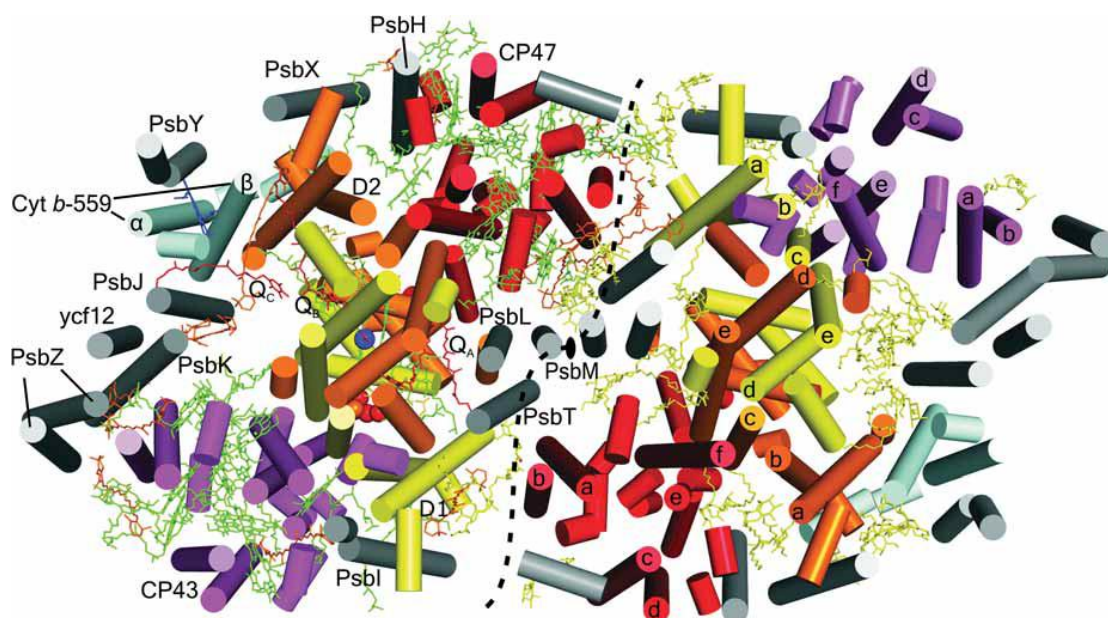
κυανοβακτήρια *Thermosynechococcus elongatus* και *Thermosynechococcus vulcanus* έχει προσδιοριστεί την τελευταία δεκαετία με κρυσταλλογραφία ακτίνων – Χ (Zouni et al. 2001, Ferreira et al. 2004, Biesiadka et al. 2004, Loll et al. 2005, Guskov et al. 2009, Umena et al. 2011). Ο προσδιορισμός της δομής του είναι μεγάλο επίτευγμα για την κρυσταλλογραφία, καθώς οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες δεν είναι εύκολο να κρυσταλλωθούν και, επιπλέον, το ΦΣ II αποτελείται από πολλές υπομονάδες. Το φυτικό ΦΣ II έχει μελετηθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία (Rhee et al. 1998, Hankamer et al. 2001) και με ακτίνες – Χ (Rhee et al. 1998). Οι δομές αυτές όμως είναι χαμηλής διακριτικής ικανότητας. Ωστόσο, διακρίνεται η διευθέτηση των διαμεμβρανικών ελίκων και φαίνεται η ομοιότητα με το ΦΣ II των κυανοβακτηρίων. Οι κύριες διαφορές μεταξύ του ΦΣ II των δύο οργανισμών είναι στις τρεις μη διαμεμβρανικές υπομονάδες, που βρίσκονται στην πλευρά του μικροχώρου.

Το ΦΣ II είναι διμερές, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.5 (κίτρινο). Τα δύο μονομερή είναι συμμετρικά τοποθετημένα και στα ανώτερα φυτά γύρω τους προσδένονται σύμπλοκα συλλογής φωτός (light-harvesting complexes, Lhcs): το LHC II (Light Harvesting Complex II), το CP26 και το CP29 (Nield & Barber 2006) και το CP24 (Amerongen & Croce 2013). Τα σύμπλοκα αυτά είναι πλούσια σε χλωροφύλλη, η οποία διεγείρεται από το ηλιακό φως και η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται από χλωροφύλλη σε χλωροφύλλη στο κέντρο αντίδρασης, στον πυρήνα του κάθε μονομερούς. Στα κυανοβακτήρια τα σύμπλοκα συλλογής φωτός είναι διαφορετικά.



Εικόνα 1.5: Το φυτικό ΦΣ II όπως φαίνεται από την πλευρά του στρώματος. Ο πυρήνας (core) του ΦΣ II φαίνεται με κίτρινο, ενώ γύρω είναι τοποθετημένες οι φωτοσυλλεκτικές κεραίες, άλλες πιο ισχυρά (S) και άλλες πιο χαλαρά συνδεδεμένες (M). (Από Amerongen & Croce 2013).

Το καθένα από τα δύο μονομερή παρουσιάζει και εσωτερικά (ψευδο)συμμετρία. Στο κέντρο του βρίσκονται συμμετρικά τοποθετημένες οι αλυσίδες D1 (PsbA) και D2 (PsbD), οι οποίες αποτελούν το κέντρο αντίδρασης και η καθμία αποτελείται από 5 διαμεμβρανικές έλικες (εικόνα 1.6). Επάνω τους βρίσκονται όλα τα μόρια που συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το H₂O στην πλαστοκινόνη: το σύμπλοκο Mn₄CaO₅ επάνω στο οποίο προσδέεται το H₂O, η οξειδοαναγωγικά ενεργή Τυροσίνη – 161 της D1 υπομονάδας, γνωστή ως Tyr_Z, ένα ειδικό σύμπλοκο τεσσάρων χλωροφυλλών, το P680, όπου γίνεται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου, 2 φαιοφυτίνες, 2 πλαστοκινόνες και ένα ιόν μη αιμικού σιδήρου (εικόνα 1.7).



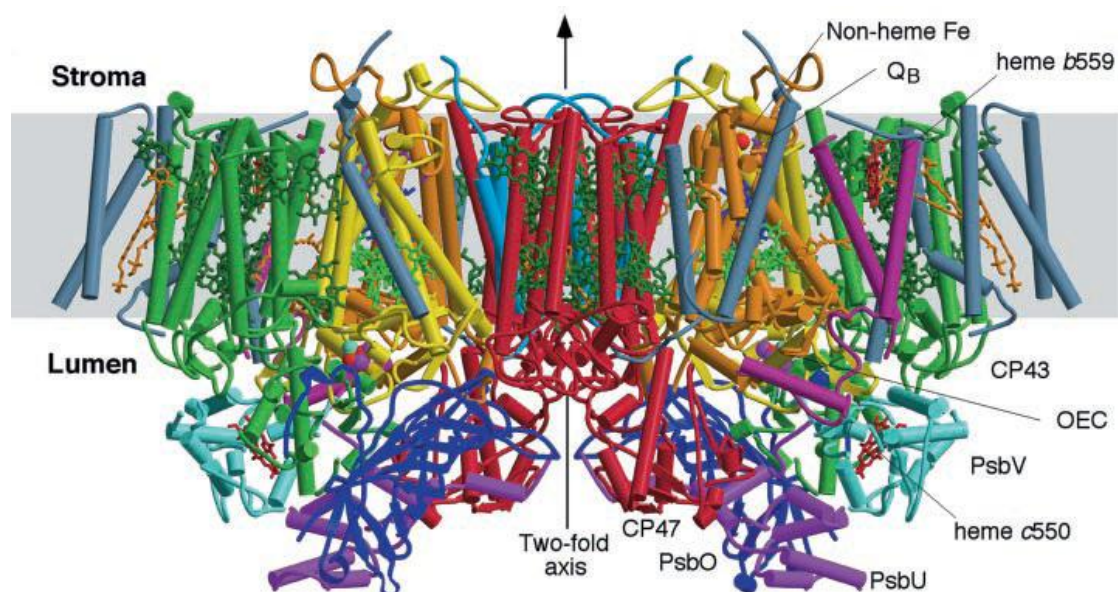
Εικόνα 1.6: Το φωτοσύνθεμα II των κυανοβακτηρίων, όπως φαίνεται από την πλευρά του κυτταροπλάσματος. Η διεπιφάνεια των δύο μονομερών είναι σχεδιασμένη με διακεκομμένη μαύρη γραμμή και ο άξονας συμμετρίας που συνδέει τα δύο μονομερή με μαύρη έλλειψη. Στο μονομερές I φαίνονται οι χλωροφύλλες (πράσινο), τα καροτενοειδή (πορτοκαλί), η αίμη (μπλε), η φαιοφυτίνη (κίτρινο), οι πλαστοκινόνες (κόκκινο), το σύμπλοκο Mn₄CaO₅ (κόκκινες και πορτοκαλί σφαίρες) και ο μη αιμικός σίδηρος (μπλε). (Από *Guskov et al.* 2009).

Η συμμετρία δεν είναι απόλυτη, το μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων από το H₂O προς την πλαστοκινόνη βρίσκεται κυρίως στην D1 υπομονάδα (μόνο η Q_A βρίσκεται επάνω στην D2), ενώ στην D2 λειτουργεί ένα δευτερογενές μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων που δρα φωτοπροστατευτικά σε συνθήκες έντονου

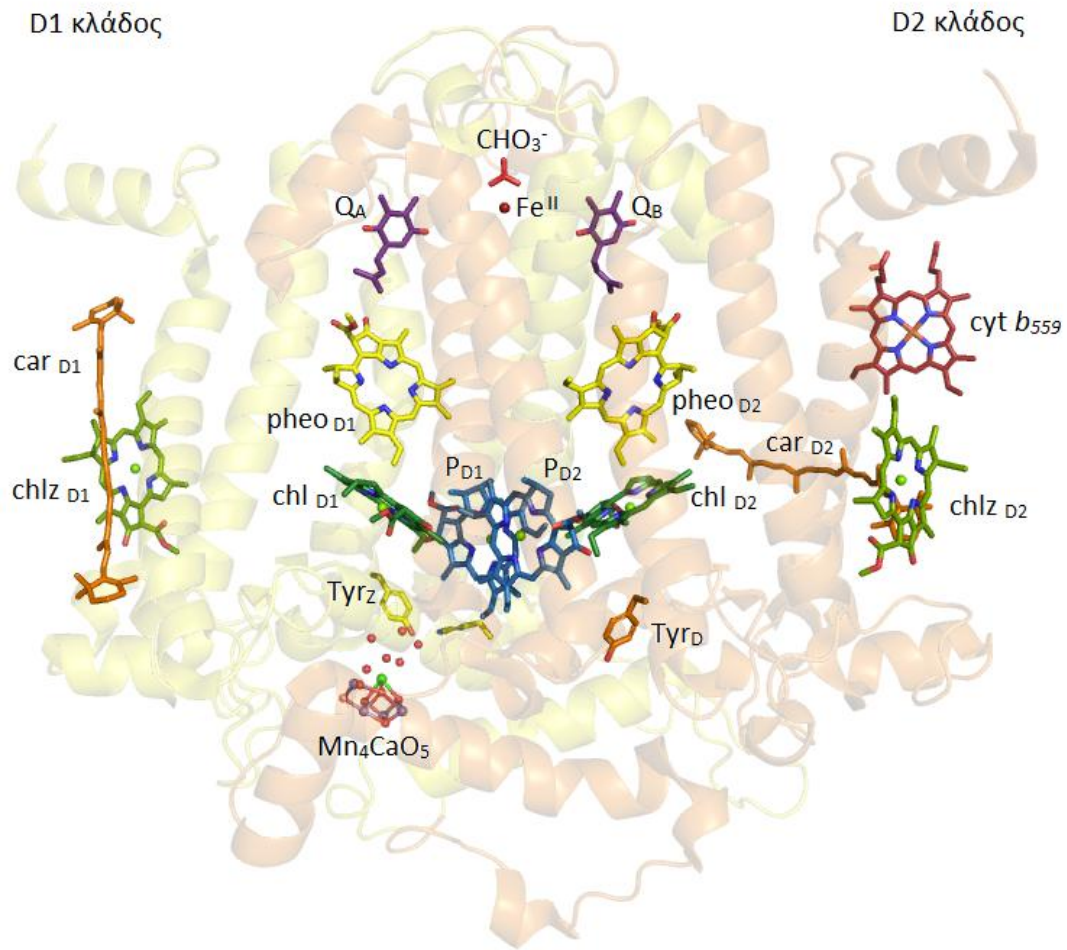
φωτισμού (Shinopoulos & Brudvig 2012). Στο μονοπάτι αυτό συμμετέχουν ένα β - καροτένιο και η chl_Z D₂ της D2.

Αντιδιαμετρικά τοποθετημένες, πλάι στις D1 και D2, αντίστοιχα, βρίσκονται οι δύο υπομονάδες CP43 (PsbC) και 47 (PsbB) (CP: chlorophyll - binding proteins), αποτελούμενες από 6 διαμεμβρανικές έλικες η καθεμιά, κυκλικά τοποθετημένες, σε ζεύγη. Οι δύο αυτές υπομονάδες λειτουργούν ως κεραίες και μεταφέρουν την ενέργεια διέγερσης από τις εξωτερικές κεραίες (LHC II, CP26, 29 και 24) στο P680, όπου γίνεται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου (Nield & Barber 2006). Για αυτό, επάνω στην καθεμιά βρίσκονται τοποθετημένα 13 – 16 μόρια χλωροφύλλης και 5 β - καροτένια (Umeha et al. 2011, εικόνες 1.6 και 1.7).

Γύρω από τον πυρήνα CP43/D1/D2/CP47 βρίσκονται άλλες 13 υπομονάδες, οι οποίες έχουν βοηθητικό ρόλο και όλες, εκτός από την Z, αποτελούνται από μια διαμεμβρανική έλικα.



Εικόνα 1.7: Δομή του ΦΣ II. Διαμεμβρανικές υπομονάδες: D1: κίτρινο, D2: πορτοκαλί, CP47: κόκκινο, CP43: πράσινο, cyt *b*₅₅₉: μωβ, PsbL, M, T: ανοιχτό μπλε, PsbH, I, J, K, X, Z, N: γκρι. Εξωτερικές υπομονάδες: PsbO: μπλε, PsbU: μωβ, PsbV: γαλάζιο. Χλωροφύλλες ενεργού κέντρου: ανοιχτό πράσινο, χλωροφύλλες κεραιών: σκούρο πράσινο, φαιοφυτίνες: μπλε, καροτενοειδή: πορτοκαλί, αίμη και μη αιμικός σίδηρος: κόκκινο, Q_A και Q_B: μωβ. Σύμπλοκο Mn₄CaO₅: O: κόκκινο, Mn: μωβ, Ca^{II}: γαλάζιο. (Από Ferreira et al. 2004).



Εικόνα 1.8: Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του ΦΣ II: εικόνα κάθετα στο επίπεδο της μεμβράνης. Διακρίνονται: οι τέσσερις χλωροφύλλες του P680 με σκούρο μπλε (P_{D1} , P_{D2}) και πράσινο (chl_{D1} , chl_{D2}), οι φαιοφυτίνες ($pheo_{D1}$, $pheo_{D2}$) με κίτρινο, οι κινόνες Q_A και Q_B με μωβ, η οξειδοαναγωγικά ενεργή τυροσίνη Tyr_Z με κίτρινο, το σύμπλοκο Mn_4CaO_5 (Mn: μωβ, Ca: πράσινο, O: κόκκινο), καθώς και τα μόρια του D2 κλάδου που δρουν προστατευτικά: η αίμη του κυτοχρώματος b_{559} με κόκκινο, ένα β - καροτένιο (πορτοκαλί) και μια χλωροφύλλη (ανοιχτό πράσινο) του D2 κλάδου.

Δίπλα στην D2 βρίσκεται το κυτόχρωμα b_{559} (Cyt b_{559}), που συμμετέχει στο δευτερογενές μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων του κλάδου της D2. Αποτελείται από τις PsbE (α υπομονάδα) και PsbF (β υπομονάδα). Ένα μόριο αίμης είναι συνδεδεμένο με δύο συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης των α και β υπομονάδων (Ferreira et al. 2004). Το δυναμικό του cyt b_{559} ποικίλει, στο μη τροποποιημένο ένζυμο είναι εξαιρετικά υψηλό (375 mV), αντίθετα στο κατεστραμμένο ΦΣ II το δυναμικό είναι χαμηλό (5mV) (Thompson et al. 1989, Muh et al. 2012). Είναι

δότης ηλεκτρονίου προς το P680 όταν το ΣΔΝ είναι ανενεργό (*Thompson & Brudvig 1988, Thompson et al. 1989, Buser et al. 1992*). Η οξειδωμένη μορφή του μπορεί να λειτουργήσει ως αποδέκτης ηλεκτρονίου από την ανηγμένη φαιοφυτίνη (*Barber & de las Rivas 1993*) ή ανηγμένες πλαστοκινόνες (*Nedbal et al. 1992, Stewart & Brudvig 1998*).

Δίπλα στο κυτόχρωμα είναι τοποθετημένη η υπομονάδα PsbY, η λειτουργία της οποίας δεν έχει προσδιοριστεί προς το παρόν.

Οι υπομονάδες L, M και T βρίσκονται στο σημείο επαφής των δύο μονομερών του ΦΣ II και σταθεροποιούν το διμερές. Η υπομονάδα M του ενός μονομερούς αλληλεπιδρά με την αντίστοιχη του άλλου μονομερούς μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ λευκίνης, ισολευκίνης και βαλίνης (*Guskov et al. 2009*).

Οι PsbJ, PsbK, PsbZ βρίσκονται δίπλα στην CP43 και σταθεροποιούν μόρια καρτενοειδών (*Ferreira et al. 2004*). Επιπλέον, η PsbJ σχηματίζει μαζί με τις δύο υπομονάδες του *cyt b₅₅₉* ένα υδρόφοβο κανάλι για τη ανταλλαγή των μορίων κινόνης μεταξύ της μεμβράνης – δεξαμενής και της θέσης Q_B (*Murray & Barber 2007*).

Δίπλα στην K υπομονάδα βρίσκεται η Psb30 (ή Ycf12) (*Guskov et al. 2009*), η οποία είναι απύσχα στα αγγειόσπερμα και σε κάποια θαλάσσια κυνοβακτήρια (*Pagliano et al. 2013*) και παίζει ρόλο στη διατήρηση του *cyt b₅₅₉* σε κατάσταση υψηλού δυναμικού (*Sugiura et al. 2010*).

Οι PsbI και PsbX σταθεροποιούν τις περιφερειακές χλωροφύλλες των D1 και D2, chl_{Z D1} και chl_{Z D2} (εικόνα 1.8), αντίστοιχα. Η X είναι κοντά στην έξοδο του ενός καναλιού διάχυσης της κινόνης (*Muh et al. 2012*). Δίπλα στην PsbX, βρίσκεται η PsbH, η οποία φαίνεται να παίζει ρόλο στον σχηματισμό (assembly) του ΦΣ II (*Pagliano et al. 2013*).

Στην πλευρά του μικροχώρου βρίσκονται τρεις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες: οι PsbO (*Popelkova & Yocum 2011*), PsbP (*Ifuku et al. 2004*) και PsbQ (*Balsera et al. 2005*), που σχηματίζουν ένα κάλυμμα πάνω από το σύμπλοκο διάσπασης του

H₂O σταθεροποιώντας το και ρυθμίζουν τη συγκέντρωση Ca^{II} και Cl⁻ (*Pagliano et al. 2013*). Εκτός, από το ΣΔΝ όμως οι PsbP και PsbQ επηρεάζουν και τη θέση πρόσδεσης της κινόνης, πιθανόν τροποποιώντας με την πρόσδεσή τους τις διαμεμβρανικές υπομονάδες που σχετίζονται με την κινόνη, καθώς και την πρόσδεση των εξωτερικών κεραιών (*Ifuku et al. 2011*). Ακόμη, οι P και Q σταθεροποιούν το υδρόφοβο περιβάλλον της αίμης του cyt b₅₅₉, ώστε να διατηρείται το κυτόχρωμα σε κατάσταση υψηλού δυναμικού (*Thompson et al. 1989*). Οι P και Q στα κυανοβακτήρια αντικαθίστανται από τις PsbV και PsbU που έχουν εντελώς διαφορετική δομή (*Nelson & Yocum 2006*).

Έχουν βρεθεί και άλλα πολυπεπτίδια που ανήκουν στο ΦΣ II, αλλά δεν έχουν εντοπιστεί στις κρυσταλλικές δομές.

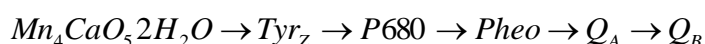
1.2.2 Μεταφορά ηλεκτρονίων στο ΦΣ II

Οι χλωροφύλλες των εξωτερικών κεραιών (LHC II, 24, 26, 29) διεγείρονται από το φως (*Amerongen & Croce 2013*). Η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται από χλωροφύλλη σε χλωροφύλλη στις εσωτερικές κεραιές CP 43 και 47 (*Nield & Barber 2006*) και καταλήγει στο τετραμερές χλωροφυλλών P680, όπου γίνεται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου. Ηλεκτρόνιο του P680 μεταφέρεται αρχικά στην φαιοφυτίνη σε χρόνο μερικών ps (*Groot et al. 2005, Holzwarth et al. 2006*) και στη συνέχεια σε ~ 300 ps στην πλαστοκινόνη Q_A (*Bernarding et al. 1994*). Η μεταφορά του ηλεκτρονίου στην Q_A σταθεροποιεί τον διαχωρισμό φορτίου. Τέλος, το ηλεκτρόνιο αυτό σε χρόνο 200 - 800 μs (*Wijn & Gorkom 2001*) μεταφέρεται στην πλαστοκινόνη Q_B, η οποία μετά από δύο κύκλους προσλαμβάνει και δύο πρωτόνια από το στρώμα, αποσυνδέεται από το ΦΣ II και μεταφέρεται στο κυτόχρωμα b₆f, δίνοντας την θέση της σε μια νέα κινόνη.

Το έλλειμμα ηλεκτρονίου στο P680 καλύπτεται από ηλεκτρόνια του συμπλόκου Mn₄CaO₅, επάνω στο οποίο προσδέεται το H₂O. Η μεταφορά αυτή

διευκολύνεται από μια οξειδοαναγωγικά ενεργή τυροσίνη της D1 υπομονάδας, την D1 – Tyr 161, γνωστή ως τυροσίνη Z (Tyr_Z). Κάθε φορά που γίνεται διαχωρισμός φορτίου στο P680 ένα ηλεκτρόνιο αποσπάται από το σύμπλοκο Mn₄CaO₅ και μεταφέρεται στην πλαστοκινόνη Q_B και ταυτόχρονα ένα πρωτόνιο αποσπάται και μεταφέρεται στον μικροχώρο. Μετά από τέσσερις κύκλους τα οξειδωτικά ισοδύναμα που έχουν συγκεντρωθεί στο Mn₄CaO₅ μεταφέρονται στο H₂O και σχηματίζεται το O₂.

Συνοπτικά η μεταφορά ηλεκτρονίων φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Όταν το σύμπλοκο Mn₄CaO₅ είναι ανενεργό λειτουργεί ένα δευτερογενές μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων για να αναχθεί η τριπλή κατάσταση ³P680⁺, που μπορεί να δημιουργήσει ¹O₂, το οποίο είναι δραστικό και μπορεί να οξειδώσει την πρωτεΐνη και τις χρωστικές (Murray & Barber 2007, Krieger et al. 2008). Στο μονοπάτι αυτό συμμετέχει το cyt *b*₅₅₉, η chl_Z D₂ και ένα β-καροτένιο της D2 υπομονάδας. Το cyt *b*₅₅₉ είναι ο δότης ηλεκτρονίου, το β-καροτένιο και η χλωροφύλλη είναι ενδιάμεσα στη μεταφορά του ηλεκτρονίου προς το P680, αλλά αν το κυτόχρωμα είναι οξειδωμένο οξειδώνεται το καροτένιο ή η χλωροφύλλη (Shinopoulos & Brudvig 2012). Στην πραγματικότητα τα πράγματα είναι ακόμα πιο περίπλοκα καθώς συμμετέχουν και άλλα καροτενοειδή και χλωροφύλλες που συνδέουν τα παραπάνω μόρια με τις χλωροφύλλες των κεραιών (Tracewell & Brudvig 2008).

1.2.3 P680: πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου

Το σύμπλοκο P680 αποτελείται από 4 χλωροφύλλες: τις P_{D1} και P_{D2}, τοποθετημένες με τα επίπεδα των δακτυλίων τους παράλληλα και σε απόσταση μεταξύ τους ~ 3.5 Å, και τις chl_Z D₁ και chl_Z D₂, τοποθετημένες δίπλα στις δύο πρώτες, αντίστοιχα (εικόνα 1.8). Ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου φαίνεται να γίνεται

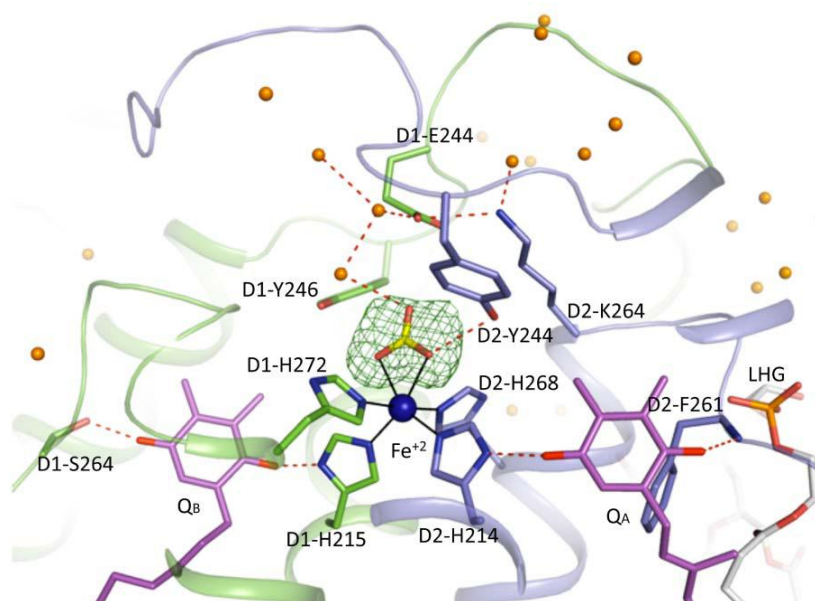
στην $chlZ_{D1}$, σταθεροποιείται όμως με την μεταφορά της θετικής οπής στην P_{D1} (Groot et al. 2005, Holzwarth et al. 2006).

1.2.4 Ο αποδέκτης των ηλεκτρονίων

Κοντά στην πλευρά της μεμβράνης βρίσκονται τοποθετημένες οι κινόνες Q_A και Q_B . Ανάμεσα τους βρίσκεται ένα ιόν Fe^{II} . Το σύμπλοκο αυτό είναι γνωστό ως «σύμπλοκο της σιδηροκινόνης» (εικόνα 1.9) και εκεί επιτελείται η ημιαντίδραση κατά την οποία η πλαστοκινίνη μετατρέπεται σε πλαστοκινόλη:

$$2PQ + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2PQH_2$$

Τα τέσσερα ηλεκτρόνια προέρχονται από το H_2O , ενώ τα τέσσερα πρωτόνια από το στρώμα.



Εικόνα 1.9: Το σύμπλοκο της σιδηροκινόνης: ο αποδέκτης των ηλεκτρονίων του H_2O (κρυσταλλική δομή με διακριτική ικανότητα 1.9 Å, Umena et al. 2011). Επάνω στον άξονα συμμετρίας του ΦΣ II βρίσκεται το ιόν Fe^{II} , το οποίο έχει ως υποκαταστάτες ένα ιόν HCO_3^- και τέσσερις ιστιδίνες, οι δύο από αυτές (D1 – H 215 και D2 – H 214) συνδέονται με τις κινόνες Q_A και Q_B , αντίστοιχα.

Η πλαστοκινόνη Q_A βρίσκεται τοποθετημένη σε μια υδρόφοβη κοιλότητα. Η κεφαλή της, όμως, σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με την αμινομάδα της D2 – Phe 261 και την D2 – His 214, ο δεύτερος είναι ισχυρότερος (*Umena et al. 2011*). Το E_m της Q_A είναι -80 mV στο λειτουργικό ΦΣ II και ανεξάρτητο από το pH, σε τιμές pH = 5.5 – 7.5 όπου το ΦΣ II είναι σταθερό, ενώ στο ανενεργό σύστημα το E_m είναι θετικό (*Krieger et al. 1995*).

Το περιβάλλον της Q_B είναι επίσης υδρόφοβο, τα κετο-Ο της κεφαλής όμως σχηματίζουν δεσμούς H με την D1 – His 215 και την D1 – Phe 265 (*Umena et al. 2011*). Η Q_B , σε αντίθεση με την Q_A , είναι ευκίνητη. Όταν προσλάβει δύο ηλεκτρόνια από την Q_A , και δύο πρωτόνια από το στρώμα αποσυνδέεται και την θέση της παίρνει μια νέα πλαστοκινόνη από την δεξαμενή των κινονών που βρίσκεται στη θυλακοειδή μεμβράνη. Ακόμη, η πλαστοκινόνη μπορεί να ανταλλαχθεί με συνθετικές κινόνες (*Petrouleas & Diner 1987*). Η θέση πρόσδεσης Q_B είναι η θέση όπου συνδέονται ζιζανιοκτόνα, τα οποία καταστέλλουν την φωτοσύνθεση (*Velthuys 1981, Lavergne 1982, Jursinic & Stemler 1983, Trebst 2007*).

Μεταξύ των δύο πλαστοκινονών είναι τοποθετημένο το ιόν Fe^{II} . Έχει ως υποκαταστάτες τέσσερα κατάλοιπα ιστιδίνης, τα D2 – His 214, D1 – His 215, D1 – His 272, D2 – His 268, εκ των οποίων το πρώτο και δεύτερο συνδέονται και με την Q_A και με την Q_B , αντίστοιχα και ένα ιόν HCO_3^- ως δισχιδή υποκαταστάτη (*Umena et al. 2011*). Φαίνεται ότι ρυθμίζει τη λειτουργία της πλευράς του αποδέκτη καθώς το δυναμικό του είναι πολύ υψηλό για να παίρνει μέρος στη μεταφορά ηλεκτρονίων από την Q_A στην Q_B (*Petrouleas & Crofts 2005, Müh et al. 2012*). Με αντικατάσταση όμως της πλαστοκινόνης Q_B με συγκεκριμένες συνθετικές κινόνες ο Fe^{II} μπορεί να οξειδωθεί από την Q_B σε Fe^{III} (*Zimmermann & Rutherford 1986, Petrouleas & Diner 1987*).

Η μεταφορά ηλεκτρονίου από την Q_A προς την Q_B είναι στενά συνδεδεμένη με την δυναμική της πρωτεΐνης και μπλοκάρεται σε θερμοκρασία 245 K, ή και χαμηλότερα αν η Q_B έχει προσλάβει ήδη ένα ηλεκτρόνιο (*Garbers et al. 1998, Reifarth & Renger 1998, Fufezan et al. 2005*). Αυτό δείχνει ότι κατά τη μεταφορά αυτού του ηλεκτρονίου γίνεται μια σημαντική αναδιάταξη της πρωτεΐνης. Με την

μεταφορά ηλεκτρονίου από την Q_A στην Q_B , σχηματίζεται η ημικινόνη Q_B^- , ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να πρωτονιώνεται κάποιο κοντινό κατάλοιπο. Η Q_B , σε αντίθεση με την Q_A , περιβάλλεται από κατάλοιπα που μπορούν να πρωτονιωθούν. Η μεταφορά του δεύτερου ηλεκτρονίου από την Q_A στην Q_B είναι συζευγμένη με τη μεταφορά του πρώτου πρωτονίου. Πρώτα γίνεται η μεταφορά του πρωτονίου και σχηματίζεται η Q_BH και στη συνέχεια Q_BH^- και τέλος το δεύτερο πρωτόνιο. Η Q_BH_2 παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια για τη θέση πρόσδεσης της Q_B σε σχέση με την ημικινόνη, και έτσι απομακρύνεται προς το κυτόχρωμα b_6f (Muh et al. 2012).

1.2.5 Το σύμπλοκο διάσπασης του νερού

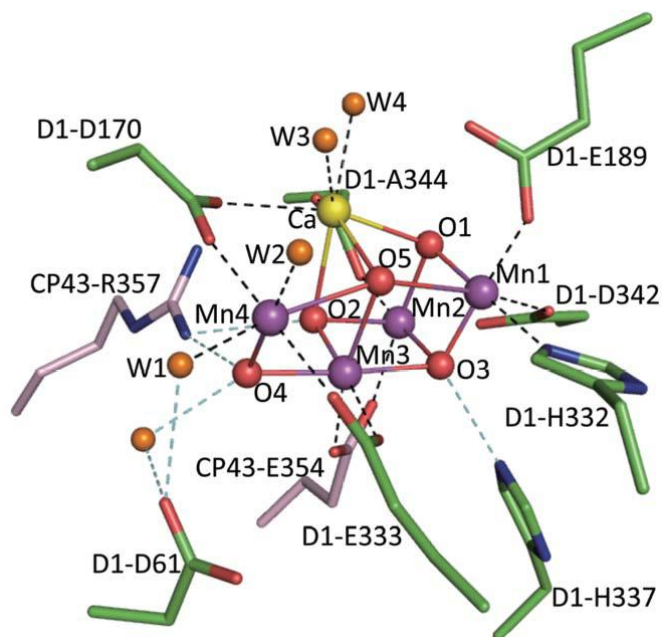
Στην πλευρά του μικροχώρου, συνδεδεμένο επάνω στην D1 υπομονάδα κυρίως, βρίσκεται το σύμπλοκο Mn_4CaO_5 όπου προσδένεται το νερό, το υπόστρωμα του ΦΣ II. Εκεί, πραγματοποιείται η ημιαντίδραση: $2H_2O \xrightarrow{4hv} O_2 + 4H^+ + 4e^-$

Τα τέσσερα ηλεκτρόνια που αποσπώνται από το νερό καταλήγουν στην πλαστοκινόνη Q_B , ενώ τα πρωτόνια ελευθερώνονται στον μικροχώρο και ενεργοποιούν την συνθετάση του ATP να φωσφορυλιώσει ADP σε ATP. Το O_2 , το οποίο είναι παραπροϊόν, ελευθερώνεται στο περιβάλλον.

1.2.5.1 Η δομή...

Ο προσδιορισμός της δομής του ΦΣ II αποτελεί για χρόνια πρόκληση και έχει προταθεί μια μεγάλη ποικιλία μοντέλων (για ανασκόπηση βλ. McEvoy & Brudvig 2006). Τα περισσότερα έχουν προκύψει κρυσταλλογραφικά, είναι όμως χαμηλής διακριτικής ικανότητας (Zouni et al. 2001, Biesiadka et al. 2004, Ferreira et al. 2004, Loll et al. 2005, Guskov et al. 2009). Επιπλέον, οι ακτίνες - X υψηλής ενέργειας που χρησιμοποιούνται στην κρυσταλλογραφία ανάγουν το Mn^{III} και Mn^{IV} του ΣΔN σε Mn^{II} , η δε αναγωγή συνοδεύεται και από αλλαγή της δομής (Yano et al. 2005, Yano

& Yachandra 2008). Μια άλλη μέθοδος που έχει βοηθήσει στη διαλεύκανση της δομής είναι η φασματοσκοπία EXAFS (Extended X – Ray Absorption Fine Structure), η οποία δίνει δομές με υψηλή διακριτική ικανότητα και χωρίς να ανάγεται το μαγγάνιο (Yano *et al.* 2006, Yano & Yachandra 2008). Το μειονέκτημα της, όμως, είναι ότι προκύπτουν πολλές ισοδύναμες δομές και δεν παρέχονται πληροφορίες για το πρωτεϊνικό περιβάλλον.



Εικόνα 1.10: Η δομή του συμπλόκου Mn_4CaO_5 . (Από Umena *et al.* 2011).

Πρόσφατα, προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά η δομή του ΦΣ II με 1.9 Å διακριτική ικανότητα (Umena *et al.* 2011). Πέρα από την καλύτερη διακριτική ικανότητα, η δομή αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι χρησιμοποιήθηκε μέθοδος ώστε να μειωθεί η δόση ακτίνων X που παίρνει το δείγμα. Με αυτή τη μελέτη προσδιορίστηκαν οι θέσεις των O που λειτουργούν ως οξο – γέφυρες μεταξύ των ιόντων Mn και μορίων H_2O , συνδεδεμένων στο σύμπλοκο. Η δομή αυτή παρουσιάζεται στην εικόνα 1.10. Με θεωρητικούς υπολογισμούς φάνηκε ότι η δομή δεν αντιστοιχεί στην S_1 , την οξειδωτική κατάσταση στην οποία βρίσκονται δείγματα αποθηκευμένα στο σκοτάδι, αλλά σε μίγμα καταστάσεων, πιο ανηγμένων από την S_0 (Luber *et al.* 2011, Galstyan *et al.* 2012), που δεν αποτελούν ενδιάμεσα του καταλυτικού κύκλου του συμπλόκου.

Στη δομή αυτή τρία Mn, το Ca και πέντε άτομα O σχηματίζουν μια περίπου κυβική δομή. Η απόσταση μεταξύ του Ca και των O είναι 2.4 – 2.5 Å, ενώ των Mn και των O 1.8 – 2.1 Å. Το O5 απέχει από το Ca 2.7 Å και από τα Mn 2.4 – 2.6 Å, γι' αυτό ο κύβος δεν είναι συμμετρικός. Το τέταρτο Mn συνδέεται με τον κύβο με μία μ -οξο-γέφυρα (το ένα από τα δύο άτομα O είναι το O5). Το O5 είναι πιο χαλαρά συνδεδεμένο στο σύμπλοκο και για αυτό θα πρέπει να έχει υψηλή δραστηριότητα. Η συνολική δομή του συμπλόκου μοιάζει με παραμορφωμένη καρέκλα. Επιπλέον, βρέθηκαν τέσσερα μόρια H₂O: τα δύο συνδέονται με το Ca^{II} και τα άλλα δύο με το Mn^{IV}. Ακόμη, βρέθηκαν και δύο Cl⁻ σε απόσταση περίπου 7 Å από το Mn^I το πρώτο και από το Mn^{IV}, το δεύτερο. Το O5, το W2 και το W3 θεωρούνται υποψήφια για το ρόλο του υποστρώματος (*Umeha et al. 2011, Rapatskiy et al. 2012*).

Το μαγγάνιο

Το Mn είναι άφθονο στο περιβάλλον και μπορεί να πάρει πολλούς αριθμούς οξείδωσης (II – V). Το Mn^{II} είναι σταθερό λόγω της 3d⁵ δομής του, ευκίνητο και προσλαμβάνεται εύκολα από τα κύτταρα. Το Mn^{III} και Mn^{IV} συμπλέκεται ισχυρά με το O και σχηματίζει πολυπυρηνικά σύμπλοκα μεικτού σθένους (*Armstrong 2008*). Κατά την φωτοενεργοποίηση του ΦΣ II, το Mn^{II} οξειδώνεται και σχηματίζεται το λειτουργικό Mn₄CaO₅ (*Dasgupta et al. 2008, Vinyard et al. 2013*). Το MnO₂, που απαντάται σε ποικιλία πετρωμάτων και ιζημάτων, έχει δράση καταλάσης, δηλαδή επιταχύνει τη μετατροπή του H₂O₂ σε H₂O και O₂, και θεωρείται πιθανόν να είναι το υλικό από το οποίο πρωτοσχηματίστηκε το ΣΔΝ (*Sauer & Yachandra 2002*).

Το ασβέστιο

Το Ca^{II} είναι απαραίτητο συστατικό του συμπλόκου, σε δείγματα που έχει αφαιρεθεί δεν μπορεί να ολοκληρωθεί ο καταλυτικός κύκλος που σταματάει στην S₂Tyr[•] (*Boussac et al. 1989*). Το μόνο ιόν που μπορεί να αντικαταστήσει το Ca^{II} και να παραμείνει το σύμπλοκο ενεργό είναι το Sr^{II} (*Boussac & Rutherford 1988*), επιβραδύνονται όμως λίγο οι μεταβάσεις S (*Westphal et al. 2000*). Το Ca^{II} δεν έχει

σημαντικό δομικό ρόλο, παρότι είναι μέρος του συμπλόκου Mn_4CaO_5 , καθώς η απουσία (ή αντικατάσταση του με Sr^{II}) δεν επηρεάζει ούτε τη δομή του υπόλοιπου συμπλόκου (*Riggs-Gelasco et al. 1996, Latimer et al. 1998, Yachandra & Yano 2011*), ούτε τις ηλεκτρονικές του ιδιότητες (*Lohmiller et al. 2012*). Το Ca^{II} αποτελεί μέρος και ρυθμιστή του δικτύου δεσμών H που συνδέουν την Tyr_z με το Mn_4CaO_5 (*Haumann & Junge 1999, Styring et al. 2003, Rappaport et al. 2011*). Ακόμη, έχει προταθεί ότι επάνω του προσδέεται μόριο H_2O/OH^- υποστρώματος και το Ca^{II} λειτουργώντας ως οξύ κατά Lewis ρυθμίζει τη δραστικότητα του συμπλεγμένου H_2O , έτσι, το Sr^{II} μπορεί να το αντικαταστήσει επειδή έχουν παρόμοιο pK (βλ. και κεφάλαιο 1.2.5.3, *Vrettos et al. 2001*). Αλλά, ακόμα κι αν δεν παίρνει μέρος το Ca^{II} στη διάσπαση του H_2O , έχει θεωρηθεί ότι είναι το πρώτο σημείο πρόσδεσης μορίου H_2O υποστρώματος, το οποίο στη συνέχεια συνδέεται στην θέση όπου θα γίνει ο σχηματισμός του O_2 (*Rappaport et al. 2011*). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι μη οξειδοαναγωγικά ιόντα (Ca^{II} , Sr^{II} κλπ) σε Mn - όξο σύμπλοκα ρυθμίζουν το δυναμικό πλειάδων του Mn, και το δυναμικό είναι ανάλογο με το pK του μη οξειδοαναγωγικού ιόντος (*Tsui et al. 2013*).

Τα αμινοξικά κατάλοιπα που λειτουργούν ως υποκαταστάτες

Το σύμπλοκο Mn_4CaO_5 αλληλεπιδρά με καρβοξυλομάδες συντηρημένων ασπαρτικών και γλουταμινικών που αντισταθμίζουν το θετικό φορτίο του (*Ferreira et al. 2004, Loll et al. 2005, McEnoy & Brudvig 2006, Debus 2008, Umena et al. 2011*): το D1 – Asp 170 (*Boerner et al. 1992, Diner & Nixon 1992, Nixon & Diner 1992*), το D1 – Glu 189 (*Chu et al. 1995 (a), Kimura et al. 2005*), το D1 – Glu 333 (*Chu et al. 1995 (b), Service et al. 2013*), το D1 – Asp 342 (*Chu et al. 1995 (b)*), το καρβοξυτελικό άκρο της D1, την Ala 344 (*Chu et al. 2004, Stull et al. 2010*) και το CP43 – Glu 354 (*Service et al. 2011*) και με μια ιστιδίνη, την D1 – His 332 (*Tang et al. 1994, Chu et al. 1995 (b), Stich et al. 2011*). Η ιστιδίνη έχει ουδέτερο φορτίο και αποτρέπει το ιόν Mn^{III} να οξειδωθεί περαιτέρω, τουλάχιστον μέχρι να οξειδωθούν τα υπόλοιπα Mn (*Stich et al. 2011*).

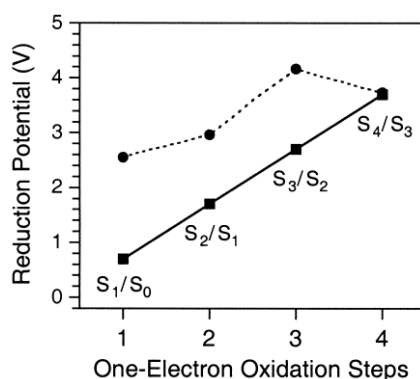
Στη δεύτερη σφαίρα συντάξεως, βρίσκονται μερικά ακόμα σημαντικά για τη λειτουργία του Mn_4CaO_5 , γι' αυτό και συντηρημένα, κατάλοιπα: το D1 – Asp 61 (*Hundelt et al. 1998, Qian et al. 1999, Singh et al. 2008*), που θεωρείται το πρώτο αμινοξύ καναλιού που ενώνει το Mn_4CaO_5 με τον αυλό (*Fereira et al. 2004, Murray & Barber 2007, Dilbeck et al. 2012*, βλ. και κεφάλαιο 1.2.5.6), η υδρόφοβη D1 – Val 185 που βρίσκεται πλησίον του O5 και χωρίζει την κοιλότητα των μορίων H_2O που βρίσκονται μεταξύ της Tyr₂ και του Mn_4CaO_5 από το Asp 61 (*Dilbeck et al. 2013*), η D1 – His 337 (*Chu et al. 1995 (β)*) και η CP43 – Arg 357 (*Knoepfle et al. 1999*) στην οποία έχει αποδοθεί ο ρόλος της βάσης που αποσπά πρωτόνια από το Mn_4CaO_5 (*McEnoy & Brudvig 2004, 2006*).

1.2.5.2 Ο καταλυτικός κύκλος

Η διάσπαση του H_2O χωρίς καταλύτη απαιτεί στο πρώτο βήμα περισσότερη ενέργεια από αυτήν που μπορεί να μεταφέρει ένα φωτόνιο 680 nm (1.8 eV). Όταν γίνεται όμως με τη μεσολάβηση του συμπλόκου Mn_4CaO_5 αποθηκεύονται σε αυτό οξειδωτικά ισοδύναμα που απαιτούν χαμηλότερη ενέργεια για να δημιουργηθούν και μεταφέρονται τέλος στο H_2O . Έτσι αποφεύγεται το πρώτο δαπανηρό βήμα (*εικόνα 1.11, Britt 1996*). Επίσης, με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η συσσώρευση των δραστικών ενδιάμεσων που δημιουργούνται κατά την οξείδωση του H_2O , τα οποία θα μπορούσαν να καταστρέψουν την πρωτεΐνη.

Ο καταλυτικός κύκλος της διάσπασης του H_2O αποτελείται από 5 οξειδωτικές καταστάσεις S_n του συμπλόκου Mn_4CaO_5 (όπου n: τα οξειδωτικά ισοδύναμα (δηλαδή θετικό φορτίο) που συσσωρεύονται σε κάθε βήμα στο σύμπλοκο Mn_4CaO_5). Αυτές είναι οι: $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ (*Kok et al. 1970*). Κάθε φορά που το P680 διεγείρεται από φωτόνιο και γίνεται διαχωρισμός φορτίου, το σύμπλοκο Mn_4CaO_5 οξειδώνεται, μέσω της τυροσίνης Z, περνώντας στην επόμενη οξειδωτική κατάσταση.

Η S_0 είναι η πιο ανηγμένη φυσιολογική κατάσταση. Η S_1 είναι η πιο σταθερή στο σκοτάδι (Kok *et al.* 1970), γι' αυτό το μεγαλύτερο ποσοστό των κέντρων δείγματος που βρίσκεται στο σκοτάδι βρίσκονται σε αυτήν (Styring & Rutherford 1987). Η S_4 είναι ασταθές ενδιάμεσο και μεταπίπτει στην S_0 χωρίς φωτισμό, είναι δε η μόνη που δεν έχει παγιδευτεί. Κατά τη μετάβαση $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ γίνεται ο σχηματισμός του οξυγόνου (εικόνα 1.12).

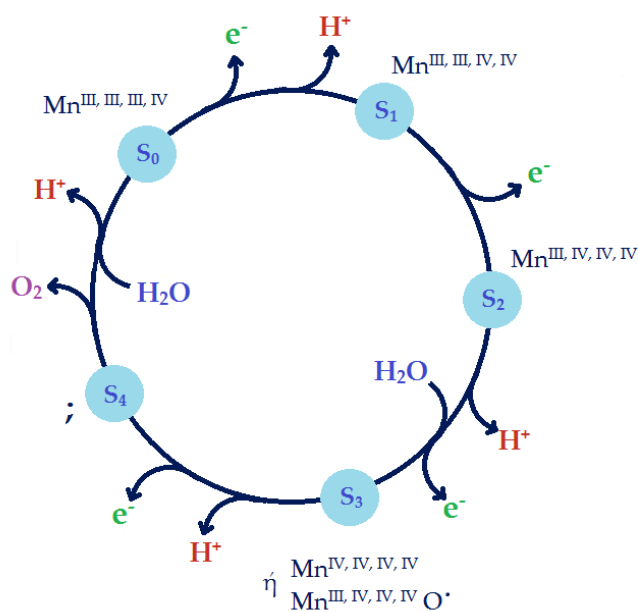


Εικόνα 1.11: Συσσώρευση οξειδωτικών ισοδυνάμων κατά την οξείδωση δύο μορίων H_2O σε O_2 χωρίς καταλύτη (κύκλοι) και με καταλύτη το ΦΣ II (τετράγωνα). (Από Tommos & Babcock 2000).

Ταυτόχρονα με την αποβολή ηλεκτρονίων από το Mn_4CaO_5 απομακρύνονται και πρωτόνια. Όμως, σε κάθε αποβολή ηλεκτρονίου από το Mn_4CaO_5 δεν αντιστοιχεί και απόσπαση H^+ . Ο αριθμός των πρωτονίων που αποβάλλονται από το Mn_4CaO_5 κατά τη διάρκεια των μεταβάσεων $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_0$ είναι 1 : 0 : 1 : 2 αντίστοιχα (Schloder & Witt 1999, Goussias *et al.* 2002, Dau & Haumann 2007, Suzuki *et al.* 2009, Klauss *et al.* 2012, Noguchi *et al.* 2012). Η παραμονή του H^+ κοντά στο Mn_4CaO_5 κατά την μετάβαση $S_1 \rightarrow S_2$ οδηγεί σε συσσώρευση θετικού φορτίου στις καταστάσεις S_2 και S_3 .

