



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»**

**ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « Ανόργανη Χημεία και Τεχνολογία »**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Μεταβολές στο Σύμπλοκο Διάσπασης του Νερού  
κατά τη μετάβαση  $S_2$  προς  $S_3$ .  
Μελέτη με Φασματοσκοπία EPR**

**ΜΑΡΙΑ ΧΡΥΣΙΝΑ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΙΟΥΝΙΟΣ 2011**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

Μεταβολές στο Σύμπλοκο Διάσπασης του Νερού  
κατά τη μετάβαση  $S_2$  προς  $S_3$ .  
Μελέτη με Φασματοσκοπία EPR

**ΜΑΡΙΑ ΧΡΥΣΙΝΑ**

**A.M.:** 82928

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

Παναγιώτης Κυρίτσης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Παναγιώτης Κυρίτσης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ  
Βασίλειος Πετρουλέας, Διευθυντής Ερευνών ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»  
Ιωάννης Μαρκόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ** 23/06/2011



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φωτοσύστημα II, στα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια, καταλύει την φωτοεπαγόμενη διάσπαση του νερού. Όταν ειδικό συγκρότημα χλωροφυλλών, το P680, απορροφήσει φωτόνιο, γίνεται ασταθές και αποδίδει ένα ηλεκτρόνιο στην πλαστοκινόνη  $Q_B$ . Η θετική οπή, που δημιουργείται, καταλαμβάνεται από ηλεκτρόνιο που προέρχεται από σύμπλοκο  $Mn_4Ca$ , επάνω στο οποίο είναι προσδεδμένα δύο μόρια νερού. Κατά την διάρκεια της σταδιακής απορρόφησης 4 φωτονίων, αφαιρούνται 4 ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο  $Mn_4Ca(2H_2O)$  και ελευθερώνονται 4  $H^+$  στην υδατική φάση, οδηγώντας στον σχηματισμό μοριακού οξυγόνου. Επομένως, ο καταλυτικός κύκλος του  $Mn_4Ca$  περιλαμβάνει τέσσερις οξειδωτικές μεταβάσεις, αποκαλούμενες μεταβάσεις S:  $S_0 \rightarrow S_1$ ,  $S_1 \rightarrow S_2$ ,  $S_2 \rightarrow S_3$ ,  $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ . Σημαντικό ρόλο στην διάσπαση του νερού παίζει η Tyr<sub>Z</sub>, η οποία δρα ως ενδιάμεσος μεταφορέας ηλεκτρονίων μεταξύ του  $Mn_4Ca$  και του P680, ενώ παράλληλα επηρεάζει και τη μεταφορά  $H^+$ .

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία EPR θερμοκρασιών υγρού ηλίου για να μελετηθούν οι μεταβολές που προκαλούνται στο σύμπλοκο διάσπασης του νερού κατά την κρίσιμη μετάβαση  $S_2$  προς  $S_3$ . Παρατηρήθηκε ότι η μεταβατική κατάσταση  $S_2Y_Z^{\cdot}$  εμφανίζει δύο συνιστώσες οι οποίες αντιπροσωπεύουν δύο διαδοχικές κινήσεις  $H^+$  κατά την οξείδωση της Tyr<sub>Z</sub>. Κέντρα με  $S = 5/2$  στην  $S_2$  μετατρέπονται σε  $S = 1/2$  πριν το σχηματισμό της  $S_3$ . Κινητήρια δύναμη για τη μετατροπή αυτή είναι ο διαχωρισμός φορτίου και η δημιουργία της  $S_2Y_Z^{\cdot}$ .

Θεματική περιοχή: Φωτοσύνθεση

Λέξεις – κλειδιά: φωτοσύνθεση, φωτοσύστημα II, σύμπλοκο διάσπασης του νερού, S – μεταβάσεις, τυροσίνη Z, φασματοσκοπία EPR.

## ABSTRACT

Photosystem II in plants, algae and cyanobacteria catalyzes the photoinduced water oxidation. When a special cluster of chlorophylls, P680, absorbs a photon, it gives an electron to plastoquinone  $Q_B$ . The positive charge on P680 is covered by an electron from a  $Mn_4Ca$  cluster, which binds substrate water molecules. When four photons are absorbed, four electrons have moved from the  $Mn_4Ca$  cluster to quinone and four  $H^+$  have been released to the bulk, then  $O_2$  is formed. Therefore, the catalytic cycle of the  $Mn_4Ca$  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  $Mn_4Ca$ , 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 study the changes that occur in the water-splitting complex during the critical  $S_2$  to  $S_3$  transition. Two different conformations of  $S_2Y_Z^{\cdot}$  were identified in the EPR spectra. These correspond to two successive movements of  $H^+$  during oxidation of the  $Tyr_Z$ . Besides, it is found that centers characterized by  $S = 5/2$  in  $S_2$  are converted to  $S = 1/2$  prior to the  $S_3$  formation. This conversion is driven by the oxidation of  $Tyr_Z$ .

Subject area: Photosynthesis

Keywords: photosynthesis, photosystem II, oxygen evolving complex, S – transitions, tyrosine Z, EPR spectroscopy.

*Στους γονείς μου, Θανάση και Καλή...*





## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>15</b>
<b>1. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ</b> .....	<b>16</b>
<b>2. ΤΟ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ II</b> .....	<b>19</b>
2.1 ΟΙ ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ ΤΟΥ ΦΣ II .....	20
2.2 Η ΑΛΥΣΙΔΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ .....	22
2.3 Ο ΔΕΚΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ: ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΤΗΣ ΣΙΔΗΡΟΚΙΝΟΗΣ .....	23
2.4 Ο ΔΟΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ: ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΤΟΥ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ .....	25
2.4.1 Η δομή του συμπλόκου του Μαγγανίου .....	25
2.4.2 Η λειτουργία του συμπλόκου του μαγγανίου: Ο κύκλος των S- καταστάσεων .....	28
2.4.3 Η τυροσίνη Z.....	30
2.4.4 Μοντέλα απόσπασης $H^+$ από το ΣΔN .....	32
2.4.5 Οι μεταβατικές καταστάσεις $S_nY_Z'$ .....	33
2.4.6 Ο μηχανισμός διάσπασης του $H_2O$ .....	35
<b>3. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ EPR</b> .....	<b>38</b>
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	38
3.2 ΣΠΙΝ ΚΑΙ ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΡΟΠΗ .....	38
3.3 ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΖΕΕΜΑΝ .....	40
3.4 Ο ΠΑΡΑΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ.....	40
3.5 Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ G .....	42
3.6 ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΔΙΝΟΥΝ ΣΗΜΑ EPR .....	44
3.7 ΔΙΑΠΛΑΤΥΝΣΗ ΤΩΝ ΓΡΑΜΜΩΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ .....	45
3.8 ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΤΟΥ ΣΠΙΝ.....	46
3.9 ΡΟΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΟΙ ΑΠΟΔΙΕΓΕΡΣΗΣ.....	47

3.10 ΥΠΕΡΛΕΠΤΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ .....	48
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>51</b>
4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ II.....	51
4.1.1 Σύσταση Διαλυμάτων.....	51
4.1.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης μεμβρανών BBY.....	52
4.1.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης.....	53
4.1.4 Φωτισμός δειγμάτων .....	53
4.1.5 Προσθήκη γλυκερόλης στα δείγματα.....	54
4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ EPR.....	54
4.2.1 Γέφυρα μικροκυμάτων .....	55
4.2.2 Κοιλότητα συντονισμού.....	56
4.2.3 Μαγνήτης .....	56
4.2.4 Ανιχνευτής 'Lock in'.....	57
4.2.5 Ηλεκτρονικός υπολογιστής.....	57
4.3 ΚΡΥΟΣΤΑΤΗΣ .....	58
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>60</b>
5.1 ΟΙ ΔΥΟ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΑΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ $S_2Y_Z'$ .....	60
5.1.2 Το φάσμα της $S_2Y_Z'$ στους 10 K μετά από φωτισμό στους 150 K σε δείγματα χωρίς και με γλυκερόλη .....	60
5.1.2 Διαφορές μεταξύ των δειγμάτων χωρίς και με γλυκερόλη.....	62
5.1.3 Οι δύο συνιστώσες δεν οφείλονται σε ανομοιογένεια της $S_2$ .....	63
5.1.4 Κινητική επανασύνδεσης της $S_2Y_Z'$ με την $Q_A^-$ στους 10 K.....	65
5.1.5 Φάσμα υψηλής ευκρίνειας της $S_2Y_Z'$ σε δείγματα με 50% γλυκερόλη .....	66
5.1.6 Συζήτηση.....	68
5.2 ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΣΔΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ $S_2 \rightarrow S_3$ ΚΑΙ Η ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΤΗΣ $S_2Y_Z'$ .....	71

5.2.1 Εισαγωγικά .....	71
5.2.2 Το $g = 4.1$ μετατρέπεται σε πολυγραμμικό με φωτισμό στους $-50^{\circ}\text{C}$ .....	73
5.2.3 Εύρος θερμοκρασιών στις οποίες γίνεται η μετατροπή .....	76
5.2.4 Η μετατροπή μπορεί να γίνει και με φωτισμό σε χαμηλότερη θερμοκρασία και στη συνέχεια μεταφορά του δείγματος στους $-50^{\circ}\text{C}$ .	78
5.2.5 Παγίδευση της $\text{S}_2\text{Yz}$ με φωτισμό στους $-50^{\circ}\text{C}$ και γρήγορο πάγωμα .....	79
5.2.6 Πειράματα για να ελεγχθεί το πού οφείλεται η μετατροπή $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό.....	83
5.2.7 Συζήτηση.....	84
5.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	86
<b>5. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....</b>	<b>88</b>
<b>6. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....</b>	<b>89</b>
<b>8. ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</b>	<b>90</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: (α) Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου χλωροπλάστη από φύλλο σπανακιού (β) Μοριακή οργάνωση των μεμβρανών των θυλακοειδών. ....	16
Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων των θυλακοειδών.. ....	17
Εικόνα 2.1: Το φωτοσύστημα II των κυανοβακτηρίων από την πλευρά του κυτταροπλάσματος.....	19
Εικόνα 2.2: Δομή του ΦΣ II .....	21
Εικόνα 2.3: Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του ΦΣ II .....	23
Εικόνα 2.4: Το σύμπλοκο της σιδηροκινόνης.....	24
Εικόνα 2.5: Πιθανά μοντέλα του συμπλόκου του Mn.....	26
Εικόνα 2.6: Η δομή του συμπλόκου $Mn_4CaO_5$ . ....	28
Εικόνα 2.7: Συσσώρευση οξειδωτικών ισοδυνάμων κατά την οξείδωση δύο μορίων $H_2O$ σε $O_2$ χωρίς καταλύτη και με καταλύτη το ΦΣ II .....	29
Εικόνα 2.8: Ο κύκλος των S-καταστάσεων .....	30
Εικόνα 2.9: Ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίου προς το $P680^+$ και πρωτονίου προς την ιστιδίνη 190, κατά την οξείδωση της $Tyr_Z$ .....	31
Εικόνα 2.10: Το δίκτυο των δεσμών H που συνδέει το σύμπλοκο του Mn με την $Tyr_Z$ , την $His^{190}$ και την $Asn^{298}$ .....	32
Εικόνα 2.11: Μοντέλο απόσπασσης ηλεκτρονίου και πρωτονίου από το ΣΔΝ κατά τις μεταβάσεις $S_0 \rightarrow S_1$ , $S_1 \rightarrow S_2$ , $S_2 \rightarrow S_3$ .....	34
Εικόνα 2.12: Ο κύκλος των S-καταστάσεων, όπως έχει προταθεί με μοντέλα DFT QM/MM. ....	36
Εικόνα 2.13: Ο κύκλος των S-καταστάσεων .....	37
Εικόνα 3.1: Μαγνητικό πεδίο, σπιν και μαγνητική ροπή. ....	39
Εικόνα 3.2: Μετάβαση EPR.....	41
Εικόνα 3.3: Απορρόφηση EPR.....	42
Εικόνα 3.4: Η επίδραση του μαγνητικού πεδίου στις ενεργειακές καταστάσεις του σπιν .....	43
Εικόνα 3.5: Μορφές της γραμμής απορρόφησης. ....	46
Εικόνα 3.6: Ροή ενέργειας ανάμεσα στην μικροκυματική ακτινοβολία, το σύστημα σπιν και το πλέγμα.....	48