Οι αριθμοί οξείδωσης των ιόντων του Mn (εικόνα 1.12) για την S_1 είναι III, III, IV, IV και για την S_2 : III, IV, IV, IV (Hasegawa *et al.* 1998, Peloquin & Britt 2001, Yachandra 2002, Charlot *et al.* 2005, Kulik *et al.* 2007, Krewald *et al.* 2015), για την S_0 φαίνεται να επικρατεί η άποψη ότι είναι: III, III, III, IV (Kulik *et al.* 2007, Pal *et al.* 2013, Krewald *et al.* 2015), εναλλακτικές απόψεις που περιλαμβάνουν Mn^{II} είναι: II,

III, IV, IV (Iuzzolino et al. 1998, Messinger et al. 2001, Kulik et al. 2005) ή II, III, III, III (Kolling et al. 2012). Για την S_3 υπάρχει διαφωνία μεταξύ: III, IV, IV, IV (Ioannidis et al. 2000, 2002, Messinger et al. 2001, Yachandra 2002, Yano & Yachandra 2007, 2008, Boussac et al. 2009) ή IV, IV, IV, IV (Iuzzolino et al. 1998, Dau & Haumman 2007, Meyer et al. 2007, Sproviero et al. 2008, Siegbahn 2009, Cox et al. 2014, Krewald et al. 2015). Στην πρώτη περίπτωση, δεν γίνεται οξείδωση του Mn κατά τη μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$, αλλά δημιουργείται ρίζα O^\cdot .

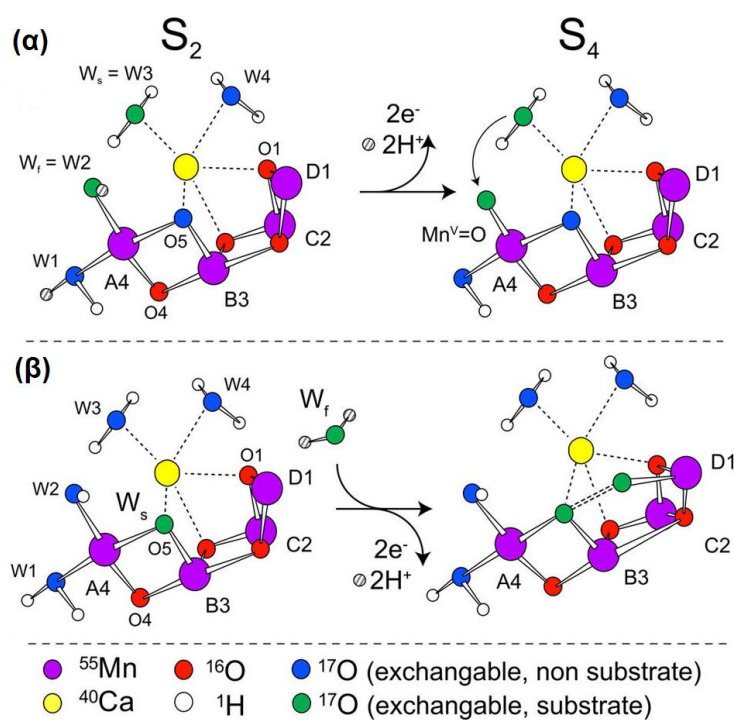


Εικόνα 1.12: Ο κύκλος των S – καταστάσεων

Στην πραγματικότητα δεν μπορούμε να μιλήσουμε για τυπικούς αριθμούς οξείδωσης του κάθε ιόντος Mn, επειδή το ηλεκτρονικό νέφος είναι απεντοπισμένο σε όλο το σύμπλοκο και τους υποκαταστάτες του (Yano & Yachandra 2007, Glatzel et al. 2013). Ειδικά για την S_3 έχει προταθεί ότι ίσως υπάρχουν σε ισορροπία και οι δύο πιθανές οξειδωτικές καταστάσεις (Cox & Messinger 2013).

1.2.5.3 Η S₄ και ο μηχανισμός σχηματισμού του O₂

Έχουν προταθεί πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί για το σχηματισμό του O₂, καθώς «τα πειραματικά αποτελέσματα είναι τόσα σε όγκο και ποικιλία ώστε να μπορούν να υποστηριχθούν όλοι αυτοί οι πιθανοί διαφορετικοί μηχανισμοί» (για ανασκόπηση βλ. McEvoy & Brudvig 2006). Οι δύο επικρατέστεροι μηχανισμοί είναι η πυρηνόφιλη προσβολή μεταξύ δύο ατόμων O των H₂O υποστρώματος ή η σύζευξη οξο-/οξυλ-ρίζας (Messinger 2004, Kanady et al. 2012, Barber & Tran 2013, Betley et al. 2008).



Εικόνα 1.13: Οι δύο πιθανοί μηχανισμοί για τον σχηματισμό του O₂: (α) πυρηνόφιλη προσβολή και (β) σύζευξη οξυλ/οξο ρίζας (Από Rapatskiy et al. 2012).

Στην πρώτη περίπτωση γίνεται πυρηνόφιλη προσβολή Ca^{II}-OH₂/OH⁻ σε Mn^V≡O/Mn^{IV}=O[•] (εικόνα 1.13α, Pecoraro et al. 1998, Vrettos et al. 2001, Ferreira et al. 2004, Mullins & Pecoraro 2008, McEvoy & Brudvig 2004, 2006, Sproviero et al. 2008, Saito et al. 2012, Pokhrel et al. 2013), τα μόρια H₂O που λειτουργούν ως

υπόστρωμα είναι τα W2 και W3. Στην δεύτερη περίπτωση μπορεί να γίνεται σύζευξη ρίζας οξυγόνου με μια όξο γέφυρα (εικόνα 1.13β, *Seigbahn 2009, 2013, Rapatskiy et al. 2012, Cox & Messinger 2013*) ή OH⁻ του ασβεστίου με γέφυρα O (*Pushkar et al. 2008*). Η οξο - γέφυρα είναι η O5 και η ρίζα O το W2 ή κάποιο H₂O που προστίθεται κατά την S₂ → S₃ επάνω στο Mn1 και γι' αυτό δεν υπάρχει στην κρυσταλλική δομή.

Η S₄ είναι η μόνη κατάσταση που δεν έχει παγιδευτεί και μόνο υποθέσεις (που στηρίζονται σε δεδομένα των χαμηλότερων καταστάσεων S, την ταυτότητα των νερών υποστρωμάτων, σύγκριση με συνθετικά μοντέλα) υπάρχουν για τη φύση της. Η μεταβαση S₂ → S₃ είναι καθοριστική για τον μηχανισμό, καθώς κατά τη διάρκειά της το σύμπλοκο προετοιμάζεται για τον σχηματισμό του O₂ - γι' αυτό είναι σημαντική η μελέτη της.

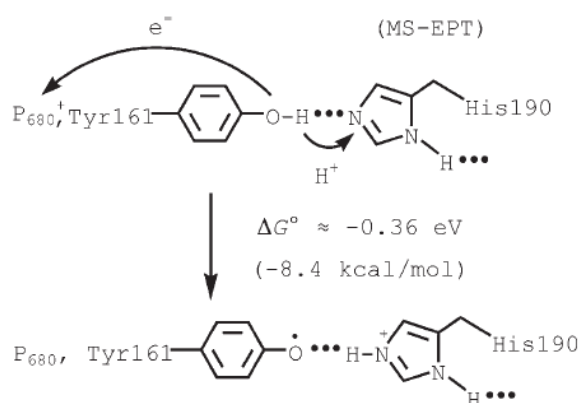
1.2.5.4 η Τυροσίνη Z

Η οξειδωση του συμπλόκου Mn₄CaO₅ από το P680 γίνεται μέσω της D1 – Tyr 161 ή τυροσίνης Z (*Debus et al. 1988 (b), Metz et al. 1989*). Η τυροσίνη Z συνδέει το P680, όπου γίνεται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου, με το Mn₄CaO₅, όπου γίνεται η διάσπαση του νερού και επιτρέπει στο ΦΣ II να λειτουργεί με κβαντική απόδοση κοντά στο 1, ανάγοντας το P680⁺ ταχύτερα (μέσα σε ns) από ό,τι γίνεται η επανασύνδεση με την Q_A⁻ (μs) (*Tommos & Babcock 2000*).

Η Tyr_Z απέχει 13.7 Å από το ιόν Mg^{II} της P_{D1}, 4.8 Å από το Ca^{II}, το πιο κοντινό σε αυτήν ιόν του συμπλόκου Mn₄CaO₅ και 2.5 Å από την D1 – His190 με την οποία συνδέεται με δεσμό H (*Umeha et al. 2011*). Ο δεσμός αυτός θεωρείται πιθανόν να είναι low barrier hydrogen bond (δεσμός υδρογόνου χαμηλού φράγματος) που σημαίνει ότι το H⁺ μπορεί να κινείται εύκολα μεταξύ των δύο καταλοίπων λόγω της μικρής απόστασης (*McEnoy & Brudvig 2006*). Η ισχύς του δεσμού, έχει προταθεί με θεωρητικούς υπολογισμούς, ότι ρυθμίζεται από τα μόρια H₂O που βρίσκονται μεταξύ του Mn₄CaO₅ και της Tyr_Z, και ιδιαίτερα από το W7 που σχηματίζει δεσμό H

με την Tyr_Z αλλά και το D1 – Glu 189 (Saito *et al.* 2011). Ακόμη, έχει ειπωθεί ότι τα H₂O ρυθμίζονται από το Ca^{II}, άρα το Ca^{II} ρυθμίζει έμμεσα τον δεσμό Tyr_Z – His190 και επομένως το δυναμικό της Tyr_Z (Retegan *et al.* 2014).

Στον κλάδο της D2, σε συμμετρική θέση σε σχέση με την Tyr_Z, βρίσκεται άλλη μια οξειδοαναγωγικά ενεργή τυροσίνη, η D2 – Tyr 160 ή Tyr_D (Barry & Babcock 1987, Debus *et al.* 1988 (a)). Απέχει 27.5 Å από το Mn1, το πιο κοντινό σε αυτήν ιόν του Mn₄CaO₅ και 13.6 Å από το Mg^{II} της P_{D2}, την πιο κοντινή της χλωροφύλλη του P680 (Umena *et al.* 2011). Όπως η Tyr_Z, έτσι και η Tyr_D συνδέεται με δεσμό H με την D2 – His 189 (Kim *et al.* 1997), ο δεσμός αυτός όμως δεν είναι ισχυρός (LBHB) όπως στην περίπτωση της Tyr_Z. Η D2 – His 189 δεν λειτουργεί ως δέκτης H⁺, όπως η D1 – His 190, επειδή βρίσκεται κοντά στην θετικά φορτισμένη D2 – Arg 294, κατά την οξείδωση της Tyr_D το φαινολικό πρωτόνιο μετακινείται προς ένα H₂O (Saito *et al.* 2013). Η εν λόγω τυροσίνη οξειδώνεται από το P680, αλλά δεν παίρνει άμεσα μέρος στη διάσπαση του H₂O επειδή έχει χαμηλότερο δυναμικό αναγωγής από την Tyr_Z. Η οξειδωμένη μορφή, Tyr_D[•], μπορεί να οξειδώσει την S₀ προς S₁ στο σκοτάδι, ενώ η ανηγμένη μορφή, Tyr_D, μπορεί να ανάγει την S₂ και την S₃ κατάσταση (Styring & Rutherford 1987). Έχει προταθεί και ηλεκτροστατικός ρόλος για την Tyr_D[•]: σπρώχνει το θετικό φορτίο του P680 προς την πλευρά της P_{D1}, η οποία βρίσκεται πιο κοντά στην Tyr_Z και έτσι είναι πιο αποτελεσματική και πιο γρήγορη η οξείδωση της Tyr_Z (Faller *et al.* 2001, Rutherford *et al.* 2004).



Εικόνα 1.14: Ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίου προς το P680⁺ και πρωτονίου προς την ιστιδίνη 190, κατά την οξείδωση της τυροσίνης Z (Από Meyer *et al.* 2007).

Η ρίζα Tyr_z[•] είναι ουδέτερη, δηλαδή ταυτόχρονα με την οξείδωση απομακρύνεται ένα H⁺ (Diner & Babcock 1996). Όταν απομακρύνεται ταυτόχρονα e⁻ και H⁺ υπάρχει ενεργειακό πλεονέκτημα ($\Delta G < 0$) σε σχέση με απομάκρυνση μόνο e⁻ ή H⁺ ($\Delta G > 0$), επειδή στη δεύτερη περίπτωση σχηματίζονται ενδιάμεσα υψηλής ενέργειας (εικόνα 1.14, Meyer et al. 2007). Ενδεικτικό είναι το γεγονός ότι η σταθερά pK_a της τυροσίνης στην ανηγμένη και οξειδωμένη μορφή της είναι 10 και -2 αντίστοιχα, που σημαίνει ότι στην πρώτη περίπτωση δεν απομακρύνεται H⁺, ενώ στη δεύτερη απομακρύνεται (Tommos & Babcock 2000, McEnoy & Brudvig 2006).

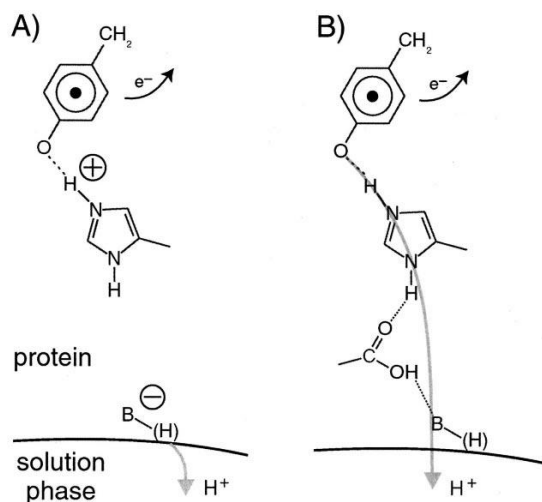
Η D1 – His 190 μπορεί να δράσει ως βάση κατά την οξείδωση της Tyr_z έλκοντας το H⁺ μέσω του δεσμού H που τις συνδέει (Mamedov et al. 1998, Tommos & Babcock 2000).

1.2.5.5 Απόσπαση πρωτονίων από το Mn₄CaO₅

Η απόσπαση ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο Mn₄CaO₅ είναι αναμφισβήτητο πλέον ότι γίνεται από την Tyr_z. Ένα ανοιχτό ερώτημα είναι πώς γίνεται η απόσπαση των H⁺. Έχουν προταθεί δύο μοντέλα: το “proton rocking model” (μοντέλο παλινδρόμησης πρωτονίου) και το “hydrogen-abstraction model” (μοντέλο απόσπασης υδρογόνου). Τα δύο μοντέλα παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 1.15.

Σύμφωνα με το μοντέλο παλινδρόμησης πρωτονίου (McEnoy & Brudvig 2006), η Tyr_z αποσπά μόνο ηλεκτρόνιο από το Mn₄CaO₅, ενώ οδηγεί ηλεκτροστατικά την απόσπαση του πρωτονίου από κοντινή, στο Mn₄CaO₅, βάση B, μέσω ρύθμισης του pK της βάσης αυτής: Κατά την οξείδωση της Tyr_z το φαινολικό της πρωτόνιο μετακινείται προς την His 190, το θετικό φορτίο που δημιουργείται προκαλεί μείωση στο pK της βάσης B και απομάκρυνση H⁺ στον αυλό. Στη συνέχεια, η Tyr_z ανάγεται από το Mn₄CaO₅ και ταυτόχρονα το φαινολικό πρωτόνιο, που είχε

μετατοπιστεί προς την His 190, επιστρέφει στην Tyr_z. Το pK της βάσης B επιστρέφει στην αρχική τιμή του και αποσπά πρωτόνιο από το Mn₄CaO₅.



Εικόνα 1.15: Τα δύο πιθανά μοντέλα για την απόσπαση H⁺ από το Mn₄CaO₅: (A) μοντέλο παλινδρόμησης πρωτονίου και (B) μοντέλο απόσπασης H. Από *Tommos & Babcock 2000*.

Η πρώτη παρατήρηση που οδήγησε αργότερα προς το μοντέλο παλινδρόμησης πρωτονίου είναι ότι η ενέργεια ενεργοποίησης της οξείδωσης της Tyr_z από το P680⁺ είναι μικρότερη από την ενέργεια που απαιτείται για να σπάσει δεσμός H, και επομένως το φαινολικό πρωτόνιο της Tyr_z, κατά την οξείδωση, κινείται προς βάση B, η οποία συνδέεται μέσω προϋπάρχοντος δεσμού H με την Tyr_z (*Eckert & Renger 1988*), αλλά και γενικότερα η μελέτη της (τριφασικής) κινητικής της οξείδωσης της Tyr_z από το P680⁺ και η ερμηνεία της μιας των φάσεων αυτών μέσω της κίνησης του φαινολικού πρωτονίου προς την βάση B (*Christen & Renger 1999, Christen et al. 1999*). Καθοριστικά για το μοντέλο αποτελέσματα ήταν ότι η έκλυση H⁺ στον αυλό δεν σχετίζεται με τον χρόνο ζωής της ρίζας Tyr_z[•], καθώς επίσης και ότι το θετικό φορτίο κοντά στη ρίζα (το οποίο φαίνεται από μετατόπιση στα φάσματα ορατού – υπεριώδους κοντινών στη ρίζα χρωστικών) παραμένει, μέχρι αυτή να αναχθεί από το Mn₄CaO₅ (*Rappaport et al. 1994, Ahlbrink et al. 1998, Junge et al. 2002*). Ο ρόλος της βάσης B έχει αποδοθεί είτε στην θετικά φορτισμένη CP43 –

Arg 357, η οποία αποδίδει H^+ στο γειτονικό της D1 – Asp 61 (McEnoy & Brudvig 2004, 2006), είτε στο D1 – Asp 61 απευθείας (Meyer et al. 2007).

Σύμφωνα με το μοντέλο απόσπασης H, η Tyr_z αποσπά μαζί με το ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο από Mn₄CaO₅, δηλαδή ένα άτομο H σε κάθε μετάβαση S, στη συνέχεια το ηλεκτρόνιο μετακινείται προς το P680, ενώ το πρωτόνιο μέσω της His 190 και άλλων καταλοίπων που σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών H, στον μικροχώρο.

Στη διατύπωση του μοντέλου απόσπασης H από την Tyr_z οδήγησαν πειράματα με φασματοσκοπία EPR και ENDOR με τα οποία φάνηκε ότι η Tyr_z αλληλεπιδρά μαγνητικά με το Mn₄CaO₅, επομένως η απόσταση μεταξύ τους είναι μικρή ώστε επιτρέπεται απόσπαση H του Mn₄CaO₅ από την Tyr_z (Gilchrist et al. 1995, Tang et al. 1996) και επίσης, ότι είναι ευκίνητη καθώς δεν υπάρχει στο περιβάλλον της αυστηρά καθορισμένο δίκτυο δεσμών H (Tommos et al. 1995). Η τελευταία παρατήρηση, όμως, είχε γίνει σε ανενεργά δείγματα στα οποία είχε αφαιρεθεί το Mn (Mn depleted) και τα συμπεράσματα δεν ισχύουν για το λειτουργικό ΦΣ II.

Μια άλλη παρατήρηση που ενίσχυσε το μοντέλο απόσπασης H είναι ότι η πρόσδεση του H₂O/OH⁻ επάνω σε ιόντα Mn υψηλού σθένους χαμηλώνει την ενέργεια που απαιτείται για να αποσπαστεί H, σε τιμή που ταιριάζει με την αντίστοιχη τιμή για το φαινολικό H της τυροσίνης (Blomberg et al. 1997) και άρα είναι δυνατή η απόσπαση H από H₂O προσδεμένο στο Mn από την Tyr_z. Σύμφωνα με την αρχική διατύπωση του μοντέλου απόσπασης H, σε κάθε μετάβαση S αποσπάται ένα άτομο H (Hoganson et al. 1995, Hoganson & Babcock 1997, Westphal et al. 2000). Η πρόταση αυτή είχε στηριχτεί σε λάθος δομή του συμπλόκου διάσπασης του H₂O και έχει εγκαταλειφθεί. Επιπλέον, δεν αποσπάται ένα H⁺ σε κάθε μετάβαση S, όπως ήδη ειπώθηκε.

Με την δημοσίευση των πρώτων κρυσταλλικών δομών χαμηλής ευκρίνειας (Zouni et al. 2001, Ferreira et al. 2004, Loll et al. 2005) φάνηκε ότι η απόσταση Mn₄CaO₅ – Tyr_z είναι αρκετά μεγάλη για να αποσπά η Tyr_z πρωτόνιο από H₂O/OH⁻ του Mn₄CaO₅. Έτσι, την τελευταία δεκαετία έχει εγκαταλειφθεί το μοντέλο απόσπασης ατόμου H. Όμως, με την ανακοίνωση της τελευταίας κρυσταλλικής

δομής (Umena et al. 2011) όπου παρουσιάστηκε ένα δίκτυο δεσμών H που συνδέει την Tyr₂ με τον αυλό, το μοντέλο απόσπασης H επανήλθε στο προσκήνιο (Umena et al. 2011, Saito et al. 2012, Klauss et al. 2012).

Τέλος, έχουν προταθεί μοντέλα για τον κύκλο των καταστάσεων S στα οποία γίνεται συνδυασμός και των δύο μοντέλων απόσπασης H⁺, δηλαδή αλλάζει ο τρόπος που αποσπάται H⁺ από το Mn₄CaO₅ ανάλογα με την οξειδωτική του κατάσταση (Tang et al. 1996, Haumann & Junge 1999, Vrettos et al. 2001, Saito et al. 2012, Klauss et al. 2012).

1.2.5.6 Δίαυλοι και δίκτυα δεσμών H στο ΦΣ II

Στο ΦΣ II έχουν εντοπιστεί με υπολογιστικές μεθόδους, κυρίως, πολλά κανάλια και δίκτυα δεσμών H μεταξύ αμινοξικών καταλοίπων και μορίων H₂O που ξεκινούν από το Mn₄CaO₅ και καταλήγουν στον αυλό, χρησιμεύουν πιθανόν στη είσοδο H₂O και στην έξοδο O₂ και H⁺ (Murray & Barber 2007, Ho & Styring 2008, Gabdulkhakov et al. 2009, Bondar et al. 2012, Vassiliev et al. 2012). Στην εικόνα 1.16 φαίνονται τα κανάλια που βρέθηκαν χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές μεθόδους υπολογισμού (η αρίθμηση διαφέρει).

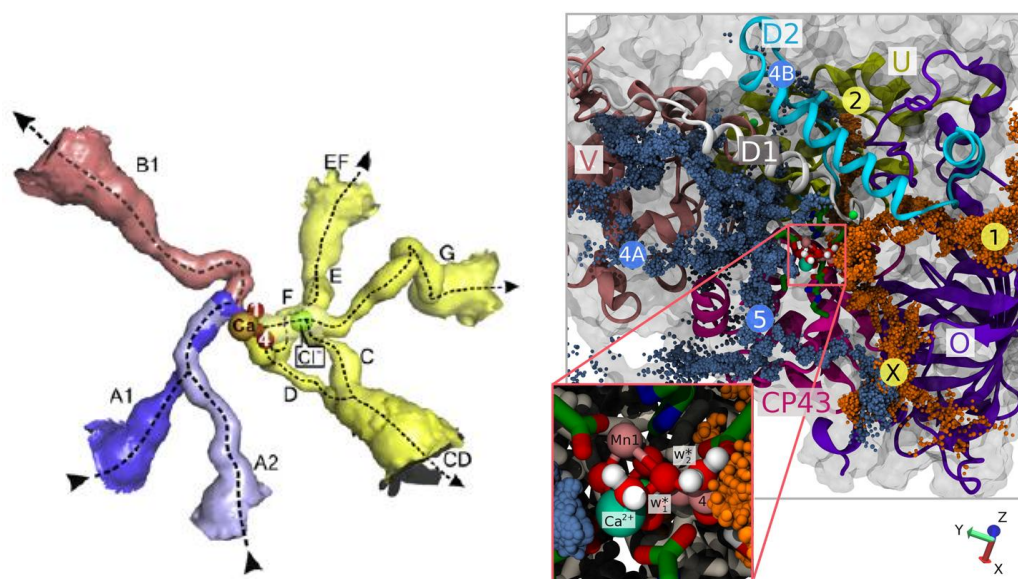
Στη μελέτη του μηχανισμού διάσπασης του H₂O δεν έχει τόση σημασία η πορεία του καναλιού, αλλά από ποιο σημείο του συμπλόκου ξεκινάει, ώστε να διευκρινιστεί π.χ. από πού φεύγει το H⁺, σε ποιο σημείο ακριβώς προσδένεται το H₂O υπόστρωμα κλπ.

Το πρώτο κανάλι που βρέθηκε ξεκινάει από το D1 – Asp 61 (Ferreira et al. 2004), που βρίσκεται στην πλευρά του Mn₄, είναι το πιο μελετημένο, έχουν γίνει μεταλλάξεις στα αμινοξέα που το περιβάλλουν (Service et al. 2010), και έχει προταθεί ότι λειτουργεί για την απομάκρυνση H⁺ από το Mn₄CaO₅. Στην εικόνα 1.16 είναι το C (κίτρινο) ή 1 (πορτοκαλί). Σε αυτό το κανάλι βρίσκεται το ένα από τα δύο ιόντα Cl⁻ και πιθανόν έχει ρυθμιστικό ρόλο.

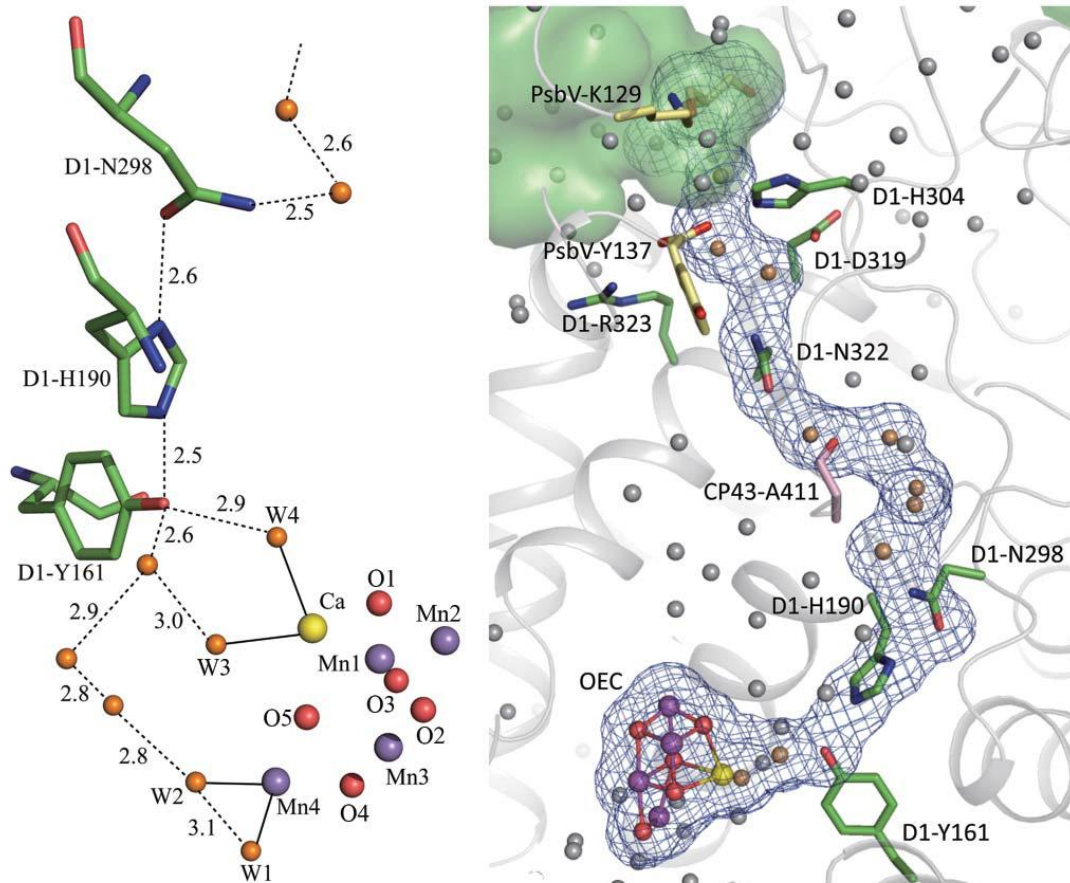
Αντιδιαμετρικά του Asp61, κοντά στο Mn1 ξεκινάει ένα κανάλι από το D1 – Asp 342 (4A και 4B, *εικόνα 1.16β*). Τα δύο αυτά κανάλια δεν επικοινωνούν, δηλαδή δεν μπορεί να μετακινηθεί H₂O από το ένα κανάλι προς το άλλο, εκτός αν μετακινηθούν και τα μόρια H₂O που είναι προσδεδεμένα στο Mn (*Vassiliev et al. 2012*).

Στην τελευταία κρυσταλλική δομή (*Umena et al. 2011*) βρέθηκε ένα δίκτυο δεσμών H που ξεκινάει από την Tyr_Z, και μέσω της His 190, της Asn 298 και άλλων καταλοίπων και μορίων H₂O καταλήγει στον αυλό του θυλακοειδούς. Οπότε ξαναέρχεται στο προσκήνιο η ιδέα της απόσπασης πρωτονίων του Mn₄CaO₅ από την Tyr_Z.

Ακόμη, έχουν βρεθεί και κανάλια από όπου φεύγει το O₂ (*Vassiliev et al. 2013*).



Εικόνα 1.16: Κανάλια του ΦΣ II: (α). Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται τα υποθετικά κανάλια απόσπασης H⁺, με μπλε τα κανάλια εισόδου του H₂O και με κόκκινο το κανάλι εξόδου του O₂ (*Gabdulkhakon et al. 2009*), (β). Τα κανάλια του ΦΣ II, όπως φαίνονται αν εισαχθούν μόρια H₂O (μπλε και πορτοκαλί σφαίρες) θεωρητικά, στο ένθετο φαίνεται ότι καταλήγουν σε δύο διαφορετικές πλευρές του Mn₄CaO₅ που δεν επικοινωνούν μεταξύ τους (*Vassiliev et al. 2012*).



Εικόνα 1.17: Το δίκτυο των δεσμών H που συνδέει το σύμπλοκο Mn_4CaO_5 με την Tyr_Z , την His 190 και την Asn 298 (Από Kawakami *et al.* 2011).

1.3 Φασματοσκοπία EPR

We must be clear that when it comes to atoms, language can be used only as in poetry.

*The poet, too, is not nearly so concerned with describing facts as with creating images
and establishing mental connections.*

N.Bohr

1.3.1 Εισαγωγή

Η φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance, EPR) αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο στη μελέτη ενζύμων που περιέχουν ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια όπως στοιχεία μετάπτωσης ή ελεύθερες ρίζες, είτε σταθερές, είτε ενδιάμεσα που δημιουργούνται κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Βοηθά στον προσδιορισμό στοιχείων της δομής, αλλά κυρίως της λειτουργίας του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Ένζυμα που έχουν μελετηθεί εκτενώς με EPR είναι αυτά της αναπνευστικής αλυσίδας της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων αλλά και οι φωτοσυνθετικές πρωτεΐνες των θυλακοειδών. Ειδικά για την φωτοσύνθεση έχει ειπωθεί ότι αποτελεί τον κήπο της Εδέμ για αυτόν που ασχολείται με το EPR (Hoff 1987).

Όταν ένωση με ασύζευκτα ηλεκτρόνια βρεθεί σε μαγνητικό πεδίο, αίρεται ο εκφυλισμός των ενεργειακών καταστάσεων του σπιν των ηλεκτρονίων. Οι ενεργειακές διαφορές που προκύπτουν, εξαρτώνται από την φύση της χημικής ενώσεως και προσδιορίζονται με απορρόφηση μικροκυματικής ακτινοβολίας.

1.3.2 Σπιν και μαγνητική ροπή

Η συνολική στροφορμή του ηλεκτρονίου σε ένα άτομο οφείλεται στην τροχιακή στροφορμή (L) και στην ιδιοστροφορμή ή σπιν (S). Στις περιπτώσεις των

ελευθέρων ριζών και των ιόντων μετάπτωσης η πρώτη συνεισφέρει ελάχιστα στον παραμαγνητικό συντονισμό.

Η συνιστώσα S_z του σπιν (εικόνα 1.18), που είναι ομόρροπη σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, δίνεται από τον τύπο: $S_z = m_s \hbar$

m_s : κβαντικός αριθμός του σπιν, παίρνει τιμές $\pm 1/2$,

$\hbar = h/2\pi$, h : σταθερά του Plank.

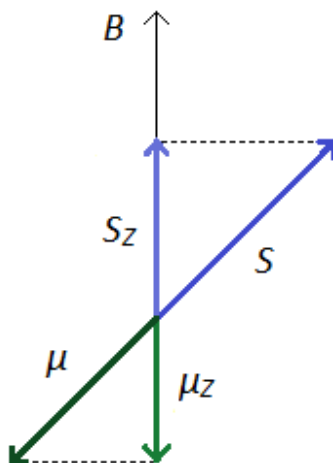
Λόγω της ιδιοστροφομής του, το ηλεκτρόνιο έχει μαγνητική ροπή, η οποία δίνεται από τον τύπο: $\vec{\mu} = \gamma \vec{S}$

γ : γυρομαγνητικός λόγος, που ισούται με $\gamma = -\frac{e}{2mc}$

e : φορτίο του ηλεκτρονίου,

m : μάζα του ηλεκτρονίου,

c : ταχύτητα του φωτός.



Εικόνα 1.18: Μαγνητικό πεδίο, σπιν και μαγνητική ροπή.

Η συνιστώσα μ_z της μαγνητικής ροπής είναι αντίρροπη με την S_z και ισούται με:

$$\mu_z = -g_e \frac{eh}{4\pi mc} m_s = -g_e \beta_e m_s$$

β : η μαγνητόνη του Bohr που ισούται με: $\beta_e = \frac{eh}{4\pi mc}$

$g_e = 2.002319\dots$: παράγοντας Lande.

1.3.3 Το φαινόμενο Zeeman

Όταν ένα ηλεκτρόνιο βρεθεί σε μαγνητικό πεδίο αίρεται ο εκφυλισμός των ενεργειακών καταστάσεων του σπιν και προκύπτουν δύο ενεργειακές στάθμες με $m_s = \pm 1/2$. Η μαγνητική ροπή του προσανατολίζεται ομόρροπα ή αντίρροπα με το εξωτερικό πεδίο. Η ομόρροπη διεύθυνση στο πεδίο (με $m_s = -1/2$) έχει χαμηλότερη ενέργεια.

Η ενέργεια του ηλεκτρονίου σε αυτές τις δύο ενεργειακές στάθμες είναι:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = -\mu B \cos(\theta) = -\mu_z B$$

B : ένταση του μαγνητικού πεδίου, θ : γωνία μεταξύ B και μ_z .

Αν αντικαταστήσουμε την μ_z τότε προκύπτει η εξίσωση:

$$E = g_e \beta_e B m_s = \pm \frac{1}{2} g_e \beta_e B$$

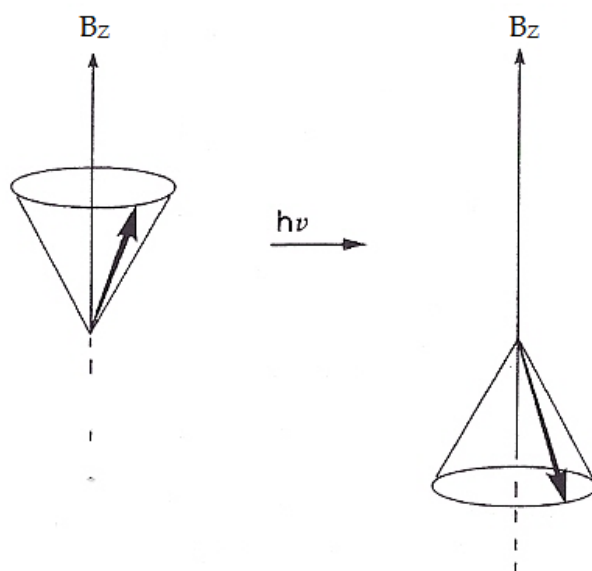
1.3.4 Ο παραμαγνητικός συντονισμός

Αν ηλεκτρόνιο, που βρίσκεται στην χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη, απορροφήσει ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας θα μεταβεί στην υψηλότερη ενεργειακή στάθμη, δηλαδή το σπιν του θα αλλάξει προσανατολισμό (εικόνα 1.19). Για να γίνει αυτό θα πρέπει:

1. Να ικανοποιείται η συνθήκη συντονισμού: $\Delta E = h\nu_0 = g_e \beta_e B_0$

ν_0 , B_0 : συχνότητα και μαγνητικό πεδίο για τα οποία επιτυγχάνεται συντονισμός. Η κατάλληλη συχνότητα για να γίνουν μεταβάσεις αντιστοιχεί στην περιοχή των μικροκυμάτων.

2. Η μαγνητική συνιστώσα B_1 του κύματος να είναι κάθετη στο μαγνητικό πεδίο B και $|\Delta m_s| = 1$, επειδή το απορροφούμενο φωτόνιο έχει μια μονάδα στροφορμής (\hbar).

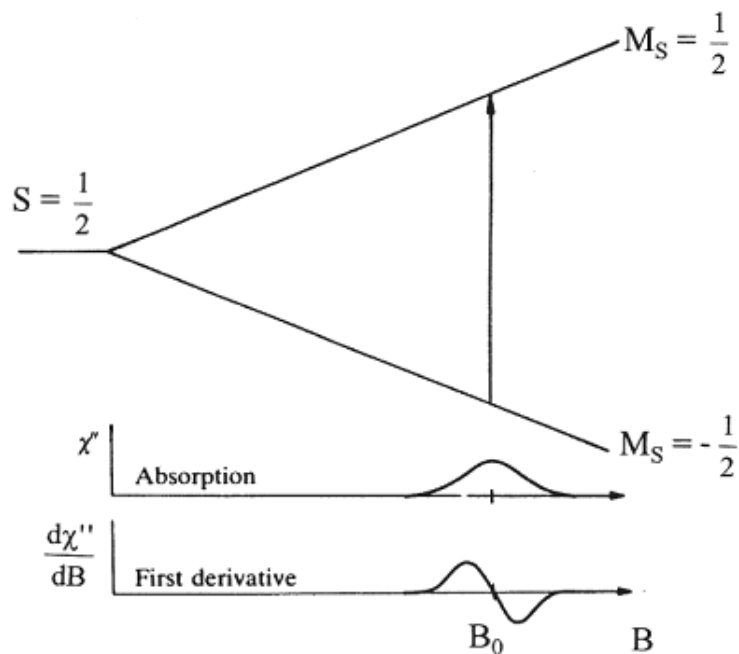


Εικόνα 1.19: Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο προσανατολισμένο παράλληλα στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο προσανατολίζεται αντιπαράλληλα με απορρόφηση ακτινοβολίας κατάλληλου μήκους κύματος.

Από την εξίσωση συντονισμού φαίνεται ότι μπορούμε να πάρουμε φάσματα EPR είτε μεταβάλλοντας τη συχνότητα της ακτινοβολίας, είτε μεταβάλλοντας το μαγνητικό πεδίο. Συνήθως, για τεχνικούς λόγους καταγράφουμε την πρώτη παράγωγο της απορρόφησης συναρτήσει του μαγνητικού πεδίου (εικόνα 1.20).

1.3.5 Ο παράγοντας g

Ο παράγοντας g για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο ισούται με $g_e = 2.002319$. Όταν το ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε μόριο και αλληλεπιδρά με μαγνητικά πεδία άλλων ηλεκτρονίων ή πυρήνων, το g διαφέρει από το g_e του ελεύθερου ηλεκτρονίου.

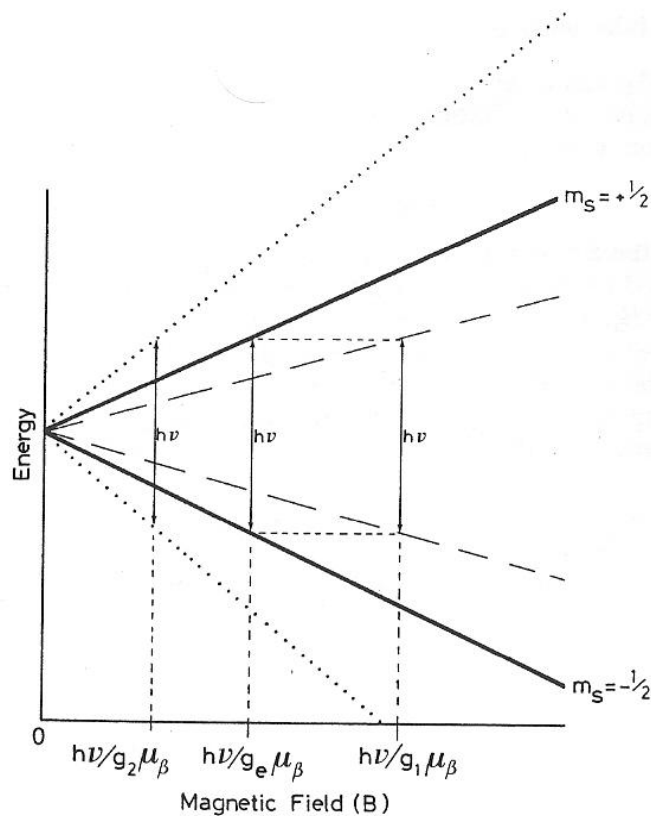


Εικόνα 1.20: Διάγραμμα ενέργειας για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο ($S = \frac{1}{2}$) συναρτήσει του μαγνητικού πεδίου, που δείχνει την απορρόφηση EPR. Απορρόφηση EPR και η πρώτη παράγωγος της συναρτήσει του μαγνητικού πεδίου.

Ο g είναι χαρακτηριστικός για ένα παραμαγνητικό σύστημα, για αυτό και ο υπολογισμός του για ένα άγνωστο σήμα βοηθάει στην ταυτοποίησή του.

Αποκλίσεις από την τιμή του g_e οφείλονται στην σύζευξη σπιν – τροχιακής στροφορμής. Αν η υποστοιβάδα είναι λιγότερο από μισογεμάτη η σταθερά σύζευξης σπιν – τροχιακής στροφορμής $\lambda > 0$, τότε $g < g_e$, αν η υποστοιβάδα είναι περισσότερο από μισογεμάτη και $\lambda < 0$, τότε $g > g_e$ (εικόνα 1.21). Οπότε, το g εκφράζει το μέγεθος της απόκλισης μεταξύ των δύο ενεργειακών σταθμών του σπιν.

Το g , γενικά, εμφανίζει ανισοτροπία και έχει τρεις τιμές (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}) κατά μήκος τριών ορθογωνίων αξόνων (είναι τανυστής δεύτερης τάξης). Αν το σύστημα είναι ιστροπικό: $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$. Αν το σύστημα έχει αξονική συμμετρία: $g_{xx} = g_{yy} = g_{\perp}$ και $g_{zz} = g_{\parallel}$. Για ρομβική συμμετρία ισχύει: $g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$.



Εικόνα 1.21: Η επίδραση του μαγνητικού πεδίου στις ενεργειακές καταστάσεις του σπιν. Η έντονη γραμμή αντιστοιχεί σε ηλεκτρόνιο χωρίς τροχιακή στροφορμή με $g = g_e$, η διακεκομμένη σε $g_1 < g_e$ και η διάστικτη σε $g_2 > g_e$.

1.3.6 Ενώσεις που δίνουν σήμα EPR

Η φασματοσκοπία EPR χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια σε ένα δείγμα. Τέτοιες ενώσεις που δίνουν σήμα EPR είναι:

1. ελεύθερες ρίζες, δηλαδή μόρια με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Τέτοιες ρίζες στο ΦΣ II είναι οι οξειδωμένες Tyr_z και Tyr_D , καθώς και η οξειδωμένη φαιοφυτίνη και κινόνη.
2. διπλές ρίζες, μόρια με δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια απομακρυσμένα το ένα από το άλλο, ώστε οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις είναι ασθενείς. Επίσης, υπάρχουν και ρίζες με περισσότερα από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια.

3. ιόντα μετάπτωσης. Τα στοιχεία μετάπτωσης μπορεί να έχουν περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Στο ΦΣ II στοιχεία μετάπτωσης που δίνουν σήμα EPR είναι κέντρα Mn, καθώς και ο μη αιμικός σίδηρος που βρίσκεται στην πλευρά του αποδέκτη και ο αιμικός σίδηρος του cyt b_{559} .
4. τριπλά εκφυλισμένες καταστάσεις. Τα μόρια αυτά έχουν δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που αλληλεπιδρούν ισχυρά. Συνήθως, οι τριπλές καταστάσεις είναι ασταθείς και χρειάζονται οπτική ή θερμική διέγερση για να σχηματιστούν, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις είναι η θεμελιώδης κατάσταση.
5. σημειακές πλεγματικές ατέλειες σε στερεά. Ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια μπορεί να παγιδευτούν σε τέτοιες ατέλειες και να σχηματίσουν ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια.
6. συστήματα με αγώγιμα ηλεκτρόνια, όπως ημιαγωγοί και μέταλλα.

1.3.7 Διαπλάτυνση των γραμμών απορρόφησης

Με βάση την εξίσωση συντονισμού, θα περιμέναμε το φάσμα να είναι μια γραμμή, δεν συμβαίνει όμως αυτό επειδή οι ενεργειακές καταστάσεις είναι διαπλατυσμένες και επομένως συντονισμός συμβαίνει σε ένα εύρος τιμών μαγνητικού πεδίου. Υπάρχουν δύο αιτίες διαπλάτυνσης των φασμάτων.

Ο χρόνος ζωής μιας κατάστασης σπιν, Δt , συνδέεται με το εύρος αυτής της κατάστασης, ΔE , με την εξίσωση της αρχής της απροσδιοριστίας του Heisenberg:

$$\Delta E \Delta t \approx \frac{h}{2\pi} \quad \text{ή} \quad \Delta \nu \Delta t \approx \frac{1}{2\pi} \quad (\text{επειδή } \Delta E = h \Delta \nu)$$

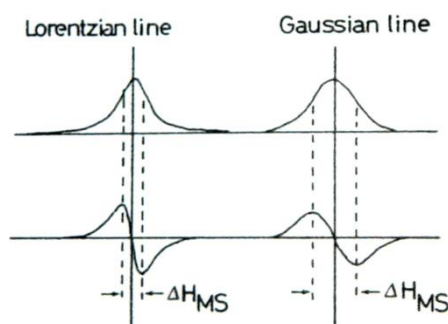
$$\text{όμως, } \Delta \nu = \frac{g\beta}{h} \Delta B$$

$$\text{οπότε: } \Delta B \Delta t \approx \frac{h}{g\beta}$$

Από την εξίσωση αυτή φαίνεται ότι όσο μειώνεται ο χρόνος αποδιέγερσης, το φάσμα διαπλάτνεται. Η διαπλάτνωση είναι ομογενής.

Η δεύτερη αιτία διαπλάτνωσης των φασμάτων είναι τα τοπικά μαγνητικά πεδία που επιδρούν στα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Αυτά τα τοπικά πεδία μπορεί να αλλάζουν με το χρόνο ή στο χώρο. Τα πεδία που αλλάζουν με το χρόνο δίνουν ομογενή διαπλάτνωση ενώ τα πεδία που αλλάζουν στο χώρο μη ομογενή διαπλάτνωση.

Τα φάσματα με ομογενή διαπλάτνωση έχουν λορεντζιανή μορφή, ενώ τα φάσματα με μη ομογενή διαπλάτνωση γκαουσιανή μορφή (εικόνα 1.22).



Εικόνα 1.22: Μορφές της γραμμής απορρόφησης: λορεντζιανή και γκαουσιανή. Η πρώτη είναι στενότερη στο κέντρο και εκτείνεται στις άκρες, ενώ η δεύτερη είναι φαρδύτερη στο κέντρο και δεν εκτείνεται πολύ στις άκρες.

1.3.8 Δυναμική του σπιν

Όταν συμβαίνει συντονισμός, μπορούν να γίνουν μεταβάσεις είτε από την χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη προς την ανώτερη (απορρόφηση ακτινοβολίας), είτε το αντίθετο (εκπομπή). Για να δημιουργηθεί σήμα EPR, πρέπει να γίνεται καθαρή απορρόφηση και επομένως να είναι μεγαλύτερος ο πληθυσμός των ηλεκτρονίων που βρίσκονται στην χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη. Η ένταση του σήματος EPR αυξάνεται με την αύξηση της πληθυσμιακής διαφοράς μεταξύ των ενεργειακών καταστάσεων.

Τα ηλεκτρόνια κατανέμονται στα δύο ενεργειακά επίπεδα σύμφωνα με την κατανομή Boltzmann:

$$\frac{N^+}{N^-} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{g\beta B_0}{kT}}$$

N^+ και N^- : ηλεκτρόνια που βρίσκονται στο υψηλότερο και χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο αντίστοιχα,

k : σταθερά Boltzmann,

T : απόλυτη θερμοκρασία.

Από την παραπάνω εξίσωση βλέπουμε ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, τόσο μειώνεται η πληθυσμιακή διαφορά μεταξύ των καταστάσεων Zeeman και επομένως μειώνεται και η ένταση του σήματος EPR.

Για $\nu \approx 10^{10}$ Hz, $T = 300$ K ο λόγος $N^+/N^- = 0,9984$ που σημαίνει ότι πολύ λίγα κέντρα συμβάλλουν στην απορρόφηση.

Η εξάρτηση της μαγνήτισης από τη θερμοκρασία φαίνεται και από την εξίσωση του Curie: $M = C \frac{B}{T}$ η οποία ισχύει για υψηλές θερμοκρασίες ή ασθενή μαγνητικά πεδία.

1.3.9 Ροή ενέργειας και χρόνοι αποδιέγερσης

Ένα διεγερμένο σπιν αποδιεγείρεται αποδίδοντας την ενέργεια στο περιβάλλον (πλέγμα) υπό μορφή θερμότητας. Η σύζευξη σπιν – πλέγματος χαρακτηρίζεται από τον χρόνο αποκατάστασης σπιν – πλέγματος, T_1 , ενώ η σύζευξη μεταξύ δύο σπιν χαρακτηρίζεται από τον χρόνο αποδιέγερσης T_2 . Ο T_1 σχετίζεται με την σύζευξη σπιν – τροχιακής στροφορμής.

Για την περίπτωση της αλληλεπίδρασης σπιν – πλέγματος, ο ρυθμός μεταφοράς ενέργειας από το σύστημα σπιν προς το πλέγμα και ο χρόνος T_1 συνδέονται από τις παρακάτω σχέσεις:

$$\frac{dE}{dt} = k_1 k (T_S - T_L)$$

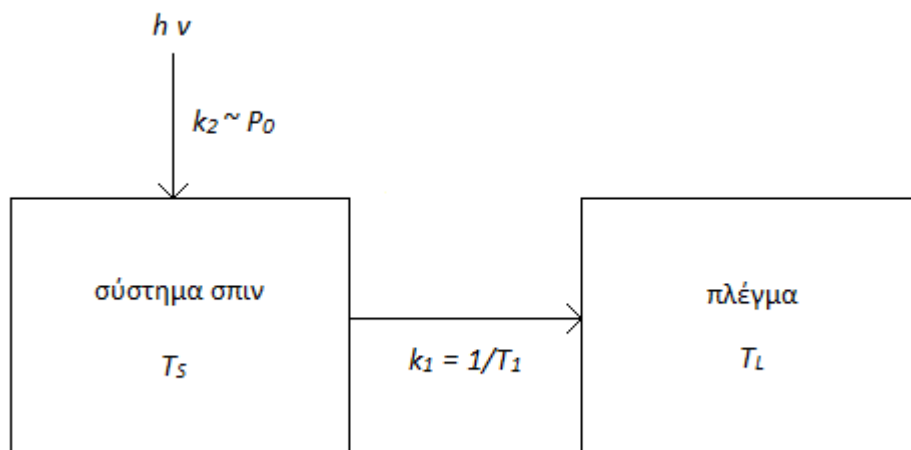
dE/dt : ρυθμός μεταφοράς ενέργειας από το σύστημα σπιν προς το πλέγμα,

T_S : απόλυτη θερμοκρασία συστήματος σπιν,

T_L : απόλυτη θερμοκρασία πλέγματος,

k : σταθερά Boltzmann,

k_1 : σταθερά (s^{-1}), $k_1 = \frac{1}{T_1}$



Εικόνα 1.23: Ροή ενέργειας ανάμεσα στην μικροκυματική ακτινοβολία, το σύστημα σπιν και το πλέγμα.

Ο ρυθμός με τον οποίο προσφέρεται ενέργεια από την ακτινοβολία χαρακτηρίζεται από την σταθερά k_2 , που είναι ανάλογη της μικροκυματικής ισχύος P_0 . Αν η μικροκυματική ισχύς είναι μεγάλη, γίνονται μεταβάσεις από την κατώτερη στην ανώτερη στάθμη Zeeman σε μεγάλο ποσοστό κέντρων και επομένως, η πληθυσμιακή διαφορά μεταξύ των καταστάσεων μειώνεται. Αν ο χρόνος αποδιέγερσης (T_1) είναι μικρός, όπως συμβαίνει συνήθως στις περιπτώσεις μαγνητικών αλληλεπιδράσεων, η πληθυσμιακή διαφορά παραμένει σταθερή. Αν, αντίθετα, ο T_1 είναι μεγάλος η πληθυσμιακή διαφορά μικραίνει και επομένως η ένταση EPR μειώνεται. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται κορεσμός του

σήματος EPR. Για να γίνει δυνατή η παρατήρηση τέτοιων σημάτων πρέπει να χρησιμοποιηθεί χαμηλή ισχύς μικροκυμάτων.

Ο T_1 εξαρτάται και από την θερμοκρασία· μικραίνει καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται. Ακόμα, μικραίνει όταν η σύζευξη σπιν – τροχιακής στροφορμής είναι πολύ ισχυρή (π.χ. στα στοιχεία μετάπτωσης). Όταν ο T_1 είναι πολύ μικρός, το φάσμα διαπλατώνεται και δεν φαίνεται.

Όπως ειπώθηκε στην ενότητα 1.3.8, η ένταση του σήματος EPR αυξάνεται με την μείωση της θερμοκρασίας. Με μείωση της θερμοκρασίας, όμως αυξάνει και ο T_1 και το σήμα φτάνει ευκολότερα σε κορεσμό. Επομένως, για κάθε περίπτωση πρέπει να βρούμε τις καλύτερες συνθήκες μέτρησης.

1.3.10 Υπέρλεπτες αλληλεπιδράσεις

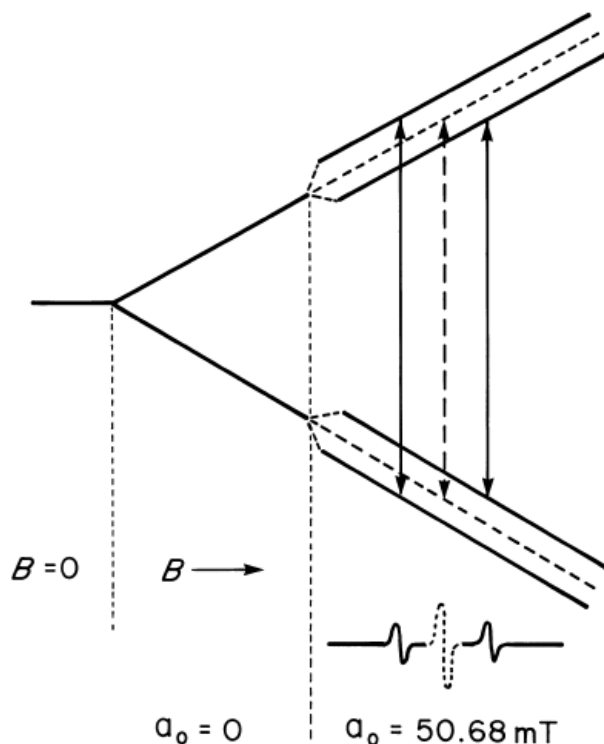
Πολλοί πυρήνες έχουν πυρηνικό σπιν ($I \neq 0$). Η συνιστώσα του πυρηνικού σπιν στον άξονα z χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό m_I , που παίρνει τιμές $(-I, -I+1, \dots, I-1, I)$. Επομένως, για σπιν I δημιουργούνται $2I+1$ ενεργειακές στάθμες.

Λόγω του πυρηνικού σπιν οι πυρήνες αυτοί έχουν διπολική ροπή και δημιουργούν γύρω τους μαγνητικό πεδίο (B_{local}), το οποίο προστίθεται στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (B_{ext}):

$$B_{eff} = B_{ext} + B_{local}$$

Εφόσον, υπάρχουν $2I+1$ πιθανές τιμές για το m_I τόσες είναι και οι τιμές που μπορεί να πάρει το B_{local} .

Ηλεκτρόνιο που βρίσκεται κοντά σε πυρήνα που έχει μαγνητική ροπή αλληλεπιδρά με αυτόν. Η αλληλεπίδραση αυτή ονομάζεται υπέρλεπτη αλληλεπίδραση και εξαιτίας της δημιουργούνται επιπλέον ενεργειακές στάθμες, εκτός από αυτές που οφείλονται στο φαινόμενο Zeeman, ο αριθμός των οποίων εξαρτάται από την τιμή του I .



Εικόνα 1.24: Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων σε ένα σύστημα με $S = I = \frac{1}{2}$. Με διακεκομμένες γραμμές φαίνονται οι ενεργειακές στάθμες και η ΔE για $S = \frac{1}{2}$, $I = 0$. Από κάτω φαίνεται το αντίστοιχο φάσμα EPR. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται το φάσμα για $S = \frac{1}{2}$, $I = 0$, δηλ. χωρίς υπέρλεπτη αλληλεπίδραση.

Έτσι, η συνθήκη συντονισμού ικανοποιείται για $2I+1$ τιμές μαγνητικού πεδίου που δίνονται από τον τύπο:

$$B_{\text{hyperfine}} = B_0 - am_I$$

a : ένταση του τοπικού μαγνητικού πεδίου.

Οι μεταβάσεις επιτρέπονται μόνο μεταξύ ενεργειακών επιπέδων για τα οποία ισχύει: $|\Delta m_S| = 1$ και $\Delta m_I = 0$, επειδή το πυρηνικό σπιν δεν αλλάζει κατά τις μεταβάσεις EPR.

1.3.11 Αλληλεπιδράσεις σπιν - σπιν

Υπάρχουν δύο ειδών αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο διαφορετικών σπιν: διπόλου - διπόλου και ανταλλαγής. Η φύση των δύο αλληλεπιδράσεων είναι διαφορετική. Οι διπολικές αλληλεπιδράσεις είναι μαγνητικές και δρουν σε μεγάλες αποστάσεις. Οι αλληλεπιδράσεις ανταλλαγής είναι ηλεκτροστατικές και δρουν μεταξύ διπλανών ατόμων μέσω των δεσμών ή και μέσω ενδιάμεσων ατόμων, είναι πολύ πιο ισχυρές από τις διπολικές.

Η ενέργεια της διπολικής αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο σημειακών μαγνητικών διπόλων εκφράζεται ως:

$$E_{\alpha\beta} = \frac{\vec{\mu}_\alpha \cdot \vec{\mu}_\beta}{r^3} - \frac{3(\vec{\mu}_\alpha \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_\beta \cdot \vec{r})}{r^5}$$

r : απόσταση μεταξύ των δύο σπιν,

μ_α, μ_β : μαγνητική ροπή των δύο σπιν

Όπως φαίνεται από την εξίσωση, η διπολική αλληλεπίδραση μειώνεται γρήγορα με την αύξηση της απόστασης.

Η ενέργεια των αλληλεπιδράσεων ανταλλαγής εκφράζεται από την παρακάτω χαμιλτωνιανή:

$$H_{exchange} = -2JS_\alpha \cdot S_\beta$$

J (cm^{-1}) η τιμή του υπολογίζεται, $J < 0$ σιδηρομαγνητική σύζευξη (ομόρροπα σπιν), $J > 0$ αντισιδηρομαγνητική σύζευξη (αντίρροπα σπιν).

Αλληλεπιδράσεις ανταλλαγής αναπτύσσονται μεταξύ των ιόντων Mn στο Mn_4CaO_5 (Hasegawa et al. 1999, Charlot et al. 2005, Ames et al. 2011, Asada et al. 2013). Διπολική αλληλεπίδραση αναπτύσσεται μεταξύ της Tyr_Z' και του Mn_4CaO_5 .

2. Υλικά και μέθοδοι

Dans les champs de l'observation le hasard ne favorise que les esprits préparés.

L. Pasteur

2.1 Απομόνωση και επεξεργασία δειγμάτων φωτοσυστήματος II

Η απομόνωση ΦΣ II έγινε από φύλλα σπανακιού με την μέθοδο των Berthold, Babcock και Yokum (BBY, *Berthold et al. 1981*) με κάποιες τροποποιήσεις (*Ford & Evans 1983*). Με τη μέθοδο αυτή διαλυτοποιούνται με απορρυπαντικό οι άκρες των θυλακοειδών μεμβρανών, οι οποίες περιέχουν ΦΣ I, το οποίο δίνει και αυτό σήματα EPR και μένει κυρίως ΦΣ II.

2.1.1 Σύσταση Διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης

400 mM σουκρόζη

15 mM NaCl

5 mM MgCl₂

2% αλβουμίνη ορού βοός

5 mM EDTA

50 mM HEPES (pH = 7.5)

Ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης και έκπλυσης

400 mM σουκρόζη

15 mM NaCl

5 mM MgCl₂

40 mM MES (pH = 6.5)

Διάλυμα TRITON

Ρυθμιστικό διάλυμα εκπλύσεως

20% κ.ο. Triton X-100

Η ρύθμιση του pH των διαλυμάτων γίνεται με NaOH.

2.1.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης μεμβρανών BBY

1. Φύλλα σπανακιού ομογενοποιούνται σε blender με ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης και στη συνέχεια διηθούνται με πανί τυριού.

2. Το διήθημα φυγοκεντρείται για 10 min σε 10000 g στους 277 K. Το ίζημα επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και φυγοκεντρείται για 10 min σε 10000 g στους 277 K. Μετά τη φυγοκέντρηση το ίζημα περιέχει θυλακοειδή με όλα τα φωτοσυνθετικά σύμπλοκα. (Η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται 3 φορές).

3. Το ίζημα αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης σε 2.7 mg chl/mL και αφήνεται για 1.5 h στους 273 K για καλύτερη στοίβαξη των μεμβρανών και διαχωρισμό του ΦΣ II από το ΦΣ I.

4. Στο αιώρημα προστίθεται διάλυμα Triton ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης και του απορρυπαντικού να είναι 2 mg/mL και 5% v/v αντίστοιχα και ακολουθεί επώαση για 30 min στο σκοτάδι. Με αυτό τον τρόπο διαλυτοποιούνται τα θυλακοειδή στρώματος και οι μεμβράνες των grana που είναι σε επαφή με το στρώμα, δηλαδή οι θέσεις όπου υπάρχει κυρίως ΦΣ I [εικόνα 1.4].

5. Το αιώρημα φυγοκεντρείται σε 10000 g στους 277 K για 5 min. Το ίζημα περιέχει άμυλο, πρωτεΐνες και DNA.

6. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται για 30 min στους 277 K σε 20000 g.

7. Το ίζημα επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειαστεί, ώστε να υπάρχει μόνο ίζημα, δηλαδή μεμβράνες BBY.

8. Στη συνέχεια αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σε συγκέντρωση 4 - 6 mg chl/mL και φυλάσσονται σε υγρό άζωτο μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.1.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της χλωροφύλλης (Arnon 1949):

1. Το αιώρημα των μεμβρανών εκχυλίζεται σε διάλυμα με 80% ακετόνη και 20% H₂O.

2. Φυγοκεντρείται σε χαμηλές στροφές.

3. Μετράται η απορρόφηση του υπερκειμένου στα 663 nm και 645 nm (μέγιστα απορρόφησης των chl_a και β αντίστοιχα).

Η ολική συγκέντρωση χλωροφύλλης δίνεται από τη σχέση:

$$c \text{ (}\mu\text{g chl/ml)} = [20,2 \cdot A_{645} + 8,02 \cdot A_{663}] \cdot \text{αραιώση}$$

όπου A₆₄₅ και A₆₆₃ είναι η απορρόφηση στα 645 και 663 nm, αντίστοιχα.

2.1.4 Αλλαγή του pH των δειγμάτων

1. Παρασκευάζονται ρυθμιστικά διαλύματα με pH = 5.5, 6.5, 7.5:

400 mM σουκρόζη

15 mM NaCl

5 mM MgCl₂

40 mM MES (pH = 6.5 ή pH = 5.5) ή 40 mM HEPES (pH = 7.5)

η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH.

2. 1 mL μεμβράνων BBY αραιώνεται σε 20 mL του αντίστοιχου ρυθμιστικού.
3. Γίνεται φυγοκέντρηση σε 20000 g για 30 min στους 277 K.
4. Τα δείγματα επαναιωρούνται στα αντίστοιχα ρυθμιστικά.
5. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση.
6. Τα δείγματα επαναιωρούνται στα αντίστοιχα ρυθμιστικά ώστε η συγκέντρωση της χλωροφύλλης να είναι 4 - 6 mg chl/mL.

2.1.5 Προετοιμασία των δειγμάτων

Σε δείγματα αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο στο σκοτάδι, το 75% των κέντρων βρίσκεται στην S₁, ενώ το 25% στην S₀ (Joliot *et al.* 1971, Styring & Rutherford 1987). Για να συγχρονιστούν όλα τα κέντρα του δείγματος στην S₁, γίνεται φωτισμός με παλμό ώστε τα κέντρα που βρίσκονται στην S₀ να προχωρήσουν στην S₁ – ταυτόχρονα τα κέντρα που βρίσκονται στην S₁ προχωρούν στην S₂ και στη συνέχεια, με επώαση του δείγματος στους 273 K για μισή ώρα επιστρέφουν στην S₁.

Στα δείγματα προστίθεται εξωτερική κινόνη, ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι περίπου 1 mM. Οι κινόνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η phenyl-p-benzoquinone (PpBQ) και η 2,6-dichloro-p-benzoquinone (DCBQ). Οι εξωγενείς κινόνες προσδένονται στη θέση της Q_B.

Η ποιότητα των δειγμάτων μπορεί να προσδιοριστεί με EPR. Τα ανενεργά δείγματα χαρακτηρίζονται από μεγάλο σε ένταση σήμα Mn^{II}, που υπονοεί ότι τα ιόντα Mn^{III} και Mn^{IV} του Mn₄CaO₅ έχουν ελευθερωθεί στο διάλυμα.

2.1.6 Φωτισμός δειγμάτων

Ο φωτισμός των δειγμάτων έξω από την κοιλότητα του φασματομέτρου γίνεται σε γυάλινο θερμομονωτικό δοχείο με ακετόνη, η θερμοκρασία της οποίας ρυθμίζεται με υγρό άζωτο. Για τον συνεχή φωτισμό των δειγμάτων χρησιμοποιείται λυχνία ισχύος 360 W, αφού μπροστά της τοποθετηθεί διάλυμα Cu_2SO_4 , ως φίλτρο για το υπέρυθρο. Για το φωτισμό των δειγμάτων με παλμό χρησιμοποιήθηκε λαμπτήρας ισχύος 1200 W και διάρκειας παλμού 2 ms (elinchrom). Για τον φωτισμό του δείγματος μέσα στην κοιλότητα τοποθετείται οπτική ίνα μπροστά στον λαμπτήρα. Εναλλακτικά, για φωτισμό μόνο έξω από την κοιλότητα χρησιμοποιείται λαμπτήρας ισχύος 200 W και διάρκειας παλμού 1,2 ms (astrapi 2).

Η δημιουργία της κατάστασης S_2 γίνεται είτε με δύο κύκλους συνεχούς φωτισμού για 4 min στους 190 K, επώαση για 2 min στο σκοτάδι στους 190 K και επώαση για 30 sec στους 165 K, ώστε το ηλεκτρόνιο να μεταφερθεί από την Q_A στην Q_B , είτε με παλμό στους 253 K και επώαση για 2 min στην ίδια θερμοκρασία ώστε να μετακινηθεί το ηλεκτρόνιο στην Q_B . Για τον σχηματισμό της S_3 κατάστασης δίνουμε άλλο ένα παλμό στους 253 K και το αφήνουμε 2 min στο σκοτάδι.

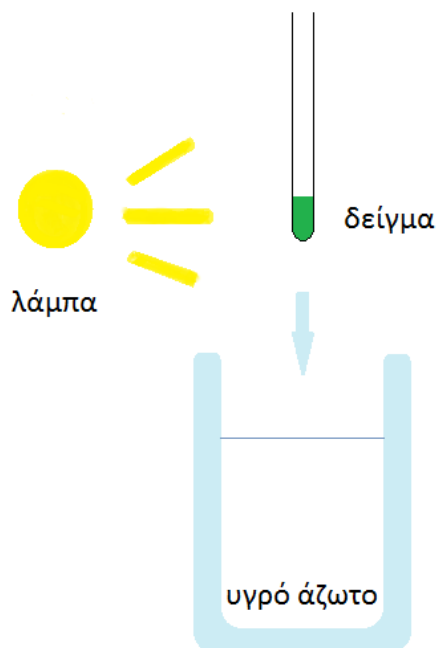
(Για την δημιουργία της S_2 αρχικά χρησιμοποιήθηκε συνεχής φωτισμός, στη συνέχεια επειδή φάνηκε ότι δεν επιτυγχάνεται το μέγιστο της S_2 λόγω επανασύνδεσης στους 165 K, δινόταν παλμός με την elinchrom, επειδή όμως έτσι γίνονταν διπλά βήματα στα τελευταία πειράματα χρησιμοποιήθηκε η astrapi 2).

2.1.7 Παγίδευση καταστάσεων S_nTyr_z'

Για να παγιδευτούν οι ενδιάμεσες καταστάσεις S_nTyr_z' απαιτείται φωτισμός του δείγματος σε θερμοκρασίες 223 K έως 253 K, ανάλογα με την κατάσταση S και την επεξεργασία του δείγματος, και γρήγορο πάγωμα σε θερμοκρασία υγρού αζώτου. Χρησιμοποιήθηκε η διάταξη που φαίνεται στην εικόνα 2.1. Το δείγμα αφήνεται για ένα λεπτό σε λουτρό ακετόνης που έχει ρυθμιστεί στην επιθυμητή θερμοκρασία με υγρό άζωτο. Το δείγμα τοποθετείται μπροστά στη λάμπα και επάνω από το υγρό άζωτο, φωτίζεται και αμέσως τοποθετείται στο υγρό άζωτο.

Η διαδικασία από τη στιγμή που βγαίνει το δείγμα από το λουτρό μέχρι τον φωτισμό και το πάγωμα παίρνει 5 – 10 s. Η θερμοκρασία του δείγματος δεν αλλάζει σημαντικά σε αυτό το διάστημα, τουλάχιστον στα σωληνάκια του X - band (έχει γίνει και δοκιμή με θερμοστοιχείο μέσα στο δείγμα). (Επιπλέον, το δείγμα βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε περιμένουμε να θερμανθεί, αλλά πάνω από τους ατμούς του υγρού αζώτου, οπότε υπάρχει μια ισορροπία).

Ο χρόνος που μεσολαβεί από τον φωτισμό μέχρι το πάγωμα του δείγματος, εκτιμάται να είναι περίπου 500 ms. Το δείγμα βρίσκεται περίπου 3 cm επάνω από το υγρό άζωτο, και καλύπτει την απόσταση αυτή μέσα σε 6 ms, αν υποθέσουμε ότι κάνει ελεύθερη πτώση. Ακόμη, χρειάζεται και χρόνος για να παγώσει το δείγμα αφού μπει στο υγρό άζωτο, λογικά ο χρόνος αυτός θα είναι ίδιας τάξης μεγέθους. Η μεγάλη καθυστέρηση προκύπτει από τον ανθρώπινο παράγοντα, καθώς μεσολαβεί κάποιος χρόνος από τη στιγμή που το ένα χέρι δίνει τον παλμό μέχρι το άλλο χέρι να τοποθετήσει το δείγμα στο υγρό άζωτο. Ο χρόνος απόκρισής μου σε οπτικό ερέθισμα είναι περίπου 300 ms (μετρήθηκε με ένα απλό πείραμα που υπάρχει στο διαδίκτυο (www.humanbenchmark.com): η οθόνη είναι κόκκινη και κάποια στιγμή αλλάζει σε πράσινη, με την αλλαγή ο χρήστης «πατάει κλικ» και έτσι μετράται ο χρόνος απόκρισής του).



Εικόνα 2.1: Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την παγίδευση των καταστάσεων $S_n Y_Z$.

2.1.8 Δημιουργία της $S_2 Fe^{III} Q_A$ -αττ κατάστασης (σταθερή S_2 , χωρίς διαθέσιμη Q_B)

Για να απομακρύνουμε την εξωτερική κίνηση χρησιμοποιούμε ατραζίνη, ένα ζιζανιοκτόνο το οποίο προσδένεται στη θέση της Q_B και αναστέλλει τη λειτουργία της. Με τον παλμό που θα δώσουμε για να προχωρήσει το δείγμα στην S_2 θα σχηματιστεί η ασταθής κατάσταση $S_2 Q_A^-$, εφόσον το ηλεκτρόνιο δεν μπορεί να προχωρήσει στην Q_B . Γι' αυτό προοξειδώνεται ο μη αιμικός Fe^{II} σε Fe^{III} , ώστε με τον παλμό να δημιουργηθεί η σταθερή κατάσταση $S_2 Q_A Fe^{II}$.

Αναλυτικά:

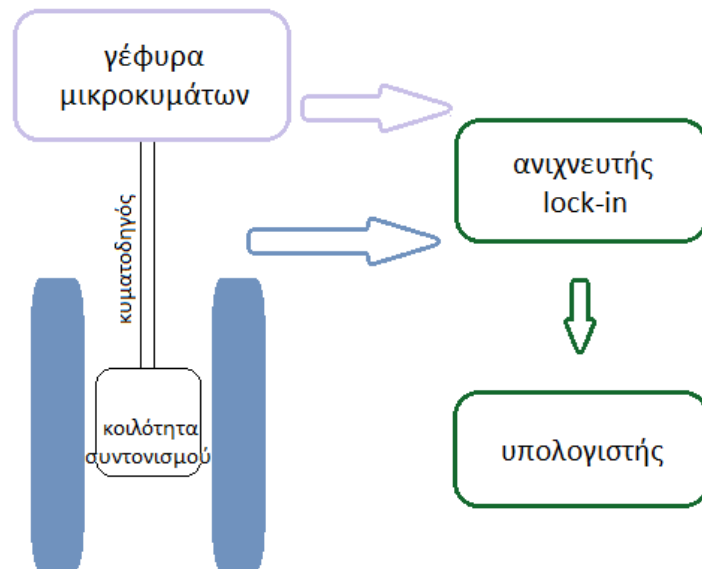
1. 25 μ L $K_3 [Fe^{III}(CN)_6]$ (ferricyanide) 30 mM προστίθενται σε 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης
2. 600 μ L μεμβρανών BBY αραιώνονται στο παραπάνω διάλυμα και επωάζονται για 30 min στους 277 K στο σκοτάδι.
3. γίνεται φυγοκέντρηση για 30 min, 35.000 g στους 277 K.
4. επαναιώρηση με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και φυγοκέντρηση.

5. επαναιώρηση με διάλυμα έκπλυσης σε 4 - 6 mg chl/mL
6. προσθήκη 5% v/v μεθανόλης (10 mL μεθανόλη σε 200 mL BBY)
7. προσθήκη ατραζίνης σε τελική συγκέντρωση στο δείγμα 1 mM.
8. παλμός στους 253 K, για να σχηματιστεί η S₂.

2.2 Φασματόμετρο EPR

Χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο EPR τύπου Bruker ER 200D, το οποίο αναβαθμίστηκε εκτεταμένα στο εργαστήριο και διαθέτει κρυοστάτη τύπου ESR-900 της εταιρίας Oxford Instruments. Για τις μετρήσεις στην μικροκυματική ζώνη Q (34.4 GHz), χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο συναρμολογημένο στο εργαστήριο. Παρακάτω περιγράφεται το φασματόμετρο που λειτουργεί στην μικροκυματική ζώνη X (9.4 GHz), αλλά τα ίδια ισχύουν και για το Q.

Στην εικόνα 2.2 φαίνεται ένα απλοποιημένο διάγραμμα του φασματομέτρου EPR. Το δείγμα τοποθετείται στην κοιλότητα συντονισμού (§2.2.2), η οποία βρίσκεται ανάμεσα στους πόλους του ηλεκτρομαγνήτη (§2.2.3). Τα μικροκύματα παράγονται στην γέφυρα μικροκυμάτων (§2.2.1) και κατευθύνονται στην κοιλότητα μέσω ενός κυματοδηγού. Το ρεύμα του ηλεκτρομαγνήτη μεταβάλλεται και σε τιμές μαγνητικού πεδίου στις οποίες ικανοποιείται η συνθήκη συντονισμού παρατηρούμε απορρόφηση (§2.2.4). Τα μικροκύματα που ανακλώνται από την κοιλότητα ανιχνεύονται από μια δίοδο.



Εικόνα 2.2: Σχηματική απεικόνιση του φασματομέτρου EPR που χρησιμοποιήθηκε.

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά τα μέρη του φασματομέτρου.

2.2.1 Γέφυρα μικροκυμάτων

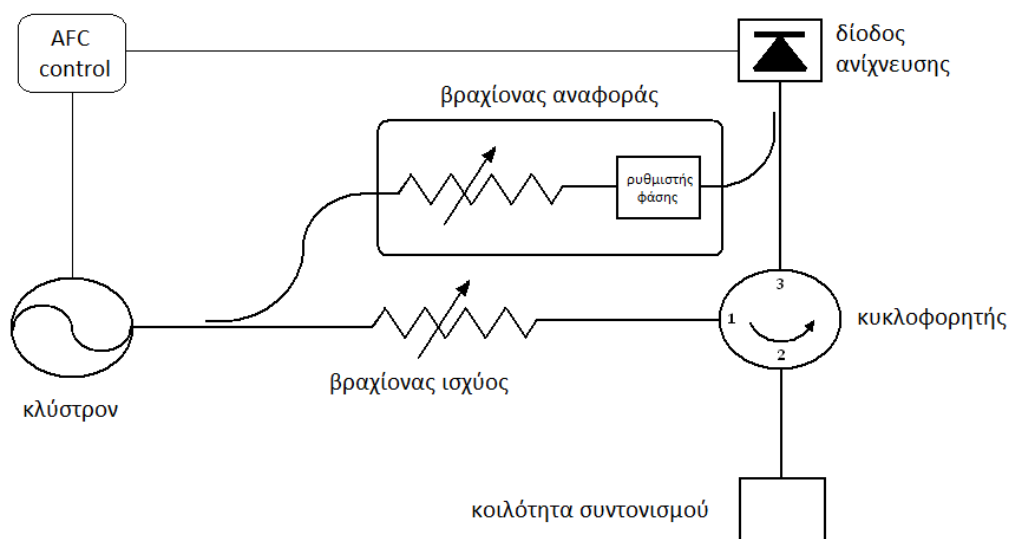
Τα μικροκύματα δημιουργούνται από λυχνία-κλύστρον και κατευθύνονται στην κοιλότητα συντονισμού, όπου βρίσκεται το δείγμα, μέσω ενός κυματοδηγού. Η ισχύς της ακτινοβολίας ρυθμίζεται από έναν εξασθενητή. Ο κυκλοφορητής δεν επιτρέπει στην ακτινοβολία, που ανακλάται από την κοιλότητα, να επιστρέψει στη λυχνία και την οδηγεί προς τη δίοδο ανίχνευσης, όπου η μικροκυματική ισχύς μετατρέπεται σε ρεύμα.

Το ρεύμα της δίοδου πρέπει να είναι περίπου 200 μA επειδή σε αυτή την τιμή είναι γραμμική συνάρτηση της ισχύος. Υπάρχει ένας βραχίονας αναφοράς (bias) που δίνει επιπλέον ισχύ στην δίοδο για να επιτευχθεί η σωστή τιμή ρεύματος. Ο βραχίονας αναφοράς έχει ρυθμιστή φάσης ώστε τα μικροκύματα

που στέλνει στη δίοδο να βρίσκονται σε φάση με τα μικροκύματα που έρχονται από την κοιλότητα.

Η σταθερότητα της συχνότητας των μικροκυμάτων ρυθμίζεται από ένα σύστημα ανατροφοδότησης (AFC, automatic frequency control) που φροντίζει η συχνότητα των μικροκυμάτων που παράγει η κλύστρον να είναι ίση με την συχνότητα της κοιλότητας συντονισμού. Η συχνότητα της κλύστρον είναι διαμορφωμένη με συχνότητα διαμόρφωσης 100 KHz.

Η συχνότητα των μικροκυμάτων είναι 9.408 GHz (ζώνη X) ή 35.35 GHz (ζώνη Q).

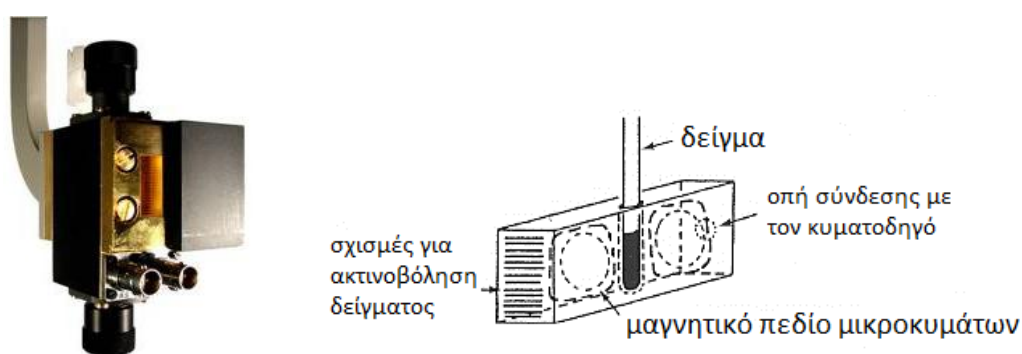


Εικόνα 2.3: Σχηματική απεικόνιση της γέφυρας μικροκυμάτων.

2.2.2 Κοιλότητα συντονισμού

Η κοιλότητα συντονισμού που χρησιμοποιήθηκε στο φασματόμετρο X-band είναι η 4102ST της Bruker (εικόνα 2.4). Έχει σχήμα ορθογωνίου

παράλληλεπιπέδου με τις κατάλληλες διαστάσεις να ισούνται με πολλαπλάσιο του μισού του μήκους κύματος των μικροκυμάτων, ώστε να δημιουργούνται στάσιμα κύματα. Έτσι, η πυκνότητα της ενέργειας είναι χιλιάδες φορές υψηλότερη μέσα στην κοιλότητα από ό,τι στον κυματοδηγό και επιπλέον, διαχωρίζεται τοπικά το ηλεκτρικό πεδίο από το μαγνητικό. Στο σημείο όπου τοποθετείται το δείγμα η τιμή του μαγνητικού πεδίου είναι η μέγιστη, ενώ του ηλεκτρικού πεδίου (πρέπει να) είναι μηδενική. Το μαγνητικό πεδίο της ακτινοβολίας ταλαντώνεται κάθετα στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.



Εικόνα 2.4: η κοιλότητα συντονισμού Bruker 4102ST

Η συγκεκριμένη κοιλότητα είναι τύπου TE_{102} (TE: transverse electric, στο χώρο του δείγματος το ηλεκτρικό πεδίο είναι μηδενικό, ο δείκτης υποδηλώνει την πολλαπλότητα του μήκους κύματος του ηλεκτρικού πεδίου κατά μήκος των 3 καρτεσιανών αξόνων) και είναι η πιο διαδεδομένη. Ένα κριτήριο ποιότητας της κοιλότητας είναι ο παράγοντας $Q = \nu/\Delta\nu$, όπου ν : συχνότητα συντονισμού της κοιλότητας και $\Delta\nu$: η διαφορά συχνότητας αν μειωθεί στο μισό η ισχύς των μικροκυμάτων. Για την κοιλότητα 4102ST, $Q = 6000$.

Η κοιλότητα συνδέεται με τον κυματοδηγό μέσω μιας οπής που ονομάζεται ίριδα. Με την ίριδα επιτυγχάνεται η σωστή σύζευξη κυματοδηγού και κοιλότητας ώστε να μεταφέρεται όλη η ισχύς από τον κυματοδηγό στην κοιλότητα. Η σωστή σύζευξη επιτυγχάνεται μεταβάλλοντας το μέγεθος της ίριδας με τη βοήθεια μιας βίδας με μεταλλικό άκρο.

Η κοιλότητα συντονισμού του φασματομέτρου που λειτουργεί στη μικροκυματική ζώνη Q είναι πιο μικρή, όπως και το δείγμα, για να ταιριάζει στο μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

2.2.3 Μαγνήτης

Το μαγνητικό πεδίο στο χώρο του δείγματος δημιουργείται από ηλεκτρομαγνήτη που μπορεί να φτάσει μέχρι και 1.3 T. Η ένταση του μαγνητικού πεδίου μετράται με μαγνητόμετρο 035M NMR της Bruker.

Στο εσωτερικό του ηλεκτρομαγνήτη υπάρχει ένα ζεύγος πηνίων Helmholtz, το οποίο δημιουργεί ένα χρονομεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο της μορφής:

$$B' = B_m \cdot \cos(2\pi\nu_m t)$$

Το πεδίο αυτό είναι παράλληλο με το εξωτερικό και προστίθεται σε αυτό διαμορφώνοντάς το κατά πλάτος. Η συχνότητα διαμόρφωσης είναι 100 KHz και το πλάτος της διαμόρφωσης (B_m) το επιλέγουμε έτσι ώστε να είναι αρκετά μικρότερο από το εύρος της γραμμής απορρόφησης. Με αυτό τον τρόπο, τελικά, καταγράφουμε την πρώτη παράγωγο της απορροφούμενης μικροκυματικής ισχύος συναρτήσει του μαγνητικού πεδίου.

Ένα δεύτερο ζεύγος πηνίων έχει τη δυνατότητα επαναλαμβανόμενης και γρήγορης σάρωσης μικρού εύρους πεδίου (Rapid Scanning EPR) και ρυθμίζεται από τη μονάδα χρόνου, που είναι ενσωματωμένη στον υπολογιστή.

2.2.4 Καταγραφή του σήματος: ανιχνευτής 'Lock in' και υπολογιστής

Στον ανιχνευτή 'Lock in' φτάνει το σήμα από την δίοδο και αντιστοιχίζεται στην τιμή του πεδίου από τον μαγνήτη. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ανίχνευσης φάσης, μπορεί να εντοπίσει πολύ μικρά ρεύματα. Λειτουργεί με συχνότητα 100 kHz, που είναι η ίδια με τη συχνότητα διαμόρφωσης του πεδίου

και πολύ μικρότερη από την συχνότητα των μικροκυμάτων, καθώς και με ίδια φάση. Μ' αυτό τον τρόπο φιλτράρεται ο θόρυβος και αυξάνεται ο λόγος σήματος/θόρυβος.

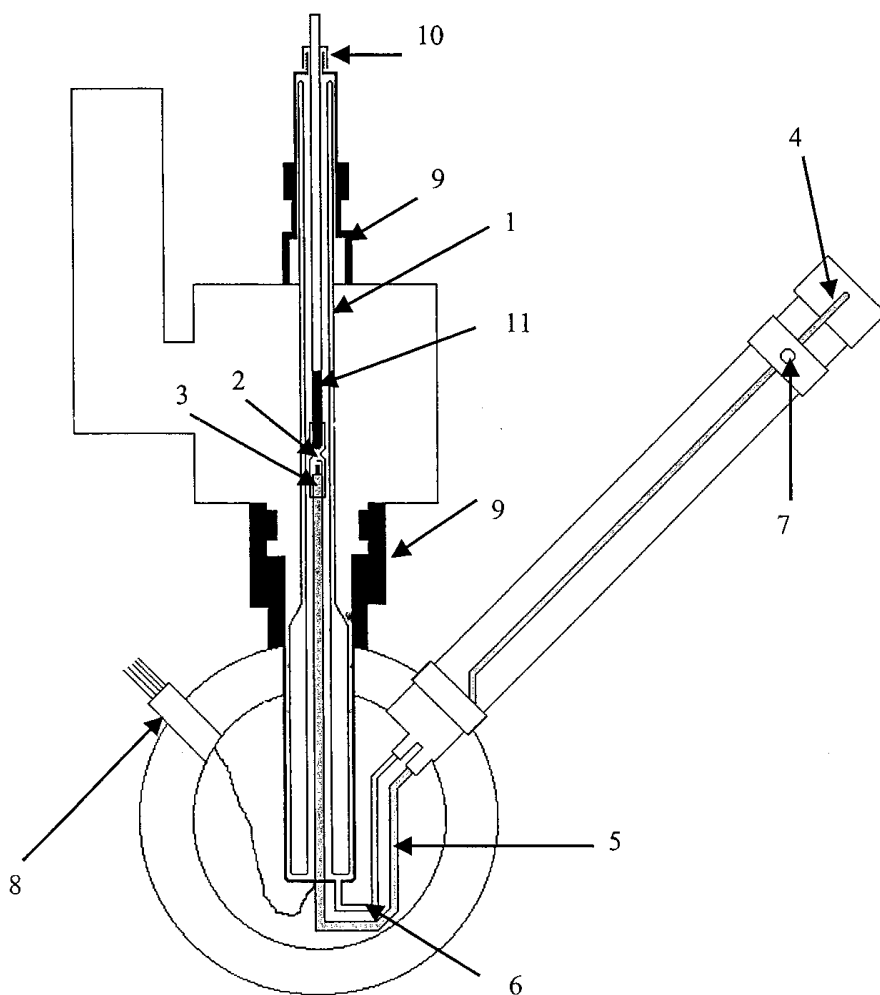
Η πληροφορία από τον ανιχνευτή 'Lock in' καταγράφονται στον υπολογιστή μέσω του προγράμματος Labview, στο οποίο είναι ενσωματωμένος ο ρυθμιστής πεδίου και η μονάδα χρόνου.

Από τον ρυθμιστή πεδίου γίνεται η επιλογή του πλάτους διαμόρφωσης (B_m), του εύρους και των τιμών μαγνητικού πεδίου. Η μονάδα χρόνου συγχρονίζει τη λήψη δεδομένων με την μεταβολή του μαγνητικού πεδίου και επίσης, από εκεί επιλέγεται ο χρόνος σάρωσης των φασμάτων.

Σε πειράματα στα οποία απαιτείται γρήγορη επαναλαμβανόμενη σάρωση συγκεκριμένου εύρους μαγνητικού πεδίου (Rapid Scanning EPR), η μονάδα χρόνου συνδέεται με το δεύτερο ζεύγος πηνίων Helmholtz. Τα δεδομένα καταγράφονται στην κάρτα NI 6251 pci, η οποία μετατρέπει το σήμα από αναλογικό σε ψηφιακό και είναι συνδεδεμένη με το πρόγραμμα Labview.

2.2.5 Κρυοστάτης

Η ένταση του σήματος EPR είναι αντιστρόφως ανάλογη της θερμοκρασίας (§ 1.3.8) γι' αυτό οι μετρήσεις γίνονται σε θερμοκρασίες υγρού ηλίου. Ο χώρος του δείγματος ψύχεται με ροή υγρού ηλίου ή αζώτου που περνάει μέσα από κρυοστάτη τύπου ESR-900 της εταιρίας Oxford Instruments. Η ελάχιστη θερμοκρασία που επιτυγχάνεται είναι 2.5 K, ενώ η μέγιστη 300 K. Η θερμοκρασία ρυθμίζεται μέσω της ροής του ηλίου/αζώτου και μέσω ηλεκτρικής αντίστασης. Ο κρυοστάτης του οργάνου που λειτουργεί στη ζώνη Q είναι διαφορετικός.

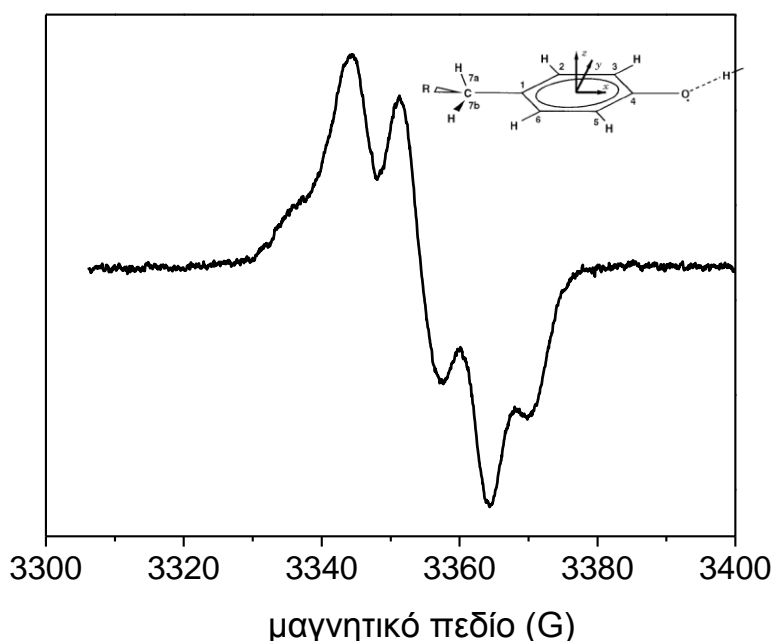


Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση του κρυοστάτη φασματομέτρου EPR σε μικροκυματική ζώνη X. (1) κυρίως σώμα κρυοστάτη (Wilmad). Αποτελείται από χαλαζία υψηλής καθαρότητας, ώστε να μη δίνει σήμα EPR. Έχει διπλά τοιχώματα και φέρει άνοιγμα από όπου γίνεται άντληση για τη δημιουργία κενού (10^{-5} Torr), (2) σωλήνας από χαλαζία που φέρει κατάλληλη στένωση, ώστε να συγκρατεί το δείγμα πάνω από την έξοδο του υγρού ηλίου/αζώτου, (3) θερμοζεύγος (Au +0.03% Fe/Chromel) και αντίσταση (100 Ω) για μέτρηση και ρύθμιση της θερμοκρασίας αντίστοιχα, (4) είσοδος υγρού ηλίου/αζώτου μέσω γραμμής μεταφοράς από το δοχείο αποθήκευσής του. Η γραμμή μεταφοράς είναι τύπου GFS-300, Oxford Instruments, (5) γραμμή εισόδου υγρού ηλίου/αζώτου, (6) γραμμή εξόδου αέριου ηλίου/αζώτου (7) βαλβίδα σύνδεσης αντλίας κενού, (8) σύνδεση θερμοστοιχείου και αντίστασης με τα όργανα ανάγνωσης και ελέγχου της θερμοκρασίας αντίστοιχα, (9) θέσεις μηχανικής σύνδεσης του κρυοστάτη πάνω στην κοιλότητα συντονισμού, (10) είσοδος δείγματος και διάταξη στεγανοποίησης εισόδου, (11) δείγμα.

2.3 Σήματα EPR του φωτοσυστήματος II

2.3.1 Το σήμα της Tyr_D' (σήμα II)

Το σήμα της Tyr_D' ή σήμα II (εικόνα 2.6) είναι το πρώτο σήμα EPR του ΦΣ II που παρατηρήθηκε και είναι σταθερό στο σκοτάδι (*Commoner et al. 1956, για ανασκόπηση βλ. Styring et al. 2012*). Αρχικά, θεωρήθηκε ότι προέρχεται από πλαστοκινόνη, αλλά με δευτερίωση της πλαστοκινόνης και της τυροσίνης σε κυανοβακτήρια (*Barry & Babcock 1987*) και αργότερα με μεταλλαξογένεση φάνηκε ότι προέρχεται από την D2 – Tyr 160 (*Debus et al. 1988*). Το σήμα της Tyr_D' σε αντίθεση με αυτό της Tyr_Z' κορέννυται σε υψηλές τιμές μικροκυματικής ισχύος· ο κορεσμός αλλάζει ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του Mn₄CaO₅ (*Styring & Rutherford 1988b*). Η Tyr_Z' έχει μικρό χρόνο αποκατάστασης λόγω της μαγνητικής αλληλεπίδρασης με το κοντινό Mn₄CaO₅, γι' αυτό και δεν κορέννυται.

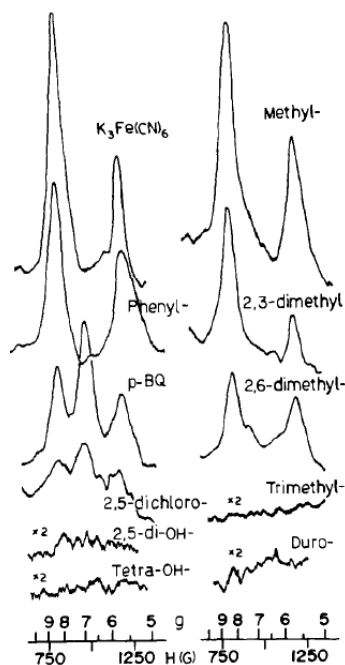
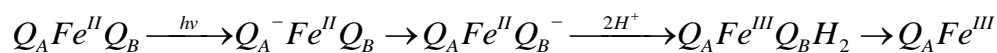


Εικόνα 2.6: Το σήμα της Tyr_D' ή σήμα II (μέσος όρος 4 φασμάτων). Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 13 μW, πλάτος διαμόρφωσης: 4 Gpp, σταθερά χρόνου: 100 ms, χρόνος σάρωσης: 50 s. Θερμοκρασία: 77 K.

Η Tyr_D[·] έχει $S = \frac{1}{2}$. Το g παρουσιάζει ανισοτροπία και τα g_x, g_y, g_z έχουν προσδιοριστεί με φασματοσκοπία EPR υψηλού μαγνητικού πεδίου (Un et al. 1996, Hofbauer et al. 2001, Faller et al. 2003). Η τιμή του g_x είναι ενδεικτική της ισχύος του δεσμού H μεταξύ της τυροσίνης και της ιστιδίνης με την οποία συνδέεται με δεσμό H. Το $S = \frac{1}{2}$ αλληλεπιδρά με τα τέσσερα φαινολικά πρωτόνια και τα δύο β – μεθυλενο πρωτόνια της τυροσίνης και αυτή η υπέρλεπτη αλληλεπίδραση δίνει τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος της Tyr_D[·] (Ioannidis et al. 2008)

2.3.2 Το σήμα του Fe^{III} της πλευράς του αποδέκτη

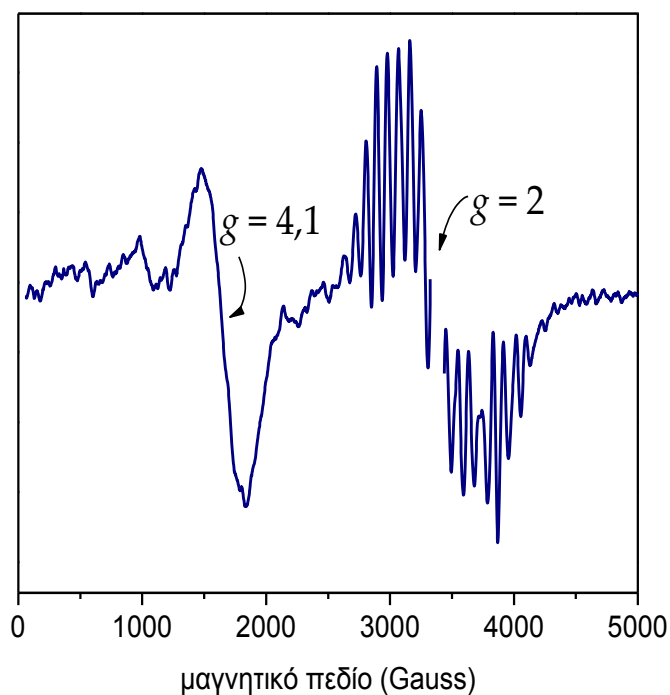
Το ιόν μη αιμικού Fe^{II} που βρίσκεται ανάμεσα στις δύο κινόνες Q_A και Q_B μπορεί να οξειδωθεί από υψηλού δυναμικού εξωγενείς κινόνες σε Fe^{III} (Petrouleas & Diner 1987). Ο Fe^{III} με $S = 5/2$ δίνει σήμα EPR σε χαμηλά πεδία, $g = 5.5 - 8$ (εικόνα 2.7). Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι:



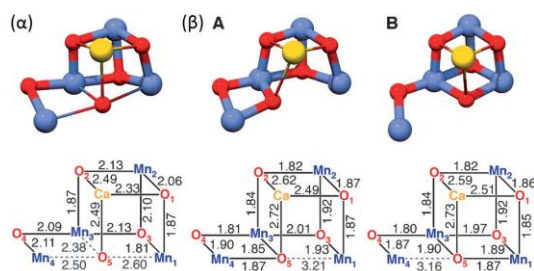
Εικόνα 2.7: Τα φωτοεπαγόμενα σήματα του Fe^{III} που δημιουργούνται με προσθήκη διάφορων εξωγενών κινονών σε σύγκριση με τον πλήρως οξειδωμένο σίδηρο από K₃Fe(CN)₆. Από Petrouleas & Diner 1987.