Εικόνα 3.7: Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων σε ένα σύστημα με $S = I = 1/2$ .....	49
Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση ενός απλού φασματομέτρου EPR και μιας κοιλότητας συντονισμού.....	54
Εικόνα 4.2: Σχηματική απεικόνιση της γέφυρας μικροκυμάτων. ....	56
Εικόνα 4.3: Σχηματική απεικόνιση του κρουοστάτη.....	59
Εικόνα 5.1: Οι δύο διαμορφώσεις της $S_2Y_Z'$ . ....	61
Εικόνα 5.2: Οι δύο διαμορφώσεις της $S_2Y_Z'$ σε δείγμα με 50% γλυκερόλη v/v .....	61
Εικόνα 5.3: Η ρίζα που δημιουργείται στους 10 K στην $S_2$ σε δείγμα με 50% γλυκερόλη.....	63
Εικόνα 5.4: πείραμα με IR.....	64
Εικόνα 5.5: Τα αντίστοιχα φάσματα της μικρής περιοχής της εικόνας 5.4. ....	65
Εικόνα 5.6: Κινητική μείωσης της $S_2Y_Z'$ . ....	66
Εικόνα 5.7: Το φάσμα της $S_2Y_Z'$ στους 150 K σε δείγμα χωρίς καμία τροποποίηση ( <i>Ioannidis et al. 2008</i> ) και σε δείγμα με 50% v/v γλυκερόλη, σε σύγκριση με το φάσμα της $Y_D'$ . ....	67
Εικόνα 5.8: Σύγκριση του φάσματος αμέσως μετά τον παλμό με τα φάσματα της αργής συνιστώσας της κινητικής .....	68
Εικόνα 5.9: Μοριακό μοντέλο που ερμηνεύει τις δύο συνιστώσες της $S_2Y_Z'$ . ....	71
Εικόνα 5.10: Μετατροπή του $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό με φωτισμό στους $-50^\circ\text{C}$ .....	74
Εικόνα 5.11: Ποσοστό πολυγραμμικού και $g = 4.1$ σε κάθε βήμα του πειράματος της εικόνας 5.10 .....	75
Εικόνα 5.12: Το τροποποιημένο πολυγραμμικό, που έχει προέλθει από την μετατροπή $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό, σε σύγκριση με το κανονικό ...	75
Εικόνα 5.13: Σύγκριση της μετατροπής του $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό με φωτισμό σε θερμοκρασίες $-80^\circ\text{C}$ , $-60^\circ\text{C}$ και $-40^\circ\text{C}$ .....	77
Εικόνα 5.14: Μετατροπή του $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό με φωτισμό στους $-30^\circ\text{C}$ .. .....	77
Εικόνα 5.15: Μετατροπή του $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό με φωτισμό στους $-80^\circ\text{C}$ και γρήγορη μεταφορά του δείγματος στους $-50^\circ\text{C}$ .....	78

Εικόνα 5.16: Μετατροπή του $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό με φωτισμό στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , επώαση για 3 min στην ίδια θερμοκρασία και στη συνέχεια μεταφορά του δείγματος στους $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .....	79
Εικόνα 5.17: Η ρίζα της εικόνας 5.10 σε σύγκριση με την $S_2Y_Z'$ που δημιουργείται με φωτισμό στους 180 K.....	80
Εικόνα 5.18: Σύγκριση του φάσματος της $S_2Y_Z'$ με ισχύ μικροκυμάτων 100 mW (μαύρο) και 31 mW (μπλε).....	81
Εικόνα 5.19: Η μετατροπή $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό και η παγίδευση της $S_2Y_Z'$ σε δείγμα με PPBQ ως εξωτερική κινόνη.....	82
Εικόνα 5.20: Η $S_2Y_Z'$ που παγιδεύεται με φωτισμό στους $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ και γρήγορο πάγωμα, σε δείγμα με 50% γλυκερόλη v/v.....	82
Εικόνα 5.21: Η $S_2Y_Z'$ της προηγούμενης εικόνας, 6 min μετά τον φωτισμό μείον την $S_2$ . .....	83
Εικόνα 5.22: Φωτισμός στους $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε δείγμα με ατραζίνη. ....	84
Εικόνα 5.23: Μετατροπή του $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό κατά τη μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$ . .....	86

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

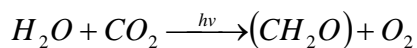
Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο φασματοσκοπίας EPR του Ινστιτούτου Επιστήμης Υλικών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Παναγιώτη Κυρίτση για το συνεχές ενδιαφέρον του, όπως επίσης και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Ιωάννη Μαρκόπουλο. Ιδιαίτερως ευχαριστώ τον Διευθυντή Ερευνών του Ινστιτούτου Επιστήμης Υλικών, κ. Βασίλη Πετρουλέα, που με καθοδήγησε όλο αυτό το διάστημα. Ακόμη, ευχαριστώ τον Δρ. Νίκο Ιωαννίδη και την Δρ. Γεωργία Ζαχαρίου για το ενδιαφέρον και την πολύτιμη βοήθειά τους, καθώς και τον τεχνικό του υγροποιητή ηλίου του Δημοκρίτου κ. Μιχάλη Τζίφια.

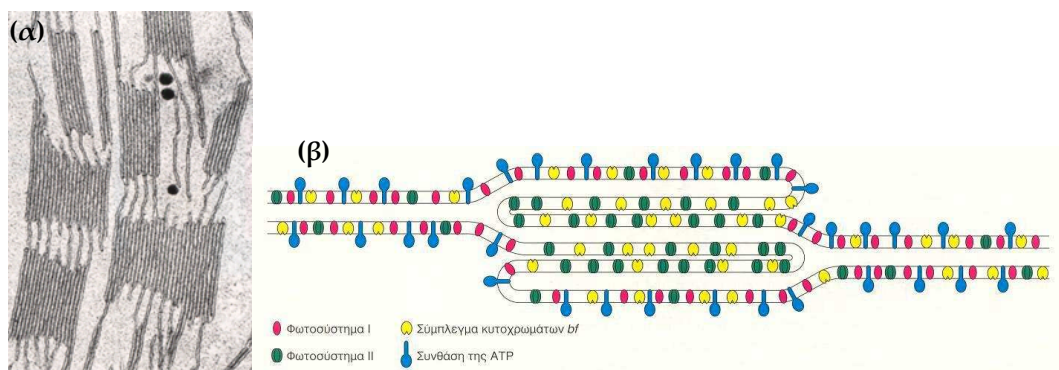
# 1. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ

Με τη φωτοσύνθεση τα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια αξιοποιούν το φως του ήλιου και το νερό για να παράγουν ενέργεια και βιομάζα για τα ίδια, αλλά και για όλους τους οργανισμούς. Με την οξυγονική φωτοσύνθεση η ατμόσφαιρα εμπλουτίστηκε με οξυγόνο που ελευθερώνεται ως παραπροϊόν, το οποίο έκανε πιο αποτελεσματική την αναπνοή. Επιπλέον, από το οξυγόνο αυτό δημιουργήθηκε το στρώμα του όζοντος που προστατεύει τους οργανισμούς από την υπεριώδη ακτινοβολία.

Φωτοσύνθεση είναι η αναγωγή του  $CO_2$  της ατμόσφαιρας σε υδατάνθρακες. Η ενέργεια προσφέρεται από τον ήλιο και ως αναγωγικό χρησιμοποιείται το νερό. Η γενική αντίδραση της οξυγονικής φωτοσύνθεσης είναι:



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 τα θυλακοειδή στρώματος και τα θυλακοειδή των grana [εικόνα 1.1]. Το εσωτερικό των θυλακοειδών ονομάζεται αυλός (lumen) ή μικροχώρος.



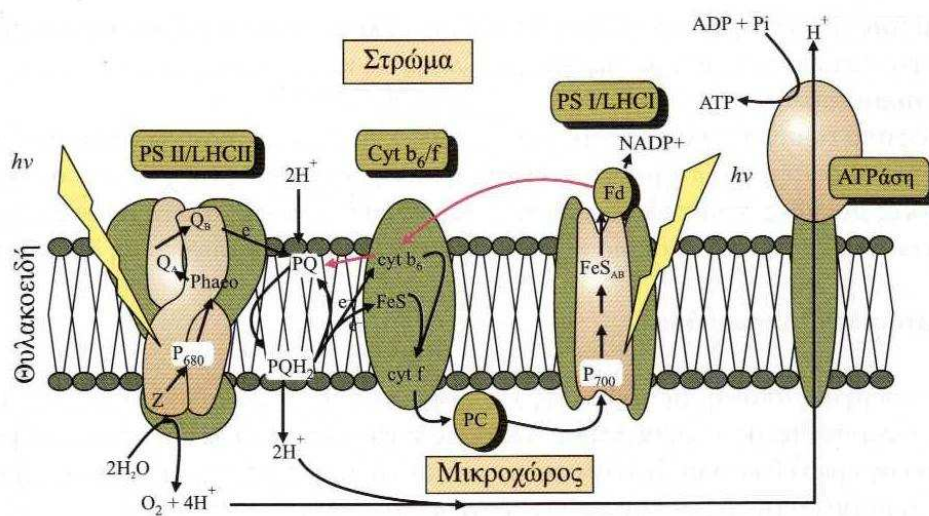
**Εικόνα 1.1: (α) Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου χλωροπλάστη από φύλλο σπανακιού, όπου φαίνονται τα grana που συνδέονται μεταξύ τους με τα θυλακοειδή στρώματος, (β) Μοριακή οργάνωση των μεμβρανών των θυλακοειδών. [Από Βιοχημεία I, J.M.Berg, J.L.Tymoczko, L.Stryer]**



Η φωτοσύνθεση περιλαμβάνει τις φωτεινές και τις σκοτεινές αντιδράσεις, οι πρώτες απαιτούν φως για να γίνουν, ενώ οι δεύτερες όχι. Κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις παράγεται γλυκόζη από το CO<sub>2</sub>. Για να γίνει αυτό απαιτείται ενέργεια (ATP) και αναγωγική δύναμη (NADPH), τα οποία παράγονται κατά τις φωτεινές αντιδράσεις.

Τα περισσότερα ένζυμα που παίρνουν μέρος στις σκοτεινές αντιδράσεις βρίσκονται στο στρώμα των χλωροπλαστών.

Οι φωτεινές αντιδράσεις γίνονται στα θυλακοειδή των χλωροπλαστών και σε αυτές συμμετέχουν τέσσερα διαμεμβρανικά σύμπλοκα πρωτεϊνών: το φωτοσύστημα II (ΦΣ II), το κυτόχρωμα b<sub>6</sub>f, το φωτοσύστημα I (ΦΣ I), η συνθετάση του ATP και δύο διαλυτές πρωτεΐνες: η πλαστοκυανίνη και η αναγωγή του ζεύγους φερρεδοξίνης - NADP<sup>+</sup>. Διαμέσου αυτών των πρωτεϊνών γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων από το H<sub>2</sub>O προς το NADP<sup>+</sup>.



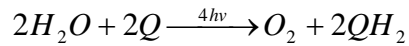
**Εικόνα 1.2:** Σχηματική απεικόνιση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων των θυλακοειδών. [Από *Φυσιολογία Φυτών, Κεφάλαιο 5, Γανωτάκης, Κοτζαμπάσης*].

Το H<sub>2</sub>O συνδέεται στο σύμπλοκο διάσπασης του νερού (ΣΔΝ), το Mn<sub>4</sub>Ca, του ΦΣ II και ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω του ΦΣ II προς την πλαστοκινίνη, η οποία μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο κυτόχρωμα b<sub>6</sub>f. Στη συνέχεια, μέσω της πλαστοκυανίνης τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο ΦΣ I και από εκεί στη φερρεδοξίνη και με τη βοήθεια της αναγωγής Fd -

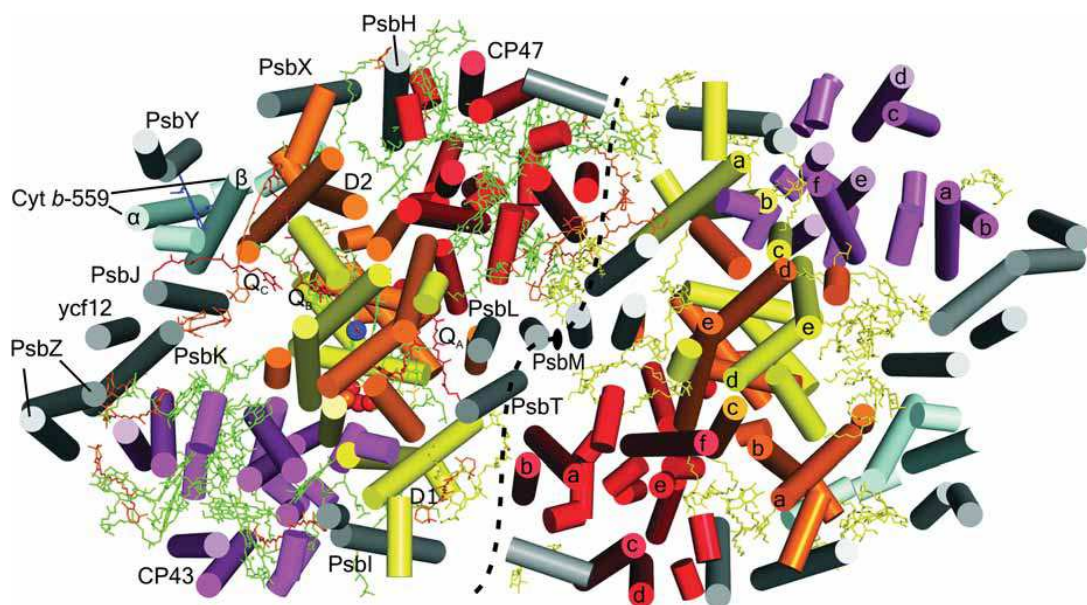
$\text{NADP}^+$ , στο  $\text{NADP}^+$ . Η ενέργεια που απαιτείται για την μεταφορά των ηλεκτρονίων δίνεται από φως που απορροφάται από τις χλωροφύλλες του ΦΣ I και ΦΣ II. Ταυτόχρονα με την κίνηση των ηλεκτρονίων, μετακινούνται  $\text{H}^+$  προς το εσωτερικό των θυλακοειδών και έτσι δημιουργείται βαθμίδωση συγκέντρωσης. Στη συνέχεια, λόγω της διαφοράς συγκέντρωσης, τα  $\text{H}^+$  μεταφέρονται μέσω της ATP-συνθετάσης στο στρώμα, ενεργοποιώντας την, με αυτό τον τρόπο, να φωσφορυλιώσει ADP. [εικόνα 1.2].

## 2. ΤΟ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ II

Το ΦΣ II λειτουργεί ως οξειδοαναγωγή νερού – πλαστοκινόνης καταλύοντας την παρακάτω αντίδραση:



Το ΦΣ II μπορεί να οξειδώσει περίπου 100 μόρια νερού σε ένα δευτερόλεπτο σε καλές συνθήκες ηλιακού φωτός (*Tommos & Babcock 2000*)!



Εικόνα 2.1: Το φωτοσύστημα 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  $Mn_4Ca$  (κόκκινες και πορτοκαλί σφαίρες) και ο μη αιμικός σίδηρος (μπλε). (Από *Guskov et al. 2009*).

Στα ανώτερα φυτά, το ΦΣ II αποτελείται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός (light harvesting complex II, LHC II) και τον πυρήνα του ΦΣ II (PS II core). Ο πυρήνας του ΦΣ II είναι διμερές, που παρουσιάζει ψευδοσυμμετρία δεύτερης τάξης (*Ferreira et al. 2004*) και αποτελείται από 20 υπομονάδες στα κυανοβακτήρια (17 διαμεμβρανικές και 3 διαλυτές που

βρίσκονται στην εσωτερική πλευρά του θυλακοειδούς), [εικόνα 8], (*Guskov et al. 2009*). Τα δύο μονομερή έχουν μεταξύ τους κάποιες μικρές δομικές διαφορές (*Umena et al. 2011*). Ως τώρα, οι λυμένες δομές με ακτίνες 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*) προέρχονται από κυανοβακτήρια. Το φυτικό ΦΣ II είναι δύσκολο να κρυσταλλωθεί λόγω πρωτεόλυσης των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης (*Nelson & Yocum 2006*), έχει όμως μελετηθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία (*Hankamer et al. 2001b*). Οι δομές του ευκαρυωτικού και προκαρυωτικού ΦΣ II διαφέρουν στις εξωτερικές (υδατοδιαλυτές) υπομονάδες κυρίως.

## 2.1 Οι υπομονάδες του ΦΣ II

Στο κέντρο του κάθε μονομερούς βρίσκονται οι D1 (PsbA) και D2 (PsbD), καθεμία έχει πέντε διαμεμβρανικές έλικες και επάνω τους βρίσκονται όλοι οι συμπράγοντες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων [εικόνα 2.3] (*Hankamer et al. 2001b, Zouni et al. 2001, Ferreira et al. 2004, Biesiadka et al. 2004, Loll et al. 2005, Guskov et al. 2009*). Η D1 συμμετέχει άμεσα στη διάσπαση του H<sub>2</sub>O, επάνω της βρίσκεται το ΣΔΝ (σύμπλοκο διάσπασης του νερού), η τυροσίνη Z (Tyr<sub>Z</sub>), οι δύο από τις τέσσερις χλωροφύλλες του P680, η rheo<sub>D1</sub> και η Q<sub>B</sub>.

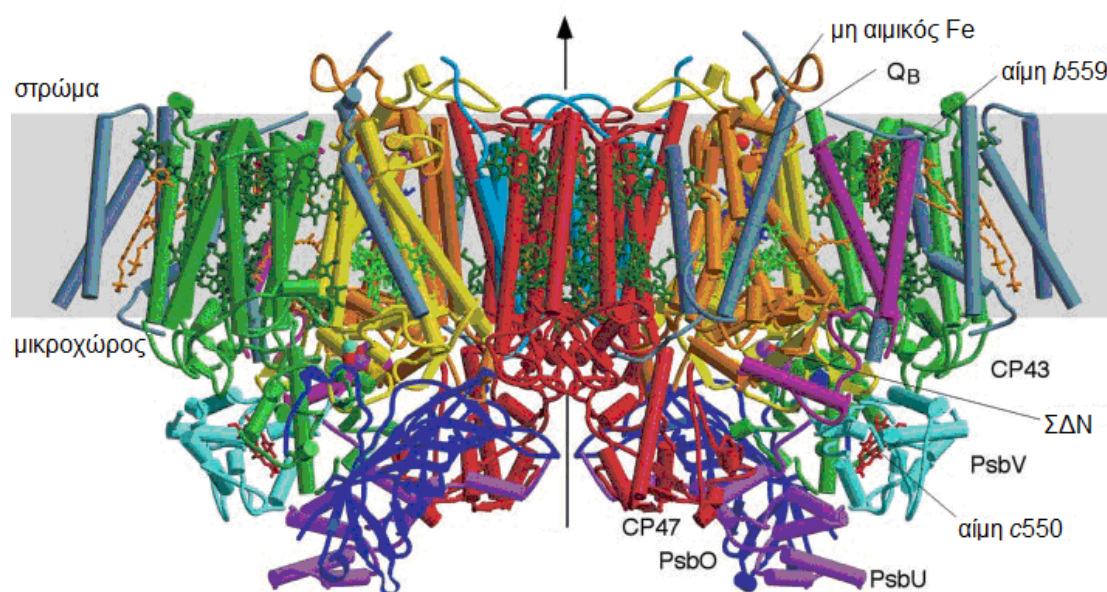
Στην D2 λειτουργεί ένα μονοπάτι δευτερογενούς μεταφοράς ηλεκτρονίων προς το P680 όταν το ΣΔΝ είναι ανενεργό, το οποίο περιλαμβάνει το cyt *b*<sub>559</sub>, ένα β-καροτένιο και την chl<sub>ZD2</sub> (τα δύο τελευταία βρίσκονται επάνω στην D2). Οι αντιδράσεις αυτές είναι πιο αργές και έτσι δεν ανταγωνίζονται την οξείδωση του H<sub>2</sub>O (*Barber 2008*).

Δίπλα στην D1 και D2 βρίσκεται αντίστοιχα η CP43 (PsbC) και η CP47 (PsbB). Οι CP43 και CP47 λειτουργούν ως κεραίες και μεταφέρουν την ενέργεια από το LHC στο κέντρο αντίδρασης (*Nelson & Yocum 2006*).

Εξωτερικά του πυρήνα CP43/D1/D2/CP47 βρίσκεται ένας αριθμός υπομονάδων μικρού μοριακού βάρους. Όλες, εκτός από την Z, έχουν μια διαμεμβρανική έλικα. Οι PsbI και PsbX, οι οποίες βρίσκονται σε

αντιδιαμετρικά σημεία, σταθεροποιούν τις περιφερειακές χλωροφύλλες των D1 και D2 ( $chl_{ZD1}$  και  $chl_{ZD2}$  [εικόνα 2.3]), αντίστοιχα.

Οι PsbE και PsbF αποτελούν τις  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδες, αντίστοιχα, του  $cyt\ b_{559}$ . Η αίμη του κυτοχρώματος συνδέεται μέσω δύο ιστιδινών στις δύο αυτές υπομονάδες (Ferreira et al. 2004).



**Εικόνα 2.2: 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<sub>A</sub> και Q<sub>B</sub>: μωβ. Σύμπλοκο Mn: οξυγόνο: κόκκινο, Mn: μωβ, Ca<sup>2+</sup>: γαλάζιο. (Από Ferreira et al. 2004).**

Οι PsbL, PsbM και PsbT βρίσκονται στο σημείο επαφής του ενός μονομερούς ΦΣ II με το άλλο και παίζουν ρόλο στο σχηματισμό του διμερούς. Οι PsbJ, PsbK, PsbN, PsbZ βρίσκονται δίπλα στην CP43 και σταθεροποιούν μόρια καροτενοειδών (Ferreira et al. 2004). Η PsbS υπομονάδα είναι μοναδική στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Nelson & Yocum 2006), όπως και η PsbW (Hankamer et al. 2001a).

Εξωτερικά της μεμβράνης, στην πλευρά του αυλού, βρίσκονται οι PsbO, PsbP και PsbQ (Ferreira et al. 2004, Biesiadka et al. 2004, Loll et al.

2005). Αυτές οι τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες, μαζί με το C άκρο της D2, σχηματίζουν ένα κάλυμμα πάνω από το ΣΔΝ, αλλά καμία από τις τρεις δεν συνδέεται άμεσα με αυτό (*Ferreira et al. 2004*). Στα κυανοβακτήρια, οι P και Q αντικαθίσταται από τις PsbV (cyt *c*<sub>550</sub>) και PsbU, αντίστοιχα.

Η υπομονάδα O σταθεροποιεί το ΣΔΝ (manganese stabilizing protein, MSP) (*Nelson & Yocum 2006*). Ένας δακτύλιός της συμμετέχει στο σχηματισμό ενός υδρόφιλου μονοπατιού που συνδέει το ΣΔΝ και τον αυλό (*Ferreira et al. 2004*).

## 2.2 Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

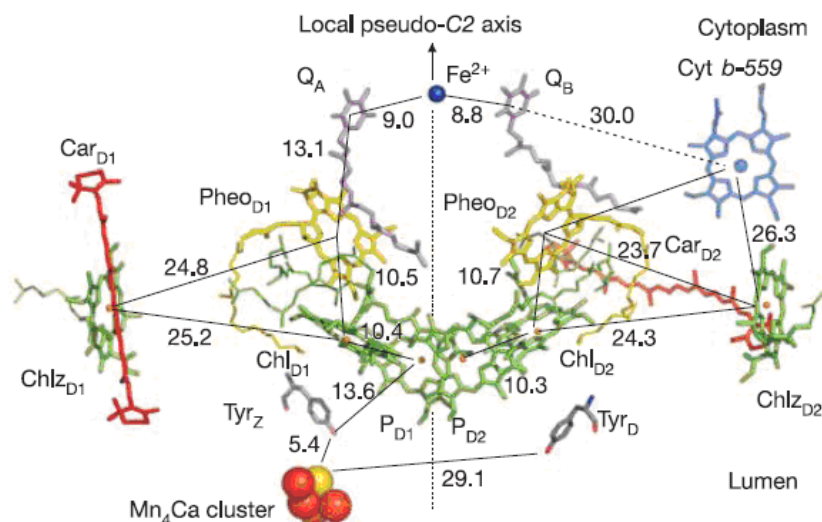
Η δομή του πυρήνα (κέντρου αντίδρασης) του ΦΣII παρουσιάζεται στην *εικόνα 2.3*. Με πράσινο διακρίνεται το συγκρότημα χλωροφυλλών P<sub>680</sub>, με κίτρινο η φαιοφυτίνη, με γκρίζο οι πλαστοκινόνες Q<sub>A</sub> και Q<sub>B</sub> και οι δύο τυροσίνες Z και D. Με μπλε είναι σχεδιασμένος ο μη αιμικός σίδηρος μεταξύ των δύο κινονών και με κόκκινο το σύμπλοκο διάσπασης του νερού, Mn<sub>4</sub>Ca, στο οποίο διακρίνεται με κίτρινο χρώμα και ιόν ασβεστίου.

Αρχικά, το φως διεγείρει τις χλωροφύλλες των φωτοσυλλεκτικών πρωτεϊνών LHC II, η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται από τη μια χλωροφύλλη στην άλλη και μέσω των χλωροφυλλών των πρωτεϊνών CP43 και CP47 καταλήγει σε ένα τετραμερές χλωροφυλλών, το P680, όπου γίνεται ο διαχωρισμός φορτίου. Ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από το P680 μέσω μιας φαιοφυτίνης στην πλαστοκινόνη Q<sub>A</sub> και στη συνέχεια στην πλαστοκινόνη Q<sub>B</sub>. Μετά από μια δεύτερη διέγερση, η Q<sub>B</sub> έχει δύο ηλεκτρόνια, προσλαμβάνει και δύο H<sup>+</sup> από το στρώμα και απομακρύνεται προς το cyt *b*<sub>6</sub>*f*.

Το έλλειμμα ηλεκτρονίου που δημιουργείται στο P680 καλύπτεται από ένα ηλεκτρόνιο του ΣΔΝ, όπου βρίσκεται δεσμευμένο H<sub>2</sub>O, μέσω μιας οξειδοαναγωγικά ενεργής τυροσίνης, της Tyr<sub>Z</sub>. Όταν το P680 έχει διεγερθεί τέσσερις φορές, τέσσερα ηλεκτρόνια έχουν αποσπασθεί από το ΣΔΝ,



τέσσερα  $H^+$  έχουν μετακινηθεί προς τον αυλό του θυλακοειδούς και τελικά δύο μόρια  $H_2O$  μετατρέπονται σε  $O_2$ .