2.3.3 Τα σήματα της S_2

Δείγματα με σουκρόζη ως κρουπροστατευτικό που βρίσκονται στην S_2 παρουσιάζουν ανομοιογένεια. Υπάρχουν κέντρα που χαρακτηρίζονται από το πολυγραμμικό σήμα με $g = 2$, που αντιστοιχεί σε $S = \frac{1}{2}$ (Dismukes & Siderer 1981) και άλλα που χαρακτηρίζονται από μια απλή παράγωγο με $g = 4.1$ (Zimmermann & Rutherford 1986), που αντιστοιχεί σε $S = 5/2$ (Horner et al. 1998, Haddy et al. 2004). Η ισορροπία αυτή αλλάζει ανάλογα με την επεξεργασία του δείγματος: με γλυκερόλη ως κρουπροστατευτικό όλα τα κέντρα αποκτούν $S = \frac{1}{2}$ και χαρακτηρίζονται από το πολυγραμμικό (Casey & Sauer 1984, Zimmermann & Rutherford 1986). Το ίδιο συμβαίνει και αν προστεθεί μεθανόλη σε συγκέντρωση μέχρι 5% v/v (Force et al. 1998).



Εικόνα 2.8: Τα δύο χαρακτηριστικά σήματα EPR της S_2 : το πολυγραμμικό με $g = 2$ και το $g = 4.1$.



Εικόνα 2.9: (α) Η κρυσταλλική δομή του Mn_4CaO_5 , (β) οι υπολογισμένες θεωρητικά δομές του Mn_4CaO_5 στην S_2 , κατάσταση χαμηλού σπιν (A) και υψηλού σπιν (B). Από *Pantazis et al. 2012*.

Και οι δύο μορφές αντιστοιχούν σε αριθμούς οξειδωσης $Mn^{III}Mn^{IV}_3$, αλλά διαφέρει η κατανομή του φορτίου στο σύμπλοκο (*Boussac et al. 1996, Ioannidis et al. 2006*). Με EXAFS έχει φανεί ότι υπάρχουν μικρές δομικές διαφορές μεταξύ των δύο διαμορφώσεων της S_2 (*Liang et al. 1994*). Με θεωρητικούς υπολογισμούς υπολογίστηκαν οι δομές που αντιστοιχούν στις δύο διαφορετικές καταστάσεις σπιν: στην περίπτωση του χαμηλού σπιν το Mn^{III} είναι το $Mn1$, ενώ στην κατάσταση του υψηλού σπιν το Mn^{III} είναι το $Mn4$, ακόμη διαφέρει ο τρόπος που συνδέεται το $O5$ με τα $Mn1$ και $Mn4$: στην πρώτη περίπτωση το $O5$ συνδέεται μόνο με το $Mn4$ ενώ στην δεύτερη μόνο με το $Mn1$ και σχηματίζεται κλειστός κύβος (*Pantazis et al. 2012*). Η κατάσταση χαμηλού σπιν υπολογίστηκε ότι είναι κατά 1 kcal/mol σταθερότερη.

3. Αποτελέσματα

*An expert is a person who has found out by his own painful experience
all the mistakes that one can make in a very narrow field.*

N.Bohr

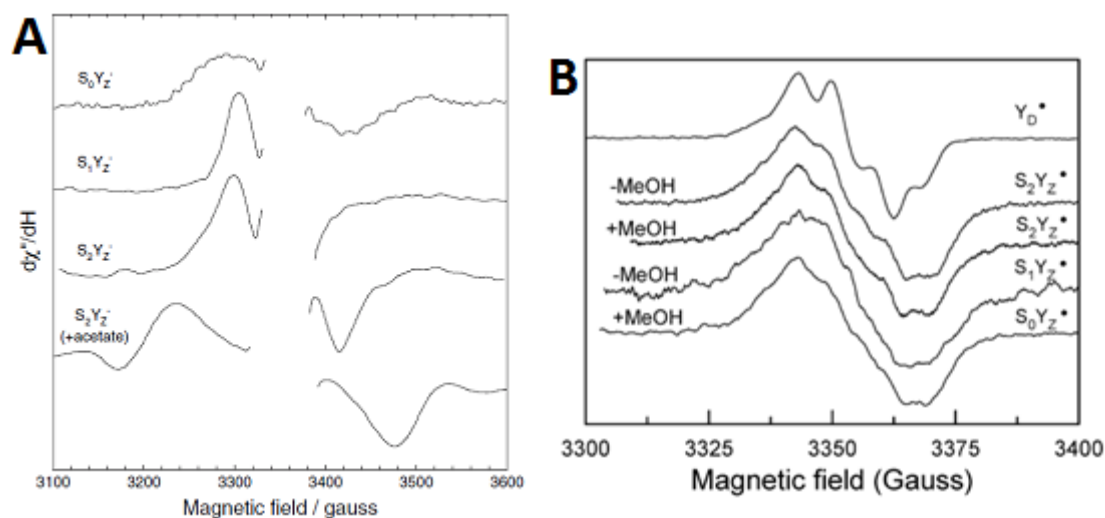
Ο μηχανισμός διάσπασης του H₂O περιλαμβάνει την απόσπαση ηλεκτρονίων και πρωτονίων από μόρια H₂O που προσδένονται στο Mn₄CaO₅. Ο περιοριστικός παράγοντας είναι κυρίως η απόσπαση και μεταφορά των πρωτονίων. Τα ηλεκτρόνια κινούνται ανεμπόδιστα ακόμα και στους 10 K, τα πρωτόνια σε αυτές τις θερμοκρασίες μπορούν να κινηθούν μόνο κατά μήκος ήδη σχηματισμένων δεσμών H. Μικρές κινήσεις πρωτονίων γίνονται σε θερμοκρασίες υγρού αζώτου, εκτεταμένες όμως μεταφορές συνδυασμένες πιθανόν με κινήσεις της πρωτεΐνης απαιτούν θερμοκρασίες κοντά στους 273 K.

Οι ενδιάμεσες καταστάσεις S_nTyrz' αντιστοιχούν στην τυροσίνη που μόλις έχει οξειδωθεί από το P680 και πριν οξειδώσει το Mn₄CaO₅. Η μελέτη των καταστάσεων S_nTyrz' έχει μεγάλη σημασία για να διευκρινιστεί ο ρόλος της τυροσίνης στην απόσπαση πρωτονίων από το Mn₄CaO₅. Οι ενδιάμεσες αντιδράσεις της διάσπασης του H₂O αναστέλλονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η θερμοκρασία αναστολής αντικατοπτρίζει τη φύση της αντίδρασης.

Οι κατώτερες καταστάσεις S_nTyrz' έχουν μελετηθεί εκτενώς με φασματοσκοπία EPR. Οι S₁Tyrz' και S₀Tyrz' σχηματίζονται με φωτισμό ακόμα και στους 5 K (Nugent et al. 2002, Zhang & Styring 2003, Zhang et al. 2004). Η S₂Tyrz' αρχικά μελετήθηκε σε ανενεργά δείγματα (Hallahan et al. 1992, Peloquin et al. 1998) και αργότερα σε λειτουργικά (Ioannidis et al. 2006).

Σε θερμοκρασίες υγρού ηλίου η Tyrz' αλληλεπιδρά μαγνητικά με το Mn₄CaO₅ δίνοντας φάσματα μετάλλου – ρίζας χαρακτηριστικά για κάθε μετάβαση S (εικόνα 3.1A). Σε ψηλότερες θερμοκρασίες χάνεται η μαγνητική αλληλεπίδραση με το

Mn_4CaO_5 και το αδιατάρακτο φάσμα της Tyr_z' δεν διαφέρει στις καταστάσεις S_0 , S_1 , S_2 (Ioannidis et al. 2008, εικόνα 3.1B).



Εικόνα 3.1: (A). Τα χαρακτηριστικά σήματα μετάλλου - ρίζας των καταστάσεων S_0Tyr_z' , S_1Tyr_z' , S_2Tyr_z' και $S_2Tyr_z' + CH_3COO^-$ (με προσθήκη CH_3COO^- ο κύκλος των καταστάσεων S σταματάει στην S_2Tyr_z'). Από Haddy 2007. (B). Το φάσμα της Tyr_z' στους 130 K, θερμοκρασία στην οποία δεν αλληλεπιδρά μαγνητικά με το Mn_4CaO_5 δεν διαφέρει στις διαφορετικές καταστάσεις S (Ioannidis et al. 2008).

Σε αυτή την εργασία μελετήθηκαν οι μεταβατικές καταστάσεις S_2Tyr_z' και S_3Tyr_z' , που είναι τα τελευταία βήματα πριν το σχηματισμό του O_2 . Η μελέτη της S_2Tyr_z' αποτελεί συστηματική επέκταση προηγούμενων μελετών. Η ανίχνευση του κρίσιμου ενδιάμεσου S_3Tyr_z' γίνεται για πρώτη φορά στην διεθνή βιβλιογραφία. Η παγίδευση και των δύο ενδιάμεσων στα περισσότερα πειράματα γίνεται «εν δράσει», δηλ. κατά την διάρκεια του λειτουργικού κύκλου διάσπασης του H_2O . Σημαντικό τεχνικό παράγοντα απετέλεσε η προσθήκη μεθανόλης (έως 5% v/v) σε πολλά δείγματα. Η μεθανόλη σε αυτή τη συγκέντρωση, χωρίς να μειώνει την ενεργότητα (έκλυση O_2) των δειγμάτων προκαλεί ομογενοποίηση της κατάστασης S_2 ενώ συγχρόνως δείχνει να δυσκολεύει τις μεταβάσεις S (επιτρεπτές μεταβάσεις σε υψηλότερη θερμοκρασία από ότι χωρίς μεθανόλη) επιτρέποντας πιο αποτελεσματική παγίδευση των ενδιάμεσων.

3.1 S₂Tyr_z' σε δείγματα με μεθανόλη σε pH = 5.5 – 7.5

3.1.1 Εισαγωγικά

Στην S₂ το σύμπλοκο Mn₄CaO₅ είναι θετικά φορτισμένο επειδή κατά τη μετάβαση S₁ → S₂ δεν απομακρύνεται πρωτόνιο (Suzuki *et al.* 2009). Λόγω του θετικού φορτίου μειώνεται το pK της Tyr_z και δεν μπορεί να οξειδωθεί με φωτισμό στους 10 K (για την οξείδωση της τυροσίνης είναι αναγκαία και η απομάκρυνση του H⁺ από τον φαινολικό δακτύλιο, βλ. § 1.2.5.4). Η S₂Tyr_z' μπορεί να παγιδευθεί, όπως έδειξαν παλαιότερες μετρήσεις (Ioannidis *et al.* 2006), σε θερμοκρασίες > 77 K με σύντομο παλμό φωτός και γρήγορο πάγωμα στους 10 K. Το φάσμα της S₂Tyr_z' έχει εύρος 120 G, και ελαττώνεται μέσα σε περίπου 10 min στους 10 K. Με φωτισμό στους 10 K το σήμα ξαναδημιουργείται, καθώς κάποια κέντρα έχουν παγώσει σε διευθέτηση τέτοια ώστε η τυροσίνη να μπορεί να οξειδωθεί, (κατάσταση S₂^{trapped}) (Ioannidis *et al.* 2006).

Σε θερμοκρασία > 77 K το πρωτόνιο του φαινολικού δακτυλίου μπορεί να κινηθεί προς την His 190, γι' αυτό είναι δυνατή η οξείδωση, και σε ακόμη ψηλότερες θερμοκρασίες (150 K) έχει υποτεθεί το πρωτόνιο της His 190 κινείται προς την Asn 298. Οι δύο αυτές διαδοχικές κινήσεις των πρωτονίων εκφράζονται με δύο διαφορετικού εύρους σήματα EPR της S₂Tyr_z' στους 10 K (Chrysinia *et al.* 2011)

Στις θερμοκρασίες παγίδευσης της S₂Tyr_z' στα παλαιότερα πειράματα η μετάβαση S₂Tyr_z' → S₃ δεν πραγματοποιείται καθώς πριν την οξείδωση του μαγγανίου πρέπει να αποσπαστεί πρωτόνιο για να μειωθεί το φορτίο του συμπλόκου (Klauss *et al.* 2012) και αυτό απαιτεί υψηλότερη θερμοκρασία. Εξ' άλλου κατά τη μετάβαση αυτή γίνονται δομικές αλλαγές στο σύμπλοκο, οι οποίες έχουν παρατηρηθεί με EXAFS (Liang *et al.* 2000, Haumann *et al.* 2005, Glöckner *et al.* 2013) και πρόσδεση μορίου H₂O (Hillier *et al.* 1998, Cox & Messinger 2013) και αυτά απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες.

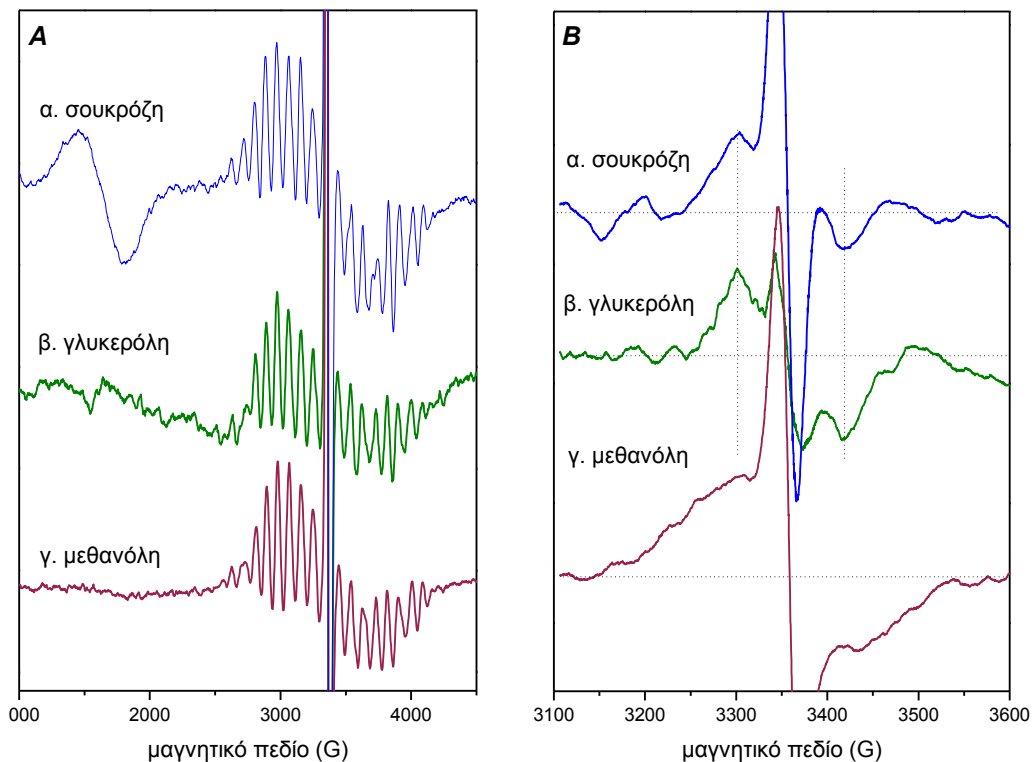
Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος οι μεταβάσεις S γίνονται πολύ γρήγορα και είναι αδύνατο να παγιδευτεί ενδιάμεσο. Αν όμως, το δείγμα φωτιστεί κοντά στη θερμοκρασία ημιαναστολής της μετάβασης $S_2 \rightarrow S_3$, στους 230 K (Styring & Rutherford 1988), όπου η μετάβαση γίνεται αργά, είναι εφικτό να παγιδευτεί η S_2Tyrz' με γρήγορο πάγωμα, πριν προλάβει να αναχθεί από το Mn_4CaO_5 .

Σε δείγματα με μεθανόλη σχηματίζεται η S_2Tyrz' σε μικρό ποσοστό ακόμη και με φωτισμό στους 10 K. Με φωτισμό, όμως, στους 233 K και γρήγορο πάγωμα μπορεί να παγιδευτεί μια αρκετά μεγαλύτερη σε ένταση και σταθερή S_2Tyrz' (Zahariou et al. 2014). Η παρούσα μελέτη επεκτάθηκε και σε δείγματα με διαφορετικά pH. Διαφορές στο φάσμα της S_2Tyrz' ανάλογα με το pH μπορεί να οφείλονται σε αδυναμία απόσπασης του πρωτονίου, ή διαφορετικό τρόπο απόσπασης και έτσι ίσως διευκρινιστεί ο τρόπος που αποσπάται το πρωτόνιο κατά την κρίσιμη μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$ και ο ρόλος της $Tyrz'$ σ' αυτό.

3.1.2 Σύγκριση διαφορετικών επεξεργασιών των δειγμάτων

Η παγίδευση της S_2Tyrz' με φωτισμό κοντά στη θερμοκρασία ημιαναστολής της μετάβασης $S_2 \rightarrow S_3$ και ταχεία ψύξη (βλ. Υλικά και μέθοδοι, § 2.1.6) δοκιμάστηκε σε τρία είδη δειγμάτων: με σουκρόζη ως κρυσπροστατευτικό, με γλυκερόλη ως κρυσπροστατευτικό και με προσθήκη 5% v/v μεθανόλης (σε δείγματα με σουκρόζη). Τα σήματα που παίρνουμε από το κάθε δείγμα φαίνονται στην εικόνα 3.2, μαζί με το σήμα της S_2 κάθε δείγματος, πριν τον σχηματισμό της S_2Tyrz' .

Στα δείγματα με σουκρόζη παγιδεύεται ρίζα της οποίας το σήμα έχει πολύ μικρή ένταση. Με γλυκερόλη επιτυγχάνεται η δημιουργία αρκετά έντονου σήματος. Με μεθανόλη παγιδεύεται σήμα που, αναλόγως με την παρασκευή, μπορεί να φτάσει μέχρι και το 25% των κέντρων. Για αυτό το λόγο προτιμήθηκαν τα δείγματα με μεθανόλη. Στην επόμενη ενότητα παρουσιάζεται η επίδραση της αλλαγής του pH στα δείγματα αυτά.

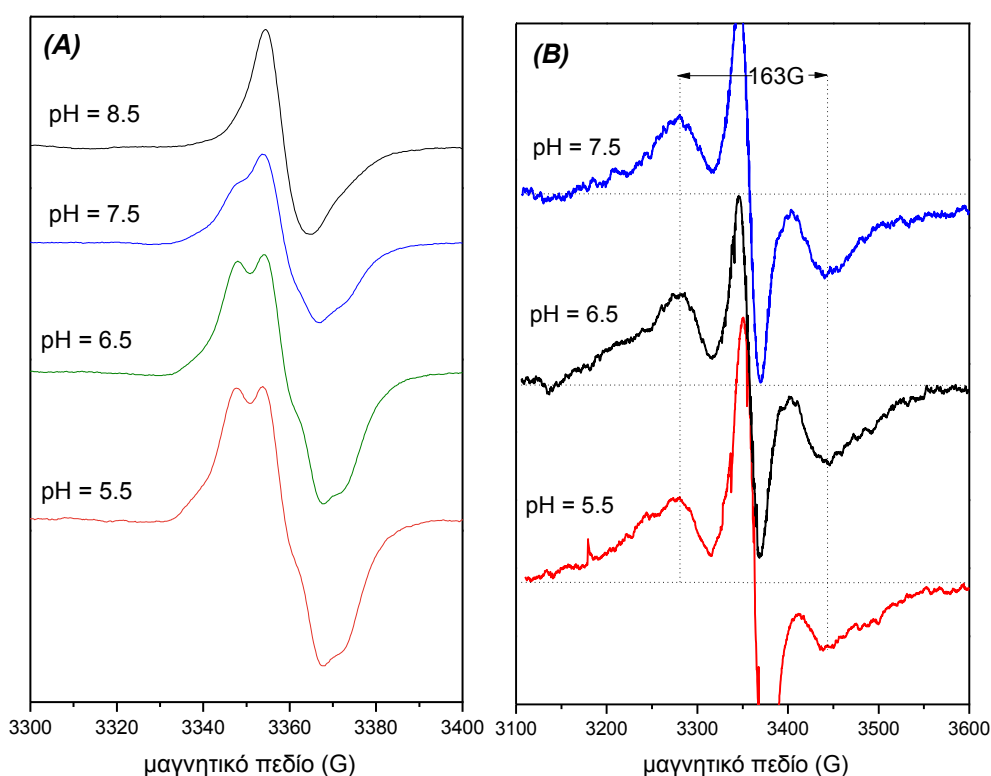


Εικόνα 3.2: Το παγιδευμένο σήμα της S_2TyrgZ' (B) σε δείγματα με σουκρόζη, γλυκερόλη και μεθανόλη μαζί με το αντίστοιχο σήμα της S_2 (A) του κάθε δείγματος. (A) τα φάσματα είναι διαφορές του φάσματος που καταγράφεται μετά τον σχηματισμό της S_2 μείον το φάσμα της S_1 , (B) διαφορές του φάσματος αμέσως μετά τον φωτισμό του δείγματος σε θερμοκρασία 223 K (φάσματα α, β) ή 233 K (φάσμα γ) και ταχεία ψύξη σε υγρό άζωτο μείον το φάσμα μετά από επώαση του δείγματος στο σκοτάδι για να πέσει το σήμα. Τα σήματα κανονικοποιήθηκαν ανάλογα με την συγκέντρωση των δειγμάτων. Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp, χρόνος σάρωσης: 200 s, σταθερά χρόνου: 300 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 30 mW (α) και χρόνος σάρωσης: 50 s, σταθερά χρόνου: 300 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW (β). Θερμοκρασία: 10 K.

3.1.3 Επίδραση του pH στην ενεργότητα των δειγμάτων και σε γνωστά σήματα EPR

Το pH των δειγμάτων ώστε η έκλυση O_2 να είναι η μέγιστη είναι 5.5 – 7 (Styring et al. 2012). Τα δείγματα με υψηλό pH χαλάνε πιο γρήγορα από τα φυσιολογικά με επώαση στους 277 K στο σκοτάδι, λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης OH^- . Ακόμη, στις μετρήσεις με χαμηλή ισχύ μικροκυμάτων εκτός από

το σήμα II (το σταθερό σήμα της Tyr_D· μετρημένο με χαμηλή μικροκυματική ισχύ) φαίνεται και ένα άλλο πιο στενό σήμα με εύρος ≈ 11 G, λίγο ασύμμετρο (η κορυφή είναι λίγο πιο μεγάλη σε ένταση από την κοιλάδα) (εικόνα 3.3A). Η ένταση αυτού του σήματος φαίνεται να είναι ανάλογη του πόσο χαλασμένο είναι το δείγμα. Η ποιότητα των δειγμάτων εκτιμάται από το σήμα της Tyr_D, καθώς και το σήμα του Mn^{II} (§ 2.1.5).



Εικόνα 3.3: Επίδραση της αλλαγής του pH σε δύο χαρακτηριστικά σήματα: (A) το σήμα II και (B) το ασθενές φωτοεπαγόμενο σήμα στους 10 K στην S_2 σε δείγματα με μεθανόλη. (Τα φάσματα είναι η διαφορά του φάσματος αμέσως μετά από τρεις συνεχόμενους παλμούς στους 10 K με ορατό φως μείον το τελικό σκοτάδι, μετά από 10 min). Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 4 Gpp (A) και 25 Gpp (B), χρόνος σάρωσης: 50 s, σταθερά χρόνου: 300 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 12, 6 μ W (A) και 100 mW (B). Θερμοκρασία: 10 K.

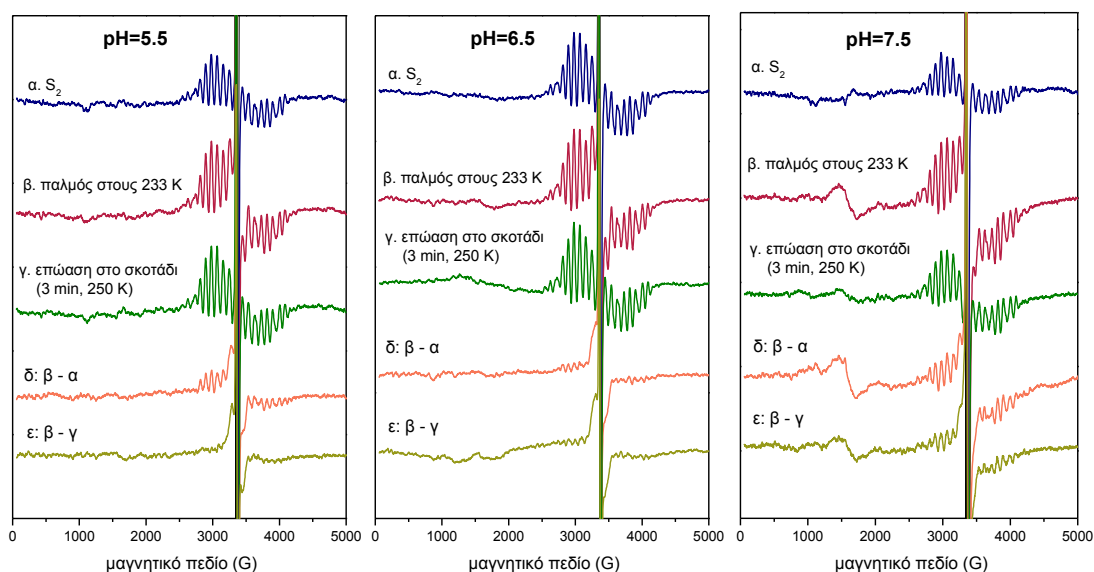
Το πολυγραμμικό σήμα της S_2 έχει μικρότερη ένταση στα πιο ακραία pH χωρίς να σημαίνει ότι είναι μικρότερος ο πληθυσμός των κέντρων που βρίσκονται στην S_2 (Geijer et al. 2000, Bernat et al. 2002). Με φωτισμό στους 10 K στα δείγματα

με μεθανόλη παρατηρείται το σήμα μετάλλου - ρίζας της S_2Tyr_2' και έχει εύρος 160 G (Ioannidis et al. 2006). Το σήμα αυτό, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.3B, δεν αλλάζει με την αλλαγή του pH. Τα φάσματα της εικόνας 3.3B είναι η διαφορά φάσματος που καταγράφεται αμέσως μετά τον φωτισμό στους 10 K μείον το τελικό σκοτάδι, μετά από 10 min, οπότε το σήμα έχει πέσει εντελώς. Το σήμα αυτό φαίνεται να οφείλεται σε κάποια μεινότητα κέντρων στα οποία μπορεί να οξειδωθεί η Tyr_2' ακόμα και σε τόσο χαμηλή θερμοκρασία. Το ίδιο συμβαίνει και σε δείγματα με γλυκερόλη. Τα σήματα αυτά είναι μικρής έντασης σε σχέση με αυτά που παγιδεύονται σε ψηλές θερμοκρασίες, όπως φαίνεται και στη συνέχεια.

3.1.4 Παγίδευση της S_2Tyr_2' στη θερμοκρασία ημιαναστολής της μετάβασης $S_2 \rightarrow S_3$ σε δείγματα με μεθανόλη

Αν δώσουμε παλμό σε δείγμα που βρίσκεται στην S_2 κοντά στη θερμοκρασία ημιαναστολής της μετάβασης $S_2 \rightarrow S_3$ και παγώσουμε γρήγορα μπορούμε να παγιδεύσουμε την S_2Tyr_2' . Στη θερμοκρασία αυτή η μετάβαση γίνεται σχετικά αργά (αλλά όχι σε όλα τα κέντρα) και έτσι προλαβαίνουμε να παγώσουμε το δείγμα πριν η Tyr_2' αναχθεί από το Mn_4CaO_5 . Η θερμοκρασία ημιαναστολής για την S_2 προς S_3 είναι περίπου 230 K (Styring & Rutherford 1988).

Στην εικόνα 3.4 φαίνεται ολόκληρη η πορεία του πειράματος παγίδευσης της S_2Tyr_2' σε δείγματα με 5% v/v μεθανόλη σε τρία διαφορετικά pH: 6.5 (το φυσιολογικό), 5.5 και 7.5. Όλα τα φάσματα είναι διαφορές μείον την S_1 . Η S_2 (φάσμα α) δημιουργήθηκε με δύο κύκλους φωτισμού για 4 min στους 190 K και στη συνέχεια επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 265 K για 30 s. Δημιουργείται το χαρακτηριστικό πολυγραμμικό σήμα της S_2 σε όλες τις τιμές pH.

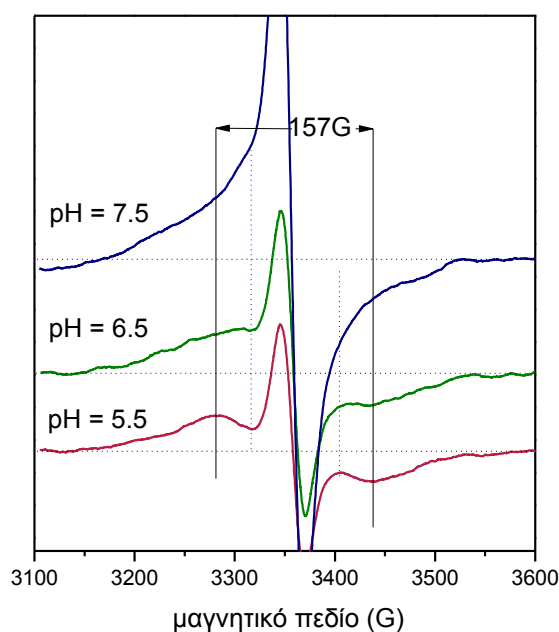


Εικόνα 3.4: Παγίδευση της S_2Tygz' σε δείγματα με 5% v/v μεθανόλη και $pH = 5.5, 6.5$ και 7.5 , με παλμό στους 233 K και γρήγορη κατάψυξη. Όλα τα φάσματα είναι διαφορές μείον το αρχικό σκοτάδι (S_1). Στα δείγματα έχει προστεθεί DCBQ ως αποδέκτης των ηλεκτρονίων. Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp , χρόνος σάρωσης: 200 s , σταθερά χρόνου: 300 ms , ισχύς μικροκυμάτων: 30 mW . Θερμοκρασία: 10 K .

Στη συνέχεια, δίνεται παλμός στους 233 K και αμέσως το δείγμα καταψύχεται σε υγρό άζωτο, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.1.5 (φάσμα β). Παρατηρείται αύξηση του πολυγραμμικού σήματος της S_2 , ιδιαίτερα στα ακραία pH , πιθανόν λόγω κέντρων που είχαν μείνει στην S_1 και τώρα προχωρούν στην S_2 . Ακόμη, παρατηρείται η δημιουργία σήματος με $g = 4.1$ (διαφορετική διαμόρφωση της S_2 με $S = 5/2$) στο δείγμα με $pH = 7.5$. Παράλληλα, δημιουργείται ένα διασπασμένο σήμα (split signal) με $g \approx 2$, το οποίο φαίνεται καλύτερα στο φάσμα δ, το οποίο είναι η διαφορά του φάσματος β μείον το φάσμα α. Τέλος, γίνεται επώαση στους 250 K στο σκοτάδι για 3 min και η $Tygz'$ επανασυνδέεται (φάσμα γ), στην διαφορά του φάσματος β μείον το γ φαίνεται και πάλι το διασπασμένο σήμα (φάσμα ε). Σε αυτά τα φάσματα δεν διακρίνονται οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών pH . Παρακάτω παρουσιάζονται φάσματα καλύτερης ευκρίνειας.

3.1.5 Επίδραση του pH στο σήμα μετάλλου – ρίζας της κατάστασης S_2Tyr_z' με μεθανόλη

Το διασπασμένο σήμα της S_2Tyr_z' που παγιδεύεται με φωτισμό στους 233 K και γρήγορο πάγωμα σε pH = 5.5, 6.5 και 7.5, μετρημένα στους 10 K, φαίνονται στην εικόνα 3.5. Τα φάσματα προέκυψαν με αφαίρεση τους φάσματος μετά τον παλμό στους 233 K μείον το τελικό σκοτάδι, δηλαδή μετά την επώαση στους 250 K στο σκοτάδι. Το σήμα που αντιστοιχεί σε pH = 5.5 μοιάζει αρκετά με το γνωστό σήμα της S_2Tyr_z' με μεθανόλη που δημιουργείται με φωτισμό στους 10 K και έχει εύρος 160 G (εικόνα 3.3B). Καθώς το pH αυξάνεται το φάσμα στενεύει – για την ακρίβεια – αυξάνεται η συνεισφορά κάποιου στενότερου σήματος – αυτό θα φανεί καλύτερα στη συνέχεια. Τα σημεία στα οποία φαίνεται να βρίσκονται τα μέγιστα του στενού σήματος είναι περίπου εκεί που βρίσκονται οι μπλε διακεκομμένες γραμμές (εικόνα 3.5).

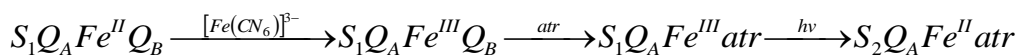


Εικόνα 3.5: S_2Y_z' (233 K) σε δείγματα με 5% v/v μεθανόλη και pH = 5.5, 6.5 και 7.5. Τα φάσματα είναι η διαφορά του φάσματος μετά τον παλμό στους 233 K μείον το τελικό σκοτάδι. Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp, χρόνος σάρωσης: 50 s, σταθερά χρόνου: 300 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW. Θερμοκρασία: 10 K.

3.1.6 Η εξαιρετική σταθερότητα του φωτοεπαγόμενου σήματος $S_2Tyr_z^-$ των 233 K οφείλεται στον σχηματισμό Q_B^-

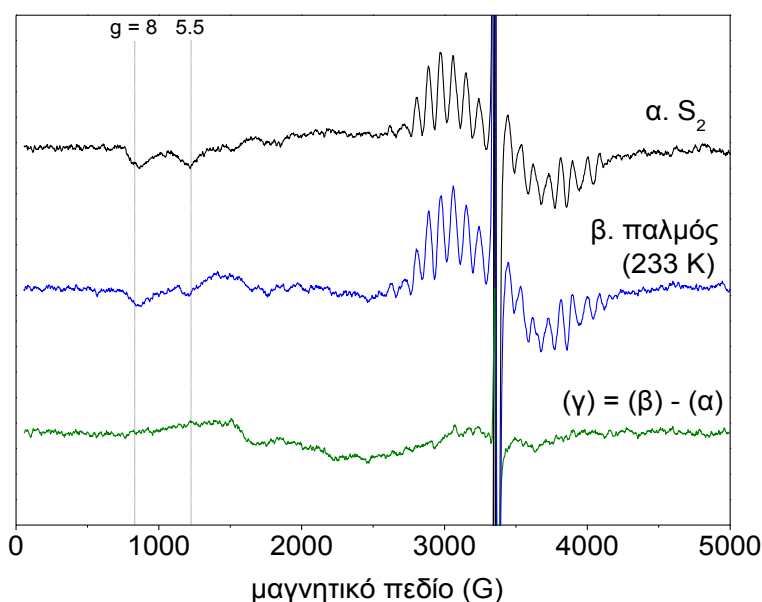
Ο λόγος στον οποίο οφείλεται η επιτυχία της παγίδευσης του σήματος της $S_2Tyr_z^-$ (233 K) είναι η εξαιρετική σταθερότητά του. Είναι σταθερό στους 10 K, πέφτει ελάχιστα με παραμονή του δείγματος για μέρες σε υγρό άζωτο και εξαφανίζεται σε 2 min με επώαση του δείγματος στους 253 K. Αυτό ισχύει και για τα δείγματα χωρίς μεθανόλη (§ 3.1.2). Αντίθετα, η $S_2Tyr_z^-$ που σχηματίζεται στους 150 K (σε δείγματα χωρίς μεθανόλη) πέφτει στους 10 K μέσα σε 10 min, λόγω επανασύνδεσης με την Q_A^- (Ioannidis et al. 2006). Η σταθερότητα της παγιδευμένης $S_2Tyr_z^-$ (233 K) αποδίδεται στη μεταφορά του ηλεκτρονίου από την Q_A στην Q_B , η οποία δεν επανασυνδέεται σε κρυογενικές θερμοκρασίες. Η μεταφορά ηλεκτρονίου από την Q_A στην Q_B , γίνεται περίπου στα μισά κέντρα στους 245 K έως 255 K (Reifarth & Renger 1998, Fufezan et al. 2005, βλέπε και ενότητα 1.2.4).

Μια εναλλακτική ερμηνεία για την σταθερότητα του σήματος είναι ότι το δείγμα παγώνει σε μια κατάσταση στην οποία το πρωτόνιο της Tyροσίνης έχει απομακρυνθεί πολύ κατά την οξειδωσή της και δεν μπορεί να επιστρέψει σε χαμηλές θερμοκρασίες, επομένως δεν μπορεί να γίνει και επανασύνδεση. Για να ξεκαθαριστεί αν η σταθερότητα οφείλεται και σε απομάκρυνση του πρωτονίου έγινε το πείραμα της εικόνας 3.6. Χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο είχε γίνει οξειδωση του Fe^{II} της πλευράς του αποδέκτη σε Fe^{III} , με $[Fe(CN)_6]^{3-}$ (βλ. Υλικά και μέθοδοι, § 2.1 7) και προσθήκη ατραζίνης. Η ατραζίνη είναι ζιζανιοκτόνο, το οποίο προσδένεται στη θέση της Q_B και αναστέλλει τη λειτουργία του ΦΣ II (Jursinic & Stemler 1983). Συνοπτικά, η προετοιμασία του δείγματος είναι:



Αρχικά, το δείγμα βρίσκεται στην κατάσταση S_1Fe^{III} – στο φάσμα (α) φαίνονται ανεστραμμένα τα σήματα του Fe^{III} με $g = 8$ και $g = 5.5$ (Petrouleas & Diner 1987), καθώς είναι η διαφορά της S_2 μείον την S_1 . Με έναν παλμό στους 253 K (φάσμα α , εικόνα 3.5) σχηματίζεται η S_2Fe^{II} (ο σίδηρος ανάγεται, γι' αυτό και είναι

ανεστραμμένα τα σήματα του Fe^{III}). Στη συνέχεια δίνεται ο παλμός στους 233 K για το σχηματισμό του σταθερού σήματος (φάσμα β). Το φάσμα (γ) είναι η διαφορά του φάσματος μετά τον παλμό στους 233 K μείον το φάσμα της S_2 . Δεν παρατηρείται καθόλου σήμα της Tyr_2^- . Κατά την οξείδωση της Tyr_2^- το ηλεκτρόνιο πηγαίνει στην Q_A και στη συνέχεια επανασυνδέεται γρήγορα, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμη κίνηση στη θέση της Q_B . Εάν η σταθερότητα οφειλόταν και στην απομάκρυνση πρωτονίου θα βλέπαμε σήμα, έστω λίγο μικρότερο. Αυτό δεν σημαίνει ότι δεν γίνεται εκτεταμένη μετακίνηση πρωτονίων, πολύ πιθανόν και αποβολή του στον αυλό, η σταθερότητα του σήματος όμως δεν σχετίζεται με αυτό.



Εικόνα 3.6: Η σταθερότητα του σήματος $S_2\text{Tyr}_2^-$ (233 K) οφείλεται στον σχηματισμό της Q_B^- . Σε δείγμα που βρίσκεται στην S_2 και περιέχει ατραζίνη δεν παγιδεύεται το σήμα λόγω της γρήγορης επανασύνδεσης με την Q_A . (α) S_2 η οποία σχηματίστηκε με παλμό στους 253 K, (β) παλμός στους 233 K και γρήγορο πάγωμα, (γ) $(\gamma) = (\beta) - (\alpha)$ είναι εμφανής η απουσία του σήματος επειδή το ηλεκτρόνιο δεν μπορεί να προχωρήσει στην Q_B , λόγω της ατραζίνης, και επανασυνδέεται γρήγορα. Το δείγμα περιέχει 5% μεθανόλη και ατραζίνη. Έχει οξειδωθεί ο Fe^{II} σε Fe^{III} με $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, ώστε να σχηματιστεί σταθερή S_2 παρά την παρουσία ατραζίνης. Συνθήκες EPR όπως στην εικόνα 3.4.

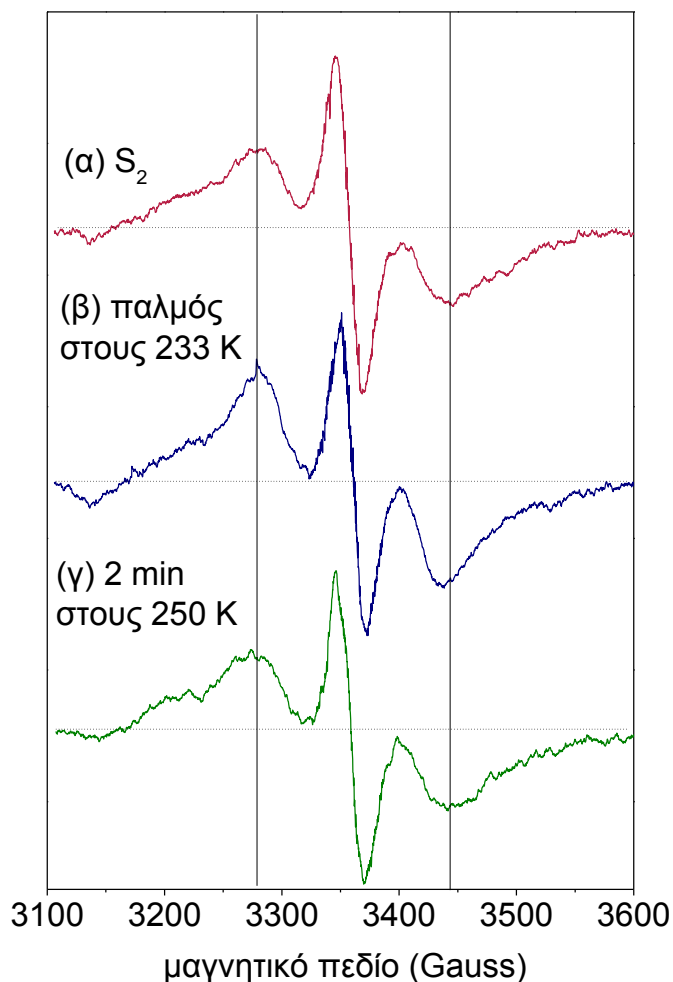
3.1.7 Αύξηση του φωτοεπαγόμενου σήματος στους 10 K στα προ-φωτισμένα δείγματα. Ανάλυση του σήματος σε δύο συνιστώσες.

Αφού διευκρινίστηκε που οφείλεται η σταθερότητα του παγιδευμένου σήματος η οποία επιτρέπει την εκτενή μελέτη του, επόμενο ερώτημα είναι εάν η παγίδευση του σήματος στους 233 K επηρεάζει το φωτοεπαγόμενο σήμα των 10 K. Φάνηκε, λοιπόν, ότι μετά τον σχηματισμό της σταθερής ρίζας με φωτισμό στους 233 K, φωτίζοντας στους 10 K παίρνουμε μεγαλύτερο σήμα της S_2Tyrz^{\cdot} από ότι με φωτισμό της αρχικής S_2 . Στην *εικόνα 3.7* φαίνεται η S_2Tyrz^{\cdot} (10 K) στην αρχική S_2 (φάσμα α), μετά το σχηματισμό της σταθερής ρίζας (φάσμα β), μετά το τελικό σκοτάδι και την πτώση του σταθερού σήματος (φάσμα γ) σε δείγμα με pH = 5.5 (τα ίδια όμως ισχύουν και για τα άλλα pH). Η (μικρή) αύξηση της S_2Tyrz^{\cdot} (10K) αποδίδεται σε κέντρα όπου οξειδώθηκε η $Tyrz^{\cdot}$ με τον παλμό στους 233 K, αλλά επανασυνδέθηκε στο χρόνο που μεσολάβησε μέχρι να παγώσει το δείγμα, όμως η αναδιάταξη των πρωτονίων γύρω από την τυροσίνη κατά την οξείδωσή της (και ίσως και κάποιες αλλαγές στην πρωτεΐνη) δεν πρόλαβαν να επανέλθουν στην αρχική κατάσταση και το δείγμα πάγωσε σε αυτή τη διαμόρφωση που ευνοεί την οξείδωση της τυροσίνης.

Επομένως το σήμα των 10 K έχει την ίδια προέλευση με το σήμα των 233 K. Το σήμα των 10 K δεν έχει καμία συνεισφορά από την πιο στενή συνιστώσα που φαίνεται να υπάρχει στο σήμα που δημιουργείται σε υψηλή θερμοκρασία. Με κατάλληλη αφαίρεση των δύο φασμάτων μπορούμε να απομακρύνουμε την φαρδιά συνιστώσα. Το αποτέλεσμα αυτής της αφαίρεσης φαίνεται στην *εικόνα 3.8*.

Τα φάσματα είναι κανονικοποιημένα σε σχέση με τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης των αντίστοιχων δειγμάτων. Στην *εικόνα 3.8A* δεν υπάρχει καμία συνεισφορά από το φαρδύ σήμα (των 160 G). Στην περίπτωση του pH = 6.5 και 5.5 έχει αφαιρεθεί το διπλάσιο του σήματος των 10 K, ενώ στο 7.5 το τριπλάσιο, σε όλα έχει αφαιρεθεί περίπου ίδιας έντασης φαρδύ σήμα (*εικόνα 3.8B*). Επομένως, το φαρδύ σήμα δεν φαίνεται να αλλάζει σημαντικά σε ένταση με την αλλαγή του pH. Το στενό σήμα όμως αυξάνεται με την αύξηση του pH. Το εύρος του φαίνεται να

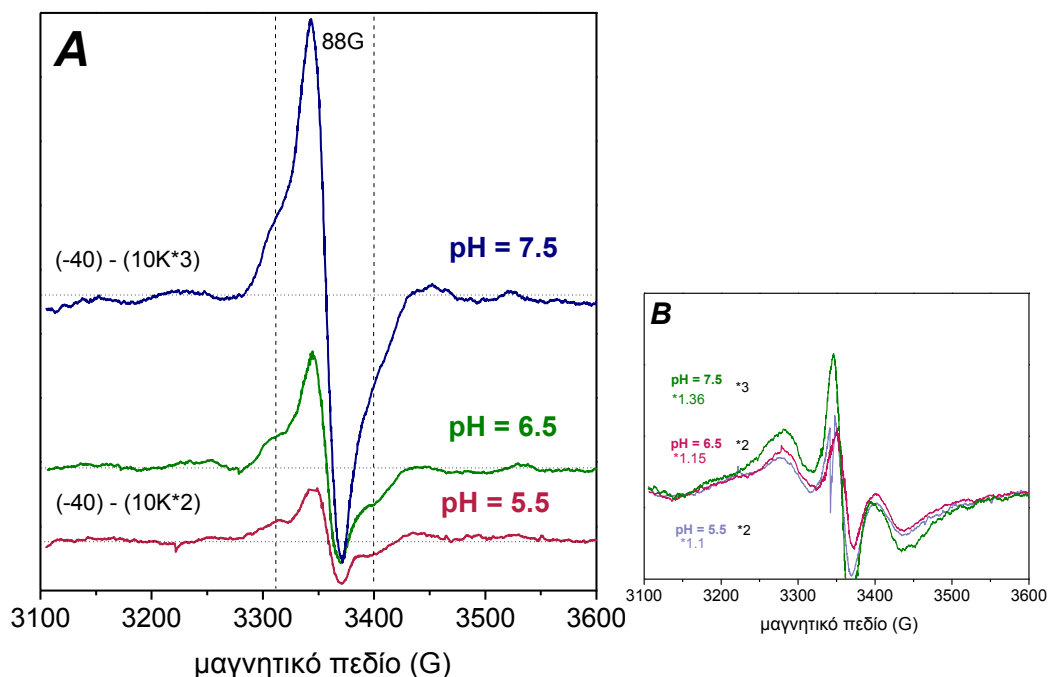
είναι περίπου 88 G (η παρουσία του σήματος σε $g = 2$ εμποδίζει τον ακριβή προσδιορισμό του εύρους). Στην εικόνα 3.8A εκτός από το στενό σήμα φαίνονται και οι κορυφές του πολυγραμμικού.



Εικόνα 3.7: Φωτοεπαγόμενο σήμα των 10 K στην S₂ (α), μετά τον σχηματισμό της σταθερής S₂Tyr₂[•] (β) και μετά το τελικό σκοτάδι (γ) σε δείγμα με 5% v/v μεθανόλη, DCBQ ως δευτερογενή κινόνη και pH = 5.5. Συνθήκες EPR και θερμοκρασία όπως στην εικόνα 3.5.

Το διαφορετικό εύρος του σήματος οφείλεται σε διαφορά στην μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ του Mn₄CaO₅ και της Tyr₂[•]. Το Mn₄CaO₅ και η Tyr₂[•] αλληλεπιδρούν μαγνητικά στους 10 K και αυτός είναι ο λόγος που δεν βλέπουμε ένα απλό φάσμα τυροσίνης. Όσο ισχυρότερη είναι η αλληλεπίδραση τόσο πιο

φαρδύ είναι το σήμα. Επομένως, στα κέντρα που αντιπροσωπεύονται από το φαρδύ σήμα το Mn_4CaO_5 και η Tyr_2^{\cdot} αλληλεπιδρούν ισχυρότερα από από αυτά του στενού σήματος που παρουσιάζεται στο υψηλό pH.