**Εικόνα 2.3: Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του ΦΣ II: εικόνα κάθετα στο επίπεδο της μεμβράνης. Στο ΣΔΝ τα ιόντα Mn είναι κόκκινα και το  $Ca^{2+}$  κίτρινο. (Από Loll et al. 2005).**

### 2.3 Ο δέκτης ηλεκτρονίων: το σύμπλοκο της σιδηροκινόνης

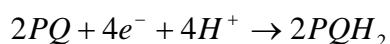
Το σύμπλοκο της σιδηροκινόνης βρίσκεται κοντά στην πλευρά του στρώματος. Η  $Q_A$  είναι σφιχτά συνδεδεμένη επάνω στην πρωτεΐνη και μπορεί να προσλάβει ένα μόνο ηλεκτρόνιο, ενώ αντίθετα η  $Q_B$  αφού αναχθεί διπλά και προσλάβει δύο  $H^+$  από το στρώμα μπορεί να απομακρυνθεί.

Η  $Q_A$  είναι τοποθετημένη σε μια υδρόφοβη θήκη επάνω στην D2 και συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με την Phe<sup>261</sup> και την His<sup>214</sup> της D2 (Ferreira et al. 2004, Kern & Renger 2007, Umena et al. 2011).

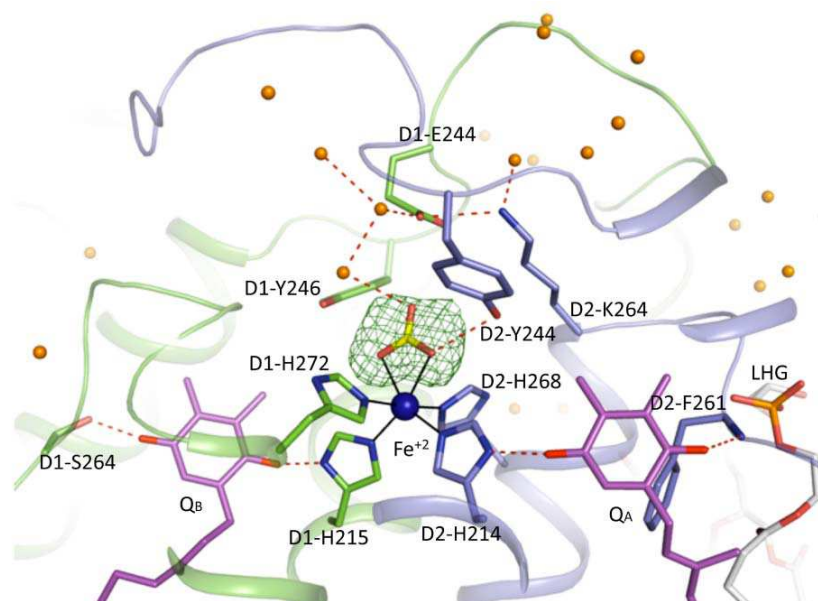
Η  $Q_B$  βρίσκεται επάνω στην D1 και συνδέεται μέσω δεσμών υδρογόνου με τις D1-Ser<sup>264</sup>, D1-His<sup>215</sup> και D1-Phe<sup>265</sup> (Ferreira et al. 2004). Η κινόνη  $Q_B$  μπορεί να αντικατασταθεί με άλλες χημικά συγγενείς κινόνες (Petrouleas & Diner 1987).

Ανάμεσα στις δύο κινόνες,  $Q_A$  και  $Q_B$ , βρίσκεται ένα μη αιμικό ιόν  $Fe^{2+}$ . Βρίσκεται επάνω στον άξονα συμμετρίας του ετεροδιμερούς D1/D2 και είναι συνδεδεμένο με τέσσερις ιστοιδίνες (D1-His<sup>215</sup>, D1-His<sup>272</sup>, D2-His<sup>214</sup>, D2-His<sup>268</sup>). Επίσης, συνδέεται με ένα όξινο ανθρακικό ιόν ( $HCO_3^-$ ) το οποίο έχει ρυθμιστικό ρόλο στη μεταφορά ηλεκτρονίων από την  $Q_A$  στην  $Q_B$ , όπως επίσης και στην πρωτονίωση της  $Q_B$ . (Ferreira et al. 2004, Kern & Renger 2007). Το όξινο ανθρακικό ιόν συνδέεται μέσω δεσμών υδρογόνου με τις D1-Tyr<sup>246</sup> και D2-Tyr<sup>244</sup> (Kern & Renger 2007).

Η αντίδραση που γίνεται στο σύμπλοκο της σιδηροκινόνης είναι η παρακάτω:



Ο σχηματισμός της  $PQH_2$  γίνεται σε δύο βήματα: αρχικά η  $Q_A^-$  ανάγει την  $Q_B$  σε ημικινόνη  $Q_B^-$  μέσα σε χρόνο μερικών εκατοντάδων μs και στη συνέχεια, με ένα δεύτερο πιο αργό βήμα, γίνεται ο σχηματισμός της  $PQH_2$ . Η μεταφορά ηλεκτρονίου από την  $Q_A$  στην  $Q_B$  απαιτεί ευκαμψία των γύρω πρωτεϊνών και γι' αυτό γίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες. Η ημικινόνη έχει υψηλή συγγένεια με την θέση πρόσδεσης, ενώ η  $PQH_2$  είναι χαλαρά προσδεδεμένη και μπορεί εύκολα να ανταλλαχθεί με μια νέα κινόνη (Kern & Renger 2007).



Εικόνα 2.4: Το σύμπλοκο της σιδηροκινόνης. (Από Umena et al. 2011).



## 2.4 Ο δότης ηλεκτρονίων: το σύμπλοκο του Μαγγανίου

Το σύμπλοκο του Mn ή σύμπλοκο διάσπασης του νερού (ΣΔΝ) αποτελείται από τέσσερα ιόντα Mn και ένα  $\text{Ca}^{2+}$  (Babcock 1995, Goussias *et al.* 2002), βρίσκεται δε, επάνω στην D1, προς την πλευρά του στρώματος. Στη συμμετρική θέση του ΣΔΝ στην πλευρά της D2 είναι τοποθετημένες ογκώδεις πλευρικές ομάδες φαινυλαλανίνης (Murray & Barber 2007).

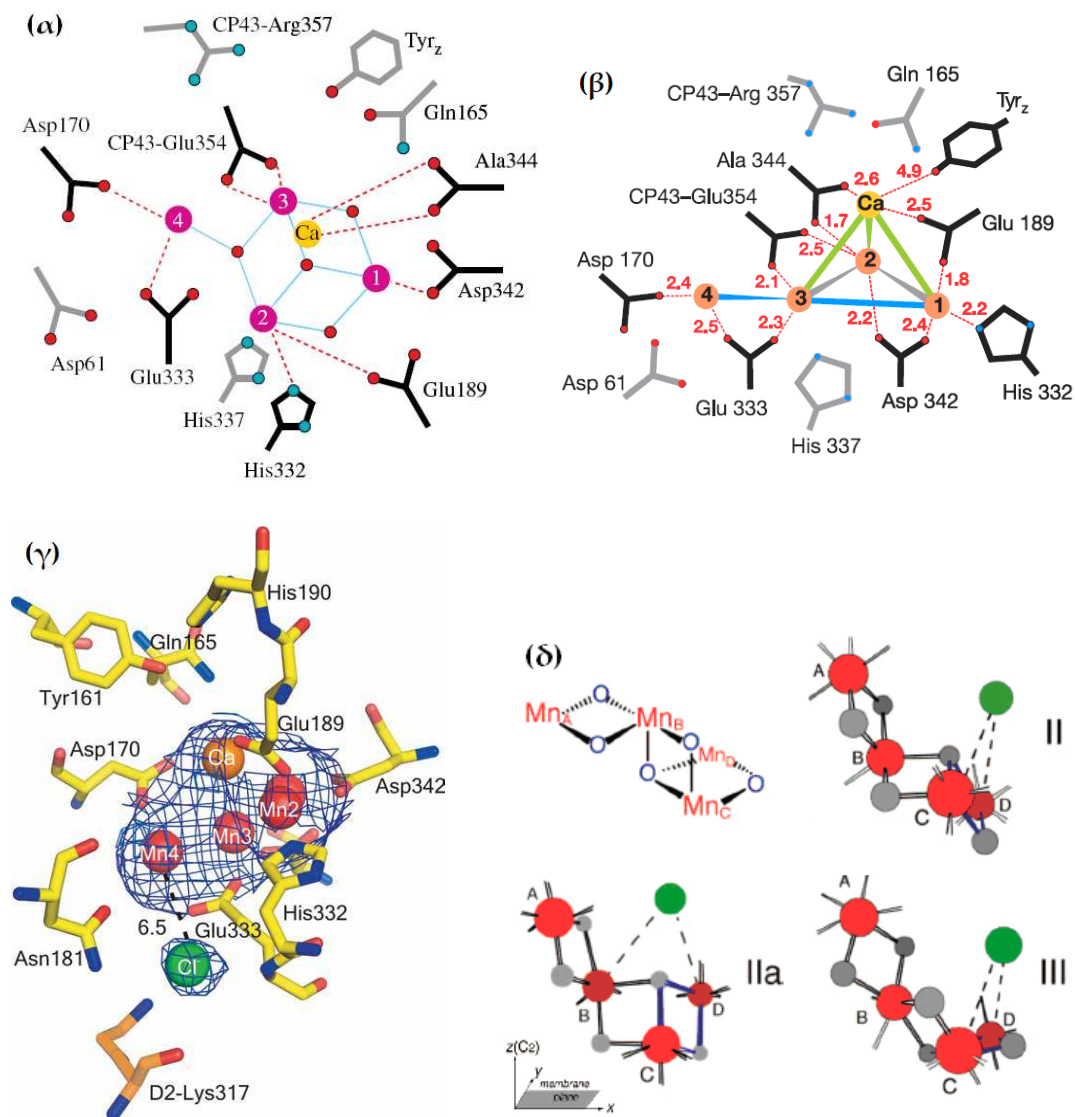
### 2.4.1 Η δομή του συμπλόκου του Μαγγανίου

Έχουν προταθεί πολλά μοντέλα για τη δομή του ΣΔΝ που έχουν προκύψει από κρυσταλλογραφία ακτίνων-X και φασματοσκοπικές μεθόδους απορρόφησης ακτίνων X.

Ως πρόσφατα, τα μοντέλα που είχαν προκύψει κρυσταλλογραφικά ήταν χαμηλής διακριτικής ικανότητας. Επιπλέον, οι ακτίνες-X υψηλής ενέργειας που χρησιμοποιούνταν ανήγαγαν το  $\text{Mn}^{3+}$  και  $\text{Mn}^{4+}$  του ΣΔΝ σε  $\text{Mn}^{2+}$ , η δε αναγωγή συνοδεύεται και από αλλαγή της δομής (Yano *et al.* 2005, Yano & Yachandra 2008). Αυτό δεν συμβαίνει όμως στη φασματοσκοπία ακτίνων X (Extended X-Ray Absorption Fine Structure, EXAFS), η οποία, επιπλέον, δίνει δομές με υψηλή διακριτική ικανότητα. Το μειονέκτημα όμως είναι ότι με αυτή τη μέθοδο προκύπτουν πολλές ισοδύναμες δομές και δεν παρέχονται πληροφορίες για το πρωτεϊνικό περιβάλλον.

Πρόσφατα όμως, προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά η δομή του ΦΣ II με 1.9 Å διακριτική ικανότητα (Umeha *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. Σε αυτή τη δομή προσδιορίστηκαν οι θέσεις των O που λειτουργούν ως οξο-γέφυρες και μόρια  $\text{H}_2\text{O}$ .

Στο μοντέλο των Zouni *et al.* το ΣΔΝ έχει σχήμα «Υ». Τα τρία ιόντα Mn είναι τοποθετημένα στις κορυφές ενός ισοσκελούς τριγώνου, ενώ το τέταρτο βρίσκεται κοντά στο κέντρο του τριγώνου.



**Εικόνα 2.5:** Πιθανά μοντέλα του συμπλόκου του Mn. *Μοντέλα που προέκυψαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ:* (α) Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου των *Ferreira et al.* Τα ιόντα Mn συμβολίζονται με μωβ σφαίρες, τα άτομα οξυγόνου με κόκκινες σφαίρες και αποστάσεις μικρότερες των 2.8 Å με διακεκομμένες γραμμές. (β) Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου των *Loll et al.* Οι αποστάσεις ανάμεσα στα ιόντα Mn και στο  $\text{Ca}^{2+}$  παριστάνονται με γκρι (2.7 Å), μπλε (3.3 Å) και πράσινες (3.4 Å) γραμμές, τα πιο κοντινά στο σύμπλοκο αμινοξέα είναι μαύρα, ενώ τα πιο απομακρυσμένα γκρι, οι αποστάσεις είναι σε Å. (γ) Το μοντέλο των *Guskov et al.* Διακρίνεται το  $\text{Cl}^-$  ως πράσινη σφαίρα. *Μοντέλα που προέκυψαν με EXAFS:* (δ) Δομή των τριών μοντέλων (σύμφωνα με το σύστημα αξόνων που βρίσκεται κάτω αριστερά): Τα ιόντα Mn συμβολίζονται με κόκκινες σφαίρες, το  $\text{Ca}^{2+}$  με πράσινη σφαίρα και τα άτομα O με γκρι. Ο τρόπος σύνδεσης του  $\text{Ca}^{2+}$  με τα ιόντα Mn δεν είναι διευκρινισμένος και γι' αυτό συμβολίζεται με διακεκομμένες γραμμές. Πάνω αριστερά φαίνεται το μοτίβο που ακολουθούν τα τρία μοντέλα (*Yano et al. 2006*).

Στο μοντέλο των *Ferreira et al.* [εικόνα 2.5α], υπάρχει μια περίπου κυβική δομή  $\text{Mn}_3\text{CaO}_4$ , τα Mn (Mn1-Mn2-Mn3) συνδέονται μέσω δι-μ-οξο γεφυρών και η απόσταση μεταξύ τους είναι 2.7 Å, επίσης το καθένα απέχει από το  $\text{Ca}^{2+}$  3.4 Å και συνδέεται με αυτό μέσω δι-μ-οξο γέφυρας. Σε απόσταση 3.3 Å βρίσκεται το Mn4 συνδεδεμένο μέσω δύο μονο-μ-οξο γεφυρών με τα Mn2 και 3. Με τροποποίηση αυτού του μοντέλου έχει προκύψει και ένα νέο, στο οποίο το Mn4 συνδέεται με το  $\text{Mn}_3\text{CaO}_4$  μόνο με μια οξο γέφυρα, ώστε να ταιριάζει καλύτερα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα (*Barber & Murray 2008*).

Στο μοντέλο των *Loll et al.* [εικόνα 2.5β], τα Mn σχηματίζουν έναν γάτζο, οι αποστάσεις Mn1-Mn2 και Mn2-Mn3 είναι 2.7 Å και συνδέονται με δι-μ-οξο γέφυρες, ενώ η απόσταση Mn1-Mn3 και Mn3-Mn4 είναι 3.3 Å και συνδέονται με μονο-μ-οξο γέφυρες. Το  $\text{Ca}^{2+}$  βρίσκεται στην κορυφή μιας τριγωνικής πυραμίδας με βάση τα Mn1-Mn2-Mn3 και απέχει από το καθένα 3.4 Å.

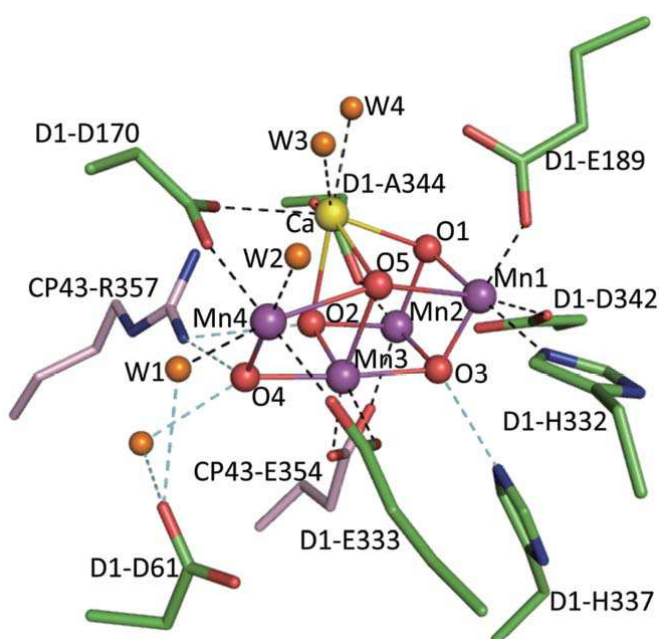
Το μοντέλο των *Guskov et al.* [εικόνα 2.5γ] δεν έχει σημαντικές διαφορές από το μοντέλο των *Loll et al.* Περιέχει όμως, επιπλέον ένα ιόν  $\text{Cl}^-$  σε απόσταση 6.5 Å από το σύμπλοκο του Mn, αντιδιαμετρικά του Ca. Επίσης, βρέθηκε πιθανόν ένα μόριο  $\text{H}_2\text{O}$  στο μισό της απόστασης  $\text{Mn}_4\text{Ca} - \text{Cl}^-$  (*Guskov et al. 2009*).

Από τη φασματοσκοπία απορρόφησης ακτίνων-X προκύπτουν τρία μοντέλα [εικόνα 2.5δ] (*Yano et al. 2006, Yano & Yachandra 2008*). Οι αποστάσεις  $\text{Mn}_C\text{-Mn}_D$  είναι 2.8 Å, ενώ οι αποστάσεις  $\text{Mn}_A\text{-Mn}_B$  και  $\text{Mn}_B\text{-Mn}_C$  2.7 Å και η απόσταση  $\text{Mn}_B\text{-Mn}_D$  3.3 Å. Το  $\text{Ca}^{2+}$  απέχει 3.4 Å, από δύο ιόντα Mn.

Στο μοντέλο των *Umeha et al.* [εικόνα 2.6] 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 ιόν Mn συνδέεται με τον κύβο με μία μ-οξο-γέφυρα (το ένα από τα δύο οξυγόνα είναι το O5). Το O5 είναι πιο χαλαρά συνδεδεμένο στο σύμπλοκο και για αυτό θα πρέπει να έχει υψηλή

δραστικότητα. Η συνολική δομή του συμπλόκου μοιάζει με παραμορφωμένη καρέκλα. Επιπλέον, βρέθηκαν τέσσερα μόρια νερού, τα δύο συνδέονται με το  $\text{Ca}^{2+}$  και τα άλλα δύο με το  $\text{Mn4}$  [εικόνα 2.6]. Ακόμη, βρέθηκαν και δύο  $\text{Cl}^-$ .

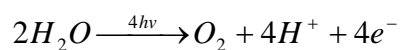
Το σύμπλοκο του Mn αλληλεπιδρά με καρβοξυλομάδες συντηρημένων ασπαρτικών και γλουταμινικών (D1-Asp<sup>170</sup>, D1-Glu<sup>189</sup>, D1-Glu<sup>333</sup>, D1-Asp<sup>342</sup>), με το C άκρο (D1-Ala<sup>344</sup>) και με μια ιστιδίνη (D1-His<sup>332</sup>) της D1, καθώς και με ένα γλουταμινικό της CP43 (Glu<sup>354</sup>). (Ferreira et al. 2004, Loll et al. 2005, McEvoy & Brudvig 2006, Umena et al. 2011).



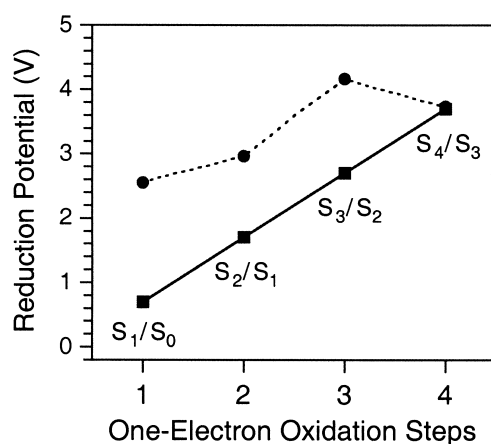
Εικόνα 2.6: Η δομή του συμπλόκου  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$ . (Από Umena et al. 2011).

#### 2.4.2 Η λειτουργία του συμπλόκου του μαγγανίου: Ο κύκλος των S-καταστάσεων

Το ΣΔΝ καταλύει την παρακάτω αντίδραση:



Η διάσπαση του  $H_2O$  με χημικό τρόπο απαιτεί στο πρώτο βήμα περισσότερη ενέργεια από αυτήν που μπορεί να μεταφέρει ένα φωτόνιο 680 nm (1.8 eV). Όμως με τη μεσολάβηση του συμπλόκου του Mn αποθηκεύονται τέσσερα οξειδωτικά ισοδύναμα το καθένα απ' τα οποία απαιτεί χαμηλότερη ενέργεια για να δημιουργηθεί και έτσι αποφεύγεται το πρώτο δαπανηρό βήμα [εικόνα 2.7] (Britt 1996). Επίσης, με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η συσσώρευση των δραστικών ενδιάμεσων που δημιουργούνται κατά την χημική οξείδωση του  $H_2O$ , τα οποία θα μπορούσαν να καταστρέψουν την πρωτεΐνη.

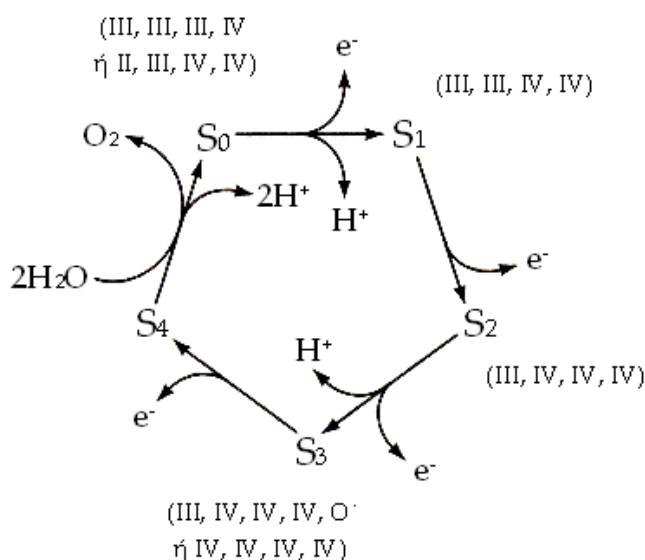


**Εικόνα 2.7:** Συσσώρευση οξειδωτικών ισοδυνάμων κατά την οξείδωση δύο μορίων  $H_2O$  σε  $O_2$  χωρίς καταλύτη (κύκλος) και με καταλύτη το  $\Phi\Sigma$  II (τετράγωνο). (Από Tommos & Babcock 2000).

Κατά τη διάσπαση του  $H_2O$ , το σύμπλοκο του Mn περνάει από 5 οξειδωτικές καταστάσεις  $S_n$  (όπου n: τα οξειδωτικά ισοδύναμα που συσσωρεύονται σε κάθε βήμα στο σύμπλοκο του Mn). Αυτές είναι:  $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ . Κάθε φορά που το P680 διεγείρεται από φωτόνιο και γίνεται διαχωρισμός φορτίου, το σύμπλοκο του Mn οξειδώνεται, μέσω της  $Tyr_Z$ , περνώντας στην επόμενη οξειδωτική κατάσταση. Ταυτόχρονα με την οξείδωση απομακρύνονται και πρωτόνια. Ο αριθμός των πρωτονίων που αποβάλλονται από το ΣΔΝ κατά τη διάρκεια των παραπάνω μεταβάσεων είναι 1, 0, 1, 2 .

Η  $S_0$  είναι η πιο ανηγμένη κατάσταση. Η  $S_1$  είναι η πιο σταθερή στο σκοτάδι, γι' αυτό το μεγαλύτερο ποσοστό των κέντρων δείγματος που βρίσκεται στο σκοτάδι βρίσκονται σε αυτήν. 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 2.8].

Οι αριθμοί οξειδωσης των ιόντων του Mn [εικόνα 2.8] για την  $S_1$  είναι III, III, IV, IV και για την  $S_2$ : III, IV, IV, IV, ενώ για την  $S_0$  υπάρχουν δύο πιθανές περιπτώσεις: III, III, III, IV ή II, III, IV, IV (McEvoy & Brudvig 2006). Το ίδιο συμβαίνει και για την  $S_3$ : III, IV, IV, IV (Ioannidis et al. 2000, 2002, Yano & Yachandra 2007, 2008, Boussac et al. 2005) ή IV, IV, IV, IV (Dau & Haumann 2007, Meyer et al. 2007, Sproviero et al. 2008, Siegbahn 2009). Στην πρώτη περίπτωση, δεν γίνεται οξείδωση του Mn κατά τη μετάβαση  $S_2 \rightarrow S_3$ , αλλά δημιουργείται μια ρίζα  $O^\cdot$ .



**Εικόνα 2.8:** Ο κύκλος των S-καταστάσεων. Στις παρενθέσεις δίνονται οι πιθανές οξειδωτικές καταστάσεις των τεσσάρων ατόμων Mn.