Εικόνα 3.8: (A) Διαφορά του φωτοεπαγόμενου σήματος σε υψηλή θερμοκρασία μείον ένα πολλαπλάσιο (*3 για το pH = 7.5 και *2 για το pH = 6.5 και 5.5) του σήματος των 10 K, για τα τρία διαφορετικά pH. Τα φάσματα είναι κανονικοποιημένα ανάλογα με την συγκέντρωση της χλωροφύλλης του κάθε δείγματος. (B) το φωτοεπαγόμενο σήμα των 10 K που αφαιρέθηκε σε κάθε περίπτωση.

Αν υποθέσουμε ότι η αλληλεπίδραση είναι διπολική, τότε εξαρτάται κυρίως από την απόσταση των δύο κέντρων (βλ. § 1.3.11). Η διπολική αλληλεπίδραση αναφέρεται σε σημειακά σπιν που βρίσκονται σε σχετικά μεγάλη απόσταση. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, φαίνεται να μην ισχύει τίποτα από τα δύο καθώς το σπιν της Tyr_2^{\cdot} είναι απεντοπισμένο σε όλο το δακτύλιο, αλλά και του Mn_4CaO_5 σε όλο το σύμπλοκο και η απόσταση μεταξύ τους δεν είναι τόσο μεγάλη ώστε να μπορούν να θεωρηθούν σημειακά. Ωστόσο, φάνηκε με προσομοίωση ότι μπορούν να ερμηνευθούν οι δύο συνιστώσες του σήματος της $S_2Tyr_2^{\cdot}$ στα μη επεξεργασμένα

δείγματα μόνο με διπολική αλληλεπίδραση και μάλιστα, η διαφορά στο εύρος υποδηλώνει διαφορετική απόσταση των δύο κέντρων (*Chrysin et al. 2011*). Το στενό σήμα αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ των κέντρων. Τα ίδια ισχύουν και εδώ.

3.1.8 Έμμεσος προσδιορισμός του ποσοστού των κέντρων που παγιδεύονται στην κατάσταση S_2Tyr_z'

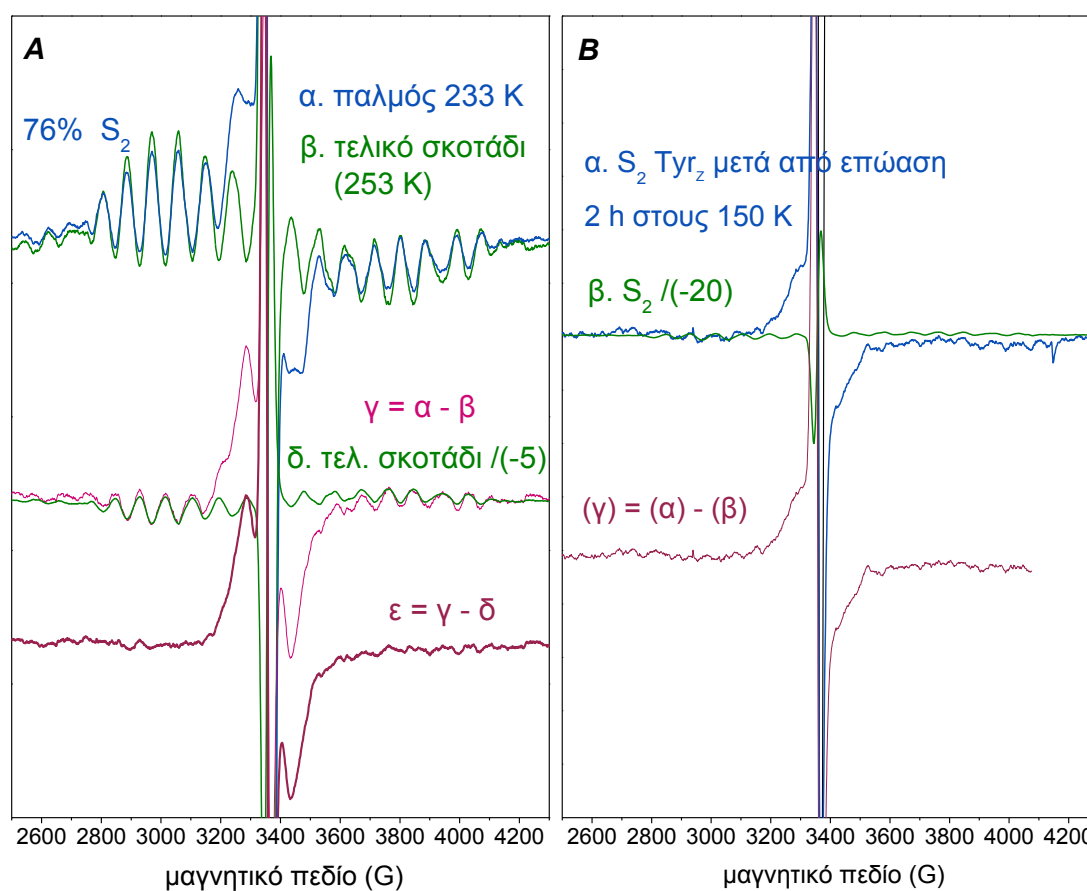
Απ' ευθείας προσδιορισμός του ποσοστού των κέντρων που παγιδεύονται στην κατάσταση S_2Tyr_z' (με ολοκλήρωση του σχετικού φάσματος) δεν είναι εύκολος λόγω προσμίξεως και άλλων σημάτων. Έμμεση εκτίμηση μπορεί να γίνει ως εξής. Κατά τη δημιουργία της S_2Tyr_z' η μαγνητική αλληλεπίδραση του σπιν της Tyr_z' με το σπιν του συμπλόκου του Mn προκαλεί διαπλάτυνση όχι μόνο του σήματος της τυροσίνης αλλά και του πολυγραμμικού σήματος της S_2 . Σε κανονικά δείγματα το πολυγραμμικό μειώνεται και οι κορυφές του μετατοπίζονται, ενώ σε δείγματα με μεθανόλη το σήμα απλώς μειώνεται (*Ioannidis et al. 2006*). Το ποσοστό του σήματος της S_2Tyr_z' που δημιουργείται μπορεί να εκτιμηθεί στην τελευταία περίπτωση από τη μείωση του πολυγραμμικού σήματος.

Στην *εικόνα 3.9A* συγκρίνεται το συνολικό φάσμα κατά την παγίδευση της ρίζας (φάσμα α), με το φάσμα της S_2 , που καταγράφηκε μετά την επώαση του δείγματος για 2 min στους 253 K (φάσμα β). Η διαφορά των δύο φασμάτων (φάσμα γ) συγκρίνεται με την S_2 πολλαπλασιασμένη επί (-5) (φάσμα δ). Αν πάρουμε τη διαφορά των δύο τελευταίων φασμάτων βλέπουμε το φάσμα της ρίζας χωρίς τις κορυφές του πολυγραμμικού. Η ένταση του πολυγραμμικού στην κατάσταση S_2Tyr_z' είναι 76% της S_2 , άρα η ρίζα έχει δημιουργηθεί στο 24% των κέντρων του δείγματος. Το ποσοστό αυτό είναι σημαντικό, εάν ληφθεί υπ' όψη, ότι η ενδιάμεση κατάσταση S_2Tyr_z' παγιδεύεται κατά την διάρκεια της μετάβασης $S_2 \rightarrow S_3$.

Στην *εικόνα 3.9B* φαίνεται το στενό σήμα (φάσμα α), το οποίο παραμένει μετά την επώαση στους 150 K (με επώαση του δείγματος στους 150 K για 2 h το

φαρδύ σήμα πέφτει, ενώ το στενό όχι, βλ. § 3.1.9), σε σύγκριση με την S_2 πολλαπλασιασμένη επί (-20) (φάσμα β) και το φάσμα (γ) είναι η διαφορά τους. Η πτώση του πολυγραμμικού που συνοδεύει το στενό σήμα είναι πολύ μικρή επειδή στο $pH = 5.5$, που παρουσιάζεται στην εικόνα, δημιουργείται σε λίγα κέντρα το στενό σήμα.

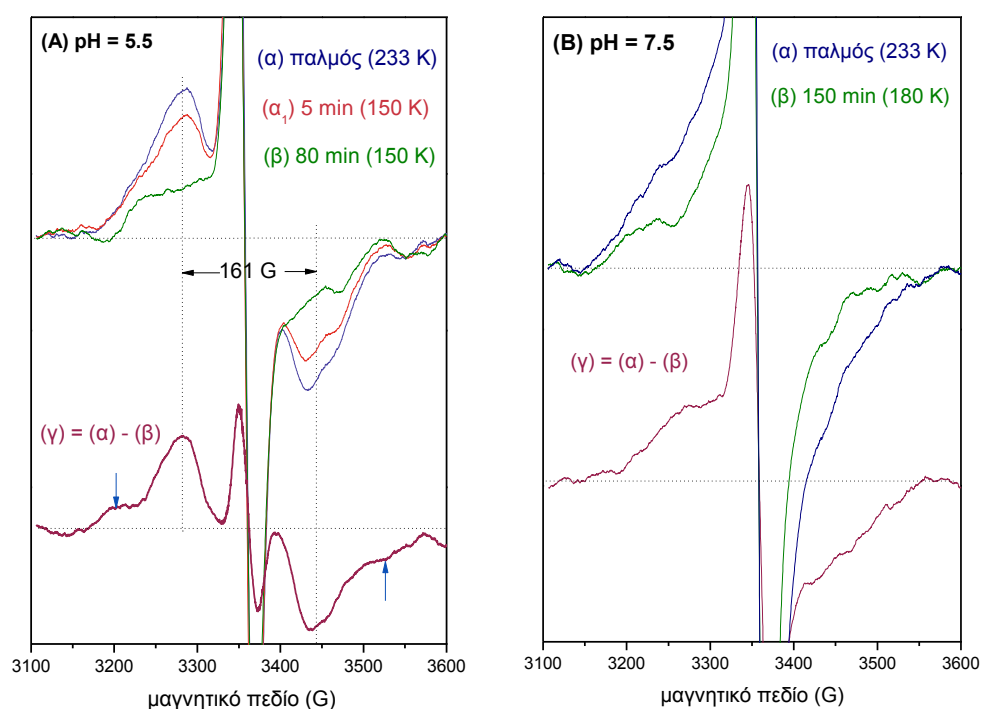
Επομένως, και οι δύο συνιστώσες δημιουργούνται από κέντρα που βρίσκονται στην S_2 και χαρακτηρίζονται από το πολυγραμμικό σήμα.



Εικόνα 3.9: Με την δημιουργία της ρίζας μειώνεται το πολυγραμμικό και με την πτώση της, αυξάνεται. Η κλίμακα στα δύο διαγράμματα είναι ίδια. (A) Η πτώση του πολυγραμμικού που συνοδεύει την παρουσία της φαρδιάς συνιστώσας, (B) το ίδιο για το στενό σήμα. Το δείγμα περιέχει 5% μεθανόλη και DCBQ ως αποδέκτη των ηλεκτρονίων και έχει $pH = 5.5$. Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp, χρόνος σάρωσης: 100 s, σταθερά χρόνου: 300 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 30 mW. Θερμοκρασία: 10 K.

3.1.9 Πτώση του σήματος σε θερμοκρασίες 150 K - 180 K, διάκριση των δύο συνιστωσών

Η S_2Tyr_z' (233 K) επανασυνδέεται αργά ($t_{1/2} = 60$ min) στους 150 – 180 K. Το φαρδύ και το στενό σήμα δεν έχουν όμως την ίδια κινητική. Σε δείγματα με pH = 5.5 – 6.5 το φαρδύ σήμα πέφτει μέσα σε 1 - 2 h, ενώ το στενό παραμένει. Σε pH = 7.5 δεν γίνεται επανασύνδεση σε αυτές τις θερμοκρασίες, αλλά σε ψηλότερες.



Εικόνα 3.10: Πτώση του σταθερού σήματος της S_2Tyr_z' με επώαση στους 150 K – 180 K σε δείγμα με 5% v/v μεθανόλη και pH = 5.5 (A) ή 7.5 (B). Τα φάσματα (α), (β), (γ) είναι διαφορές του φάσματος που καταγράφηκε μετά την κατεργασία που αναφέρεται μείον το φάσμα της S_2 . Τα μπλε βέλη αντιστοιχούν σε κορυφές του πολυγραμμικού σήματος της S_2 . Τα δείγματα περιέχουν DCBQ. Συνθήκες EPR και θερμοκρασία όπως και στην εικόνα 3.5.

Στην εικόνα 3.10 παρουσιάζεται η πτώση της S_2Tyr_z' σε pH = 5.5 στους 150 K (A) και σε pH = 7.5 στους 180 K (B). Η κλίμακα στα δύο διαγράμματα είναι ίδια: το αρχικό φάσμα της S_2Tyr_z' (φάσμα α), με επώαση στους 150 K για 5 min παρατηρείται μικρή πτώση του σήματος (α_1), μετά από επώαση 1 - 2 h στην θερμοκρασία που αναφέρεται για το κάθε δείγμα το σήμα έχει πέσει σημαντικά

(φάσμα β). Το σχήμα του φάσματος που πέφτει με την επώαση στην υψηλή θερμοκρασία (γ) είναι διαφορετικό για τα δύο διαφορετικά pH και θερμοκρασίες.

Εκ πρώτης όψεως φαίνεται να αλλάζει η κινητική της φαρδιάς συνιστώσας με την αύξηση του pH. Όμως, η αλλαγή οφείλεται στους διαφορετικούς δότες προς την Ty_2Z' που λειτουργούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες (βλ. § 3.1.12)

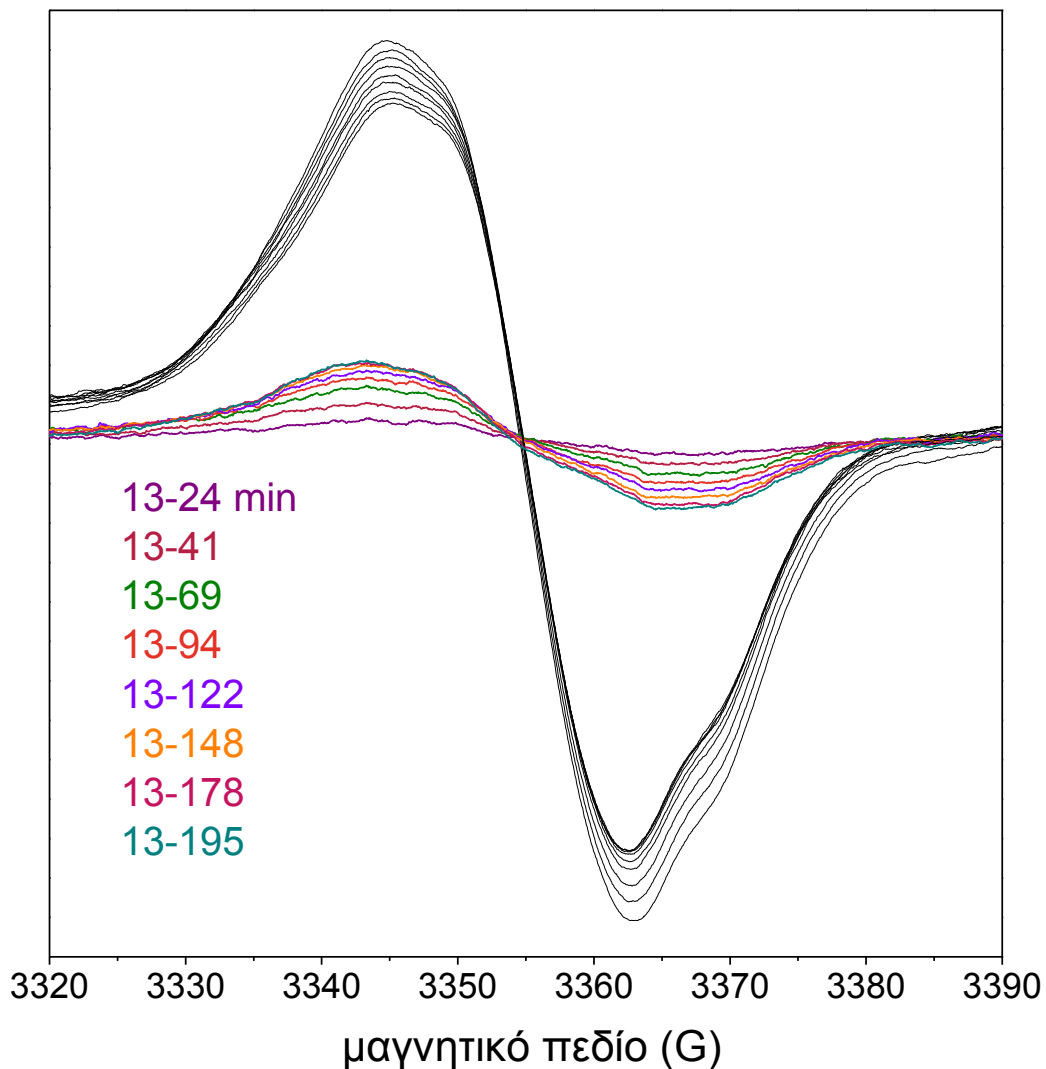
3.1.10 Το φάσμα του παγιδευμένου σήματος σε θερμοκρασίες 150 K -180 K

Στους 10 K καταγράφεται το χαρακτηριστικό σήμα μετάλλου - ρίζας λόγω της μαγνητικής αλληλεπίδρασης της Ty_2Z' με το Mn_4CaO_5 . Με την αύξηση της θερμοκρασίας μειώνεται η μαγνητική αλληλεπίδραση λόγω των θερμικών κινήσεων των σπιν και σε θερμοκρασίες > 77 K το φάσμα της Ty_2Z' είναι αδιατάρακτο από το Mn_4CaO_5 (Zahariou et al. 2007).

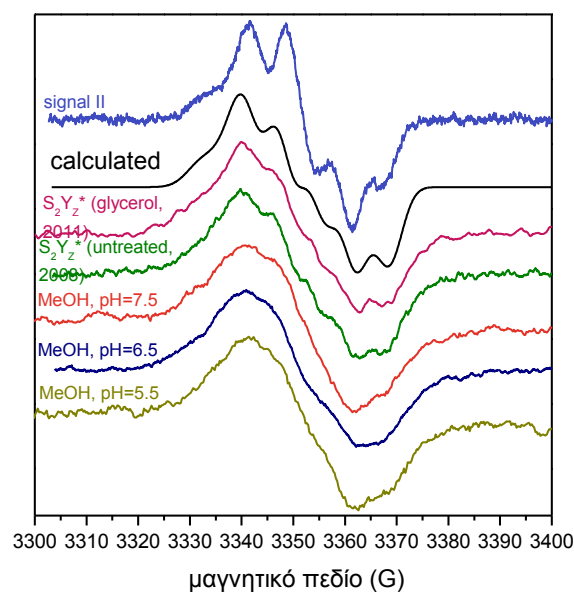
Η πτώση της παγιδευμένης S_2Ty_2Z' , που σχηματίστηκε με φωτισμό στους 233 K και γρήγορο πάγωμα, με επώαση του δείγματος στους 150 – 180 K (§ 3.1.9) είναι τόσο αργή που μπορεί να μετρηθεί το αδιατάρακτο φάσμα της Ty_2Z' . Στην εικόνα 3.11 φαίνονται τα απόλυτα φάσματα (με μαύρο) που μετρώνται σε χρόνους από 13 – 195 min κατά την επώαση του δείγματος στους 150 K. Το δείγμα έχει pH = 6.5. Χάνονται τα πρώτα min μέχρι να σταθεροποιηθεί η θερμοκρασία· το ποσοστό του σήματος που χάνεται τα πρώτα 5 min φαίνεται στην εικόνα 3.10A, για το pH = 5.5. Τα χρωματιστά φάσματα είναι η διαφορά του πρώτου που καταγράφηκε στα 13 min μείον το καθένα από τα επόμενα.

Στην εικόνα 3.12 παρουσιάζεται το φάσμα της παγιδευμένης S_2Ty_2Z' στους 150 – 180 K σε σύγκριση με το θεωρητικά υπολογισμένο φάσμα της Ty_2Z' (N. Ιωαννίδης), το σήμα που δημιουργείται με φωτισμό στους 135 K σε μη τροποποιημένο δείγμα (Ioannidis et al. 2008) και σε δείγμα με γλυκερόλη στους 150 K (Chrysina et al. 2011). Τα φάσματα είναι διαφορές του φάσματος που παίρνουμε στους 150 K (pH = 5.5) ή 160 K (pH = 6.5) ή 180 K (pH = 7.5) αμέσως μετά την

παγίδευση του σήματος στους 233 K μείον το σκοτάδι μετά από περίπου 2 h, οπότε το σήμα έχει γίνει ασθενέστερο.



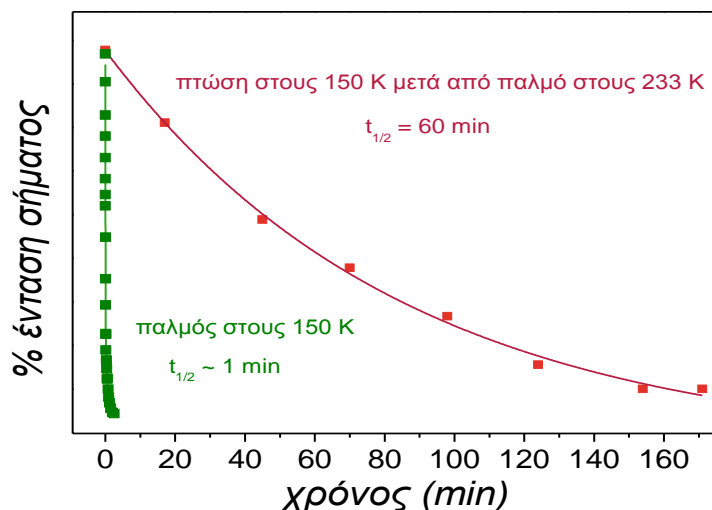
Εικόνα 3.11: Πτώση του σήματος της $S_2Tyr_2^{\bullet}$ (233 K) στους 150 K, 5% μεθανόλη, pH = 6.5. Με μαύρο φαίνονται τα απόλυτα φάσματα και με χρώματα οι διαφορές φασμάτων που αντιστοιχούν στους χρόνους που αναγράφονται. Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 4 Gpp, χρόνος σάρωσης: 50 s, σταθερά χρόνου: 100 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW, το κάθε φάσμα είναι μέσος όρος 4 σαρώσεων.



Εικόνα 3.12: Το φάσμα της S_2Tyrz' σε θερμοκρασία 150 K όπου η τυροσίνη δεν αλληλεπιδρά μαγνητικά με το Mn_4CaO_5 . Τα δείγματα περιέχουν 5% v/v μεθανόλη, DCBQ ως εξωτερική κινόνη και το pH = 5.5 – 7.5. Τα φάσματα είναι διαφορές του φάσματος που παίρνουμε στους 150 K (pH = 5.5) ή 160 K (pH = 6.5) ή 180 K (pH = 7.5) μετά την παγίδευση του σήματος στους 233 K μείον το φάσμα από το σκοτάδι μετά από περίπου 2 h, οπότε το σήμα έχει γίνει ασθενέστερο. Για σύγκριση φαίνονται τα φάσματα που προκύπτουν με φωτισμό στους 150 K σε δείγμα χωρίς καμία επεξεργασία (Ioannidis et al. 2008) και σε δείγμα με γλυκερόλη (Chrysin et al. 2011), καθώς και το σήμα II σε συνθήκες που δεν είναι κορεσμένο (12 μW) και το υπολογισμένο φάσμα της $Tyrz'$ (Ioannidis et al. 2008). Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 4 Gpp, χρόνος σάρωσης: 50 s, σταθερά χρόνου: 100 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW. Οι διαφορές έγιναν με αφαίρεση μέσου όρου 4 σαρώσεων του αρχικού και τελικού σκοταδιού.

3.1.11 Σύγκριση της κινητικής πτώσης του παγιδευμένου σήματος των 233 K με το σήμα που επάγεται στους 150 K

Στην εικόνα 3.13 συγκρίνεται η πτώση του παγιδευμένου σήματος που σχηματίστηκε στους 233 K κατά τη διάρκεια επώασης στους 150 K, με την πτώση του σήματος που φωτίστηκε στους 150 K και παρέμεινε στην ίδια θερμοκρασία (Ioannidis et al. 2008). Ο χρόνος ημιζωής στην πρώτη περίπτωση είναι περίπου 60 min, ενώ στην δεύτερη περίπου 1 min.



Εικόνα 3.13: Κινητική πτώσης της S_2Tyrz' που παγιδεύεται με παλμό στους 233 K και γρήγορο πάγωμα, σε σύγκριση με την κινητική πτώσης του σήματος που δημιουργείται στους 150 K. Για να γίνει η κινητική καταγράφηκαν φάσματα κατά την επώαση δείγματος στους 150 K για περίπου 3 h. Όλα τα φάσματα αφαιρέθηκαν από το αρχικό και η ένταση του κάθε φάσματος στον συγκεκριμένο χρόνο που μετρήθηκε αποτελεί τα σημεία της κινητικής.

Στην περίπτωση της S_2Tyrz' (150 K) η κινητική έχει γίνει με γρήγορη σάρωση (rapid scans). Για να γίνει η κινητική της S_2Tyrz' (233 K) μετρήθηκε η ένταση του φάσματος της σε διάφορους χρόνους και στη συνέχεια έγινε κανονικοποίηση για να γίνει η σύγκριση με την S_2Tyrz' (150 K). Τα φάσματα που μετρήθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους κατά την πτώση του σήματος είναι διαφορές του αρχικού φάσματος μείον το φάσμα της κάθε χρονικής στιγμής (εικόνα 3.11).

Ο μεγάλος χρόνος ζωής του παγιδευμένου σήματος των 233 K αποτελεί έκπληξη. Μέχρι πρότινος θεωρείτο ότι η ρίζα της $Tyrz$ είναι τόσο βραχύβια, που δεν είναι δυνατόν να παγιδευτεί. Τα αποτελέσματα παρέχουν τις κατάλληλες συνθήκες για την μελέτη της $Tyrz$ με φασματοσκοπία EPR υψηλού μαγνητικού πεδίου (high field EPR spectroscopy). Τα φάσματα σε υψηλότερες συχνότητες έχουν καλύτερη ευκρίνεια. Τέτοια μελέτη έχει γίνει για την Tyr_D' στη ζώνη - W (94 GHz) (Hofbauer et al. 2001) αλλά και στην $Tyrz'$ σε ανενεργά δείγματα χωρίς Mn σε 245 GHz (Un et al. 1996). Με υψηλό μαγνητικό πεδίο διαχωρίζονται τα $g_{x,y,z}$ και επομένως είναι ευκολότερος ο προσδιορισμός τους. Το g_x εξαρτάται από την ισχύ του δεσμού H,

που με τη σειρά του ρυθμίζει το δυναμικό της Τυροσίνης (*Engstrom et al. 2000, Hofbauer et al. 2001*).

3.1.12 Δότες ηλεκτρονίου προς την Tyr_Z κατά την αναγωγή της στους 150 - 180 K

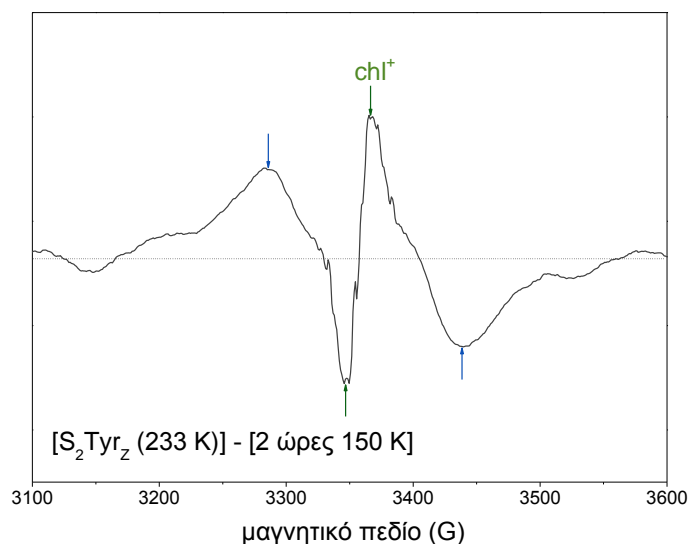
Η μελέτη της αναγωγής της Tyr_Z σε κρυογενικές θερμοκρασίες δίνει την δυνατότητα ανίχνευσης εναλλακτικών φορέων ηλεκτρονίου, οι οποίοι δρουν σε βοηθητικά μονοπάτια μεταφοράς ηλεκτρονίου και χρησιμεύουν κυρίως στην αποφόρτιση των κυρίων φορέων υπό συνθήκες stress (βλέπε § 1.2.2).

Όταν το δείγμα φωτίζεται στους 233 K και παγώνεται γρήγορα, αρχικά δημιουργείται P680⁺, το οποίο είναι ισχυρό οξειδωτικό. Οι δυνητικοί δότες ηλεκτρονίου προς το P680⁺ είναι η Tyr_Z, η Tyr_D και το cyt *b*₅₅₉, ή αν είναι οξειδωμένο το κυτόχρωμα κάποια χλωροφύλλη ή καροτενοειδές του μονοπατιού του (*Tracewell & Brudvig 2008, Shinopoulos & Brudvig 2012*). Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει επανασύνδεση με την Q_A⁻. Η Tyr_Z είναι η πιο κοντινή στο P680 οπότε και η πιο γρήγορη να το ανάγει, τα υπόλοιπα βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση και δρουν με μικρότερη πιθανότητα εκτός από όταν το Mn₄CaO₅ είναι ανενεργό (*Shinopoulos & Brudvig 2012*).

Η οξειδωμένη Tyr_Z ακόμη και στους 233 K είναι ασταθής. Ένα ποσοστό της παγιδεύεται, δίνοντας το σταθερό σήμα. Σε άλλα κέντρα οξειδώνεται κάποια χλωροφύλλη (π.χ. η chl_Z D₂) ή καροτενοειδές ή η Tyr_D, τα κέντρα αυτά δίνουν το σήμα στο $g = 2$ (εύρος 13 – 24 G) που φαίνεται σε όλα τα φάσματα, αναλόγως με το δείγμα όμως έχει διαφορετική ένταση. Με επώαση σε θερμοκρασία 150 – 160 K το σήμα της Tyr_Z μειώνεται λόγω αναγωγής της, είτε από το cyt *b*₅₅₉, είτε από την chl_Z ή από την Tyr_D. Το cyt *b*₅₅₉, η chl_Z (εικόνα 1.8), καθώς και άλλες χλωροφύλλες και καροτενοειδή βρίσκονται στο ίδιο μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Η Tyr_D στα χαμηλά pH δεν μπορεί να οξειδωθεί, ενώ πάνω από το pH = 7.6 οξειδώνεται σχεδόν σε όλα τα κέντρα, σε μη ενεργά δείγματα, όμως, στα οποία έχει αφαιρεθεί το Mn (Mn depleted) (*Faller et al. 2002, Hienerwadel et al. 2008*). Κατά

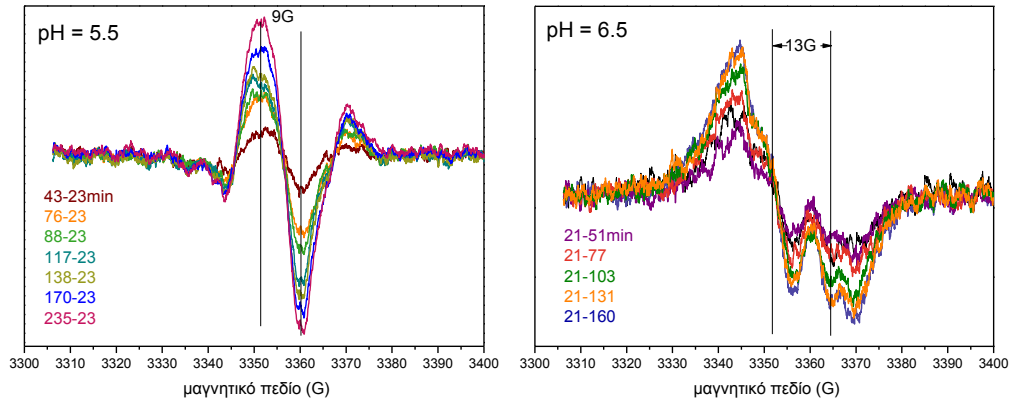
την αναγωγή της Tyr_Z' στους 150 – 180 K, στα χαμηλά pH δότης φαίνεται να είναι κάποια χλωροφύλλη, πιθανόν η chl_Z, ενώ στα υψηλά pH η Tyr_D.



Εικόνα 3.14: Σε pH = 5.5, η αναγωγή της σταθερής S₂Tyr_Z' με επώαση του δείγματος στους 150 K συνοδεύεται από εμφάνιση σήματος της chl⁺. Το δείγμα περιέχει 5% v/v μεθανόλη και DCBQ. Συνθήκες EPR: όπως στην εικόνα 3.5, θερμοκρασία: 10 K.

Στην εικόνα 3.14 φαίνεται το φάσμα της S₂Tyr_Z' (233 K) μείον το σκοτάδι μετά από επώαση του δείγματος στους 150 K για 2 ώρες, για να αναχθεί η Tyr_Z' σε pH = 5.5, μετρημένο σε θερμοκρασία υγρού ηλίου. Οι κορυφές που έχουν σημαδεωθεί με τα μπλε βέλη είναι της S₂Tyr_Z', ενώ οι αρνητικές κορυφές που έχουν σημαδεωθεί με πράσινο είναι της chl⁺. Η πτώση του σήματος της Tyr_Z' συνοδεύεται από αύξηση του σήματος της chl⁺. Κατά την αναγωγή της παγιδευμένης S₂Tyr_Z' δότης ηλεκτρονίου είναι η χλωροφύλλη, στα χαμηλά pH.

Η ίδια παρατήρηση που έγινε στους 10 K (εικόνα 3.14) γίνεται και στους 150 K, δηλαδή βλέπουμε ότι καθώς το σήμα της Tyr_Z' μειώνεται, αυξάνεται το σήμα της χλωροφύλλης (εικόνα 3.15A και 3.16). Η Tyr_D δεν μπορεί να οξειδωθεί καθώς το pK = 7.6 (Faller et al. 2002) είναι πολύ μεγαλύτερο από το pH = 5.5 του δείγματος. Σε μικρή ισχύ παρατηρείται (μικρή) πτώση του σήματος της Tyr_D', λόγω της αναγωγής της Tyr_Z.

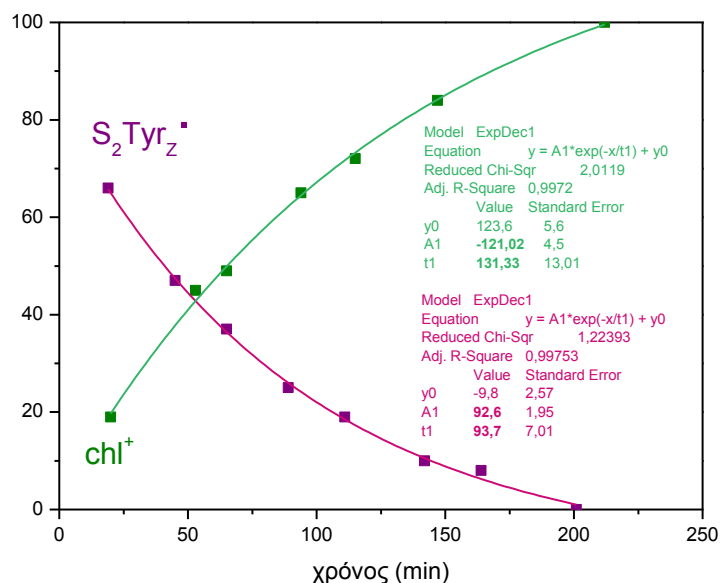


Εικόνα 3.15: Διαφορετική συμπεριφορά του δείγματος κατά την επώαση στους 150 K, ανάλογα με το pH στο οποίο βρίσκεται. Τα δείγματα περιέχουν 5% v/v μεθανόλη και DCBQ ως δευτερογενή κίνηση. Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 4 Gpp, χρόνος σάρωσης: 50 s, σταθερά χρόνου: 300 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 2.5 mW.

Στο pH = 6.5 παρατηρείται πτώση της Tyr_z^{\cdot} , που φαίνεται σε μεγάλη ισχύ μικροκυμάτων (εικόνα 3.12) και μικρή αύξηση της χλωροφύλλης, που φαίνεται σε μικρότερη ισχύ (εικόνα 3.15B). Η Tyr_z^{\cdot} ανάγεται από μόρια του μονοπατιού του cyt b_{559} : από το cyt b_{559} ή αν είναι οξειδωμένο από χλωροφύλλη ή καρροτενοειδές, και σε κάποια κέντρα και από την Tyr_D . Γι' αυτό είναι μικρότερη η αύξηση της χλωροφύλλης εδώ. Παρατηρείται και πάλι πτώση του σήματος της Tyr_D^{\cdot} λόγω της αναγωγής της Tyr_z^{\cdot} .

Στο pH = 7.5 περιμένουμε το σήμα της Tyr_D^{\cdot} να παραμείνει σταθερό ή να είναι μικρή η πτώση του σε σχέση με τα χαμηλότερα pH, καθώς η Tyr_z^{\cdot} ανάγεται οξειδώνοντας την Tyr_D σε κάποια κέντρα. Ακόμη, παρατηρείται πτώση σήματος chl^+ , μαζί με την Tyr_z^{\cdot} . Αυτή η chl^+ είναι από κέντρα στα οποία κατά τον φωτισμό στους 233 K οξειδώθηκε η χλωροφύλλη και όχι η Tyr_z . Αυτό συμβαίνει και στα άλλα pH (λογικά), αλλά εκεί καλύπτεται το φαινόμενο αυτό από την αύξηση της chl^+ που ανάγει την Tyr_z^{\cdot} .

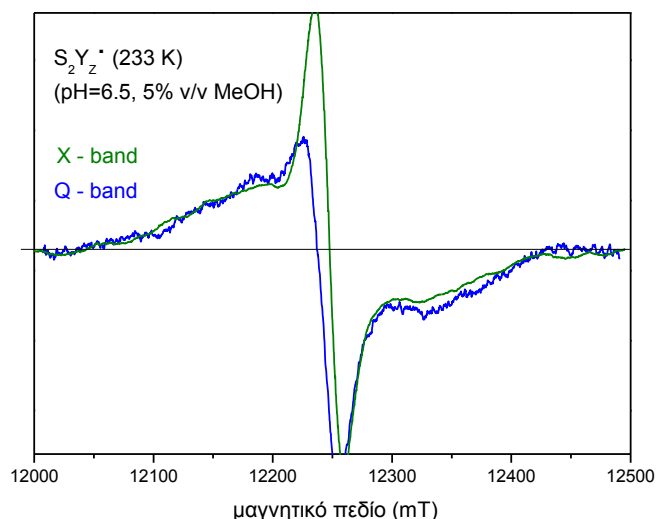
Υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ cyt b_{559} - Tyr_z - Tyr_D σε σχέση με το που εντοπίζεται η θετική οπή. Η ισορροπία εξαρτάται από το pH του δείγματος, την θερμοκρασία αλλά και από την παρασκευή.



Εικόνα 3.16: Η παγιδευμένη S_2Tyr_z' (μωβ) επανασυνδέεται οξειδώνοντας την χλωροφύλλη (πράσινο) με επώαση στους 144 K δείγματος με pH = 5.5, 5% v/v μεθανόλη και DCBQ ως δευτερογενή κινόννη. Το σήμα της Tyr_z' καταγράφεται με ισχύ μικροκυμάτων 100 mW, ενώ της chl^+ με ισχύ 2.5 mW.

3.1.13 Μελέτη του παγιδευμένου σήματος της S_2Tyr_z' στην μικροκυματική ζώνη Q

Όπως ειπώθηκε στην ενότητα 3.1.11, η παγιδευμένη S_2Tyr_z' προσφέρεται για μελέτη EPR σε υψηλά πεδία. Έγινε μια προσπάθεια να μετρηθεί στη ζώνη Q (34 GHz). Εκτός από την καλύτερη ευκρίνεια, τα σήματα είναι πιο κορεσμένα επειδή τα μικροκύματα έχουν μεγαλύτερη συχνότητα, οπότε μεταφέρουν και περισσότερη ενέργεια (επειδή $E = h\nu$). Αυτό βοηθάει στη μείωση του σήματος της Tyr_D , η οποία στη ζώνη X δυσκολεύει να δούμε καθαρά το στενό σήμα. Στην εικόνα 3.17 φαίνεται η S_2Tyr_z' σε pH = 6.5 που μετρήθηκε στη ζώνη Q, σε σύγκριση με το φάσμα που μετρήθηκε στη ζώνη X. Τα φάσματα και στις δύο περιπτώσεις είναι διαφορά του φάσματος μετά τον παλμό στους 233 K και γρήγορο πάγωμα μείον την αρχική S_2 . Παρατηρούνται μικρές διαφορές. Η ευκρίνεια εν τούτοις του φάσματος στη ζώνη Q δεν είναι αρκετή για τον ακριβή προσδιορισμό των συνιστωσών του g . Απαιτούνται μετρήσεις σε υψηλότερες συχνότητες.



Εικόνα 3.17: Φάσμα της $S_2TyZ\cdot$ στη ζώνη Q (μπλε) σε σύγκριση με το φάσμα σε ζώνη X (πράσινο). Συνθήκες EPR: ζώνη Q: πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp, χρόνος σάρωσης: 140 s, σταθερά χρόνου: 300 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 34,4 mW, έχει προστεθεί PPBQ, ζώνη X: όπως αναφέρεται στην εικόνα 3.5, το φάσμα έχει μετακινηθεί ώστε να συμπέσει με αυτό της ζώνης Q. Θερμοκρασία: 10 K

3.2 Η μεταβατική κατάσταση $S_3TyZ\cdot$: το τελευταίο βήμα πριν τον σχηματισμό του O_2

3.2.1 Εισαγωγικά

Η $S_3TyZ\cdot$ είναι η λιγότερο μελετημένη από τις μεταβατικές καταστάσεις $S_nTyZ\cdot$ - είναι όμως η πιο σημαντική επειδή είναι το τελευταίο βήμα πριν το σχηματισμό του O_2 . Έχει «παρατηρηθεί» έμμεσα μόνο ή μάλλον έχει υποτεθεί η παρουσία της. Με απορρόφηση ακτίνων X συναρτήσεως του χρόνου (time - resolved XAS) εντοπίστηκε μια καθυστέρηση 250 μs πριν την αναγωγή του Mn_4CaO_5 και τον σχηματισμό του O_2 κατά την $S_3 \rightarrow S_0$. Η καθυστέρηση αυτή αποδόθηκε σε αποβολή πρωτονίου και η κατάσταση αυτή αντιστοιχεί στην $S_3TyZ\cdot$ (Haumann et al. 2005). Πρόσφατα παρουσιάστηκε φάσμα EPR της $S_3TyZ\cdot$ πολύ χαμηλής ανάλυσης όμως (αποτελείται από 32 σημεία μόνο), μετρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου σε δείγμα

κυανοβακτηρίου *T. elongatus* όπου είχε αντικατασταθεί το Ca^{II} με Sr^{II} , το Cl^- με Br^- και η D1 υπομονάδα είχε εκφραστεί από το γονίδιο $psbA_2$ αντί του $psbA_1$ που εκφράζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες (Sugiura et al. 2012).

3.2.2 Περιορισμοί και πλεονεκτήματα στην παγίδευση της $S_3\text{Tyr}_z'$ σε σχέση με την παγίδευση της $S_2\text{Tyr}_z'$

Στην προσπάθεια παγίδευσης της $S_3\text{Tyr}_z'$ υπάρχει επιπλέον, σε σχέση με την S_2 , η δυσκολία ότι δεν βρίσκονται όλα τα κέντρα στην ίδια κατάσταση S εξαιτίας των απωλειών (misses) και των διπλών βημάτων (double hits). Στην κατάσταση που ονομάζουμε « S_3 », περίπου το 40 % των κέντρων βρίσκονται πραγματικά στην S_3 , περίπου το 50 % βρίσκεται στην S_2 , και το υπόλοιπο 10% στην S_0 και S_1 .

Στην κατάσταση $S_2\text{Tyr}_z'$, η Tyr_z' με $S = \frac{1}{2}$ αλληλεπιδρά με το Mn_4CaO_5 με $S = \frac{1}{2}$, οπότε οι δύο ενεργειακές στάθμες της Tyr_z' αναλύονται σε τέσσερις και δύο μεταπτώσεις EPR δημιουργούν το φάσμα που παρατηρούμε (Chrysinia et al. 2011). Στην κατάσταση $S_3\text{Tyr}_z'$, η Tyr_z' με $S = \frac{1}{2}$ αλληλεπιδρά με το Mn_4CaO_5 με $S = 3$ (Sanakis et al. 2008, Boussac et al. 2009, Cox et al. 2014), οπότε οι ενεργειακές καταστάσεις που προκύπτουν είναι περισσότερες. Συμβαίνουν πολλές μεταπτώσεις με μικρότερες εντάσεις από ό,τι στην S_2 , οπότε το φάσμα αναμένεται να είναι απλωμένο σε μεγαλύτερο εύρος πεδίου, με πολλές κορυφές μικρής έντασης (Zahariou et al. 2014).

Η πτώση του σήματος της $S_3\text{Tyr}_z'$ λόγω της αναγωγής της από το Mn_4CaO_5 είναι πιο αργή από ότι της $S_2\text{Tyr}_z'$. Η μετάβαση του Mn_4CaO_5 από την $S_3 \rightarrow S_0$ είναι περίπου 10 φορές πιο αργή από τις υπόλοιπες μεταβάσεις S (Babcock et al. 1976, Dekker et al. 1984, van Leeuwen et al. 1993, Rappaport et al. 1994, Razeghifard et al. 1997, Haumann et al. 2005). Οι κατώτερες μεταβάσεις S γίνονται μέσα σε μs , ενώ $S_3 \rightarrow S_0$ περίπου σε 1 ms σε θερμοκρασία δωματίου.

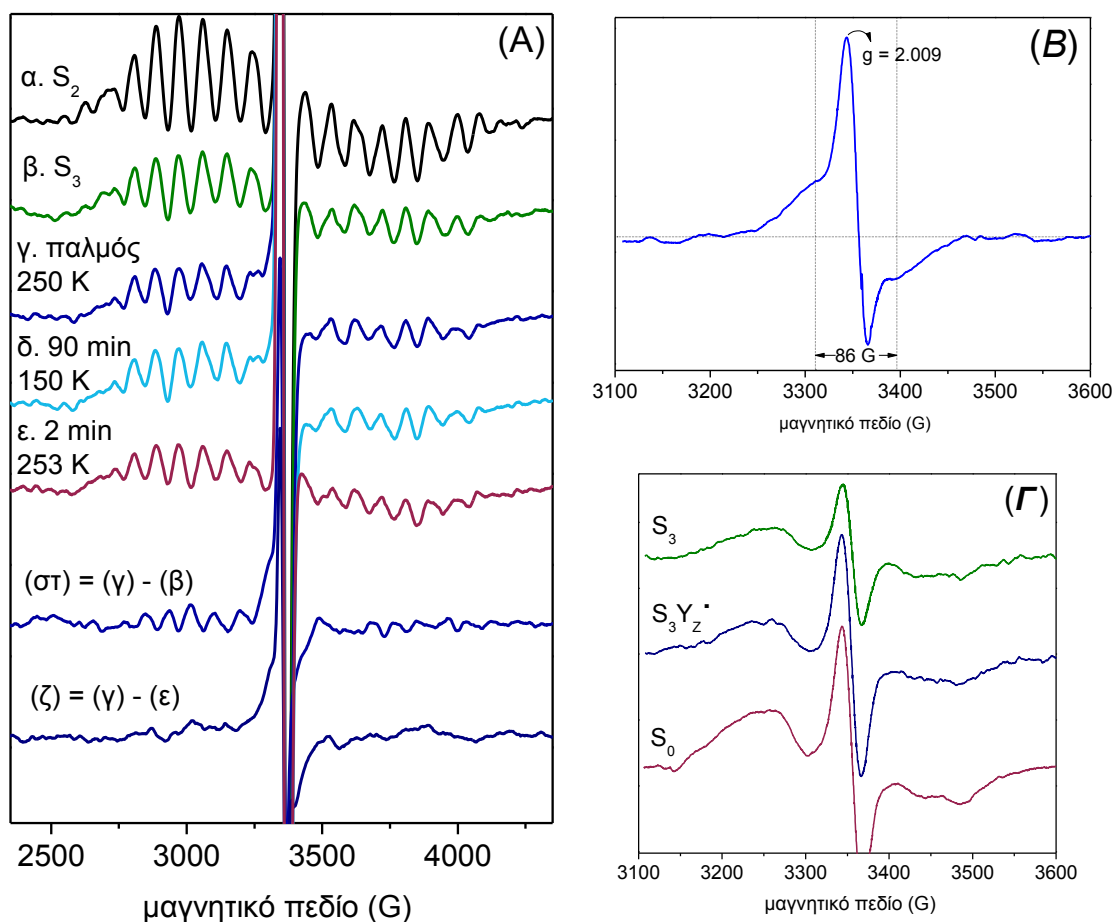
Επειδή η $S_3 \rightarrow S_0$ είναι πιο αργή, μπορούμε να φωτίσουμε σε πιο υψηλή θερμοκρασία, όπου δεν παγιδεύεται η $S_2\text{Tyr}_z'$ (καθώς ανάγεται γρήγορα από το

Mn_4CaO_5 και σχηματίζεται η S_3) και να προλάβουμε ένα (μικρό) μέρος του σήματος της S_3Tyr_z . Όπως και στην περίπτωση της S_2 , χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με μεθανόλη, επειδή σε αυτά παρατηρούνται εντονότερα σήματα.

3.2.3 Η S_3Tyr_z σε δείγματα με μεθανόλη

Σε δείγματα με μεθανόλη που βρίσκονται στην S_3 έχει παγιδευτεί ένα ασθενές ενδιάμεσο μεταξύ της S_3 και S_0 (Γ. Ζαχαρίου, διδακτορική διατριβή). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν σε υψηλότερη θερμοκρασία, όπου δεν παγιδεύεται σήμα της S_2Tyr_z . Το ενδιάμεσο αυτό είναι σταθερό στους 10 K – 150 K. Στην εικόνα 3.18A φαίνεται το πολυγραμμικό σήμα κατά την πορεία του πειράματος: πέφτει περίπου στο μισό με τον σχηματισμό της S_3 (φάσμα β). Στη συνέχεια με έναν παλμό στους 250 K (εκτός από μείωση του πολυγραμμικού που οφείλεται σε κέντρα που προχωρούν από την S_2 στην S_3) παρατηρείται ο σχηματισμός ενός σπασμένου σήματος με $g \approx 2$ (φάσμα γ), το σήμα αυτό εξαφανίζεται με επώαση του δείγματος για 2 min στους 253 K (φάσμα ε). Στις διαφορές του φάσματος μετά τον φωτισμό στους 249 K μείον την S_3 (φάσμα στ) ή το τελικό σκοτάδι (φάσμα ζ) φαίνεται πιο καθαρά το σταθερό σήμα που παγιδεύεται.

Στην εικόνα 3.18B παρουσιάζεται σε μεγαλύτερη ανάλυση το φάσμα του ενδιάμεσου που παγιδεύεται. Το σήμα αυτό αντιστοιχεί σε 4% του σήματος II, δηλαδή της Tyr_D . Ο υπολογισμός αυτός γίνεται με σύγκριση των τιμών που προκύπτουν με διπλή ολοκλήρωση των δύο σημάτων, αφού γίνουν οι απαραίτητες κανονικοποιήσεις, επειδή τα δύο σήματα μετρώνται με διαφορετική μικροκυματική ισχύ. Πάντως το ποσοστό των κέντρων που συνεισφέρουν στο νέο αυτό ενδιάμεσο πρέπει να είναι αρκετά μεγαλύτερο από το 4% διότι το σήμα αναμένεται να εκτείνεται σε μεγαλύτερο εύρος πεδίου απ'αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην ολοκλήρωση. Στην εικόνα αυτή φαίνεται και το σήμα της Q_B^- (Sedoud et al. 2011), ως μια κορυφή με $g \approx 2,009$, στον σχηματισμό της οποίας αποδίδεται η σταθερότητα του σήματος.



Εικόνα 3.18: (Α) Παγίδευση της S_3TyrZ' σε δείγματα με 5% v/v μεθανόλη με παλμό στους 250 K και ταχεία ψύξη. Στα δείγματα έχει προστεθεί DCBQ ως αποδέκτης των ηλεκτρονίων, η S_2 και S_3 σχηματίστηκαν με παλμό στους 153 K και επώαση στο σκοτάδι για ένα λεπτό, συνθήκες EPR όπως στην εικόνα 3.4, (Β) φάσμα υψηλής ανάλυσης της S_3TyrZ' , διαφορά του φάσματος μετά τον παλμό στους 250 K (γ) μείον το τελικό σκοτάδι μετά από επώαση στο σκοτάδι για 2 min στους 253 K (ε), (Γ) φωτοεπαγόμενο σήμα στους 10 K στην κατάσταση S_3 (β), μετά την παγίδευση της S_3TyrZ' (γ) και στην κατάσταση που προκύπτει μετά την επώαση στους 253 K (ε). Τα φάσματα είναι διαφορές του φάσματος μετά από τρεις παλμούς στους 10 K μείον το τελικό σκοτάδι μετά από 10 λεπτά. (Β) και (Γ) συνθήκες EPR όπως στην εικόνα 3.5.

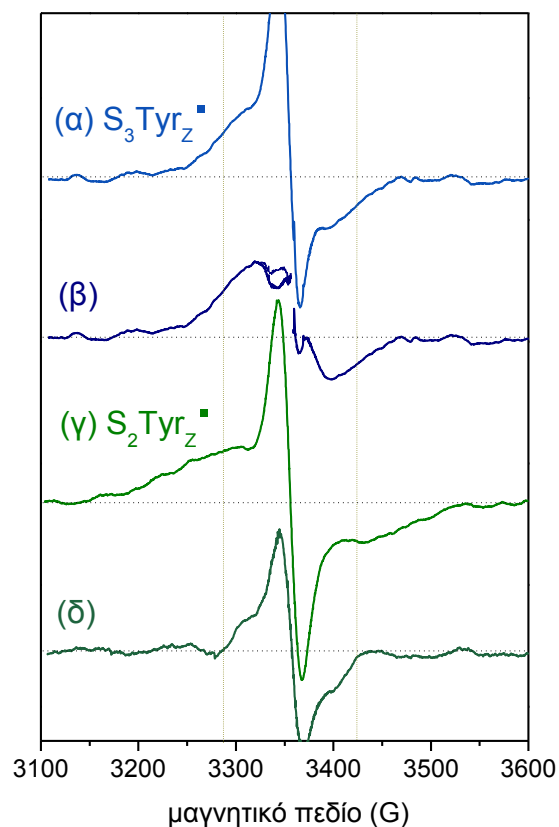
Στην εικόνα 3.18Γ βλέπουμε τα φάσματα των φωτοεπαγόμενων σημάτων στους 10 K: Στην S_3 παρατηρείται το χαρακτηριστικό σήμα της S_0TyrZ' με μεθανόλη (Su et al. 2006) λόγω της S_0 που έχει σχηματιστεί σε κέντρα στα οποία συνέβησαν διπλά βήματα. Το σήμα αυτό αυξάνεται λίγο μετά την παγίδευση του ενδιαμέσου, η μικρή αύξηση οφείλεται σε κέντρα όπου έγινε η μετάβαση $S_3 \rightarrow S_0$. Μετά την

επώαση του δείγματος στους 253 K και την πτώση του σήματος της $S_3\text{Tyr}_z^-$, το φωτοεπαγόμενο σήμα της $S_0\text{Tyr}_z^-$ στους 10 K αυξάνεται σημαντικά. Αυτό σημαίνει ότι η παγιδευμένη κατάσταση προχώρησε στην S_0 . Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι με τον παλμό και το γρήγορο πάγωμα δημιουργήθηκε η κατάσταση $S_0\text{Tyr}_z\text{Q}_A^-$, οπότε η Tyr_z δεν μπορεί να οξειδωθεί. Μετά την επώαση στους 253 K το ηλεκτρόνιο προχωρεί στην Q_B και επομένως μπορεί να οξειδωθεί η Τυροσίνη. Στην θερμοκρασία αυτή όμως το ηλεκτρόνιο προχωράει πολύ γρήγορα στην Q_B και επομένως είναι απίθανο να παγιδευτεί Q_A^- .

Μία παρατήρηση που ενισχύει την ταυτοποίηση του νέου σήματος με την $S_3\text{Tyr}_z^-$ είναι και η εξής. Σε δείγματα, όπου το σήμα ήταν πολύ μικρό παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση του φωτοεπαγόμενου σήματος της $S_0\text{Tyr}_z^-$ ήδη μετά τον παλμό και το γρήγορο πάγωμα, που σημαίνει ότι δεν έγινε αρκετά γρήγορα αυτό το βήμα ώστε να παγιδευτεί το ενδιάμεσο. Αυτό αποδεικνύει ότι είναι πράγματι ενδιάμεσο της μετάβασης $S_3 \rightarrow S_0$. Ακόμη, στα δείγματα που έχει παγιδευτεί σχετικά μεγάλη $S_3\text{Tyr}_z^-$ το σήμα της Q_A^- δεν είναι τόσο έντονο όσο σε άλλα που έχει παγιδευτεί λίγο σήμα

3.2.4 Σύγκριση του φάσματος της $S_3\text{Tyr}_z^-$ και της $S_2\text{Tyr}_z^-$ με μεθανόλη

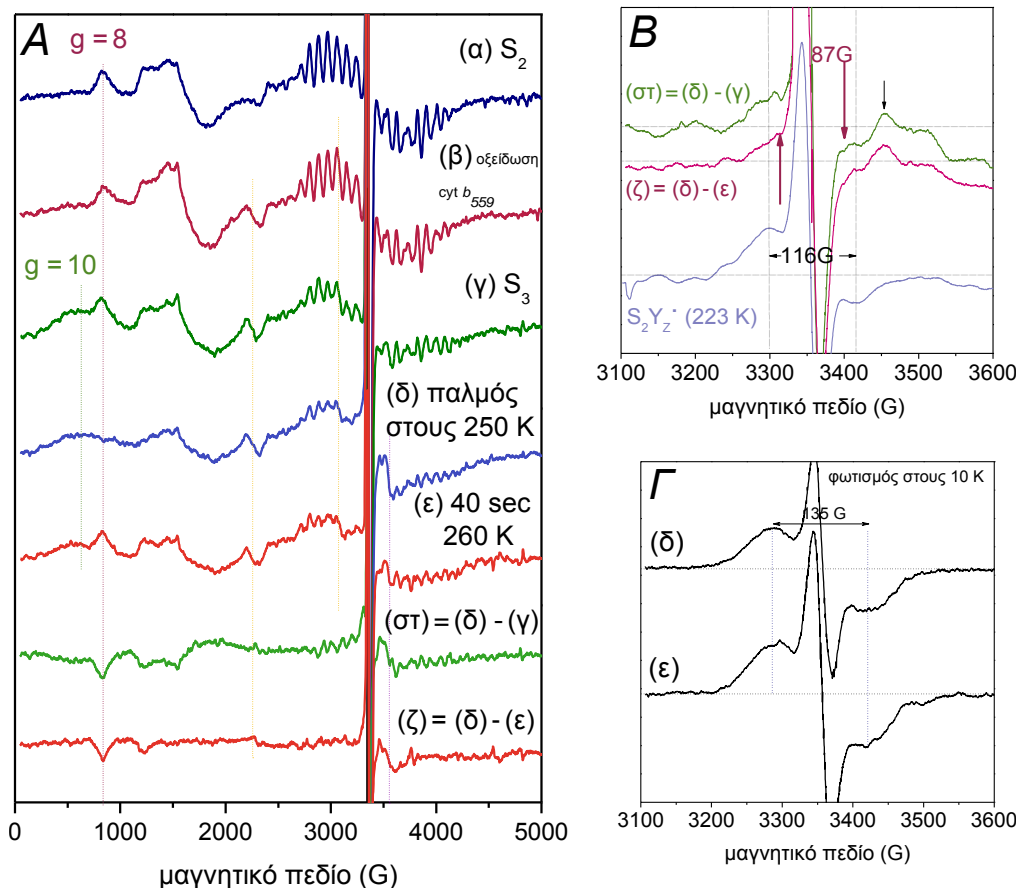
Στην εικόνα 3.19 συγκρίνεται το φάσμα της $S_3\text{Tyr}_z^-$ (α) με το φάσμα της $S_2\text{Tyr}_z^-$ (γ). Και τα δύο προέρχονται από δείγματα με 5% v/v μεθανόλη και pH = 6.5. Η $S_2\text{Tyr}_z^-$ σχηματίστηκε στους 233 K, ενώ η $S_3\text{Tyr}_z^-$ στους 250 K. Η πρώτη είναι πιο βραχύβια από την δεύτερη και γι' αυτό δεν παγιδευτεί στους 250 K. Η $S_3\text{Tyr}_z^-$ είναι πολύ πιο στενή από το φαρδύ σήμα της $S_2\text{Tyr}_z^-$: έχει όμως παρόμοιο εύρος με το στενό σήμα (φάσμα δ). Για σύγκριση υπάρχουν οι κάθετες διακεκομμένες γραμμές, ανάμεσα σε αυτές βρίσκεται το στενό σήμα της $S_2\text{Tyr}_z^-$ ενώ η $S_3\text{Tyr}_z^-$ εκτείνεται και έξω από αυτές. Αν από το φάσμα της $S_3\text{Tyr}_z^-$ αφαιρεθεί ένα ποσοστό της Tyr_D ($g \approx 2$) προκύπτει το φάσμα (β). Έχει αφαιρεθεί διαφορετικό ποσοστό του $g \approx 2$ στο αριστερό και στο δεξιό μέρος του φάσματος επειδή η κορυφή της Q_B^- το κάνει λίγο ασύμμετρο.



Εικόνα 3.19: Σύγκριση του φάσματος της $S_3Tyr_z^\bullet$ (α) με το φάσμα της $S_2Tyr_z^\bullet$ (γ) με 5% v/v μεθανόλη και pH = 6.5. Οι $S_3Tyr_z^\bullet$ και $S_2Tyr_z^\bullet$ σχηματίστηκαν με παλμό στους 250 K και 233 K, αντίστοιχα, και γρήγορο πάγωμα. Το φάσμα (β) είναι το φάσμα της $S_3Tyr_z^\bullet$ (α) από το οποίο έχει αφαιρεθεί ποσοστό του $g \approx 2$ και το φάσμα (δ) είναι η στενή συνιστώσα της $S_2Tyr_z^\bullet$, το φάσμα του pH = 6.5 της εικόνας 3.8Α.

3.2.5 $S_3Tyr_z^\bullet$ σε δείγματα χωρίς μεθανόλη

Στα μη τροποποιημένα δείγματα είναι πιο δύσκολο να φανεί η $S_3Tyr_z^\bullet$, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι ίσως μπορεί να παγιδευτεί ένα ασθενές σήμα. Σε δείγματα με PPBQ ως εξωτερική κινόνη, ίσως θα μπορούσαμε να πούμε ότι υπάρχει κάτι στενότερο από $S_2Y_z^\bullet$ και $S_0Y_z^\bullet$ που ίσως είναι $S_3Y_z^\bullet$ (κόκκινα βέλη στην εικόνα 3.20B). Η PPBQ οξειδώνει τον μη αιμικό Fe (Petrouleas & Diner 1987). Ο οξειδωμένος σίδηρος επιβραδύνει την επανασύνδεση της τυροσίνης επειδή το ηλεκτρόνιο πηγαίνει στον σίδηρο αντί για την Q_A και επανασυνδέεται πιο αργά.



Εικόνα 3.20: (Α) Παγίδευση της S_3TyrZ' σε μη τροποποιημένα δείγματα με παλμό στους 250 K και γρήγορο πάγωμα. Η S_2 (α) και η S_3 (γ) σχηματίστηκαν με παλμό στους 243 K και στη συνέχεια επώαση για 2 min στο σκοτάδι ώστε το ηλεκτρόνιο να μετακινηθεί από την Q_A προς την Q_B . (γ) φωτισμός στους 77 K για μισή ώρα και στη συνέχεια επώαση για 30 s στους 265 K. Στα δείγματα έχει προστεθεί PPBQ ως αποδέκτης των ηλεκτρονίων. Συνθήκες EPR όπως στην εικόνα 3.4. (Β) φάσμα υψηλής ανάλυσης της S_3TyrZ' , διαφορές του φάσματος μετά τον παλμό στους 250 K μείον το αρχικό σκοτάδι (σ) και μείον το τελικό σκοτάδι (ζ), με κόκκινα βέλη σημειώνεται το υποτιθέμενο σήμα της S_3TyrZ' , με μαύρο βέλος το σήμα της $Q_A^-Fe^{II}$. (Γ) Φωτοεπαγόμενο σήμα στους 10 K μετά την παγίδευση της S_3TyrZ' (δ) και μετά το τελικό σκοτάδι (ε). Τα φάσματα είναι οι διαφορές του φάσματος μετά από τρεις παλμούς μέσα στην κοιλότητα μείον το τελικό σκοτάδι μετά από 10 λεπτά, (Β) και (Γ) συνθήκες EPR όπως στην εικόνα 3.5.

Στην εικόνα 3.20Α φαίνεται όλη η πορεία του πειράματος: ο σχηματισμός της S_2 με οξειδωμένο σίδηρο (φάσμα α), φωτισμός στους 77 K για μισή ώρα ώστε να οξειδωθεί το $cyt\ b_{559}$ και στη συνέχεια επώαση στους 265 K, ώστε να αναχθεί ο σίδηρος (φάσμα β). Τα σημεία στα οποία φαίνεται το σήμα του οξειδωμένου cyt

b_{559} φαίνονται με πορτοκαλί γραμμές. Με τον επόμενο παλμό το δείγμα προχωράει στην S_3 και ο σίδηρος οξειδώνεται (φάσμα γ): διακρίνεται το σήμα της S_3 με $g = 10$ (Matsukawa et al. 1999, Ioannidis & Petrouleas 2000, Boussac et al. 2009), καθώς και του οξειδωμένου σιδήρου με $g = 8$ (Petrouleas & Diner 1987). Με τον επόμενο παλμό στους 250 K εξαφανίζεται το σήμα του οξειδωμένου σιδήρου και σχηματίζεται η S_3Tyrz' που φαίνεται αμυδρά κοντά στο $g \approx 2$ (εικόνα 3.19B, κόκκινα βέλη). Στην εικόνα 3.20B με μαύρο βέλος σημειώνεται το σήμα της Q_A^- με $g \approx 1.9$ (Nugent et al. 1992).

Παρατηρείται και εδώ, όπως και στα δείγματα με μεθανόλη, το φαινόμενο να αυξάνεται η ένταση του σήματος της S_0Tyrz' που δημιουργείται με φωτισμό στους 10 K όταν μετά τον φωτισμό στους 253 K για τον σχηματισμό της S_3Tyrz' , αφήνουμε το δείγμα στο σκοτάδι, που σημαίνει ότι με τον παλμό και το γρήγορο πάγωμα κάποιο ενδιάμεσο παγιδεύεται (εικόνα 3.20Γ). Πιθανόν, απουσία μεθανόλης, η ένταση του ενδιάμεσου μοιράζεται σε πολλές ασθενείς κορυφές, γ'αυτό είναι τόσο δύσκολο να ανιχνευθεί.

3.3 Κινητικές πτώσης του σήματος της $Tyrz'$ σε θερμοκρασίες 200 – 230 K

3.3.1 Κινητικές σημείου, εισαγωγικά...

Τα σήματα των S_2Tyrz' και S_3Tyrz' , που περιγράφηκαν στις δύο προηγούμενες ενότητες, στην πραγματικότητα αποτελούν ένα μικρό μέρος του συνολικού σήματος που δημιουργείται. Με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε παγιδεύεται ό,τι έχει χρόνο ζωής περίπου 1 s και πάνω (βλ. Υλικά και μέθοδοι § 2.1.6). Για να έχουμε μια εικόνα του σύνολου του σήματος που δημιουργείται με τον παλμό στους 233 K φωτίστηκε δείγμα μέσα στην κοιλότητα σε αυτές περίπου τις θερμοκρασίες, χωρίς να καταγράφεται όλο το φάσμα, αλλά μόνο η δημιουργία και η κινητική πτώσης του σε ένα συγκεκριμένο σημείο του φάσματος (εικόνα 3.21). Περιμένουμε να δούμε την πιο αργή κινητική αναγωγής της S_3Tyrz' σε σχέση με την S_2Tyrz' , όπως έχει φανεί με άλλες τεχνικές.

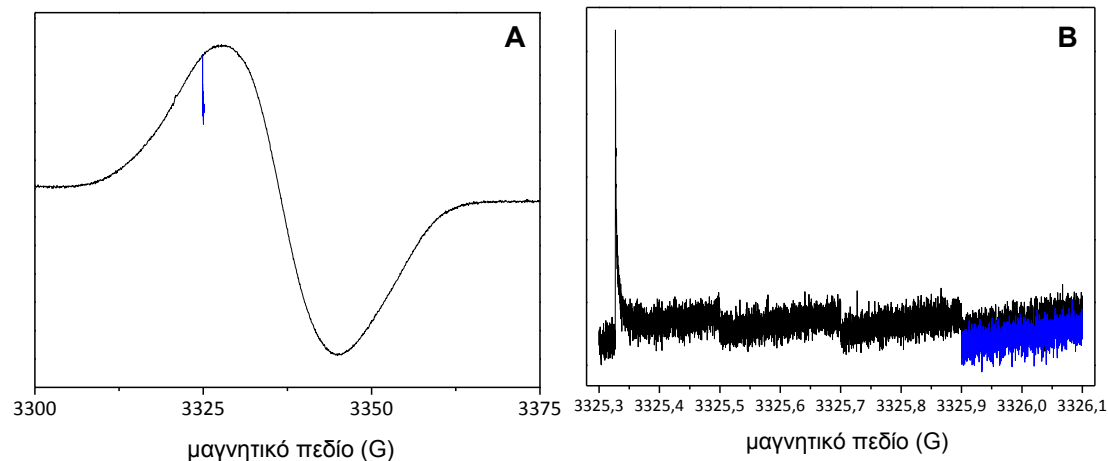
Έχουν γίνει πολλά πειράματα όπου παρακολουθείται η κινητική των μεταβάσεων S. Με φασματοσκοπία ορατού – υπεριώδους φαίνονται μετατοπίσεις στα φάσματα απορρόφησης των χρωστικών εξαιτίας των οξειδωτικών αλλαγών του Mn_4CaO_5 και έτσι παρακολουθούνται οι αντιδράσεις $S_nTyrz' \rightarrow S_{n+1}Tyrz$ (Dekker et al. 1984, Renger & Hanssum 1992, Rappaport et al. 1994). Οι κινητικές της οξείδωσης του Mn_4CaO_5 από την $Tyrz'$ στις διάφορες S καταστάσεις έχουν μελετηθεί και με απορρόφηση ακτίνων – X (time – resolved XAS) (Haumann et al. 2005, Dau et Haumann 2007 (β)) καθώς και παρακολουθώντας τις αλλαγές στον όγκο της πρωτεΐνης με PBD (photothermal beam deflection) (Klauss et al. 2012). Η φασματοσκοπία EPR είναι η μόνη μέθοδος με την οποία καταγράφεται το φάσμα της $Tyrz'$ άμεσα. Κινητικές της αναγωγής της $Tyrz'$ από το Mn_4CaO_5 με EPR έχουν γίνει ελάχιστα. Έχει γίνει σε χλωροπλάστες σε θερμοκρασία δωματίου (Babcock et al. 1976) και σε μεμβράνες ΦΣ II στους 283 K (Razeghifard & Pace 1997).

Από το εργαστήριο μας έχουν γίνει κινητικές μείωσης του φωτοεπαγόμενου σήματος της S_2Tyrz' σε θερμοκρασίες 70 – 240 K (Ioannidis et al. 2008, Γ. Ζαχαρίου – διδακτορική διατριβή) και 77 – 190 K (Μ. Χρυσίνα, πτυχιακή εργασία). Σε αυτές τις θερμοκρασίες η πτώση του σήματος της $Tyrz'$ οφείλεται σε επανασύνδεση με την Q_A^- . Η κινητική πτώσης ακολουθεί διφασική εκθετική κινητική σύμφωνα με την εξίσωση: $y = y_0 + A_1e^{-\frac{x}{t_1}} + A_2e^{-\frac{x}{t_2}}$, t_1, t_2 : χρόνοι ημιζωής των δύο συνιστωσών. Στους 70 K τα περισσότερα κέντρα ακολουθούν την αργή κινητική, ενώ στους 240 K την γρήγορη.

Στην παρούσα εργασία, έγιναν κινητικές σε θερμοκρασίες γύρω από τις θερμοκρασίες ημιαναστολής των μεταβάσεων $S_2 \rightarrow S_3$ και $S_3 \rightarrow S_0$, χρησιμοποιώντας νέα μέθοδο ώστε τα αποτελέσματα να έχουν καλύτερη ανάλυση. Τα παλιότερα πειράματα είχαν γίνει με γρήγορη σάρωση (rapid scans) με χρόνο σάρωσης 200 ms (ο νεκρός χρόνος μεταξύ των σαρώσεων είναι 20 ms) επομένως η ευκρίνεια ήταν 220 ms. Στους 233 K το μεγαλύτερο μέρος του σήματος πέφτει σε χρόνο μικρότερο από 1 s και απαιτείται καλύτερη ευκρίνεια.

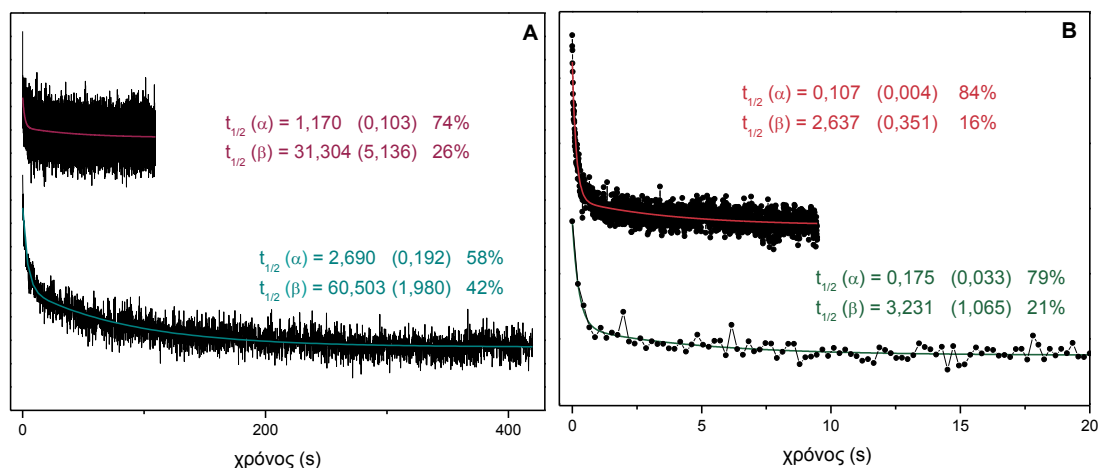
Έγιναν κινητικές χωρίς να καταγράφεται όλο το φάσμα, αλλά επιλέχθηκε η κατάλληλη τιμή μαγνητικού πεδίου (εικόνα 3.21A) και στη συνέχεια μετρήθηκαν οι αλλαγές στο σημείο αυτό συναρτήσει του χρόνου. Επειδή το φασματοόμετρο δεν έχει τη δυνατότητα να στέκεται σε μια τιμή μαγνητικού πεδίου επιλέχθηκε το ελάχιστο δυνατό εύρος που είναι 0.2 G. Επιλέχθηκε ο μεγαλύτερος δυνατός χρόνος σάρωσης, που είναι 10 s. Το φάσμα αποτελείται από 2000 σημεία και ο χρόνος σάρωσης είναι 10 s, οπότε το ένα σημείο απέχει από το άλλο $10\text{ s}/2000 = 5\text{ ms}$. Με τον τρόπο αυτό η ευκρίνεια είναι 5 ms, δηλαδή 40 φορές καλύτερη από ό,τι με την συνηθισμένη γρήγορη σάρωση.

Δίνοντας ένα παλμό αμέσως μόλις αρχίσει η σάρωση, βλέπουμε το σημείο του φάσματος που επιλέξαμε αρχικά να αυξάνεται και στη συνέχεια να μειώνεται. Στην εικόνα 3.21A φαίνεται το φάσμα του αρχικού σκοταδιού και με μπλε το σημείο στο οποίο έγινε η κινητική, ενώ στην εικόνα 3.21B φαίνονται τα φάσματα της κινητικής.



Εικόνα 3.21: (A) Το αρχικό σκοτάδι πριν τον παλμό (μαύρο) και το σημείο στο οποίο καταγράφεται η κινητική της οξειδωσης της S_2Tyr_2' και της αναγωγής της στη συνέχεια από το Mn_4CaO_5 (μπλε), (B) Τα φάσματα της κινητικής, με μπλε το φάσμα του αρχικού σκοταδιού το οποίο αφαιρούμε στη συνέχεια από όλα για να φύγει η κλίση. Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 12.5 Gpp, χρόνος σάρωσης: 10 s, σταθερά χρόνου: 1 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW. Θερμοκρασία: 220 K.

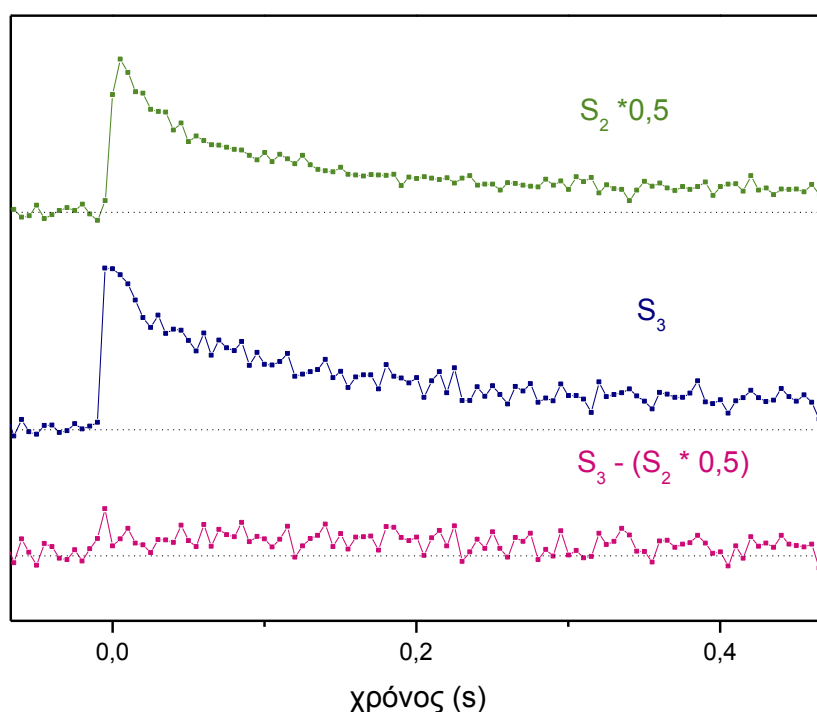
Αρχικά οι κινητικές γίνονται στην κορυφή της παραγώγου όπου το φάσμα είναι επίπεδο. Αργότερα φάνηκε όμως ότι σε αυτό το σημείο είναι μεγάλη η συνεισφορά της χλωροφύλλης, οπότε επιλέχθηκε λίγο μικρότερη τιμή μαγνητικού πεδίου. Επειδή, το φάσμα δεν είναι επίπεδο σε αυτό το σημείο, αφαιρείται από κάθε φάσμα το αρχικό σκοτάδι (μπλε στην *εικόνα 3.21B*). Οι μονάδες μαγνητικού πεδίου μετατρέπονται σε μονάδες χρόνου (0.2 G αντιστοιχούν σε 10 s). Η μέθοδος αυτή είναι καλή για τις υψηλές θερμοκρασίες που οι χρόνοι ημιζωής είναι ms – s επειδή το παράθυρο είναι 10 s, ενώ δεν προσφέρεται για τις χαμηλές θερμοκρασίες, όπου οι χρόνοι ημιζωής είναι μερικές δεκάδες s (*εικόνα 3.22*).



Εικόνα 3.22: Σύγκριση μεθόδων για την κατασκευή της κινητικής πτώσης της S_2TyrZ^\bullet . (A) Επάνω: 120 K, κινητική σημείου, συνθήκες όπως στην *εικόνα 3.21*, κάτω: 110 K, γρήγορη σάρωση όλου του φάσματος, συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 16 Gpp, χρόνος σάρωσης: 100 ms, σταθερά χρόνου: 1 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW, (B) 250 K, δείγμα με μεθανόλη, επάνω: κινητική σημείου, συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 12.5 Gpp, χρόνος σάρωσης: 10 s, σταθερά χρόνου: 3 ms, εύρος πεδίου: 0.2 G, ισχύς μικροκυμάτων: 5 db, κάτω: γρήγορη σάρωση όλου του φάσματος, συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 12.5 Gpp, χρόνος σάρωσης: 200 ms, σταθερά χρόνου: 3 ms, εύρος πεδίου: 100 G, ισχύς μικροκυμάτων: 63 mW.

3.3.2 Η S_3Tyr_2' σχηματίζεται μόνο πολύ κοντά στη θερμοκρασία της μετάβασης $S_3 \rightarrow S_0$

Στην S_3 , η Tyr_2 δεν οξειδώνεται παρά μόνο πολύ κοντά στη θερμοκρασία που γίνεται η μετάβαση $S_3 \rightarrow S_0$. Δεν παρατηρείται καθόλου το φαινόμενο να δημιουργείται από χαμηλότερες θερμοκρασίες και να αυξάνεται η ένταση της με την αύξηση της θερμοκρασίας, όπως συμβαίνει στην S_2 . Αυτή είναι σημαντική παρατήρηση, γιατί δείχνει ότι η απομάκρυνση του πρωτονίου της τυροσίνης γίνεται διαφορετικά στις δύο αυτές μεταβάσεις.



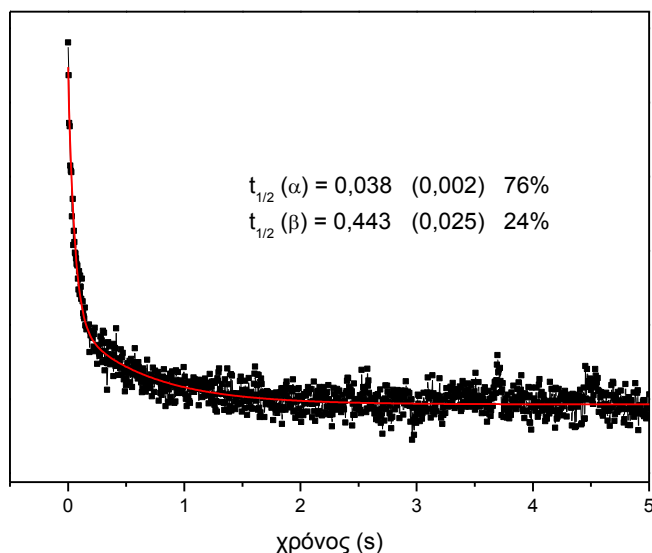
Εικόνα 3.23: Δημιουργία και πτώση της Tyr_2' με παλμό στους 223 K μέσα στην κοιλότητα, στην S_2 (πράσινο) και στην S_3 (μπλε). Με κόκκινο φαίνεται η διαφορά του σήματος στην S_3 μείον το μισό της S_2 .

Η μη δημιουργία της ρίζας σε σχετικά ψηλές θερμοκρασίες φαίνεται στην εικόνα 3.23, στην οποία περιγράφεται πείραμα κατά το οποίο δόθηκε παλμός στους 223 K μέσα στην κοιλότητα. Με πράσινο φαίνεται η δημιουργία και πτώση της Tyr_2' στην S_2 , ενώ με μπλε στην S_3 . Το φάσμα της S_2 είναι πολλαπλασιασμένο επί 0.5 και το τελευταίο φάσμα είναι η διαφορά των δύο πρώτων. Φαίνεται λοιπόν ότι στην S_3 δημιουργείται το μισό της ρίζας από ό,τι στην S_2 στην ίδια θερμοκρασία. Το σήμα

αυτό προέρχεται από κέντρα που έχουν μείνει στην S_2 . Για να οξειδωθεί η Tyr_Z στην S_3 πρέπει να ανέβουμε σε πιο υψηλές θερμοκρασίες.

3.3.3 Κινητική αναγωγής της $S_2Tyr_Z^-$ και της $S_3Tyr_Z^-$ από το Mn_4CaO_5

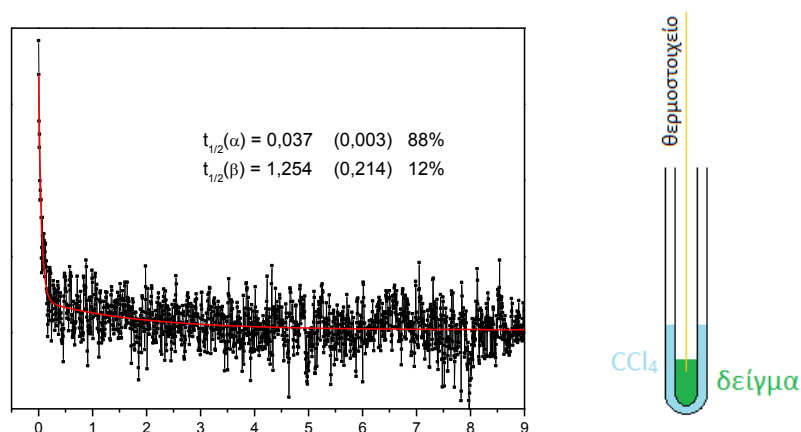
Στην εικόνα 3.24 φαίνεται η κινητική πτώσης της $S_2Tyr_Z^-$ σε θερμοκρασία περίπου 225 K. Υπάρχει μια αβεβαιότητα σχετικά με την ακριβή θερμοκρασία του δείγματος επειδή το θερμοστοιχείο για την μέτρηση της βρίσκεται ακριβώς δίπλα στην αντίσταση που θερμαίνει το ήλιο που περνά προς το δείγμα. Η κινητική πτώσης ακολουθεί διφασική κινητική με χρόνους ημιζωής περίπου 40 ms και 0.5 – 1 s. Υπάρχει σχετικά μεγάλη διασπορά στους χρόνους ημιζωής, ανάλογα με το δείγμα· εδώ παρουσιάζεται μια χαρακτηριστική κινητική. Υπάρχουν αρκετά σημεία και στην γρήγορη συνιστώσα της κινητικής. Σε αυτή τη θερμοκρασία η πτώση του σήματος οφείλεται σε επανασύνδεση με την Q_A^- ή την Q_B^- (σε αυτή τη θερμοκρασία το ηλεκτρόνιο μπορεί να κινηθεί σε κάποια κέντρα προς την Q_B) ή με χλωροφύλλη, καροτενοειδές ή το $cyt\ b_{559}$. Ίσως σε λίγα κέντρα η Tyr_Z^- να ανάγεται από το Mn_4CaO_5 .



Εικόνα 3.24: Κινητική πτώσης του σήματος της $S_2Tyr_Z^-$ στους 225 K. Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 12.5 Gpp, χρόνος σάρωσης: 10 s, σταθερά χρόνου: 1 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW.

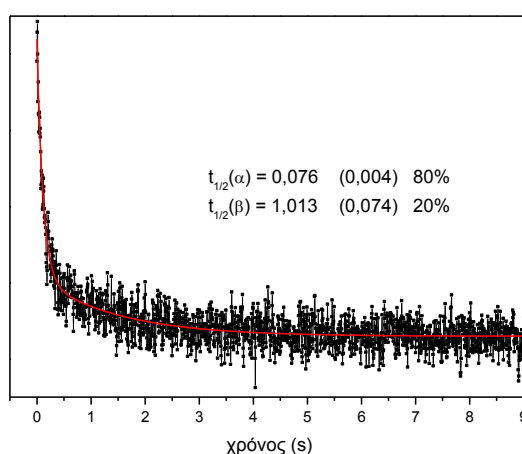
Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, όπου γίνονται κανονικά οι μεταβάσεις, το δείγμα λιώνει και δεν γίνεται σωστός συντονισμός στην κοιλότητα, επειδή το H₂O του δείγματος απορροφά μικροκύματα. Για να μειωθεί ο όγκος του δείγματος (και του H₂O που περιέχει), το δείγμα τοποθετήθηκε σε πιο στενά σωληνάκια (Q band) και το μικρό σωληνάκι μέσα σε κανονικό σωληνάκι που περιέχει CCl₄ (ο οποίος δεν έχει διπολική ροπή και δεν επηρεάζει τον συντονισμό των μικροκυμάτων). Για να μετρηθεί ακριβώς η θερμοκρασία τοποθετήθηκε θερμοστοιχείο μέσα στο δείγμα (εικόνα 3.25).

Στην εικόνα 3.25 φαίνεται η κινητική πτώσης του σήματος που δημιουργείται στους 243 K με παλμό σε δείγμα που βρίσκεται στην “S₃”. Στην πραγματικότητα περίπου το 40 % των κέντρων του δείγματος βρίσκεται στην S₃. Δίνει σήμα και το 50 % που βρίσκεται στην S₂, το ποσοστό που βρίσκεται στην S₁ και S₀ είναι αμεληταίο. Η S₂Tyr_z[•] σε αυτή τη θερμοκρασία είναι γρήγορη και δεν παγιδεύεται. Η κινητική πτώσης παρουσιάζει διφασική εκθετική κινητική με χρόνους περίπου 40 ms και 1 s, δεν μπορούμε να πούμε τι αντιστοιχεί στην κάθε συνιστώσα. Σίγουρα όμως το σήμα που παγιδεύουμε θα πρέπει να βρίσκεται στην αργή κινητική. Το σήμα που βλέπουμε είναι μείγμα S₂Tyr_z[•] και S₃Tyr_z[•]. Δεν αποκλείεται να υπάρχει και μικρή συνεισφορά από chl⁺.



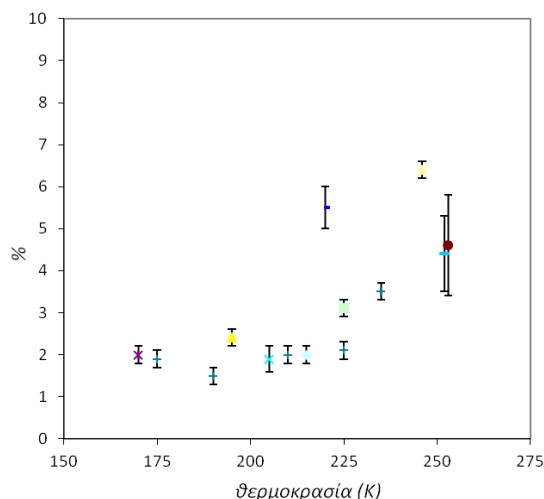
Εικόνα 3.25: Κινητική πτώσης της “S₃Tyr_z” μετά από παλμό στους 246 K. Στην πραγματικότητα στο δείγμα έχουμε 50 % S₂, 40 % S₃ και 10 % S₁, S₀. Το δείγμα περιέχει PPBQ ως δευτερογενή κίνηση. Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 12.5 Gpp, χρόνος σάρωσης: 10 s, σταθερά χρόνου: 3 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW.

Η ίδια δοκιμή έγινε και σε δείγμα με 5% v/v μεθανόλη. Εδώ ο λόγος σήματος / θόρυβο είναι καλύτερος και η κινητική της γρήγορης συνιστώσας έχει πιο πολλά σημεία απ' ό,τι στο μη τροποποιημένο δείγμα. Φαίνεται και με αυτό τον τρόπο πιο έντονο το σήμα σε δείγματα με μεθανόλη σε σχέση με τα μη τροποποιημένα δείγματα, όπως φάνηκε και στα φάσματα των 10 K. Η αργή συνιστώσα, στην οποία βρίσκεται το σήμα που παγιδεύουμε δεν φαίνεται να αλλάζει με ή χωρίς μεθανόλη.



Εικόνα 3.26: Κινητική πτώσης της “ S_3Tyr_z ” σε δείγμα με μεθανόλη στους 250 K. Η κλίμακα είναι ίδια με την κλίμακα της εικόνας 3.25. Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης: 12.5 Gpp, χρόνος σάρωσης: 10 s, σταθερά χρόνου: 3 ms, ισχύς μικροκυμάτων: 63 mW, DCBQ.

Μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσοστό του σήματος που σχηματίζεται σε σχέση με το σήμα II, της Tyr_D , σε συνθήκες μη κορεσμού. Τα ποσοστά αυτά φαίνονται στην εικόνα 3.27 συναρτήσει της θερμοκρασίας. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία αυξάνεται το μέγεθός της S_2Tyr_z , αυξάνεται όμως και ο θόρυβος. Στους 223 K μπορούμε να παγιδεύσουμε το ασθενές σήμα της εικόνας 3.2, που είναι η ουρά μόνο του σήματος που φαίνεται στη κινητική της εικόνας 3.25. Η ένταση του παλμού μέσα στην κοιλότητα (δηλαδή στις κινητικές) είναι μικρότερη σε ένταση από τον παλμό που δίνεται έξω.

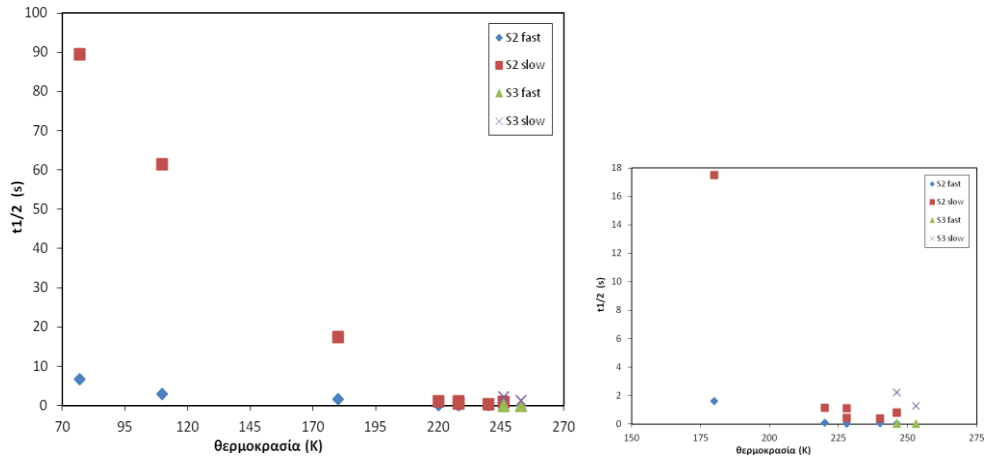


Εικόνα 3.27: Ένταση της S_2Tyrz' που σχηματίζεται με παλμό μέσα στην κοιλότητα συναρτήσεως της θερμοκρασίας. Το ποσοστό υπολογίστηκε από το μέγιστο στα πειράματα των κινητικών σε σχέση με το σήμα II σε ακόρεστες συνθήκες και κανονικοποιημένο ως προς την ισχύ των μικροκυμάτων. Η θερμοκρασία είναι αυτή που μετρά το θερμοστοιχείο του οργάνου και δεν αντιστοιχεί με την ακριβή θερμοκρασία του δείγματος, ειδικά όταν χρησιμοποιείται θέρμανση για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας.

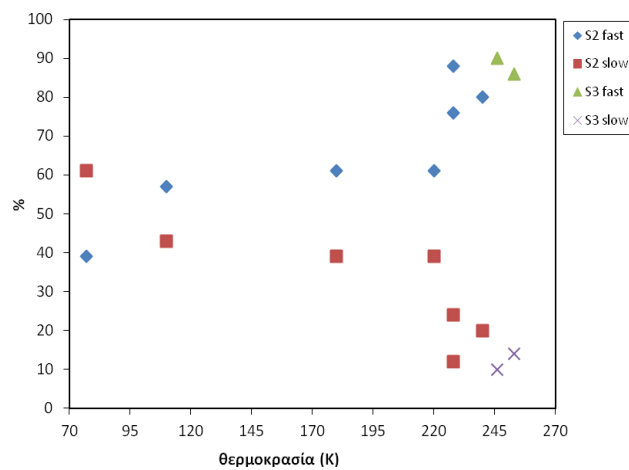
3.3.4 Χρόνοι ημιζωής της $Tyrz'$

Με τις κινητικές που έγιναν στις ψηλές θερμοκρασίες μπορούμε να συμπληρώσουμε το παλιότερο διάγραμμα (Ioannidis et al. 2008, Γ. Ζαχαρίου – διδακτορική διατριβή, Μ. Χρυσίνα – πτυχιακή εργασία). Στην εικόνα 3.28 φαίνονται οι χρόνοι ημιζωής της γρήγορης (μπλε) και της αργής (κόκκινο) συνιστώσας της κινητικής. Δεξιά φαίνεται η μεγάλη διασπορά που υπάρχει στους χρόνους, λόγω του θορύβου εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας, ακόμη οι χρόνοι ποικίλουν από δείγμα σε δείγμα. Πάντως φαίνεται οι χρόνοι της S_3Tyrz' να είναι πιο μεγάλοι και αυτός είναι ο λόγος που παγιδεύεται ένα μικρό σήμα της στους 253 K.

Στην εικόνα 3.29 φαίνονται τα ποσοστά που αντιστοιχούν σε κάθε φάση της κινητικής συναρτήσεως της θερμοκρασίας. Παρότι και πάλι υπάρχει διασπορά φαίνεται να σχηματίζεται μια σιγμοειδής καμπύλη.



Εικόνα 3.28: Χρόνοι ημιζωής των δύο φάσεων της κινητικής πτώσης της S_2Tyrz' (και της S_3Tyrz') συναρτήσει της θερμοκρασίας. Οι τρεις χαμηλότερες θερμοκρασίες είναι από την πτυχιακή.

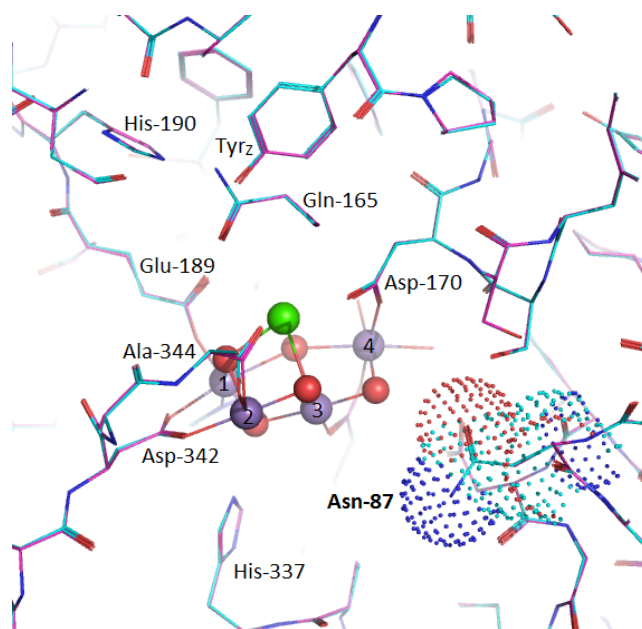


Εικόνα 3.29: Ποσοστά κέντρων που ακολουθούν τις δύο φάσεις της κινητικής συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Κατά την επανασύνδεση της $Tyrz'$, σε κάποια κέντρα το ηλεκτρόνιο επιστρέφει ταυτόχρονα με το πρωτόνιο στην τυροσίνη, ενώ σε άλλα κέντρα επιστρέφει πρώτα το ηλεκτρόνιο, ενώ το πρωτόνιο καθυστερεί. Στην πρώτη περίπτωση τα κέντρα βρίσκονται στην γρήγορη συνιστώσα, ενώ στην δεύτερη περίπτωση στην αργή συνιστώσα (Ioannidis et al. 2008). Το σήμα που παγιδεύουμε ανήκει στην δεύτερη περίπτωση.