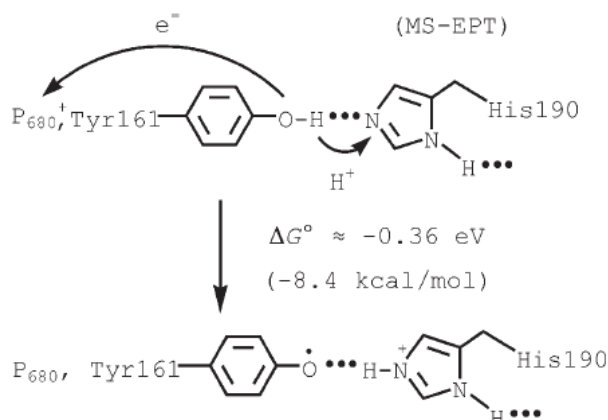
### 2.4.3 Η τυροσίνη Z

Η οξείδωση του συμπλόκου του Mn από το P680 γίνεται μέσω της D1-tyr<sup>161</sup> ή Tyr<sub>z</sub> (Debus et al. 1988b). Η Tyr<sub>z</sub> επιτρέπει στο ΦΣ II να

λειτουργεί με κβαντική απόδοση κοντά στο 1, ανάγοντας το P680<sup>+</sup> ταχύτερα (μέσα σε ns) από ό,τι γίνεται η επανασύνδεση με την Q<sub>A</sub><sup>-</sup> (μs) (Tommos & Babcock 2000).

Η Tyr<sub>Z</sub> απέχει από την P<sub>D1</sub> 13.6 Å και από το Ca<sup>2+</sup>, το πιο κοντινό σε αυτήν άτομο του ΣΔΝ, 4.9 Å (Loll et al. 2005). Επίσης, συνδέεται με δεσμό υδρογόνου με την His<sup>190</sup> (2.5 Å) (Umena et al. 2011). Ο δεσμός αυτός πιθανόν είναι low barrier hydrogen bond (δεσμός υδρογόνου χαμηλού φράγματος) που σημαίνει ότι το H<sup>+</sup> μπορεί να κινείται εύκολα μεταξύ των δύο καταλοίπων λόγω της μικρής απόστασης (McEvoy & Brudvig 2006).

Στην D2, σε συμμετρική θέση σε σχέση με την Tyr<sub>Z</sub>, βρίσκεται άλλη μια οξειδοαναγωγικά ενεργή τυροσίνη, η D2-Tyr<sup>160</sup> ή Tyr<sub>D</sub> (Barry & Babcock 1987, Debus et al. 1988a). Η εν λόγω τυροσίνη οξειδώνεται από το P680, αλλά δεν παίρνει άμεσα μέρος στη διάσπαση του H<sub>2</sub>O επειδή έχει χαμηλότερο αναγωγικό δυναμικό από την Tyr<sub>Z</sub>. Μπορεί, όμως, να οξειδώσει την S<sub>0</sub> προς S<sub>1</sub> στο σκοτάδι (Styring & Rutherford 1987). Απέχει 29.1 Å από το ΣΔΝ και 13.5 Å από την P<sub>D2</sub>, την πιο κοντινή της χλωροφύλλη του P680 (Loll et al. 2005).

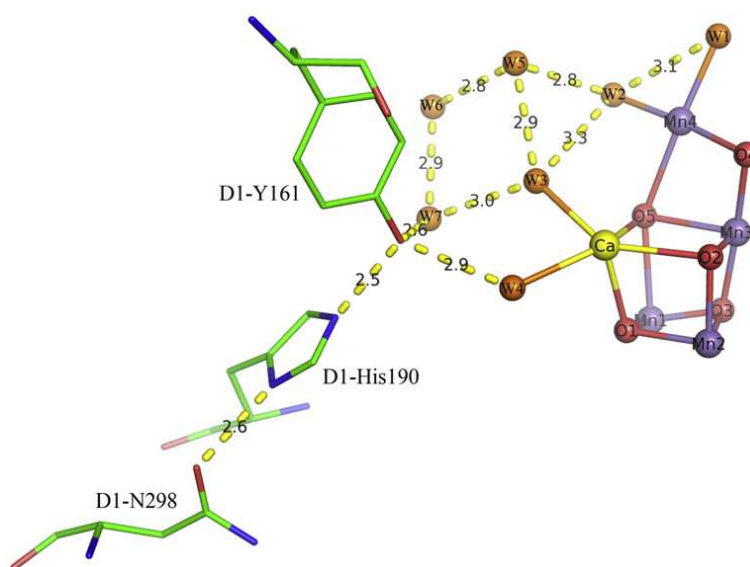


**Εικόνα 2.9:** Ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίου προς το P680<sup>+</sup> και πρωτονίου προς την ιστιδίνη 190, κατά την οξείδωση της Tyr<sub>Z</sub>. (Από Meyer et al. 2007).

Η Tyr<sub>Z</sub> όταν οξειδώνεται δημιουργεί ουδέτερη ρίζα, δηλαδή απομακρύνεται από αυτήν και ένα H<sup>+</sup> (Diner & Babcock 1996). Όταν απομακρύνεται ταυτόχρονα e<sup>-</sup> και H<sup>+</sup> υπάρχει ενεργειακό πλεονέκτημα (ΔG

< 0) σε σχέση με απομάκρυνση μόνο  $e^-$  ή  $H^+$  ( $\Delta G > 0$ ), επειδή στη δεύτερη περίπτωση σχηματίζονται ενδιάμεσα υψηλής ενέργειας (*Meyer et al. 2007*), [εικόνα 2.9]. Επιπλέον, 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 ιστιδίνη 190 μπορεί να δράσει ως βάση κατά την οξείδωση της τυροσίνης έλκοντας το  $H^+$  μέσω του δεσμού υδρογόνου που σχηματίζει με την Tyr<sub>z</sub> (*Tommos & Babcock 2000*).



Εικόνα 2.10: Το δίκτυο των δεσμών υδρογόνου που συνδέει το σύμπλοκο του Mn με την Tyr<sub>z</sub>, την His<sup>190</sup> και την Asn<sup>298</sup> (Από *Kawakami et al. 2011*).

#### 2.4.4 Μοντέλα απόσπασης $H^+$ από το ΣΔN

Έχουν προταθεί δύο μοντέλα που περιγράφουν την απόσπαση  $H^+$  από το ΣΔN:

Σύμφωνα με το “hydrogen-abstraction model” (μοντέλο απόσπασης H), η Tyr<sub>z</sub> αποσπά μαζί με το ηλεκτρόνιο και ένα  $H^+$  από νερό, που είναι



προσδεδεμένο στο σύμπλοκο του Mn. Το πρωτόνιο μεταφέρεται μέσω της His<sup>190</sup> και υποθετικού δικτύου δεσμών υδρογόνου στον αυλό (Tommos & Babcock 2000, Umena et al. 2011).

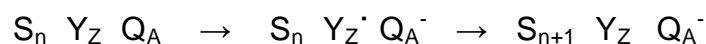
Σύμφωνα με το “proton-rocking model” (μοντέλο παλινδρόμησης H<sup>+</sup>), όταν οξειδώνεται η Tyr<sub>Z</sub> το H<sup>+</sup> μετακινείται προς την His<sup>190</sup> μέσω του δεσμού υδρογόνου που συνδέει τα δύο κατάλοιπα. Στη συνέχεια, ένα ηλεκτρόνιο από το ΣΔΝ ανάγει την Tyr<sub>Z</sub> και ένα H<sup>+</sup> απομακρύνεται προς τον αυλό του θυλακοειδούς, οπότε το H<sup>+</sup> που βρισκόταν στην ιστιδίνη επιστρέφει προς την τυροσίνη. Υποψήφια για το ρόλο της απόσπασης H<sup>+</sup> από το ΣΔΝ είναι η CP43-Arg<sup>357</sup>, η οποία βρίσκεται κοντά στο κανάλι μεταφοράς H<sup>+</sup> (Petrouleas et al. 2005, McEvoy & Brudvig 2006, Sproviero et al. 2008). Εναλλακτικά, ως βάση που αποσπά H<sup>+</sup> από το ΣΔΝ δρα το Asp<sup>61</sup> (στην αποπρωτονιωμένη μορφή COO<sup>-</sup>) (Meyer et al. 2007).

Έχουν βρεθεί οκτώ κανάλια που ξεκινούν από το ΣΔΝ και καταλήγουν στον αυλό. Τα πέντε από αυτά λόγω των διαστάσεών τους φαίνεται να μεταφέρουν H<sup>+</sup> (Guskov et al. 2009). Τα πρωτόνια μεταφέρονται σε μικρές αποστάσεις, σε αντίθεση με τα ηλεκτρόνια που μεταφέρονται μεταξύ μεγαλύτερων αποστάσεων. Για αυτό το λόγο, η μεταφορά τους διευκολύνεται από προϋπάρχοντες δεσμούς υδρογόνου (Meyer et al. 2007). Η μεταφορά πρωτονίου από το ΣΔΝ στον αυλό του θυλακοειδούς γίνεται μέσω των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των καταλοίπων της πρωτεΐνης και μορίων H<sub>2</sub>O. Το Ca<sup>2+</sup> και το Cl<sup>-</sup> σχετίζονται με τη διατήρηση του δικτύου των δεσμών υδρογόνου και η απομάκρυνσή τους διαταράσσει τη μεταφορά H<sup>+</sup> (McEvoy & Brudvig 2006).

#### 2.4.5 Οι μεταβατικές καταστάσεις S<sub>n</sub>Y<sub>Z</sub><sup>•</sup>

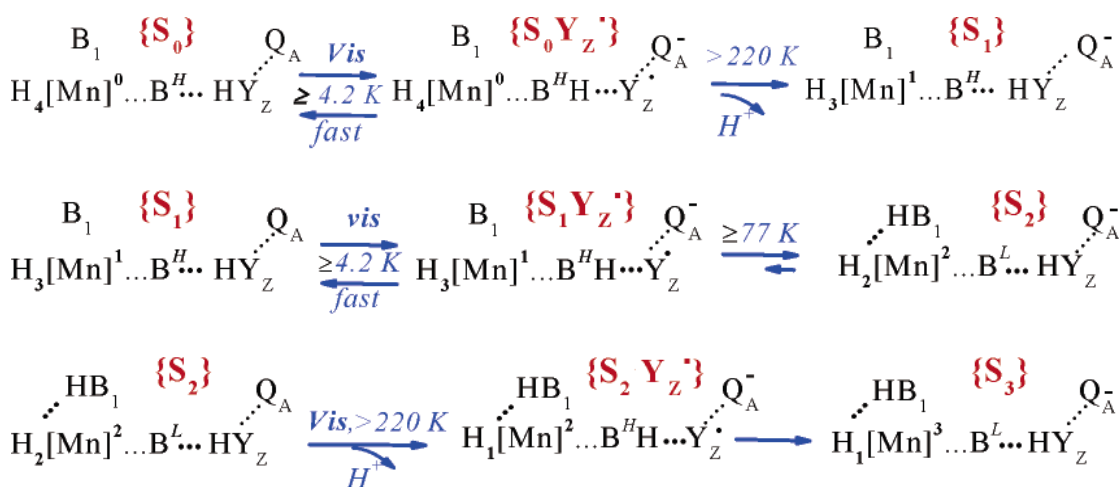
Τη μελέτη του τρόπου απόσπασης ηλεκτρονίου και πρωτονίου από το ΣΔΝ έχει βοηθήσει η μελέτη των μεταβατικών καταστάσεων S<sub>n</sub>Y<sub>Z</sub><sup>•</sup>, οι

οποίες είναι ενδιάμεσα των καταστάσεων S, που δημιουργούνται όταν η Tyr<sub>Z</sub> οξειδωθεί από το P680<sup>+</sup> και πριν αναχθεί από το ΣΔΝ:



Στην εικόνα 2.11 παρουσιάζεται ένα μοντέλο απόσπασης πρωτονίων και ηλεκτρονίων από το ΣΔΝ για τις μεταβάσεις S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>, S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>, που υποστηρίζει το “proton-rocking model” (Petrouleas et al. 2005). Το H<sup>+</sup> της Tyr<sub>Z</sub> μετακινείται προς την βάση B, την His<sup>190</sup>, και στην συνέχεια επιστρέφει στην Tyr<sub>Z</sub>, κατά την οξείδωση και αναγωγή της, αντίστοιχα.

Οι μεταβάσεις S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> και S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub> απαιτούν υψηλή θερμοκρασία (220 K) για την πραγματοποίησή τους, πιθανόν λόγω κινητικών περιορισμών που επιβάλλει η μετακίνηση H<sup>+</sup> προς τον αυλό (Styring & Rutherford 1988).



Εικόνα 2.11: Μοντέλο απόσπασης ηλεκτρονίου και πρωτονίου από το ΣΔΝ κατά τις μεταβάσεις S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>, S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>. B<sup>H</sup>, B<sup>L</sup>: βάση B σε κατάσταση υψηλού και χαμηλού pK, αντίστοιχα. Η βάση B αντιστοιχεί στην D1-His<sup>190</sup> και βάση B<sub>1</sub> στο D1-Glu<sup>189</sup>. (Από Petrouleas et al. 2005).