3.4 Ισορροπία των δύο διαμορφώσεων της S₂

Στα κυανοβακτήρια παρατηρείται μόνο το πολυγραμμικό σήμα (*McDermott et al. 1988*). Για να βρεθεί αν υπάρχει κάποια διαφορά στο πρωτεϊνικό περιβάλλον του Mn₄CaO₅ μεταξύ φυτών και κυανοβακτηρίων έγινε σύγκριση των ακολουθιών της D1 των δύο οργανισμών για να βρεθούν διαφορές στην αμινοξική ακολουθία (βλ. Παράρτημα α). Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε μοντέλο της φυτικής D1 με πρότυπο την D1 των κυανοβακτηρίων, της οποίας η δομή είναι γνωστή (βλ. Παράρτημα β).

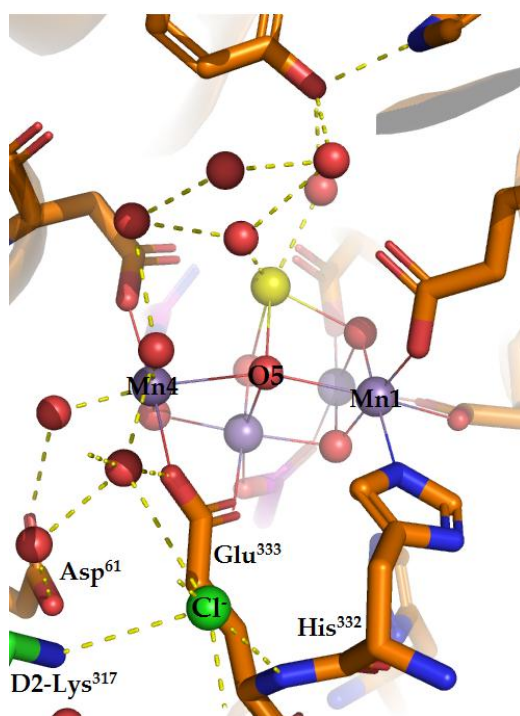


Εικόνα 3.30: Σύγκριση του περιβάλλοντος του Mn₄CaO₅ στα κυανοβακτήρια (3arc, PDB) με γαλάζιο χρώμα σε σχέση με την D1 των φυτών με ροζ χρώμα (δομή κατασκευασμένη χρησιμοποιώντας ως πρότυπο την D1 των κυανοβακτηρίων). Η Asn 87 των κυανοκτηρίων που αντικαθίσταται από αλανίνη στα φυτά είναι σχεδιασμένη με τελείες.

Υπάρχουν 9 μη συντηρημένες αντικαταστάσεις αμινοξέων αλλά γενικά οι δύο δομές είναι πανομοιότυπες. Στην εικόνα 3.30 φαίνεται η σύγκριση των δύο πρωτεϊνών για το περιβάλλον του Mn₄CaO₅. Σε απόσταση 6.5 και 7 Å από τα Mn3 και Mn4 αντίστοιχα υπάρχει μια μη συντηρημένη αντικατάσταση: η πολική Asn 87 των κυανοβακτηρίων αντικαθίσταται από την μη - πολική αλανίνη στα φυτά. Αυτό

το θετικό φορτίο, ίσως, ευθύνεται για την ομοιομορφία της S_2 σε όλα τα κέντρα, στα κυανοβακτήρια.

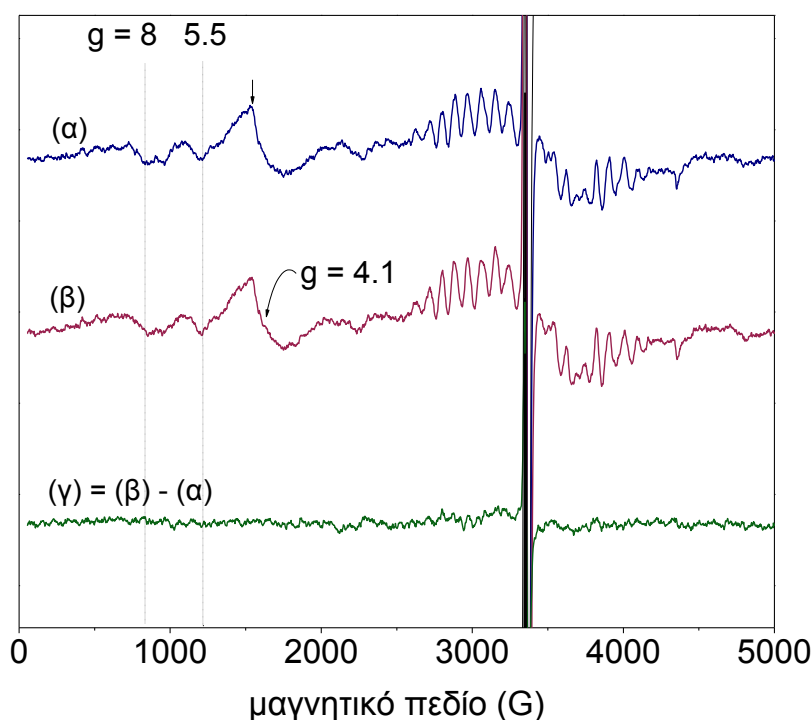
Το Cl^- επηρεάζει την ισορροπία πολυγραμμικού $-g = 4.1$. Με αφαίρεση Cl^- αυξάνεται το $g = 4.1$ εις βάρος του πολυγραμμικού (Lindberg & Andreasson 1996). Με αντικατάσταση του Cl^- με F^- όλο το πολυγραμμικό μετατρέπεται σε $g = 4.1$, ενώ με αντικατάσταση με Br^- δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή (Ono et al. 1987). Στην εικόνα 3.31 φαίνεται το Mn_4CaO_5 και πως συνδέεται με το Cl^- . Το Cl^- σχηματίζει δεσμό H με την αμινομάδα του Glu 333, εκεί όπου συνδέεται με την His 332. Το Glu 333 είναι δισχιδής υποκαταστάτης που συνδέεται με το Mn3 και Mn4, ενώ η His 332 με το Mn1. Η κατανομή του φορτίου μεταξύ του Mn1 και Mn4 είναι αυτό που διαφέρει στις δύο διαμορφώσεις της S_2 (Pantazis et al. 2012, εικόνα 3.29). Το Cl^- ίσως επηρεάζει αυτή την ισορροπία μέσω αυτού του δεσμού H.



Εικόνα 3.31: Το Cl^- συνδέεται μέσω δεσμού H με τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ του Glu 333 και της His 332, που είναι υποκαταστάτες του Mn4 και Mn1 αντίστοιχα.

Κατά την $S_2 \rightarrow S_3$ τα κέντρα που χαρακτηρίζονται από $g = 4.1$ ($S = 5/2$) πρώτα μετατρέπονται σε πολυγραμμικό σήμα ($S = 1/2$) και στη συνέχεια προχωρούν στην

S_3 (Chrysina et al. 2010). Την μετατροπή προκαλεί η Ty_2z' ή επίδραση του φωτός στο Mn_4CaO_5 . Για να διευκρινιστεί τι από τα δύο ισχύει έγινε το πείραμα της εικόνας 3.32. Το δείγμα περιέχει ατραζίνη, η οποία προσδένεται στην θέση της Q_B , ώστε να μην μπορεί να σχηματιστεί σταθερή Ty_2z' (εφόσον η σταθερότητα οφείλεται στην μεταφορά του ηλεκτρονίου στην Q_B). Για να σχηματιστεί σταθερή S_2 οξειδώθηκε ο μη αιμικός σίδηρος, ώστε να δεχτεί το ηλεκτρόνιο που απομακρύνεται από το Mn_4CaO_5 κατά την μετάβαση $S_1 \rightarrow S_2$. Το σήμα του Fe^{III} φαίνεται σε $g = 8$ και 5.5, ανεστραμμένο στο φάσμα α , το οποίο είναι η διαφορά της S_2 μείον την S_1 . Επομένως, σχηματίζεται η κατάσταση $S_2Q_AFe^{II}$. Με παλμό στους 223 K (φάσμα β), δεν παρατηρείται σχηματισμός της σταθερής S_2Ty_2z' , ούτε μετατροπή του $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό (φάσμα γ). Επομένως, η μετατροπή αυτή προκαλείται από τον σχηματισμό της Ty_2z' . Φαίνεται ότι η οξειδωμένη Ty_2z μπορεί να προκαλεί αλλαγές στο Mn_4CaO_5 , (πιθανόν μέσω του θετικού φορτίου ή των δεσμών H).



Εικόνα 3.32: Αν δεν σχηματιστεί Ty_2z' δεν γίνεται η μετατροπή του $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό σήμα κατά την μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$. (α) $S_2Q_AFe^{II}$, (β) παλμός στους 223 K. Με πράσινο βέλος έχει σημαδεωθεί σήμα με $g = 4.3$ που οφείλεται σε διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του φάσματος της S_1 σε σχέση με τα επόμενα φάσματα και δεν σχετίζεται με το ΦΣ II. Συνθήκες EPR όπως στην εικόνα 3.3.

Σύνοψη - Συμπεράσματα

Άστραψε φως κι εγνώρισεν ο νιος τον εαυτό του.

Δ. Σολωμός, «ο Πόρφυρας»

I believe in intuition and inspiration. Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution. It is, strictly speaking, a real factor in scientific research.

A. Einstein, Cosmic religion : with other opinions and aphorisms (1931)

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην διερεύνηση του ρόλου της Tyr₂ στην φωτοεπαγόμενη διάσπαση του H₂O. Χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία EPR θερμοκρασιών υγρού ηλίου για να παγιδευτούν και χαρακτηριστούν ενδιάμεσα κυρίως των κρίσιμων μεταβάσεων S₂ → S₃ και S₃ → S₀, τα οποία περιλαμβάνουν την ελεύθερη ρίζα Tyr₂[•] σε αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο Mn₄CaO₅.

Σύνοψη παρατηρήσεων

Το σήμα μετάλλου – ρίζας, S₂Tyr₂[•], που δημιουργείται με φωτισμό στους 233 K παρουσία μεθανόλης έχει εύρος 160 G στο φυσιολογικό pH = 6.5, φαίνεται όμως να στενεύει με την αύξηση του pH. Αντίθετα, η αλλαγή του pH δεν επηρεάζει το φωτοεπαγόμενο σήμα σε κρυογενικές θερμοκρασίες.

Με προσεκτικότερη παρατήρηση φάνηκε ότι στο ψηλό pH το σήμα δεν στενεύει, αλλά αυξάνεται η ένταση μιας πιο στενής συνιστώσας με εύρος περίπου 80 G. Το εύρος ενός τέτοιου σήματος εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο σπιν, εδώ του Mn₄CaO₅ και της Tyr₂[•]. Το φαρδύ σήμα υποδηλώνει ισχυρότερη αλληλεπίδραση μεταξύ τους σε σχέση με το στενό. Οι δύο συνιστώσες έχουν διαφορετική κινητική επανασύνδεσης.

Η S₂Tyr₂[•] (233 K), λόγω της εξαιρετικής σταθερότητάς της, που οφείλεται στη μεταφορά του ηλεκτρονίου στην O_B, μελετήθηκε σε θερμοκρασία 150 – 180 K. Στις

υψηλές αυτές θερμοκρασίες αποσυνδέονται μαγνητικά τα δύο κέντρα, λόγω θερμικών κινήσεων, και καταγράφεται το αδιατάρακτο από το Mn_4CaO_5 σήμα της Tyr_z' . Παρατηρήθηκε, ότι μεταβολή του pH του δείγματος στο εύρος $pH = 5.5 - 7.5$ δεν προκαλεί αλλαγές στο αδιατάρακτο φάσμα της Tyr_z' , επομένως και το στενό και το φαρδύ σήμα προέρχονται από την Tyr_z' . Επίσης, και οι δύο συνιστώσες του σήματος προέρχονται από κέντρα που βρίσκονται στην S_2 και χαρακτηρίζονται από το πολυγραμμικό σήμα με σπιν $\frac{1}{2}$.

Η αργή πτώση του σήματος της Tyr_z' κατά την επώαση στους $150 - 180 K$ οφείλεται σε επανασύνδεση φορτίου. Διαπιστώθηκε, ότι διαφέρει ο δότης ηλεκτρονίου προς την Tyr_z' ανάλογα με το pH: σε $pH = 7.5$ δότης είναι η Tyr_D , στο $pH = 5.5$ κάποια χλωροφύλλη, πιθανόν η chl_z και στο $pH = 6.5$ υπάρχουν κέντρα στα οποία η Tyr_z' επανασυνδέεται με την chl_z ενώ σε άλλα με την Tyr_D . Στα $pH = 5.5 - 6.5$ η κινητική πτώσης της φαρδύς συνιστώσας είναι πιο γρήγορη από της στενής. Στο $pH = 7.5$ όλο το σήμα μειώνεται με την ίδια κινητική. Πιθανόν, ο διαφορετικός δότης ηλεκτρονίου επηρεάζει την ταχύτητα επανασύνδεσης κι όχι η αλλαγή του pH.

Παγιδεύτηκε για πρώτη φορά ασθενές ενδιάμεσο της μετάβασης $S_3 \rightarrow S_0$ με μεθανόλη, το οποίο αποδόθηκε στην S_3Tyr_z' . Το σήμα πιθανόν αποτελεί την τελευταία μεταβατική κατάσταση πριν την έκλυση O_2 και η μελέτη του μελλοντικά μπορεί να αποκαλύψει πολλά για τον μηχανισμό σχηματισμού του O_2 . Σε δείγματα χωρίς προσθήκη μεθανόλης το σήμα είναι ασθενέστερο. Η S_3Tyr_z' δημιουργείται μόνο σε θερμοκρασίες που γίνεται η μετάβαση $S_3 \rightarrow S_0$, και όχι σε χαμηλότερες σε αντίθεση με την S_2Tyr_z' .

Μελετήθηκαν οι κινητικές πτώσης των S_2Tyr_z' και S_3Tyr_z' στην θερμοκρασία ημιαναστολής των μεταβάσεων S . Στους $243 K$ η κινητική πτώσης της S_2Tyr_z' έχει δύο συνιστώσες με χρόνους ημιζωής περίπου $40 ms$ και $400 ms$. Το σήμα που παγιδεύουμε ανήκει στην πιο αργή συνιστώσα.

Τέλος, έγινε σύγκριση των αλληλουχιών της D1 στα φυτά και τα κυανοβακτήρια και βρέθηκε μια μη συντηρημένη αλλαγή αμινοξέος στη θέση 87: στην πρώτη περίπτωση υπάρχει αλανίνη, ενώ στην δεύτερη η πολική ασπαραγίνη. Το κατάλοιπο αυτό βρίσκεται σε απόσταση περίπου 6 \AA από το Mn_4CaO_5 .

Συμπεράσματα

Δίαυλοι μεταφοράς των πρωτονίων

Η οξειδωση της $S_3\text{Tyr}_Z$ είναι εφικτή σε θερμοκρασίες όπου μπορούν να γίνουν εκτεταμένες κινήσεις της πρωτεΐνης, σε αντίθεση με την $S_2\text{Tyr}_Z$ που αρχίζει να οξειδώνεται από τους 77 K. Σε θερμοκρασίες < 120 K είναι δυνατές μόνο οι αρμονικές ταλαντώσεις, ενώ σε θερμοκρασίες > 240 K είναι δυνατές και εκτενείς κινήσεις της πρωτεΐνης (Pieper et al. 2007). Αυτό ταιριάζει με το μοντέλο που ερμηνεύει τις δύο συνιστώσες της $S_2\text{Tyr}_Z$ ως δύο διαδοχικές κινήσεις πρωτονίων κατά μήκος δεσμών H (Chrysin et al. 2011). Η μη δημιουργία της $S_3\text{Tyr}_Z$ σε θερμοκρασίες < 240 K πιθανόν υποδηλώνει ένα διαφορετικό κανάλι απόσπασης πρωτονίου για αυτή τη μετάβαση, που όταν λειτουργεί πρέπει να γίνει αναδιάταξη της πρωτεΐνης. Στο κανάλι του Asp 61 έχει προταθεί ότι λειτουργεί ένας μηχανισμός – πύλη (gating mechanism) (Bao et al. 2013). Ο μηχανισμός αυτός εξασφαλίζει ότι τα H^+ δεν θα επιστρέφουν στο Mn_4CaO_5 .

Σύμφωνα με όλα αυτά, ταιριάζει να πούμε ότι κατά την μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$ το πρωτόνιο αποσπάται από το κανάλι της His 190 και κατά την $S_3 \rightarrow S_0$ από το Asp 61. Το ίδιο έχει προταθεί και από άλλη ομάδα (Klauss et al. 2012) που κατέληξαν σε αυτό το συμπέρασμα από πειράματα μεταλλαξιγένεσης στο Asp 61. Όταν το Asp 61 αντικαθιστάται με Asn παρατηρείται πολύ μεγαλύτερη επιβράδυνση στο χρόνο της μετάβασης $S_3 \rightarrow S_0$, σε σχέση με την $S_2 \rightarrow S_3$ (Hundelt et al. 1998, Dilbeck et al. 2012).

Ένα σημαντικό επιχείρημα υπέρ του μοντέλου παλινδρόμησης πρωτονίου κατά την $S_2 \rightarrow S_3$ είναι η σημασία της παρουσίας του Cl^- κατά τη μετάβαση αυτή, μιας και αποτελεί μέρος του καναλιού που ξεκινά από το Asp 61. Το Cl^- είναι αναγκαίο μόνο κατά τις μεταβάσεις $S_2 \rightarrow S_3$ και $S_3 \rightarrow S_0$ (Wincencjusz et al. 1997). Με αφαίρεση Cl^- το σύστημα δεν προχωρεί πέρα από την $S_2\text{Tyr}_Z$ (Boussac et al. 1992). Με θεωρητικούς υπολογισμούς φάνηκε να σχηματίζεται δεσμός άλατος μεταξύ του D1 – Asp 61 και της D2 – Lys 317 με αφαίρεση του Cl^- , το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ τους (Rivalta et al. 2011). Με αυτό τον τρόπο κλείνει η πύλη και δεν είναι

δυνατή πλέον η απόσπαση πρωτονίων από το Mn_4CaO_5 , και επομένως το σύστημα σταματά στην $S_2Tyr_z^-$ (κατά την $S_1 \rightarrow S_2$ δεν αποσπάται πρωτόνιο, οπότε δεν επηρεάζεται). Μια άλλη εξήγηση όμως του φαινομένου αυτού θα μπορούσε να είναι ότι ο σχηματισμός $g = 4.1$ που συμβαίνει όταν αφαιρείται το Cl^- (Lindberg & Andreasson 1996) εμποδίζει το σύστημα να προχωρήσει, μιας και έχει φανεί ότι το $g = 4.1$ πρώτα μετατρέπεται σε πολυγραμμικό και μετά προχωρά στην S_3 (Chrysinia et al. 2010).

Οι δύο διαμορφώσεις της S_2

Στην § 3.4 ειπώθηκαν αρκετά για τις δύο διαμορφώσεις της S_2 . Φαίνεται, η διαμόρφωση της S_2 να καθορίζεται από την κατανομή του φορτίου γύρω από το σύμπλοκο Mn_4CaO_5 . Αντικατάσταση της πολικής Asn 87 των κυανοβακτηρίων, σε απόσταση $6 - 7 \text{ \AA}$ από το Mn_4CaO_5 , με την μη πολική αλανίνη στα φυτά ίσως σχετίζεται με την ανομοιογένεια της S_2 στα φυτά. Παρουσία ή απουσία, σε απόσταση περίπου 7 \AA , του ιόντος Cl^- , το οποίο συνδέεται και μέσω δεσμών H με υποκαταστάτες του συμπλόκου, επίσης αλλάζει την κατάσταση σπίν της S_2 . Ακόμη, ο σχηματισμός της Tyr_z^- οδηγεί τη μετατροπή $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό κατά τη μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$. Η επίδραση της Tyr_z^- στο Mn_4CaO_5 έχει φανεί και με φωτοακουστικά πειράματα, όπου παρατηρήθηκε κατά την μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$ συστολή του ΦΣ II σε χρόνο ns μετά τον παλμό φωτός· η συστολή αυτή φαίνεται ότι προετοιμάζει το σύμπλοκο Mn_4CaO_5 για την αποβολή ενός πρωτονίου αρχικά και ενός ηλεκτρονίου στη συνέχεια και προκαλείται από την Tyr_z^- (Klauss et al. 2012 β).

Μια άλλη πρόταση είναι ότι η ισορροπία $g = 4.1$ – πολυγραμμικό καθορίζεται από το δίκτυο των δεσμών H που δημιουργούνται μεταξύ των W1, W2 (υποκαταστατών του Mn4) και Asp 61 και ύπαρξη ή έλλειψη Cl^- . Προσθήκη μεθανόλης στη θέση αυτών των μορίων H_2O επηρεάζει το δίκτυο αυτό και με αυτό τον τρόπο την ισορροπία των δύο διαμορφώσεων (Pokhrel & Brudvig 2014). Πιο συγκεκριμένα, προτάθηκε ότι το δίκτυο αυτό ρυθμίζει την ικανότητα του Mn4 να οξειδωθεί ή όχι κατά την μετάβαση $S_1 \rightarrow S_2$ και κατά συνέπεια το σχηματισμό $g =$

4.1 στην πρώτη περίπτωση και πολυγραμμικού στην δεύτερη. Η ύπαρξη ανομοιογένειας ήδη από την S_1 έχει παρατηρηθεί με EPR: παρατηρούνται δύο διαφορετικά σήματα της $S_1\text{Tyr}_z'$ που το ένα με $g = 2.035$ οδηγεί σε σχηματισμό του πολυγραμμικού της S_2 , ενώ το άλλο με εύρος 26 G οδηγεί σε σχηματισμό $g = 4.1$ (Sioros et al. 2007).

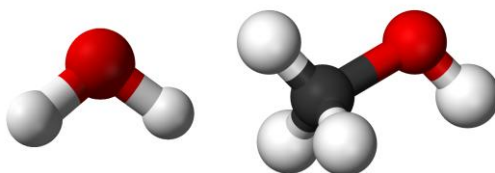
Η επίδραση της μεθανόλης

Σύμφωνα με αυτή τη λογική, ότι δηλαδή η θερμοκρασία που οξειδώνεται η Tyr_z δείχνει τον τρόπο με τον οποίο αποσπάται το πρωτόνιο κατά τη συγκεκριμένη μετάβαση, στα δείγματα με μεθανόλη θα πρέπει να λειτουργεί το μονοπάτι του Asp 61 κατά την $S_2 \rightarrow S_3$. Με μεθανόλη δημιουργείται η $S_2\text{Tyr}_z'$ στους 10 K σε μια μειονότητα κέντρων, δηλαδή η μεθανόλη βοηθά να χαλαρώσει το θετικό φορτίο της S_2 , το οποίο εμποδίζει την οξείδωση της Tyr_z' σε αυτά τα κέντρα. Δεν παρατηρείται όμως σταδιακή αύξηση της έντασης αυτού του σήματος όπως στην $S_2\text{Tyr}_z'$ χωρίς μεθανόλη, αλλά απότομη αύξηση της έντασης του σήματος στους 233 K, θερμοκρασία που μπορούν να γίνουν δραστικές αλλαγές στην πρωτεΐνη ή αλλαγές στο περιβάλλον του Mn_4CaO_5 .

Με μεθανόλη παρατηρούνται περισσότερες απώλειες (κέντρα που δεν προχωρούν) στις ταλαντώσεις (Noring et al. 2008). Για να γίνουν καλές ταλαντώσεις απαιτείται ψηλότερη θερμοκρασία σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα· η μεθανόλη με κάποιο τρόπο δυσκολεύει τις μεταβάσεις. Με μεθανόλη τα σήματα EPR της $S_0\text{Tyr}_z'$ (Su et al. 2006) και $S_2\text{Tyr}_z'$ (Ioannidis et al. 2006) είναι φαρδύτερα από ό,τι στα φυσιολογικά δείγματα, επομένως είναι ισχυρότερη η μαγνητική αλληλεπίδραση Tyr_z' και Mn_4CaO_5 . Ακόμη, αίρεται η ανομοιογένεια της S_2 ($g = 2$ και $g = 4.1$ με $S = 1/2$ και $S = 5/2$, αντίστοιχα) και όλα τα κέντρα αποκτούν $S = 1/2$ παρουσία μεθανόλης (Deak et al. 1999). Ακόμη, δεν παρατηρείται ευαισθησία στο υπέρυθρο (Ioannidis & Petrouleas 2000).

Δεν είναι γνωστό πού προσδένεται η μεθανόλη και με ποιο τρόπο επηρεάζει το σύμπλοκο. Είναι όμως ανάλογο του H_2O (εικόνα 4.1) και είναι πιθανό να

προσδένεται σε θέση νερού υποστρώματος. Με ESEEM (Electron Spin Echo Envelope Modulation) και σημασμένη με ^2H μεθανόλη έχει φανεί ότι η μεθανόλη προσδένεται στο Mn_4CaO_5 ή πολύ κοντά του (Force et al. 1998). Ακόμη, έχει προταθεί ότι η μεθανόλη προσδένεται σε Mn^{III} (Ahrling et al. 2004, 2006) και πιθανόν έτσι εξηγείται η έλλειψη ευαισθησίας στο υπέρυθρο (Ioannidis et al. 2006). Οι πιθανότερες θέσεις πρόσδεσης της μεθανόλης είναι το Mn1 και το Mn4 (Sjöholm et al. 2013, Su et al. 2011). Ίσως η μεθανόλη προσδένεται και στις δύο θέσεις με διαφορετική συγγένεια στην καθεμία (Sjöholm et al. 2013). Σύμφωνα με μια πιο πρόσφατη εργασία η μεθανόλη δεν προσδένεται απευθείας σε ιόν Mn αλλά στη θέση του W3 που είναι υποκαταστάτης του Ca^{II} ή στη θέση νερών που συνδέονται με δεσμό H με τα O1 και O4, που φαίνονται στην εικόνα 4.2 (Oyala et al. 2014).



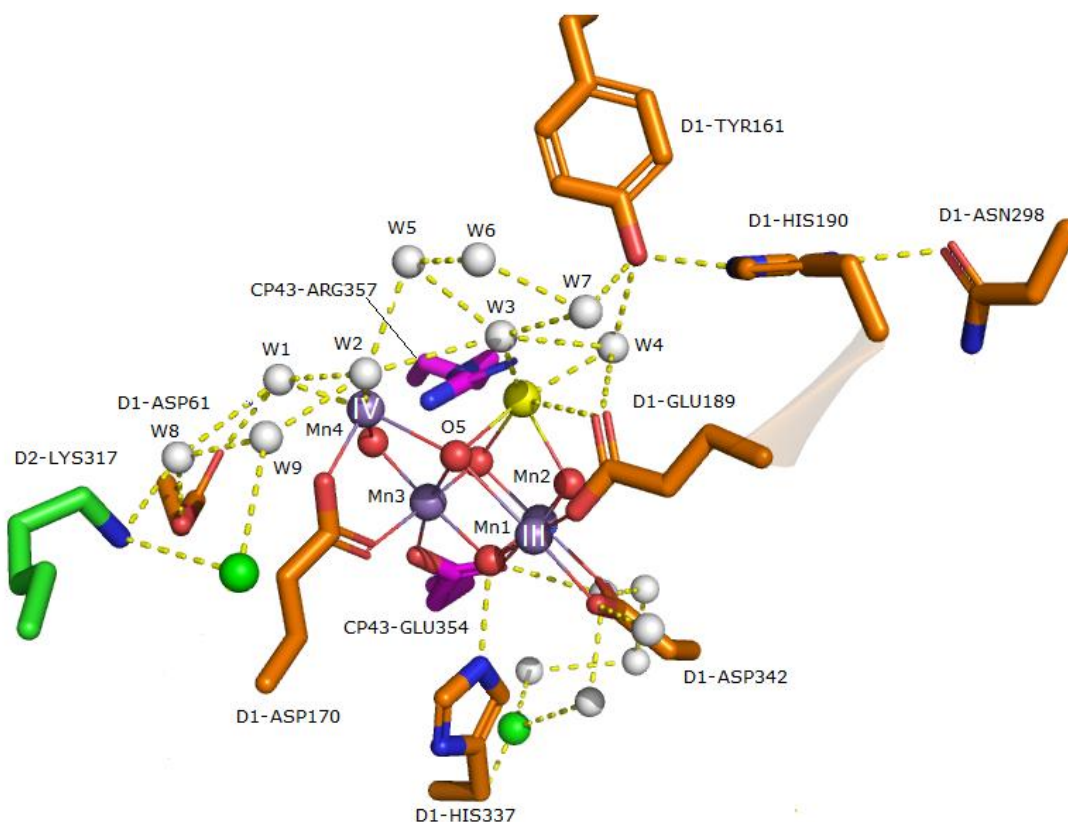
Εικόνα 4.1: το μόριο του νερού και της μεθανόλης

Εάν η μεθανόλη προσδένεται στο Mn1 εκτοπίζει το D1 – Glu 189 και έτσι το θετικό φορτίο του Mn_4CaO_5 δεν εμποδίζει πλέον την $\text{S}_2\text{Tyr}_2'$ να οξειδωθεί (Ioannidis et al. 2006). Για να προχωρήσει στην S_3 το σύμπλοκο θα πρέπει η μεθανόλη να δώσει τη θέση της σε μόριο H_2O . Ίσως αυτός να είναι ο λόγος που δυσκολεύουν οι μεταβάσεις παρουσία μεθανόλης.

Πιθανή ερμηνεία του στενού σήματος

Η εξάρτηση του εύρους του παγιδευμένου σήματος από το pH σημαίνει ότι στην παγιδευμένη κατάσταση $\text{S}_2\text{Tyr}_2'$ η απόσπαση του πρωτονίου βρίσκεται σε εξέλιξη ή έχει ολοκληρωθεί, σε αντίθεση με την $\text{S}_2\text{Tyr}_2'$ που δημιουργείται σε κρυογενικές θερμοκρασίες, η οποία δεν επηρεάζεται καθόλου από το pH. Πιθανόν

το διαφορετικό εύρος υποδηλώνει τη διαφορετική απόσταση στην οποία βρίσκεται το πρωτόνιο της Tyr_z ή του Mn₄CaO₅ κατά τη στιγμή του παγώματος του δείγματος, σε διαφορετικές τιμές pH.



Εικόνα 4.2: Το Mn₄CaO₅ και η Tyr_z, τα ιόντα Mn είναι σχεδιασμένα με μωβ σφαίρες, το ιόν Ca^{II} με κίτρινη σφαίρα και τα συνδετικά O με κόκκινες σφαίρες, ακόμη φαίνονται τα δύο ανιόντα Cl⁻ με πράσινες σφαίρες και μόρια H₂O με λευκές σφαίρες. Δεσμοί H είναι σχεδιασμένοι με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές.

Η ένταση της στενής συνιστώσας της S₂Tyr_z' (233 K) είναι μικρή στο pH = 6.5 (και ακόμα μικρότερη στο pH = 5.5) αλλά πολύ μεγάλη στο pH = 7.5. Το μικρότερο εύρος ταυτίζεται με ασθενέστερη αλληλεπίδραση Tyr_z' και Mn₄CaO₅. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει ένα ή περισσότερα κατάλοιπα με pK ≈ 7.5 που όταν αποπρωτονιώνεται προκαλεί απομάκρυνση της Tyr_z' από το Mn₄CaO₅ ή με κάποιο τρόπο αλλάζει την μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Το κατάλοιπο αυτό επηρεάζει την αλληλεπίδραση Tyr_z' και Mn₄CaO₅ μόνο στις ψηλές θερμοκρασίες όπου γίνεται απόσπαση H⁺ και πιθανόν εμπλέκεται στην απόσπαση.

Το pK αυτό ταιριάζει με της Tyr_D , αλλά βρίσκεται σε μεγάλη απόσταση για να επηρεάζει τόσο έντονα την αλληλεπίδραση Tyr_Z και Mn_4CaO_5 .

Προοπτικές

*Ἄει ὁ Θεὸς ὁ μέγας γεωμετρεῖ,
τό κύκλου μήκος ἵνα ὀρίση διαμέτρω,
παρήγαγεν ἀριθμὸν ἀπέραντον,
καὶ ὄν, φεῦ, οὐδέποτε ὄλον θνητοὶ θὰ εὔρωσι...*

N. Χατζηδάκης

Ἡ μέθοδος παγίδευσης των ενδιαμέσων των μεταβάσεων S , που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και θα μπορούσε να επεκταθεί και στα ενδιάμεσα των κατώτερων μεταβάσεων S . Ἐχει ενδιαφέρον να μελετηθεί και η εξάρτηση του σήματος S_0Tyr_Z (233 K) από το pH σε σύγκριση με αυτή της S_2Tyr_Z .

Ἡ παγίδευση της S_3Tyr_Z αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό αποτέλεσμα, δεν είναι όμως άμεσα αξιοποιήσιμο εξαιτίας του αδύναμου σήματος που παγιδεύεται. Ἐχει ενδιαφέρον να γίνουν δοκιμές παγίδευσης του σήματος σε δείγματα όπου το Ca^{II} έχει αντικατασταθεί με Sr^{II} ή/και το Cl^- με Br^- , τα οποία επιβραδύνουν την μετάβαση $S_3 \rightarrow S_0$.

Πίνακας Ορολογίας

ξενόγλωσσος όρος	ελληνικός όρος
lumen	μικροχώρος ή αυλός
Photosystem II	Φωτοσύστημα II
Light Harvesting Complex II (LHC II)	σύμπλοκο απορρόφησης φωτός II
Oxygen evolving complex	Oxygen evolving complex
low barrier hydrogen bond	δεσμός υδρογόνου χαμηλού φράγματος
Hydrogen - abstraction model	μοντέλο απόσπασης H
proton - rocking model	μοντέλο παλινδρόμησης H ⁺
multiline	πολυγραμμικό σήμα
metalloradical signal	σήμα μετάλλου - ρίζας
split signal	διασπασμένο σήμα
Signal II	σήμα II, το φάσμα EPR της Tyr _D [•] μετρημένο σε συνθήκες μη-κορεσμού.

Συντημήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

ΦΣ II	Φωτοσύστημα II
ΣΔΝ	Σύμπλοκο διάσπασης του νερού
ΑΤΡ	Τριφωσφορική αδενοσίνη
NADPH/NADP ⁺	Νικοτιναμιδο – αδενινο – φωσφορικο – δινουκλεοτίδιο, ανηγμένη και οξειδωμένη μορφή
Tyr _z , Tyr-161	Τυροσίνη 161 της D1 υπομονάδας
P680	Ειδικό σύμπλοκο 4 χλωροφυλλών, όπου γίνεται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου
Pheo _{D1} , Pheo _{D2}	Φαιοφυτίνη της D1/D2 υπομονάδας
Q _A , Q _B	πλαστοκινόνη Α, πλαστοκινόνη Β
CP	πρωτεΐνη πλούσια σε χλωροφύλλη (chlorophyll binding protein)
MES	2-(N-μορφολινο) αιθανοσουλφονικό οξύ
HEPES	4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινο- αιθανοσουλφονικό οξύ
DCBQ	2,5-διχλωρο-ρ- βενζοκινόνη
PPBQ	φαινυλ-ρ-βενζοκινόνη

Παράρτημα α

Σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας της D1 από σπανάκι και από *T. vulcanus* με το διαδικτυακό εργαλείο ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2). Με μπλε είναι σημειωμένα τα κατάλοιπα που βρίσκονται γύρω από το Mn_4CaO_5 . Με μωβ φαίνεται το κατάλοιπο στη θέση 87, που είναι μη συντηρημένη αντικατάσταση και βρίσκεται κοντά στο Mn_4CaO_5 .

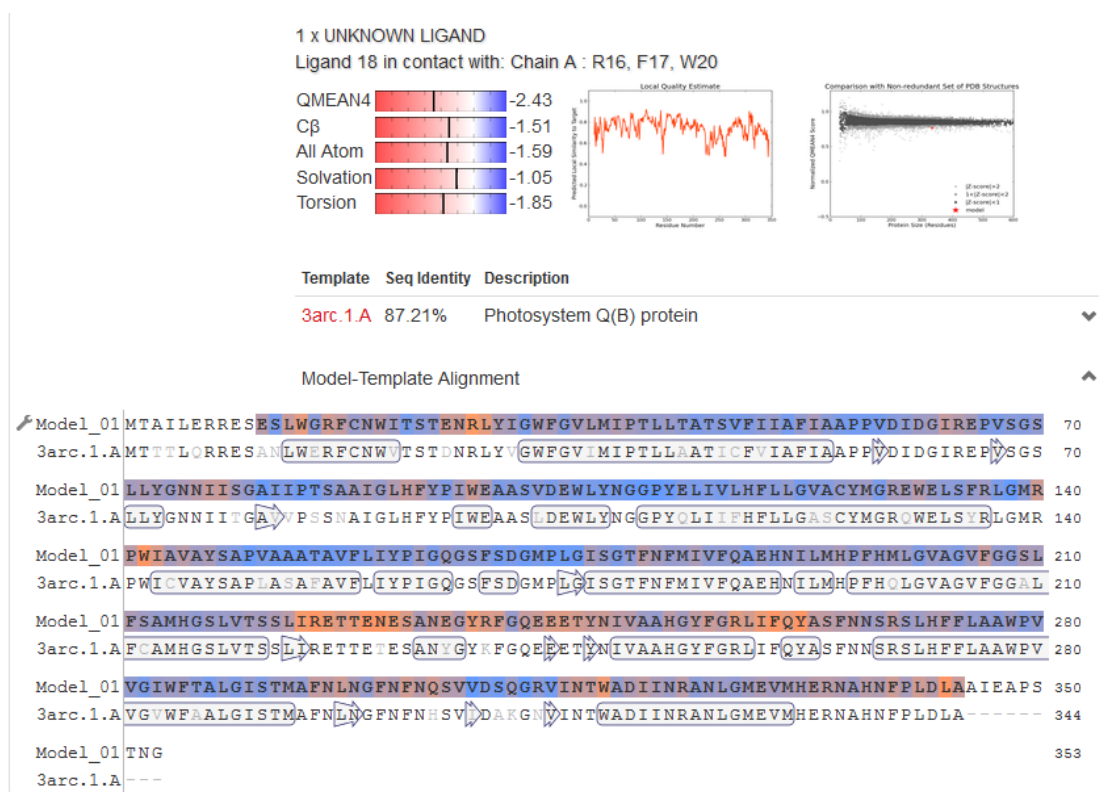
sp P51765 PSBA_THEVL	1	MTTTLQRRES	ANLWERFCNW	VTSTDNRLYV	GWFGVIMIPT	LLAATICFVI	AFIAAPPVDI
sp P69560 PSBA_SPIOL		MTAILERRES	ESLWGRFCNW	ITSTENRLYI	GWFGVLMIPT	LLTATSVFII	AFIAAPPVDI
		** : * : ** ** *	* ** ** ** *	: ** : * : ** ** *	** ** : ** ** *	** : * * * *	** ** ** ** ** *
sp P51765 PSBA_THEVL	61	DGIREPVS	LLYGNII	AVVPSNAIG	LHFYPIWEAA	SLDEWLYNGG	PYQLIIFHFL
sp P69560 PSBA_SPIOL		DGIREPVS	LLYGNII	AIIPTSAIG	LHFYPIWEAA	SVDEWLYNGG	PYELIVLHFL
		** ** ** ** ** *	** ** ** ** * :	* : * : * * ** *	** ** ** ** *	** : ** ** ** *	** : ** : * ** *
sp P51765 PSBA_THEVL	121	LGASCYMRQ	WELSYRLGMR	PWICVAYSAP	LASAFVFLI	YPIGQGSFSD	GMPLGISGTF
sp P69560 PSBA_SPIOL		LGVACYMGR	WELSFRLGMR	PWIAVAYSAP	VAAATAVFLI	YPIGQGSFSD	GMPLGISGTF
		** : * ** ** :	** ** : ** ** *	** * : ** ** *	: * : * ** ** *	** ** ** ** *	** ** ** ** *
sp P51765 PSBA_THEVL	181	NFMIVFQAEH	NILMHPFHQL	GVAGVFGGAL	FCAMHGSLVT	SSLIRETTET	ESANYGKFG
sp P69560 PSBA_SPIOL		NFMIVFQAEH	NILMHPFHML	GVAGVFGGSL	FSAMHGSLVT	SSLIRETTEN	ESANEGYRFG
		** ** ** ** * :	** ** ** * *	** ** ** * :	* : ** ** ** *	** ** ** * .	** ** * : ** *
sp P51765 PSBA_THEVL	241	QEEETYNIVA	AHGYFGRLIF	QYASFNNSRS	LHFFLAARV	VGWVFAALGI	STMAFNLN
sp P69560 PSBA_SPIOL		QEEETYNIVA	AHGYFGRLIF	QYASFNNSRS	LHFFLAAPV	VGIWFTALGI	STMAFNLN
		** ** ** ** * :	** ** ** ** *	** ** ** ** *	** ** ** * *	** : ** : ** ** *	** ** ** ** *
sp P51765 PSBA_THEVL	301	NFNHSVIDAK	GNVINTWADI	INRANLGMEV	MHERNAHNFP	LDLASAESAP	VAMIAPSING
sp P69560 PSBA_SPIOL		NFNQSVVDSQ	GRVINTWADI	INRANLGMEV	MHERNAHNFP	LDLAAIEAP	-----STNG
		** * : * : * :	* : ** ** ** *	** ** ** ** *	** ** ** ** *	** * : * :	* * *
sp P51765 PSBA_THEVL		<i>T. vulcanus</i>					
sp P69560 PSBA_SPIOL		σπανάκι					

- * all residues or nucleotides in that column are identical
- : conserved substitutions have been observed
- . semi-conserved substitutions have been observed
- no match.

Παράρτημα β

Κατασκευή μοντέλου της D1 των φυτών με πρότυπο την D1 του *T.vulcanus* (κωδικός PDB: 3arc) με το διαδικτυακό εργαλείο: swissmodel.expasy.org

Στην επάνω σειρά φαίνεται η αλληλουχία του μοντέλου, ενώ στην κάτω σειρά η ακολουθία στα κυανοβακτήρια, για τα οποία είναι γνωστή η δομή. Η περιοχή γύρω από το Mn_4CaO_5 στο κατασκευασμένο μοντέλο σε σχέση με τη γνωστή δομή φαίνεται στην *εικόνα 3.30*.



Αναφορές

Είναι παιδιά πολλών ανθρώπων τα λόγια μας.

Γιώργος Σεφέρης, Τρία κρυφά ποιήματα.

1. ER series EPR spectrometer user's manual, IBM Instruments (1982).
2. Α. Βασιλικού - Ντόβα (2001) Σημειώσεις του μεταπτυχιακού μαθήματος: Φασματοσκοπικές μέθοδοι στη φυσική στερεάς κατάστασης, Τμήμα Φυσικής, ΕΚΠΑ.
3. Β. Γαλάτης, Χ. Κατσαρός, Π. Αποστολάκος (1998) Εισαγωγή στη Βοτανική, εκδόσεις Σταμούλη.
4. Δ. Γανωτάκης, Κ. Κοτζαμπάσης (2003) Κεφάλαιο 5: "Φωτοσύνθεση Ι: Μετατροπή της ηλιακής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια", Φυσιολογία Φυτών, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
5. Γ. Ζαχαρίου (2008) Αλληλεπιδράσεις σπιν - σπιν μεταλλικών κέντρων – ελευθέρων ριζών σε βιοανόργανα συστήματα. Μελέτη της φωτοσυνθετικής διάσπασης του νερού, διδακτορική διατριβή, Τμήμα Φυσικής, ΕΚΠΑ.
6. Σ. Χαμόδρακας (1993) Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής, εκδόσεις Συμμετρία, Κεφάλαιο 2.4: Μέθοδοι μαγνητικού συντονισμού.
7. Μ. Χρυσίνα (2009) Μελέτη της φωτοσυνθετικής διάσπασης του νερού με φασματοσκοπία EPR, πτυχιακή εργασία, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.
8. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter (2002) Molecular Biology of the Cell, 4th edition, Garland Science, New York.
9. R. Ahlbrink, M. Haumann, D. Cherepanov, O. Bogershausen, A. Mulkidjanian, W. Junge (1998) Function of Tyrosine Z in water oxidation by Photosystem II: electrostatical promotor instead of Hydrogen abstractor, Biochemistry 37, 1131 – 1142.

10. K. Ahrling, M. Evans, J. Nugent, R. Pace (2004) The two forms of the S₂ state multiline signal in Photosystem II: effect of methanol and ethanol, *Biochimica et Biophysica Acta* 1656, 66 – 77.
11. K. Ahrling, M. Evans, J. Nugent, R. Ball, R. Pace (2006) ESEEM studies of substrate water and small alcohol binding to the oxygen - evolving complex of Photosystem II during functional turnover, *Biochemistry* 45, 7069 – 7082.
12. H. Amerongen, R. Croce (2013) Light harvesting in photosystem II, *Photosynthesis Research* 116, 251 – 263.
13. W. Ames, D. Pantazis, V. Krewald, N. Cox, J. Messinger, W. Lubitz, F. Neese (2011) Theoretical evaluation of structural models of the S₂ state in the Oxygen evolving complex of Photosystem II: protonation states and magnetic interactions, *Journal of American Chemical Society* 133, 19743 – 19757.
14. F. Armstrong (2008) Why did Nature choose manganese to make oxygen? , *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 1263 – 1270.
15. D. Arnon (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiology* 14, 1 – 15.
16. M. Asada, H. Nagashima, F. Koua, J. Shen, A. Kawamori , H. Mino (2013) Electronic structure of S₂ state of the oxygen - evolving complex of photosystem II studied by PELDOR, *Biochimica et Biophysica Acta* 1827, 438 – 445.
17. G. Babcock, R. Blankenship, K. Sauer (1976) Reaction kinetics for positive charge accumulation on the water side of chloroplast Photosystem II, *FEBS Letters* 61, 286 – 289.
18. M. Balsera, J. Arellano, J. Revuelta, J. de las Rivas, J. Hermoso (2005) The 1.49 Å resolution crystal structure of PsbQ from Photosystem II of *Spinacia oleracea* reveals a PPII structure in the N - terminal region, *Journal of Molecular Biology* 350, 1051 – 1060.

19. H. Bao, D. Preston, R. Burnap (2013) Proton transport facilitating water-oxidation: the role of second sphere ligands surrounding the catalytic metal cluster, *Photosynthesis Research* 116, 215 – 229.
20. J. Barber, J. de las Rivas (1993) A functional model for the role of cytochrome *b*₅₅₉ in the protection against donor and acceptor side photoinhibition, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 10942 – 10946.
21. J. Barber, P. Tran (2013) From natural to artificial photosynthesis, *Journal of the Royal Society Interface* 10, 1 – 16.
22. B. Barry, G. Babcock (1987) Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen - evolving system, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 7099 – 7103.
23. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Βιοχημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2004.
24. J. Bernarding, H. Eckert, H. Eichler, A. Napiwotzki, G. Renger (1994) Kinetic studies on the stabilization of the primary radical pair P680⁺ Pheo⁻ in different Photosystem II preparations from higher plants, *Photochemistry and Photobiology* 59, 566 – 573.
25. G. Bernat, F. Morvaridi, Y. Feyziyev, S. Styring (2002) pH dependence of the four individual transitions in the catalytic S - cycle during photosynthetic oxygen evolution, *Biochemistry* 41, 5830 – 5843.
26. Berthhold, D. A., Babcock, G. T., Yocum, C. F. (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylacoid membranes: EPR and electron transport properties, *FEBS Letters* 134, 231 – 234.
27. T. Betley, Q. Wu, T. Voorhis, D. Nocera (2008) Electronic design criteria for O-O bond formation via metal - oxo complexes, *Inorganic Chemistry* 47, 1849 – 1861.
28. J. Biesiadka, B. Loll, J. Kern, K. Irrgang, A. Zouni (2004) Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3,2 Å resolution: a closer look at the Mn-cluster, *Biochimica et Biophysica Acta* 6, 4733 – 4736.