Η μετάβαση S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub> μπορεί να γίνει και σε χαμηλότερη θερμοκρασία (77 K) επειδή δεν αποσπάται H<sup>+</sup> προς τον αυλό, αλλά μετακινείται προς μια βάση B<sub>1</sub>, που προτείνεται ότι είναι το D1-Glu<sup>189</sup>, υποκαταστάτης του Mn. Το υψηλό φορτίο που συσσωρεύεται στο ΣΔΝ προκαλεί μείωση του pK της

ιστιδίνης, δηλαδή της ικανότητας να έλκει προς το μέρος της το  $H^+$ . Ως συνέπεια, η  $S_2YZ'$  απαιτεί θερμοκρασίες  $>77\text{ K}$  για τον σχηματισμό της (Ioannidis et al. 2006), ενώ οι μεταβατικές καταστάσεις  $S_0YZ'$  και  $S_1YZ'$  δημιουργούνται ακόμη και στους  $4.2\text{ K}$ . Πιθανότατα η δημιουργία της  $S_2YZ'$  απαιτεί γενικότερη αναδιάταξη του τοπικού φορτίου, ενώ στις άλλες δύο περιπτώσεις απαιτείται απλώς μετακίνηση του πρωτονίου από την τυροσίνη προς τη γειτονική βάση.

#### 2.4.6 Ο μηχανισμός διάσπασης του $H_2O$

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για την διάσπαση του νερού. Παραθέτουμε συνοπτικά δύο από αυτά.

Από τη δομή του συμπλόκου του Mn φαίνεται ότι πιθανά υποστρώματα για τη διάσπαση του νερού είναι τα νερά W2, W3 και το O5 [εικόνα 2.6] (Umeha et al. 2011). Το W2 είναι συνδεδεμένο με το μοναχικό Mn, το Mn4, το W3 είναι συνδεδεμένο με το Ca και το O5 συνδέει το Mn4 με το Ca, το Mn3 και το Mn1.

Στον παρακάτω μηχανισμό τα μόρια νερού – υποστρώματα είναι συνδεδεμένα το ένα στο Mn4 και το άλλο στο Ca (Sproviero et al. 2008) [εικόνα 2.12].

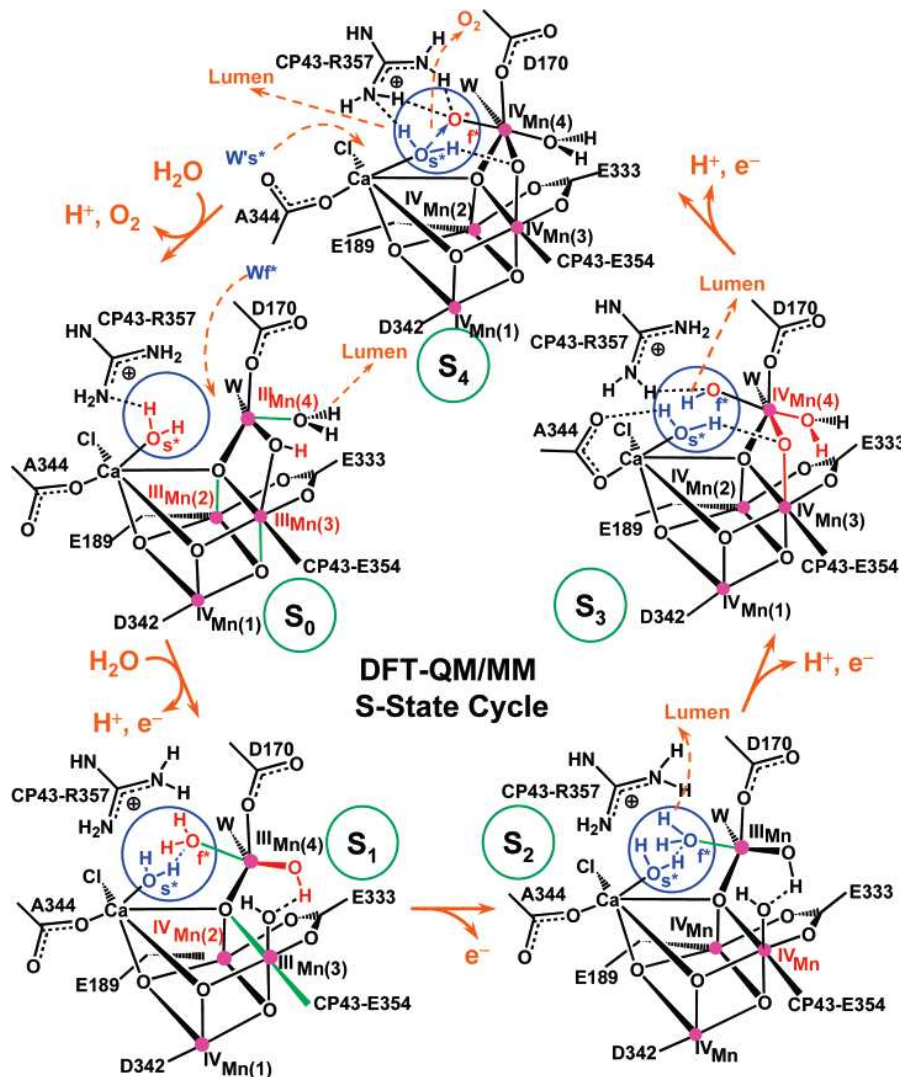
Κατά την μετάβαση  $S_0 \rightarrow S_1$  οξειδώνεται το Mn<sub>2</sub>, απομακρύνεται ένα  $H^+$  από το Mn<sub>4</sub> και ταυτόχρονα ένα μόριο  $H_2O$  υποστρώματος προσδένεται πάνω του. Η αποβολή  $H^+$  από το Mn<sub>4</sub> έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση της μιας  $\mu$ -οξο-γέφυρας που συνδέει τα Mn<sub>3</sub>-Mn<sub>4</sub>.

Κατά τη μετάβαση  $S_1 \rightarrow S_2$  οξειδώνεται το Mn<sub>3</sub>, χωρίς να γίνει αποβολή  $H^+$ , επομένως το ΣΔN φορτίζεται θετικά.

Κατά τη μετάβαση  $S_2 \rightarrow S_3$  απομακρύνεται ένα  $H^+$  από το  $H_2O$  που είναι προσδεδεμένο στο Mn<sub>4</sub> και το Mn<sub>4</sub> οξειδώνεται. Ως αποτέλεσμα, ξαναδημιουργείται η  $\mu$ -οξο-γέφυρα μεταξύ των Mn<sub>3</sub>-Mn<sub>4</sub> που καταστράφηκε κατά τη μετάβαση  $S_0 \rightarrow S_1$ .

Κατά τη μετάβαση  $S_3 \rightarrow S_4$  απομακρύνεται και το δεύτερο  $H^+$  του  $H_2O$  που συνδέεται με το  $Mn_4$  και δημιουργείται ρίζα  $O^\cdot$ .

Τέλος, κατά τη μετάβαση  $S_4 \rightarrow S_0$  σχηματίζεται το  $O_2$  με πυρηνόφιλη προσβολή του  $H_2O$  που είναι προσδεμένο με το  $Ca$  στη ρίζα  $O^\cdot$ . Για να γίνει αυτό, τα  $H^+$  του πρώτου μορίου  $H_2O$  απομακρύνονται το ένα προς τον αυλό μέσω της  $CP43-Arg^{357}$  και το άλλο στην  $\mu$ -οξο-γέφυρα μεταξύ των  $Mn_3-Mn_4$ .



Εικόνα 2.12: Ο κύκλος των  $S$ -καταστάσεων, όπως έχει προταθεί με μοντέλα DFT QM/MM. Οι μεταβολές που γίνονται σε κάθε μετάβαση επισημαίνονται με κόκκινο και διακεκομμένες γραμμές, τα μόρια  $H_2O$  που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα βρίσκονται σε μπλε κύκλο, οι δεσμοί που έχουν επιμηκυνθεί λόγω παραμόρφωσης Jahn-Teller είναι σχεδιασμένοι με πράσινο χρώμα. (Από *Sproviero et al. 2008*).

Ένα άλλο μοντέλο (Siegbahn 2009) [εικόνα 2.13] προτείνει ότι αντιδρά μία ρίζα O<sup>•</sup> με μια μ-οξο-γέφυρα (που αντιστοιχεί στο O5, το οποίο φαίνεται να παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα).

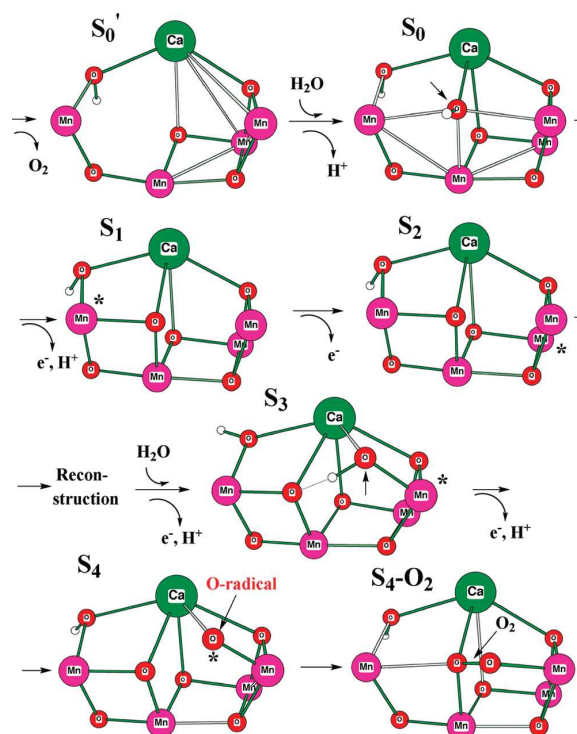
Αρχικά, προσδένεται ένα μόριο νερού, αποβάλλοντας ταυτόχρονα ένα H<sup>+</sup> και σχηματίζεται έτσι η S<sub>0</sub>. Η θέση που καταλαμβάνει αυτό το νερό (βέλος στην εικόνα ) αντιστοιχεί στη θέση του O5.

Κατά τη μετάβαση S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> οξειδώνεται το Mn4 και αποβάλλεται το H<sup>+</sup> του OH<sup>-</sup>, που προσδέθηκε προηγουμένως, προς τον αυλό.

Κατά τη μετάβαση S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub> οξειδώνεται το Mn1.

Κατά τη μετάβαση S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub> προσδένεται ένα νέο μόριο H<sub>2</sub>O, αποβάλλοντας H<sup>+</sup>, για να χωρέσει το νερό αυτό γίνεται αναδιάταξη του συμπλόκου. Στην S<sub>3</sub> όλα τα Mn έχουν αριθμό οξειδωσης IV.

Κατά τη μετάβαση S<sub>3</sub>→S<sub>4</sub> απομακρύνεται ένα H<sup>+</sup> και ένα ηλεκτρόνιο από το OH<sup>-</sup> και στη συνέχεια η ρίζα O<sup>•</sup> αντιδρά με την μ-οξο-γέφυρα που προήλθε από το πρώτο νερό σχηματίζοντας O<sub>2</sub>. Το O<sub>2</sub> ελευθερώνεται και ο κύκλος ξεκινάει από την αρχή, από την S<sub>0</sub>.



Εικόνα 2.13: Ο κύκλος των S-καταστάσεων. Με αστεράκι σημειώνεται το άτομο που οξειδώνεται κάθε φορά. (Από Siegbahn 2009).

### 3. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ EPR

#### 3.1 Εισαγωγή

Με την φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance, EPR) ανιχνεύονται ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια.

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 απ' την φύση της χημικής ενώσεως και προσδιορίζονται με απορρόφηση μικροκυματικής ακτινοβολίας. Η φασματοσκοπία EPR αποτελεί ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο στη μελέτη των φωτοχημικών αντιδράσεων της Φωτοσύνθεσης.

#### 3.2 Σπιν και μαγνητική ροπή

Η συνολική στροφορμή του ηλεκτρονίου σε ένα άτομο οφείλεται στην τροχιακή στροφορμή ( $L$ ) και στην ιδιοστροφορμή ή σπιν ( $S$ ). Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις η πρώτη συνεισφέρει ελάχιστα στον παραμαγνητικό συντονισμό.

Η συνιστώσα  $S_z$  του σπιν [εικόνα 3.1], 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 ιδιοστροφορμής του, το ηλεκτρόνιο έχει μαγνητική ροπή, η οποία δίνεται από τον τύπο:

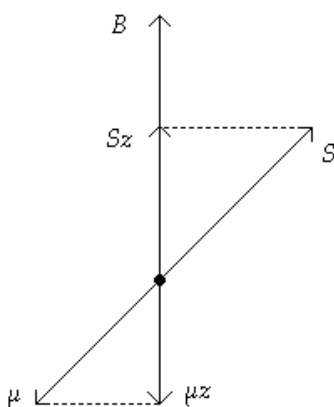
$$\vec{\mu} = \gamma \vec{S}$$

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

$e$ : φορτίο του ηλεκτρονίου,

$m$ : μάζα του ηλεκτρονίου,

$c$ : ταχύτητα του φωτός.



**Εικόνα 3.1: Μαγνητικό πεδίο, σπιν και μαγνητική ροπή.**

Η συνιστώσα  $\mu_z$  της μαγνητικής ροπής είναι αντίρροπη με την  $S_z$  και ισούται με:

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

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

$g_e = 2.002319\dots$  : παράγοντας *Lande*.

### 3.3 Το φαινόμενο Zeeman

Όταν ένα ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε μαγνητικό πεδίο, η μαγνητική ροπή του προσανατολίζεται ομόρροπα ή αντίρροπα με το εξωτερικό πεδίο. Επομένως, δημιουργούνται δύο ενεργειακές στάθμες με  $m_s = \pm 1/2$ . Η ομόρροπη διευθέτηση 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,  $\theta$ : γωνία μεταξύ  $B$  και  $\mu_z$ .