29. M. Blomberg, P. Siegbahn, S. Styring, G. Babcock, B. Åkermark, P. Korall (1997) A quantum chemical study of hydrogen abstraction from manganese - coordinated water by a tyrosyl radical: a model for water oxidation in Photosystem II, *Journal of American Chemical Society* 119, 8285 – 8292.
30. R. Boerner, A. Nguyen, B. Barry, R. Debus (1992) Evidence from directed mutagenesis that aspartate 170 of the D1 polypeptide influences the assembly and/or stability of the manganese cluster in the Photosynthetic water-splitting complex, *Biochemistry* 31, 6660 – 6672.
31. A. Bondar, H. Dau (2012) Extended protein/water H-bond networks in photosynthetic water oxidation, *Biochimica et Biophysica Acta* 1817, 1177 – 1190.
32. A. Boussac, W. Rutherford (1988) Nature of the inhibition of the oxygen-evolving enzyme of Photosystem II induced by NaCl washing and reversed by the addition of Ca^{2+} or Sr^{2+} , *Biochemistry* 27, 3476 – 3483.
33. A. Boussac, J. Zimmermann, W. Rutherford (1989) EPR signals from modified charge accumulation states of the oxygen evolving enzyme in Ca^{2+} -deficient Photosystem II, *Biochemistry* 28, 8984 – 8989.
34. A. Boussac, P. Sift, W. Rutherford (1992) Inhibition of Tyrosine Z photooxidation after formation of the S_3 state in Ca^{2+} - depleted and Cl^- - depleted Photosystem II, *Biochemistry* 31, 1224 – 1234.
35. A. Boussac, J. Girerd, A. W. Rutherford (1996) Conversion of the spin state of the manganese complex in photosystem II induced by near-infrared light, *Biochemistry* 35, 6984 – 6989.
36. A. Boussac, M. Sugiura, W. Rutherford, P. Dorlet (2009) Complete EPR spectrum of the S_3 -state of the oxygen-evolving Photosystem II, *Journal of American Chemical Society* 131, 5050 – 5051.
37. R. D. Britt (1996) Oxygen evolution. In *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (ed. D. R. Ort & C. F. Yocum), 137 – 164. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

38. C. Buser, B. Diner, G. Brudvig (1992) Photooxidation of cytochrome b_{559} in oxygen-evolving Photosystem II, *Biochemistry* 31, 11449 – 11459.
39. J. Casey, K. Sauer (1984) EPR detection of a cryogenically photogenerated intermediate in photosynthetic oxygen evolution, *Biochimica et Biophysica Acta* 767, 21 – 28.
40. M. Charlot, A. Boussac, G. Blondin (2005) Towards a spin coupling model for the Mn_4 cluster in Photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1708, 120 – 132.
41. G. Christen, G. Renger (1999) The role of Hydrogen bonds for the multiphasic $P680^{+}$ reduction by Y_z in Photosystem II with intact oxygen evolution capacity. Analysis of kinetic H/D isotope exchange effects, *Biochemistry* 38, 2068 – 2077.
42. G. Christen, A. Seeliger, G. Renger (1999) $P680^{+}$ reduction kinetics and redox transition probability of the water oxidizing complex as a function of pH and H/D isotope exchange in spinach thylakoids, *Biochemistry* 38, 6082 – 6092.
43. M. Chrysina, G. Zahariou, N. Ioannidis, V. Petrouleas (2010) Conversion of the $g = 4.1$ EPR signal to the multiline conformation during the S_2 to S_3 transition of the oxygen evolving complex of Photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 487 – 493.
44. M. Chrysina, G. Zahariou, Y. Sanakis, N. Ioannidis, V. Petrouleas (2011) Conformational changes of the S_2Y_z' intermediate of the S_2 to S_3 transition in photosystem II, *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 104, 72 – 79.
45. H. Chu, A. Nguyen, R. Debus (a) (1995) Amino acid residues that influence the binding of manganese or calcium to Photosystem II. 1. The luminal interhelical domains of the D1 polypeptide, *Biochemistry* 34, 5839 – 5858.
46. H. Chu, A. Nguyen, R. Debus (b) (1995) Amino acid residues that influence the binding of manganese or calcium to Photosystem II. 2. The carboxy-terminal domain of the D1 polypeptide, *Biochemistry* 34, 5859 – 5882.
47. H. Chu, W. Hillier, R. Debus (2004) Evidence that the C-terminus of the D1 polypeptide of Photosystem II is ligated to the manganese ion that undergoes

- oxidation during the S_1 to S_2 transition: An isotope - edited FTIR study, *Biochemistry* 43, 3152 – 3166.
48. B. Commoner, J. Heise, J. Townsend (1956) Light – induced paramagnetism in chloroplasts, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 42, 710 – 718.
 49. N. Cox, J. Messinger (2013) Reflections on substrate water and dioxygen formation, *Biochimica et Biophysica Acta* 1827, 1020 – 1030.
 50. N. Cox, M. Retegan, F. Neese, D. Pantazis, A. Boussac, W. Lubitz (2014) Electronic structure of the oxygen evolving complex in photosystem II prior to O-O bond formation, *Science* 345, 804 – 808.
 51. J. Dasgupta, G. Ananyev, C. Dismukes (2008) Photoassembly of the water-oxidizing complex in Photosystem II, *Coordination Chemistry Reviews* 252, 347 – 360.
 52. H. Dau, M. Haumann (2007) Eight steps preceding O - O bond formation in oxygenic photosynthesis - A basic reaction cycle of the Photosystem II manganese complex, *Biochimica et Biophysica Acta* 1767, 472 – 483.
 53. H. Dau, M. Haumann (2007) (β) Time-resolved X-ray spectroscopy leads to an extension of the classical S - state cycle model of photosynthetic oxygen evolution, *Photosynthesis Research* 92, 327 – 343.
 54. Z. Deak, S. Peterson, P. Geijer, K. Ahrling, S. Styring (1999) Methanol modification of the electron paramagnetic resonance signals from the S_0 and S_2 states of the water-oxidizing complex of Photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1412, 240 – 249.
 55. R. Debus, B. Barry, G. Babcock, L. McIntosh (1988) Site - directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen - evolving system, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 427 – 430.
 56. R. Debus (2008) Protein ligation of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Coordination Chemistry Reviews* 252, 244 – 258.

57. J. Dekker, J. Plijter, L. Ouwehand, H. van Gorkom (1984) Kinetics of Manganese redox transitions in the oxygen-evolving apparatus of Photosynthesis, *Biochimica et Biophysica Acta* 767, 176 – 179.
58. P. Dilbeck, H. Hwang, I. Zaharieva, L. Gerencser, Holger Dau, R. Burnap (2012) The D1-D61N mutation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 allows the observation of pH-sensitive intermediates in the formation and release of O₂ from Photosystem II, *Biochemistry* 51, 1079 – 1091.
59. P. Dilbeck, H. Bao, C. Neveu, R. Burnap (2013) Perturbing the water cavity surrounding the manganese cluster by mutating the residue D1 - Valine 185 has a strong effect on the water oxidation mechanism of Photosystem II, *Biochemistry* 52, 6824 – 6833.
60. B. Diner, P. Nixon (1992) The rate of reduction of oxidized redox-active tyrosine, Z⁺, by exogenous Mn²⁺ is slowed in a site - directed mutant, at aspartate 170 of polypeptide D1 of Photosystem II, inactive for photosynthetic oxygen evolution, *Biochimica et Biophysica Acta* 1101, 134 – 138.
61. C. Dismukes, Y. Siderer (1981) Intermediates of a polynuclear manganese center involved in photosynthetic oxidation of water, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78, 274 – 278.
62. H. Eckert, G. Renger (1988) Temperature dependence of P680⁺ reduction in O₂-evolving PS II membrane fragments at different redox states S_i of the water oxidizing system, *FEBS Letters* 236, 425 – 431.
63. M. Engstrom, F. Himo, A. Graslund, B. Minaev, O. Vahtras, H. Agren (2000) Hydrogen bonding to Tyrosyl radical analyzed by Ab initio g - tensor calculations, *Journal of Physical Chemistry A* 104, 5149 – 5153.
64. M. Evans, R. Ball, J. Nugent (2005) Ammonia displaces methanol bound to the water oxidizing complex of photosystem II in the S₂ state, *FEBS Letters* 579, 3081 – 3084.

65. D. Force, D. Randall, G. Lorigan, K. Clemens, D. Britt (1998) ESEEM studies of alcohol binding to the manganese cluster of the oxygen evolving complex of Photosystem II, *Journal of American Chemical Society* 120, 13321 – 13333.
66. A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni, W. Saenger (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9 - Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nature Structural and Molecular Biology* 16, 334 – 342.
67. B. Hallahan , J. Nugent , J. Warden , M. Evans (1992) Investigation of the origin of the "S₃" EPR signal from the oxygen - evolving complex of photosystem 2: the role of tyrosine Z, *Biochemistry* 31, 4562 – 4573.
68. K. Hasegawa, T. Ono, Y. Inoue, M. Kusunoki (1999) Spin - exchange interactions in the S - state manganese tetramer in photosynthetic oxygen - evolving complex deduced from $g = 2$ multiline EPR signal, *Chemical Physics Letters* 300, 9 – 19.
69. M. Haumann, W. Junge (1999) Evidence for impaired hydrogen - bonding of tyrosine Y_Z in calcium - depleted Photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1411, 121 – 133.
70. A. J. Hoff (1987) Electron paramagnetic resonance in photosynthesis, *Photosynthesis*, 97 – 123, Elsevier Science Publishers.
71. A. R. Holzwarth, M. G. Muller, M. Reus, M. Nowaczyk, J. Sander, M. Rogner (2006) Kinetics and mechanism of electron transfer in intact photosystem II and in the isolated reaction center: Pheophytin is the primary electron acceptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 6895 – 6900.
72. M. Hundelt, A. Hays, R. Debus, W. Junge (1998) Oxygenic Photosystem II: The mutation D1 - D61N in *Synechocystis* sp. PCC 6803 retards S - state transitions without affecting electron transfer from Y_Z to P680, *Biochemistry* 37, 14450 – 14456.

73. P. Faller, R. Debus, K. Brettel, M. Sugiura, W. Rutherford, A. Boussac (2001) Rapid formation of the stable tyrosyl radical in photosystem II, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 14368 – 14373.
74. P. Faller, W. Rutherford, R. Debus (2002) Tyrosine D oxidation at cryogenic temperature in Photosystem II, *Biochemistry* 41, 12914 – 12920.
75. P. Faller, C. Goussias, W. Rutherford, S. Un (2003) Resolving intermediates in biological proton - coupled electron transfer: A tyrosyl radical prior to proton movement, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 8732 – 8735.
76. K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, S. Iwata (2004) Architecture of the photosynthetic oxygenevolving center, *Science* 303, 1831 – 1838.
77. D. A. Force, D. Randall, G. Lorigan, K. Clemens, D. Britt (1998) ESEEM studies of alcohol binding to the manganese cluster of the oxygen evolving complex of Photosystem II, *Journal of American Chemical Society* 120, 13321 – 13333.
78. R. C. Ford, M. C. W. Evans (1983) Isolation of a photosystem 2 preparation from higher plants with highly enriched oxygen evolution activity, *FEBS Letters* 160, 159 – 164.
79. A. Fufezan, C. Zhang, A. Krieger - Liskay, W. Rutherford (2005) Secondary quinone in Photosystem II of *Thermosynechococcus elongatus*: semiquinone-iron EPR signals and temperature dependence of electron transfer, *Biochemistry* 44, 12780 – 12789.
80. A. Gabdulkhakov, A. Guskov, M. Broser, J. Kern, F. Muh, W. Saenger, A. Zouni (2009) Probing the accessibility of the Mn₄Ca cluster in Photosystem II: channels calculation, noble gas derivatization, and cocrystallization with DMSO, *Structure* 17, 1223 – 1234.
81. A. Galstyan, A. Robertazzi, E. Knapp (2012) Oxygen - evolving Mn cluster in Photosystem II: The protonation pattern and oxidation state in the high-resolution crystal structure *Journal of American Chemical Society* 134, 7442 – 7449.

82. A. Garbers, F. Reifarth, J. Kurreck, G. Renger, F. Parak (1998) Correlation between protein flexibility and electron transfer from Q_A^- to Q_B in PSII membrane fragments from spinach, *Biochemistry* 37, 11399 – 11404.
83. P. Geijer, Z. Deak, S. Styring (2000) Proton equilibria in the manganese cluster of Photosystem II control the intensities of the S_0 and S_2 state $g \approx 2$ electron paramagnetic resonance signals, *Biochemistry* 39, 6763 – 6772.
84. L. Gilchrist, J. Ball, D. Randall, D. Britt (1995) Proximity of the manganese cluster of photosystem II to the redox - active tyrosine Y_Z , *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 9545 – 9549.
85. P. Glatzel, H. Schroeder, Y. Pushkar, T. Boron, S. Mukherjee, G. Christou, V. Pecoraro, J. Messinger, V. Yachandra, U. Bergmann, J. Yano (2013) Electronic structural changes of Mn in the oxygen - evolving complex of Photosystem II during the catalytic cycle, *Inorganic Chemistry* 52, 5642 – 5644.
86. A. Glöckner, J. Kern, M. Broser, A. Zouni, V. Yachandra, J. Yano (2013) Structural changes of the oxygen evolving complex in Photosystem II during the catalytic cycle, *Journal of Biological Chemistry* 288, 22607 – 22620.
87. C. Goussias, A. Boussac, W. Rutherford (2002) Photosystem II and photosynthetic oxidation of water: an overview, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357, 1369 – 1381.
88. M. Groot, N. Pawlowicz, L. van Wilderen, J. Breton, I. van Stokkum, R. van Grondelle (2005) Initial electron donor and acceptor in isolated Photosystem II reaction centers identified with femtosecond mid-IR spectroscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 13087 – 13092.
89. A. Haddy, K. Lakshmi, G. Brudvig, H. Frank (2004) Q-band EPR of the S_2 state of Photosystem II confirms an $S = 5/2$ origin of the X-band $g = 4.1$ signal, *Biophysical Journal* 87, 2885 – 2896.
90. A. Haddy (2007) EPR spectroscopy of the manganese cluster of photosystem II, *Photosynthesis Research* 92, 357 – 368.

91. W. R. Hagen (2009) Biomolecular EPR spectroscopy, CRC Press.
92. G. Han, F. Ho, K. Havelius, S. Morvaridi, F. Mamedov, S. Styring (2008) Direct quantification of the four individual S states in Photosystem II using EPR spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta* 1777, 496 – 503.
93. B. Hankamer, E. Morris, J. Nield, C. Gerle, J. Barber, Three - dimensional structure of the Photosystem II core dimer of higher plants determined by electron microscopy (2001) *Journal of Structural Biology* 135, 262 – 269.
94. K. Hasegawa, M. Kusunoki, Y. Inoue, T. Ono (1998) Simulation of S₂ - state multiline EPR signal in oriented Photosystem II membranes: structural implications for the manganese cluster in an oxygen - evolving complex, *Biochemistry* 1998, 37, 9457 – 9465.
95. M. Haumann, W. Junge (1999) Photosynthetic water oxidation: a simplex-scheme of its partial reactions, *Biochimica et Biophysica Acta* 141, 86 – 91.
96. M. Haumann, P. Liebisch, C. Muller, M. Barra, M. Grabolle, H. Dau (2005) Photosynthetic O₂ formation tracked by time - resolved X - ray experiments, *Science* 310, 1019 – 1021.
97. M. Haumann, C. Muller, P. Liebisch, L. Iuzzolino, J. Dittmer, M. Grabolle, T. Neisius, W. Meyer-Klaucke, H. Dau (2005) Structural and oxidation state changes of the Photosystem II manganese complex in four transitions of the water oxidation cycle (S₀ → S₁, S₁ → S₂, S₂ → S₃, and S_{3,4} → S₀) characterized by X - ray absorption spectroscopy at 20 K and room temperature, *Biochemistry* 44, 1894 – 1908.
98. R. Hienerwadel, B. Diner, C. Berthomieu (2008) Molecular origin of the pH dependence of tyrosine D oxidation kinetics and radical stability in photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1777, 525 – 531.
99. W. Hillier, J. Messinger, T. Wydrzynski (1998) Kinetic determination of the fast exchanging substrate water molecule in the S₃ state of Photosystem II, *Biochemistry* 37, 16908 – 16914.

- 100.F. Ho, S. Styring (2008) Access channels and methanol binding site to the CaMn₄ cluster in Photosystem II based on solvent accessibility simulations, with implications for substrate water access, *Biochimica et Biophysica Acta* 1777, 140 – 153.
- 101.W. Hofbauer, A. Zouni, R. Bittl, J. Kern, P. Orth, F. Lendzian, P. Fromme, H. T. Witt, W. Lubitz (2001) Photosystem II single crystals studied by EPR spectroscopy at 94 GHz: The tyrosine radical Y_D[•], *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 6623 – 6628.
- 102.C. Hoganson, G. Babcock (1997) A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in Photosynthesis, *Science* 277, 1953 – 1956.
- 103.C. Hoganson, N. Lydakis-Simantiris, X. Tang, C. Tommos, K. Warncke, G. Babcock, B. Diner, J. McCracken, S. Styring (1995) A hydrogen - atom abstraction model for the function of Y_Z in photosynthetic oxygen evolution, *Photosynthesis Research* 46, 177 – 184.
- 104.A. R. Holzwarth, M. G. Muller, M. Reus, M. Nowaczyk, J. Sander, M. Rogner (2006) Kinetics and mechanism of electron transfer in intact photosystem II and in the isolated reaction center: Pheophytin is the primary electron acceptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 6895 – 6900.
- 105.O. Horner, E. Riviere, G. Blondin, S. Un, A. W. Rutherford, J. Girerd, A. Boussac (1998) SQUID magnetization study of the infrared - induced spin transition in the S₂ state of Photosystem II: spin value associated with the *g* = 4.1 EPR signal, *Journal of American Chemical Society* 120, 7924 – 7928.
- 106.K. Ifuku, K. Ido, F. Sato (2011) Molecular functions of PsbP and PsbQ proteins in the photosystem II supercomplex, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104, 158 – 164.
- 107.K. Ifuku, T. Nakatsu, H. Kato, F. Sato (2004) Crystal structure of the PsbP protein of photosystem II from *Nicotiana tabacum*, *EMBO reports* 5, 362 – 367.
- 108.N. Ioannidis, V. Petrouleas (2000) Electron paramagnetic resonance signals from the S₃ state of the oxygen - evolving complex. A broadened radical signal

- induced by low - temperature near - infrared light illumination, *Biochemistry* 39, 5246 – 5254.
- 109.N. Ioannidis, J. H. A. Nugent, V. Petrouleas (2002) Intermediates of the S_3 state of the oxygen - evolving complex of Photosystem II, *Biochemistry* 41, 9589 – 9600.
- 110.N. Ioannidis, G. Zahariou, V. Petrouleas (2006) Trapping of the S_2 to S_3 state intermediate of the oxygen-evolving complex of Photosystem II, *Biochemistry* 45, 6252 – 6269.
- 111.N. Ioannidis, G. Zahariou, V. Petrouleas (2008) The EPR spectrum of Tyrosine Z^{\bullet} and its decay kinetics in O_2 - evolving Photosystem II preparations, *Biochemistry* 47, 6292 – 6300.
- 112.L. Iuzzolino, J. Dittmer, W. Dörner, W. Meyer-Klaucke, H. Dau (1998) X - ray absorption spectroscopy on layered Photosystem II membrane particles suggests manganese - centered oxidation of the oxygen - evolving complex for the S_0 - S_1 , S_1 - S_2 , and S_2 - S_3 transitions of the water oxidation cycle, *Biochemistry* 37, 17112 – 17119.
- 113.P. Joliot, A. Joliot, B. Bouges, G. Barbieri (1971) Studies of system II photocenters by comparative measurements of luminescence, fluorescence, and oxygen emission, *Photochemistry and Photobiology* 14, 287 – 305.
- 114.W. Junge, M. Haumann, R. Ahlbrink, A. Mulkidjanian, J. Clausen (2002) Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357, 1407 – 1418.
- 115.P. Jursinic, A. Stemler (1983) Changes in [^{14}C]atrazine binding associated with the oxidation-reduction state of the secondary quinone acceptor of Photosystem II, *Plant Physiology* 73, 703 – 708.
- 116.J. Kanady, J. Mendoza-Cortes, E. Tsui, R. Nielsen, W. Goddard, T. Agapie (2012) Oxygen atom transfer and oxidative water incorporation in cuboidal Mn_3MO_n

- complexes based on synthetic, isotopic labeling, and computational studies, *Journal of American Chemical Society* 135, 1073 – 1082.
- 117.S. Kim, J. Liang, B. Barry (1997) Chemical complementation identifies a proton acceptor for redox-active tyrosine D in photosystem II, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 14406 – 14411.
- 118.Y. Kimura, N. Mizusawa, A. Ishii, S. Nakazawa, T. Ono (2005) Changes in structural and functional properties of oxygen-evolving complex induced by replacement of D1-Glutamate 189 with glutamine in Photosystem II, *The Journal of Biological Chemistry* 280, 37895 – 37900.
- 119.A. Klauss, M. Haumann, H. Dau (2012) Alternating electron and proton transfer steps in photosynthetic water oxidation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 16035 – 16040.
- 120.A. Klauss, T. Sikora, B. Süß, H. Dau (2012 β) Fast structural changes (200–900 ns) may prepare the photosynthetic manganese complex for oxidation by the adjacent tyrosine radical, *Biochimica et Biophysica Acta* 1817, 1196 – 1207.
- 121.N. Knoepfle, T. Bricker, C. Evans (1999) Site-directed mutagenesis of basic Arginine residues 305 and 342 in the CP 43 protein of Photosystem II affects oxygen-evolving activity in *Synechocystis* 6803, *Biochemistry* 38, 1582 – 1588.
- 122.B. Kok, B. Forbush, M. McGloin (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution – I. A linear four step mechanism, *Photochemistry and Photobiology* 11, 457 – 475.
- 123.D. Kolling, N. Cox, G. Ananyev, R. Pace, C. Dismukes (2012) What are the oxidation states of manganese required to catalyze photosynthetic water oxidation?, *Biophysical Journal* 103, 313 – 322.
- 124.V. Krewald, M. Retegan, N. Cox, J. Messinger, W. Lubitz, S. DeBeer, F. Neese, D. Pantazis (2015) Metal oxidation states in biological water splitting, *Chemical Science* 6, 1676 – 1695.

125. Krieger, W. Rutherford, G. Johnson (1995) On the determination of redox midpoint potential of the primary quinone electron acceptor, Q_A , in Photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1229, 193 – 201.
126. Krieger-Liszkay, C. Fufezan, A. Trebst (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism, *Photosynthesis Research* 98, 551 – 564.
127. L. Kulik, W. Lubitz, J. Messinger (2005) Electron spin-lattice relaxation of the S_0 state of the oxygen - evolving complex in Photosystem II and of dinuclear manganese model complexes, *Biochemistry* 44, 9368 – 9374.
128. L. Kulik, B. Epel, W. Lubitz, J. Messinger (2007) Electronic structure of the Mn_4O_xCa cluster in the S_0 and S_2 states of the oxygen-evolving complex of Photosystem II based on pulse ^{55}Mn - ENDOR and EPR spectroscopy, *Journal of American Chemical Society* 129, 13421 – 13435.
129. M. Latimer, V. DeRose, V. Yachandra, K. Sauer, M. Klein (1998) Structural effects of Calcium depletion on the manganese cluster of Photosystem II: determination by X-ray absorption spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry B* 102, 8257 – 8265.
130. J. Lavergne (1982) Mode of action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, evidence that the inhibitor competes with plastoquinone for binding to a common site on the acceptor side of Photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 682, 345 – 353.
131. P. van Leeuwen, C. Heimann, P. Gast, J. Dekker, H. van Gorkom (1993) Flash-induced redox changes in oxygen - evolving spinach Photosystem II core particles, *Photosynthesis Research* 38, 169 – 176.
132. W. Liang, M. J. Latimer, H. Dau, T. A. Roelofs, V. K. Yachandra, K. Sauer, M. P. Klein (1994) Correlation between structure and magnetic spin state of the manganese cluster in the oxygen - evolving complex of Photosystem II in the S_2 state: determination by X - ray Absorption Spectroscopy, *Biochemistry* 33, 4923 – 4932.

- 133.W. Liang, T. A. Roelofs, R. M. Cinco, A. Rompel, M. J. Latimer, W. O. Yu, K. Sauer, M. P. Klein, V. K. Yachandra (2000) Structural change of the Mn cluster during the $S_2 \rightarrow S_3$ state transition of the oxygen-evolving complex of Photosystem II. Does it reflect the onset of water/substrate oxidation? Determination by Mn X-ray absorption spectroscopy, *Journal of American Chemical Society* 122, 3399 – 3412.
- 134.K. Lindberg, L. Andreasson (1996) A one - site, two - state model for the binding of anions in Photosystem II, *Biochemistry* 35, 14259 – 14267.
- 135.T. Lohmiller, N. Cox, J. Su, J. Messinger, W. Lubitz (2012) The basic properties of the electronic structure of the oxygen - evolving complex of Photosystem II are not perturbed by Ca^{2+} removal, *The journal of biological chemistry* 287, 24721 – 24733.
- 136.Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, J. Biesiadka (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature* 438, 1040 – 1044.
- 137.S. Luber, I. Rivalta, Y. Umena, K. Kawakami, J. Shen, N. Kamiya, G. Brudvig, V. Batista (2011) S_1 - State model of the O_2 - evolving complex of Photosystem II, *Biochemistry* 50, 6308 – 6311.
- 138.F. Mamedov, R. Sayre, S. Styring (1998) Involvement of Histidine 190 on the D1 protein in electron/proton transfer reactions on the donor side of Photosystem II, *Biochemistry* 37, 14245 – 14256.
- 139.T. Matsukawa, H. Mino, D. Yoneda, A. Kawamori (1999) Dual - mode EPR study of new signals from the S_3 - state of oxygen - evolving complex in Photosystem II, *Biochemistry* 38, 4072 – 4077.
- 140.E. McDermott, V. K. Yachandra, R. D. Guiles, J. L. Cole, S. L. Dexheimer, R. D. Britt, K. Sauer, M. P. Klein (1988) Characterization of the manganese O_2 - evolving complex and the Iron - quinone acceptor complex in Photosystem II from a thermophilic cyanobacterium by electron paramagnetic resonance and X - ray absorption spectroscopy, *Biochemistry* 27, 4021 – 4031.

- 141.J. McEvoy, G. Brudvig (2004) Structure - based mechanism of photosynthetic water oxidation, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 4754 – 4763.
- 142.J. McEvoy, G. Brudvig (2006) Water splitting chemistry of photosystem II, *Chemical Reviews* 106, 4455 – 4483.
- 143.J. Messinger, J. Robblee, U. Bergmann, C. Fernandez, P. Glatzel, H. Visser, R. Cinco, K. McFarlane, E. Bellacchio, S. Pizarro, S. Cramer, K. Sauer, M. Klein, V. Yachandra (2001) Absence of Mn - centered oxidation in the $S_2 \rightarrow S_3$ transition: implications for the mechanism of Photosynthetic water oxidation, *Journal of American Chemical Society* 123, 7804 – 7820.
- 144.J. Messinger (2004) Evaluation of different mechanistic proposals for water oxidation in photosynthesis on the basis of Mn_4O_xCa structures for the catalytic site and spectroscopic data, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 4764 – 4771.
- 145.J. Metz, P. Nixon, M. Rogner, G. Brudvig, B. Diner (1989) Directed alteration of the D1 polypeptide of Photosystem II: evidence that Tyrosine - 161 is the redox component, Z, connecting the oxygen - evolving complex to the primary electron donor, P680, *Biochemistry* 28, 6960 – 6969.
- 146.T. Meyer, M. Huynh, H. Thorp (2007) The possible role of proton - coupled electron transfer (PCET) in water oxidation by Photosystem II, *Angewandte Chemie* 46, 5284 – 5304.
- 147.F. Müh, C. Glöckner, J. Hellmich, A. Zouni (2012) Light - induced quinone reduction in photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1817, 44 – 65.
- 148.C. Mullins, V. Pecoraro (2008) Reflections on small molecule manganese models that seek to mimic photosynthetic water oxidation chemistry, *Coordination Chemistry Reviews* 252, 416 – 443.
- 149.J. Murray, J. Barber (2007) Structural characteristics of channels and pathways in photosystem II including the identification of an oxygen channel, *Journal of Structural Biology* 159, 228 – 237.

- 150.L. Nedbal, G. Samson, J. Whitmarsh (1992) Redox state of a one - electron component controls the rate of photoinhibition of photosystem II, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 7929 – 7933.
- 151.N. Nelson, C. F. Yocum (2006) Structure and function of Photosystems I and II, *Annual Review of Plant Biology* 57, 521 – 565.
- 152.J. Nield, J. Barber (2006) Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants, *Biochimica et Biophysica Acta* 1757, 353 – 361.
- 153.P. Nixon, B. Diner (1992) Aspartate 170 of the Photosystem II reaction center polypeptide D1 is involved in the assembly of the oxygen - evolving manganese cluster, *Biochemistry* 31, 942 – 948.
- 154.T. Noguchi, H. Suzuki, M. Tsuno, M. Sugiura, C. Kato (2012) Time - resolved infrared detection of the proton and protein dynamics during photosynthetic oxygen evolution, *Biochemistry* 51, 3205 – 3214.
- 155.B. Noring, D. Shevela, G. Renger, J. Messinger (2008) Effects of methanol on the S_1 - state transitions in photosynthetic water - splitting, *Photosynthesis Research* 98, 251 – 260.
- 156.J. Nugent, D. Doetschman, D. Maclachlan (1992) Characterization of the multiple EPR line shapes of Iron - semiquinones in Photosystem 2, *Biochemistry* 31, 2935 – 2941.
- 157.J. Nugent, I. Muhiuddin, M. Evans (2002) Electron transfer from the water oxidizing complex at cryogenic temperatures: the S_1 to S_2 step, *Biochemistry* 41, 4117 – 4126.
- 158.T. Ono, H. Nakayama, H. Gleiter, Y. Inoue, A. Kawamori (1987) Modification of the properties of S_2 state in photosynthetic O_2 - evolving center by replacement of Chloride with other anions, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 256, 618 – 624.

- 159.P. Oyala, T. Stich, J. Stull, F. Yu, V. Pecoraro, D. Britt (2014) Pulse Electron Paramagnetic Resonance studies of the interaction of methanol with the S_2 state of the Mn_4O_5Ca cluster of Photosystem II, *Biochemistry* 53, 7914 – 7928.
- 160.C. Pagliano, G. Saracco, J. Barber (2013) Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II, *Photosynthesis Research* 116, 167 – 188.
- 161.R. Pal, C. Negre, L. Vogt, R. Pokhrel, M. Ertem, G. Brudvig, V. Batista (2013) S_0 state model of the oxygen-evolving complex of Photosystem II, *Biochemistry* 52, 7703 – 7706.
- 162.D. Pantazis, W. Ames, N. Cox, W. Lubitz, F. Neese (2012) Two interconvertible structures that explain the spectroscopic properties of the oxygen-evolving complex of Photosystem II in the S_2 state, *Angewandte Chemie* 51, 9935 – 9940.
- 163.V. Pecoraro, M. Baldwin, T. Caudle, W. Hsieh, N. Law (1998) A proposal for water oxidation in photosystem II, *Pure & Applied Chemistry* 70, 925 – 929.
- 164.J. Peloquin, K. Campbell, D. Britt (1998) ^{55}Mn Pulsed ENDOR demonstrates that the Photosystem II “split” EPR signal arises from a magnetically - coupled Manganese - Tyrosyl complex, *Journal of American Chemical Society* 120, 6840 – 6841.
- 165.J. Peloquin, D. Britt (2001) EPR/ENDOR characterization of the physical and electronic structure of the OEC Mn cluster, *Biochimica et Biophysica Acta* 1503, 96 – 111.
- 166.M. Pérez Navarro, W. Ames, H. Nilsson, T. Lohmiller, D. Pantazis, L. Rapatskiy, M. Nowaczyk, F. Neese, A. Boussac, J. Messinger, W. Lubitz, N. Cox (2013) Ammonia binding to the oxygen-evolving complex of photosystem II identifies the solvent-exchangeable oxygen bridge (μ -oxo) of the manganese tetramer, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 15561 – 15566.
- 167.V. Petrouleas, A. Crofts (2005) Chapter 8: The iron-quinone acceptor complex from Photosystem II: The light-driven water: plastoquinone oxidoreductase, 177 – 206.

- 168.V. Petrouleas, B. Diner (1987) Light-induced oxidation of the acceptor-side Fe(II) of Photosystem II by exogenous quinones acting through the Q_B binding site. I. Quinones, kinetics and pH-dependence, *Biochimica et Biophysica Acta* 893, 126 – 137.
- 169.J. Pieper, T. Hauss, A. Buchsteiner, K. Baczynski, K. Adamiak, R. Lechner, G. Renger (2007) Temperature - and hydration - dependent protein dynamics in Photosystem II of green plants studied by quasielastic neutron scattering, *Biochemistry* 46, 11398 – 11409.
- 170.R. Pokhrel, R. Service, R. Debus, G. Brudvig (2013) Mutation of Lysine 317 in the D2 subunit of Photosystem II alters chloride binding and proton transport, *Biochemistry* 52, 4758 – 4773.
- 171.R. Pokhrel, G. Brudvig (2014) Oxygen-evolving complex of photosystem II: correlating structure with spectroscopy, *PCCP* 16, 11812 – 11821.
- 172.H. Popelkova, C. Yocum (2011) PsbO, the manganese-stabilizing protein: Analysis of the structure–function relations that provide insights into its role in photosystem II, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104, 179 – 190.
- 173.Y. Pushkar, J. Yano, K. Sauer, A. Boussac, V. Yachandra (2008) Structural changes in the Mn₄Ca cluster and the mechanism of photosynthetic water splitting, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 1879 – 1884.
- 174.M. Qian, L. Dao, R. Debus, R. Burnap (1999) Impact of mutations within the putative Ca²⁺-binding luminal interhelical a-b loop of the Photosystem II D1 protein on the kinetics of photoactivation and H₂O-oxidation in *Synechocystis* sp. PCC6803, *Biochemistry* 38, 6070 – 6081.
- 175.L. Rapatskiy, N. Cox, A. Savitsky, W. Ames, J. Sander, M. Nowaczyk, M. Rögner, A. Boussac, F. Neese, J. Messinger, W. Lubitz (2012) Detection of the water-binding sites of the oxygen - evolving complex of Photosystem II using W-band ¹⁷O electron - electron double resonance - detected NMR spectroscopy, *Journal of American Chemical Society* 134, 16619 – 16634.

- 176.F. Rappaport , M. Blanchard-Desce, J. Lavergne (1994) Kinetics of electron transfer and electrochromic change during the redox transitions of the photosynthetic oxygen - evolving complex, *Biochimica et Biophysica Acta* 1184, 178 – 192.
- 177.F. Rappaport, N. Ishida, M. Sugiura, A. Boussac (2011) Ca^{2+} determines the entropy changes associated with the formation of transition states during water oxidation by Photosystem II, *Energy & Environmental Science* 4, 2520 – 2524.
- 178.R. Razeghifard, R. Pace (1997) Electron paramagnetic resonance kinetic studies of the S states in spinach PSII membranes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1322, 141 – 150.
- 179.F. Reifarth, G. Renger (1998) Indirect evidence for structural changes coupled with Q_B^- formation in photosystem II, *FEBS Letters* 428, 123 – 126.
- 180.G. Renger, B. Hanssum (1992) Studies on the reaction coordinates of the water oxidase in PS II membrane fragments from spinach, *FEBS* 299, 28 – 32.
- 181.M. Retegan, N. Cox, W. Lubitz, F. Neese, D. Pantazis (2014) The first tyrosyl radical intermediate formed in the $\text{S}_2 - \text{S}_3$ transition of photosystem II, *PCCP* 16, 11901 – 11910.
- 182.K. Rhee, E. Morris, J. Barber, W. Kuhlbrandt, Three - dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution (1998) *Nature* 396, 283 – 286.
- 183.P. Riggs-Gelasco, R. Mei, D. Ghanotakis, C. Yocum, J. Penner-Hahn (1996) X-ray absorption spectroscopy of Calcium-substituted derivatives of the oxygen-evolving complex of Photosystem II, *Journal of American Chemical Society* 118, 2400 – 2410.
- 184.I. Rivalta, M. Amin, S. Luber, S. Vassiliev, R. Pokhrel, Y. Umena, K. Kawakami, J. Shen, N. Kamiya, D. Bruce, G. Brudvig, M. Gunner, V. Batista (2011) Structural functional role of Chloride in Photosystem II, *Biochemistry* 50, 6312 – 6315.

- 185.W. Rutherford, A. Boussac, P. Faller (2004) The stable tyrosyl radical in Photosystem II: why D?, *Biochimica et Biophysica Acta* 1655, 222 – 230.
- 186.K. Saito, W. Rutherford, H. Ishikita (2013) Mechanism of tyrosine D oxidation in Photosystem II, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 7690 – 7695.
- 187.K. Saito, J. Shen, T. Ishida, H. Ishikita (2011) Short hydrogen bond between redox-active Tyrosine Y₂ and D1-His190 in the Photosystem II crystal structure, *Biochemistry* 50, 9836 – 9844.
- 188.T. Saito, S. Yamanaka, K. Kanda, H. Isobe, Y. Takano, Y. Shigeta, Y. Umena, K. Kawakami, J. Shen, N. Kamiya, M. Okumura, M. Shoji, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi (2012) Possible mechanisms of water splitting reaction based on proton and electron release pathways revealed for CaMn₄O₅ cluster of PSII refined to 1.9 Å° X-ray resolution, *International journal of quantum chemistry* 112, 253 – 276.
- 189.Y. Sanakis, J. Sarrou, G. Zahariou, V. Petrouleas (2008) Q-band electron paramagnetic resonance studies of the S₃ state of the oec of Photosystem II, *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*, 479 – 482.
- 190.K. Sauer, V. Yachandra (2002) A possible evolutionary origin for the Mn₄ cluster of the photosynthetic water oxidation complex from natural MnO₂ precipitates in the early ocean, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 8631 – 8636.
- 191.Schlodder, H. Witt (1999) Stoichiometry of proton release from the catalytic center in Photosynthetic water oxidation, *Journal of biological chemistry* 274, 30387 – 30392.
- 192.A. Sedoud, N. Cox, M. Sugiura, W. Lubitz, A. Boussac, W. Rutherford (2011) Semiquinone - iron complex of Photosystem II: EPR signals assigned to the low-field edge of the ground state doublet of Q_A^{•-}Fe²⁺ and Q_B^{•-}Fe²⁺, *Biochemistry* 50, 6012 – 6021.

- 193.R. Service, W. Hillier, R. Debus (2010) Evidence from FTIR difference spectroscopy of an extensive network of Hydrogen bonds near the oxygen-evolving Mn_4Ca cluster of Photosystem II involving D1-Glu⁶⁵, D2-Glu³¹², and D1-Glu³²⁹, *Biochemistry* 49, 6655 – 6669.
- 194.R. Service, J. Yano, I. McConnell, H. Hwang, D. Nicks, R. Hille, T. Wydrzynski, R. Burnap, W. Hillier, R. Debus (2011) Participation of glutamate-354 of the CP43 polypeptide in the ligation of manganese and the binding of substrate water in Photosystem II, *Biochemistry* 2011, 50, 63 – 81.
- 195.R. Service, J. Yano, P. Dilbeck, R. Burnap, W. Hillier, R. Debus (2013) Participation of glutamate-333 of the D1 polypeptide in the ligation of the Mn_4CaO_5 cluster in Photosystem II, *Biochemistry* 52, 8452 – 8464.
- 196.R. A. Serway (1990) *Physics for scientists and engineers*, εκδόσεις Κορφιάτη, υποκεφάλαια 42.3, 42.6.
- 197.K. Shinopoulos, G. Brudvig (2012) Cytochrome b_{559} and cyclic electron transfer within photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1817, 66 – 75.
- 198.P. E. M. Siegbahn (2009) Structures and Energetics for O_2 Formation in Photosystem II, *Accounts of Chemical Research* 42, 1871 – 1880.
- 199.S. Singh, R. Debus, T. Wydrzynski, W. Hillier (2008) Investigation of substrate water interactions at the high-affinity Mn site in the photosystem II oxygen-evolving complex, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 1229 – 1235.
- 200.G. Sioros, D. Koulougliotis, G. Karapanagos, V. Petrouleas (2007) The $S_1Tyr_2^{\cdot}$ metalloradical EPR signal of Photosystem II contains two distinct components that advance respectively to the multiline and $g = 4.1$ conformations of S_2 , *Biochemistry* 46, 210 – 217.
- 201.J. Sjöholm, G. Chen, F. Ho, F. Mamedov, S. Styring (2013) Split electron paramagnetic resonance signal induction in Photosystem II suggests two binding sites in the S_2 state for the substrate analogue methanol, *Biochemistry* 52, 3669 – 3677.

- 202.M. Sproviero, J. A. Gascon, J. P. McEvoy, G. W. Brudvig, V. S. Batista (2008) Quantum mechanics / molecular mechanics study of the catalytic cycle of water splitting in Photosystem II, *Journal of the American Chemical Society* 130, 3428 – 3442.
- 203.A. Stewart, G. Brudvig (1998) Cytochrome b_{559} of photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1367, 63 – 87.
- 204.T. Stich, G. Yeagle, R. Service, R. Debus, D. Britt (2011) Ligation of D1-His332 and D1-Asp170 to the manganese cluster of Photosystem II from *Synechocystis* assessed by multifrequency pulsed EPR spectroscopy, *Biochemistry* 50, 7390 – 7404.
- 205.J. Stull, T. Stich, R. Service, R. Debus, S. Mandal, W. Armstrong, D. Britt (2010) ^{13}C ENDOR reveals that the D1 polypeptide C - terminus is directly bound to Mn in the Photosystem II oxygen evolving complex, *Journal of American Chemical Society* 132, 446 – 447.
- 206.S. Styring, W. Rutherford (1987) In the oxygen - evolving complex of Photosystem II the S_0 state is oxidized to the S_1 state by D^+ (Signal II_{slow}) *Biochemistry* 26, 2401 – 2405.
- 207.S. Styring, W. Rutherford (1988) Deactivation kinetics and temperature dependence of the S - state transitions in the oxygen - evolving system of Photosystem II measured by EPR spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta* 933, 378 – 387.
- 208.S. Styring, W. Rutherford (1988 β) The microwave power saturation of sII_{slow} varies with the redox state of the Oxygen - evolving complex in Photosystem II, *Biochemistry* 27, 4915 – 4923.
- 209.S. Styring, Y. Feyziyev, F. Mamedov (2003) pH dependence of the donor side reactions in Ca^{2+} - depleted Photosystem II, *Biochemistry* 42, 6185 – 6192.
- 210.S. Styring, J. Sjöholm, F. Mamedov (2012) Two tyrosines that changed the world: Interfacing the oxidizing power of photochemistry to water splitting in photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1817, 76 – 87.

- 211.J. Su, K. Havelius, F. Mamedov, F. Ho, S. Styring (2006) Split EPR signals from Photosystem II are modified by methanol, reflecting S state - dependent binding and alterations in the magnetic coupling in the CaMn₄ cluster, *Biochemistry* 45, 7617 – 7627.
- 212.M. Sugiura, S. Harada, T. Manabe, H. Hayashi, Y. Kashino, A. Boussac (2010) Psb30 contributes to structurally stabilise the Photosystem II complex in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongates*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 1546 – 1554.
- 213.M. Sugiura, S. Ogami, M. Kusumi, S. Un, F. Rappaport, A. Boussac (2012) Environment of Tyr_z in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* in which PsbA2 is the D1 protein, *The journal of biological chemistry* 287, 13336 – 13347.
- 214.H. Suzuki, M. Sugiura, T. Noguchi (2009) Monitoring proton release during photosynthetic water oxidation in Photosystem II by means of isotope - edited infrared spectroscopy, *Journal of American Chemical Society* 131, 7849 – 7857.
- 215.H. M. Swartz, J. R. Bolton, D. C. Borg (1972) *Biological applications of ESR*, John Wiley and sons.
- 216.M. Symons (1978) *Chemical and biochemical aspects of Electron Spin Resonance spectroscopy*, Van Nostrand Reinhold Company.
- 217.X. Tang, B. Diner, B. Larsen, L. Gilchrist, G. Lorigan, D. Britt (1994) Identification of histidine at the catalytic site of the photosynthetic oxygen-evolving complex, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 704 – 708.
- 218.X. Tang, D. Randall, D. Force, B. Diner, D. Britt (1996) Manganese – Tyrosine interaction in the Photosystem II oxygen - evolving complex, *Journal of American Chemical Society* 118, 7638 – 7639.
- 219.L. Thompson, G. Brudvig (1988) Cytochrome *b*-559 may function to protect Photosystem II from photoinhibition, *Biochemistry* 27, 6653 – 6658.

- 220.L. Thompson, A. Miller, C. Buser, J. de Paula, G. Brudvig (1989) Characterization of the multiple forms of cytochrome b_{559} in Photosystem II, *Biochemistry* 28, 8048 – 8056.
- 221.C. Tommos, G. T. Babcock (2000) Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation, *Biochimica et Biophysica Acta* 1458, 199 – 219.
- 222.C. Tommos, X. Tang, K. Warncke, C. Hoganson, S. Styring, J. McCracken, B. Diner, G. Babcock (1995) Spin-density distribution, conformation, and hydrogen bonding of the redox-active Tyrosine Y_Z in Photosystem II from multiple electron magnetic-resonance spectroscopies: implications for photosynthetic oxygen evolution, *Journal of American Chemical Society* 117, 10325 – 10335.
- 223.A. Tracewell, G. Brudvig (2008) Characterization of the secondary electron-transfer pathway intermediates of photosystem II containing low-potential cytochrome b_{559} , *Photosynthesis Research* 98, 189 – 197.
- 224.A. Trebst (2007) Inhibitors in the functional dissection of the photosynthetic electron transport system, *Photosynthesis Research* 92, 217 – 224.
- 225.E. Tsui, R. Tran, J. Yano, T. Agapie (2013) Redox-inactive metals modulate the reduction potential in heterometallic manganese – oxido clusters, *Nature Chemistry* 5, 293 – 299.
- 226.Y. Umena, K. Kawakami, J. R. Shen, N. Kamiya (2011) Crystal structure of oxygen – evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature* 473, 55 – 60.
- 227.S. Un, X. Tang, B. Diner (1996) 245 GHz high-field EPR study of Tyrosine - D' and Tyrosine - Z' in mutants of Photosystem II, *Biochemistry* 35, 679 – 684.
- 228.S. Vassiliev, T. Zaraiskaya, D. Bruce (2012) Exploring the energetics of water permeation in photosystem II by multiple steered molecular dynamics simulations, *Biochimica et Biophysica Acta* 1817, 1671 – 1678.
- 229.S. Vassiliev, T. Zaraiskaya, D. Bruce (2013) Molecular dynamics simulations reveal highly permeable oxygen exit channels shared with water uptake channels in photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 1827, 1148 – 1155.

- 230.B. Velthuys (1981) Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to Photosystem II, *FEBS Letters* 126, 277-281.
231. D. Vinyard, G. Ananyev, C. Dismukes (2013) Photosystem II: The reaction center of oxygenic Photosynthesis, *Annual Review of Biochemistry* 82, 577 – 606.
232. J. Vrettos, J. Limburg, G. Brudvig (2001) Mechanism of photosynthetic water oxidation: combining biophysical studies of photosystem II with inorganic model chemistry, *Biochimica et Biophysica Acta* 1503, 229 – 245.
233. J. Vrettos, D. Stone, G. Brudvig (2001) Quantifying the ion selectivity of the Ca^{2+} site in Photosystem II: evidence for direct involvement of Ca^{2+} in O_2 formation, *Biochemistry* 40, 7937 – 7945.
234. B. Weckhuysen, R. Heidler, R. Schoonheydt, (2004) Electron Spin Resonance Spectroscopy, *Molecular Sieves* 4, 295 – 335.
235. J. A. Weil, J. R. Bolton, J. E. Wertz, (1994) *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary theory and practical applications*, John Wiley and sons, INC.
236. K. Westphal, N. Lydakis-Simantiris, R. Cukier, G. Babcock (2000) Effects of Sr^{2+} -substitution on the reduction rates of Y_z^* in PSII membranes – Evidence for concerted Hydrogen – atom transfer in Oxygen evolution, *Biochemistry* 39, 16220 – 16229.
- 237.K. Westphal, C. Tommos, G. Babcock (2000) Concerted hydrogen-atom abstraction in photosynthetic water oxidation, *Current Opinion in Plant Biology* 3, 236 – 242.
- 238.R. de Wijn, H. van Gorkom (2001) Kinetics of electron transfer from Q_A to Q_B in Photosystem II, *Biochemistry* 40, 11912 – 11922.
- 239.H. Wincencjusz, H. van Gorkom, C. Yocum (1997) The Photosynthetic Oxygen evolving complex requires Chloride for its redox state $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ and $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ transitions but not for $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$ or $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ transitions, *Biochemistry* 36, 3663 – 3670.

- 240.V. Yachandra (2002) Structure of the manganese complex in photosystem II: insights from X - ray spectroscopy, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357, 1347 – 1358.
- 241.V. Yachandra, J. Yano (2011) Calcium in the oxygen - evolving complex: Structural and mechanistic role determined by X - ray spectroscopy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104, 51 – 59.
- 242.J. Yano, J. Kern, K. Irrgang, M. J. Latimer, U. Bergmann, P. Glatzel, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, K. Sauer, J. Messinger, A. Zouni, V. K. Yachandra (2005) X-ray damage to the Mn₄Ca complex in single crystals of photosystem II: A case study for metalloprotein crystallography, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 12047 – 12052.
- 243.J. Yano, J. Kern, K. Sauer, M. J. Latimer, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, W. Saenger, J. Messinger, A. Zouni, V. K. Yachandra (2006) Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn₄Ca cluster, *Science* 314, 821 – 825.
- 244.J. Yano, V. K. Yachandra (2007) Oxidation state changes of the Mn₄Ca cluster in Photosystem II, *Photosynthesis Research* 92, 289 – 303.
- 245.J. Yano, V. K. Yachandra (2008) Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn₄Ca cluster from X-ray spectroscopy, *Inorganic Chemistry* 47, 1711 – 1726.
- 246.G. Zahariou, N. Ioannidis, G. Sioros, V. Petrouleas (2007) The collapse of the Tyrosine Z' – Mn spin - spin interaction above ~100 K reveals the spectrum of Tyrosine Z'. An Application of rapid-scan EPR to the study of intermediates of the water splitting mechanism of Photosystem II, *Biochemistry* 46, 14335 – 14341.
- 247.G. Zahariou, M. Chrysina, V. Petrouleas, N. Ioannidis (2014) Can we trap the S₃Y₂' metalloradical intermediate during the S – state transitions of Photosystem II? An EPR investigation, *FEBS Letters* 588, 1827 – 1831.

- 248.C. Zhang, S. Styring (2003) Formation of split electron paramagnetic resonance signals in Photosystem II suggests that Tyrosine_z can be photooxidized at 5 K in the S₀ and S₁ states of the Oxygen - evolving complex, *Biochemistry* 42, 8066 – 8076.
- 249.C. Zhang, A. Boussac, W. Rutherford (2004) Low - temperature electron transfer in Photosystem II: a Tyrosyl radical and semiquinone charge pair, *Biochemistry* 43, 13787 – 13795.
- 250.J. Zimmermann, A. Rutherford (1986) Photoreductant-induced oxidation of Fe²⁺ in the electron - acceptor complex of Photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta* 851, 416 – 423.
- 251.J. L. Zimmermann, A. W. Rutherford (1986) Electron paramagnetic resonance properties of the S₂ state of the oxygen - evolving complex of Photosystem II, *Biochemistry* 25, 4609 – 4615.
- 252.A. Zouni, H. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauß, W. Saenger, P. Orth (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature* 409, 739 – 743.