Αν αντικαταστήσουμε την  $\mu_z$  τότε προκύπτει η εξίσωση:

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

Το παραπάνω ονομάζεται φαινόμενο Zeeman και προκαλεί άρση του εκφυλισμού των ενεργειακών καταστάσεων του σπιν.

### 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 3.2]. Για να γίνει αυτό θα πρέπει:

1. Να ικανοποιείται η συνθήκη συντονισμού:

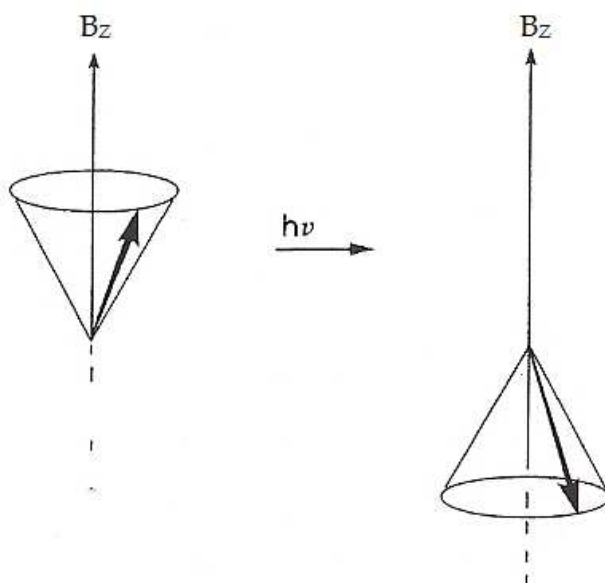
$$\Delta E = h\nu_0 = g_e \beta_e B_0$$

$\nu_0$ ,  $B_0$ : συχνότητα και μαγνητικό πεδίο για τα οποία επιτυγχάνεται συντονισμός. Η κατάλληλη συχνότητα για να γίνουν μεταβάσεις αντιστοιχεί στην περιοχή των μικροκυμάτων.



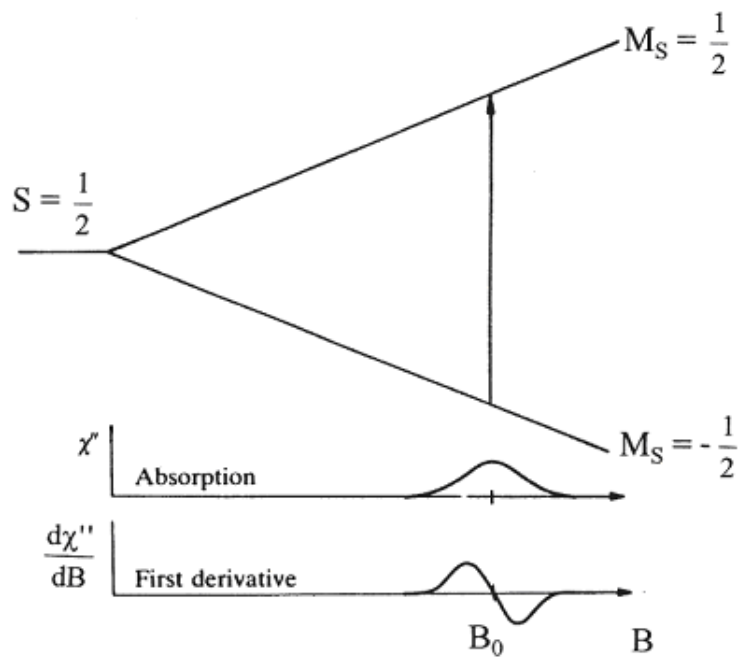
2. Η μαγνητική συνιστώσα  $B_1$  του κύματος να είναι κάθετη στο μαγνητικό πεδίο  $B$  και

3.  $|\Delta m_S|=1$ , επειδή το απορροφούμενο φωτόνιο έχει μια μονάδα στροφορμής ( $\hbar$ ).



**Εικόνα 3.2:** 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 3.3].

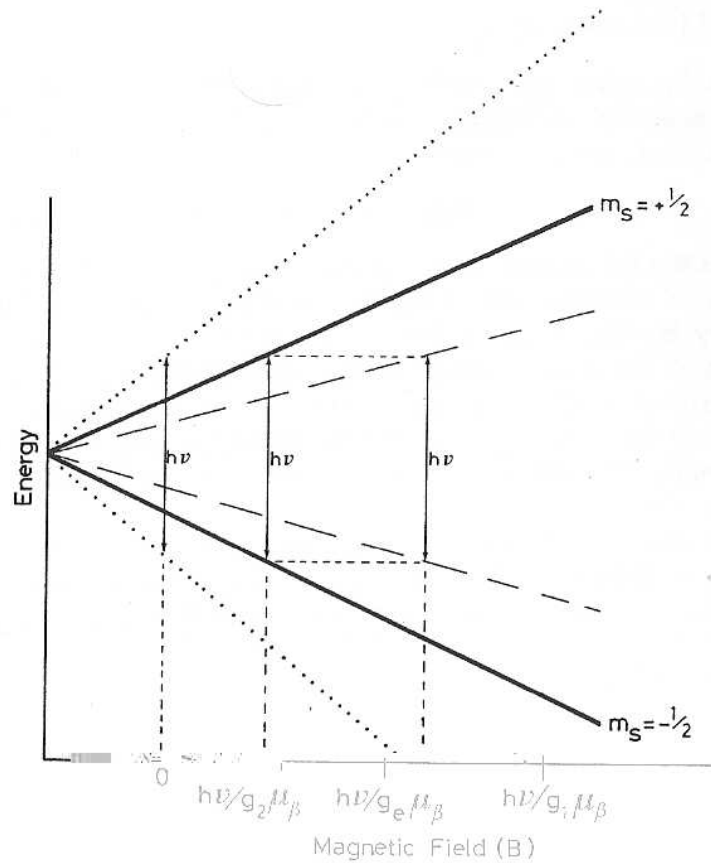


Εικόνα 3.3: Διάγραμμα ενέργειας για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο ( $S = \frac{1}{2}$ ) συναρτήσει του μαγνητικού πεδίου, που δείχνει την απορρόφηση EPR. Απορρόφηση EPR και η πρώτη παράγωγος της συναρτήσει του μαγνητικού πεδίου.

### 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.

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



**Εικόνα 3.4:** Η επίδραση του μαγνητικού πεδίου στις ενεργειακές καταστάσεις του σπιν. Η παχιά γραμμή αντιστοιχεί σε ηλεκτρόνιο χωρίς τροχιακή στροφορμή, η διακεκομμένη σε ρίζα με διεγερμένη κατάσταση χωρίς ηλεκτρόνια, ενώ η διάστικτη σε ρίζα όπου η διεγερμένη κατάσταση είναι συμπληρωμένη.

Αποκλίσεις από την τιμή του  $g_e$  οφείλονται στην σύζευξη σπιν – τροχιακής στροφορμής. Στις περισσότερες ρίζες δεν υπάρχει τέτοια σύζευξη επειδή το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο είναι σε τροχιακό απομακρυσμένο από τις ενεργειακές στάθμες. Όταν όμως, οι διεγερμένες στάθμες αναμιγνύονται με την θεμελιώδη υπάρχει σύζευξη σπιν – τροχιακής στροφορμής. Σε αυτή την περίπτωση αν η υποστοιβάδα είναι λιγότερο από μισογεμάτη και 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 4]. 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). Ισχύει  $g_{xx} = h\nu / \beta B_x$  κοκ. Αν το σύστημα είναι ισοτροπικό:  $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$ . Αν το σύστημα έχει αξονική συμμετρία:  $g_{xx} = g_{yy} = g_{\perp}$  και  $g_{zz} = g_{\parallel}$ .

### 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
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. στοιχεία μετάπτωσης. Τα στοιχεία μετάπτωσης μπορεί να έχουν περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια.
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.

### 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,  $\Delta t$ , συνδέεται με το εύρος αυτής της κατάστασης,  $\Delta E$ , με την εξίσωση της αρχής της απροσδιοριστίας του Heisenberg:

$$\Delta E \Delta t \approx \frac{h}{2\pi}$$

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

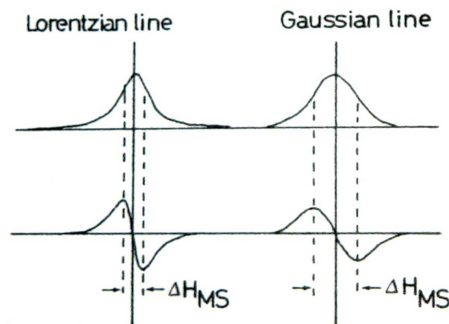
$$\text{όμως, } \Delta \nu = \frac{g\beta}{h} \Delta B$$

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

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

Η δεύτερη αιτία διαπλάτυνσης 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 διαπλάτυνση ενώ τα πεδία που αλλάζουν στο χώρο μη ομογενή διαπλάτυνση.

Τα φάσματα με ομογενή διαπλάτυνση έχουν λορεντζιανή μορφή, ενώ τα φάσματα με μη ομογενή διαπλάτυνση γκαουσιανή μορφή [εικόνα 3.5].



Εικόνα 3.5: 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.

### 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, μειώνεται η πληθυσμιακή διαφορά μεταξύ των καταστάσεων Zeeman και επομένως μειώνεται και η ένταση του σήματος EPR.

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

### 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,

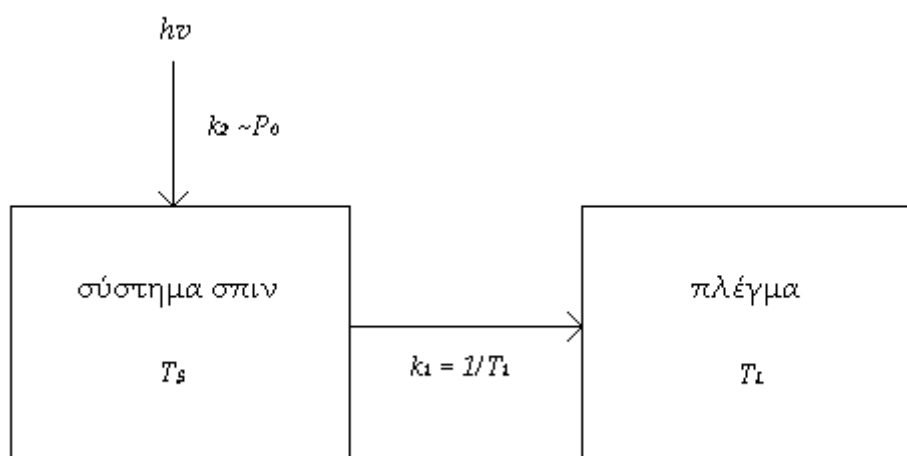
$T_L$ : απόλυτη θερμοκρασία πλέγματος,

$k$ : σταθερά Boltzmann,

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

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.



**Εικόνα 3.6: Ροή ενέργειας ανάμεσα στην μικροκυματική ακτινοβολία, το σύστημα σπιν και το πλέγμα.**

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 διαπLATύνεται και δεν φαίνεται.

### 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  $m_I$ ,



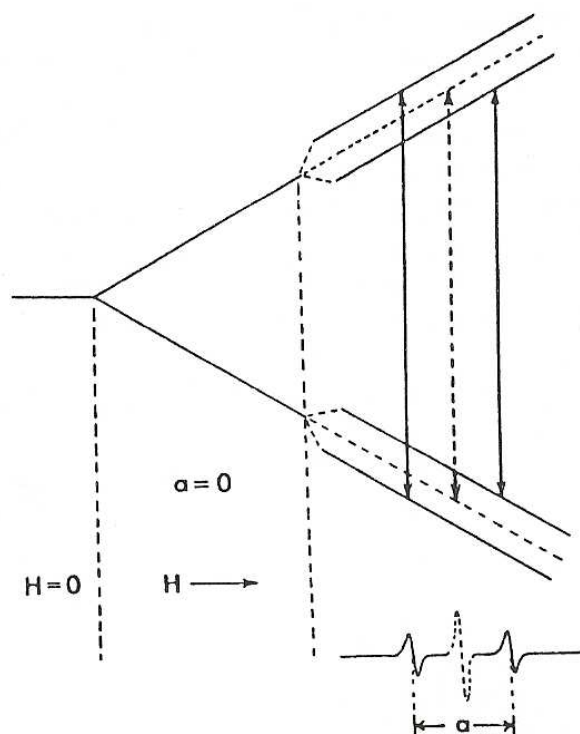
που παίρνει τιμές  $(-I, -I+1, \dots, I-1, I)$ . Επομένως, για σπιν  $I$  δημιουργούνται  $2I+1$  ενεργειακές στάθμες.

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 3.7: Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων σε ένα σύστημα με  $S = I = 1/2$ . Με διακεκομμένες γραμμές φαίνονται οι ενεργειακές στάθμες και η  $\Delta E$  για  $S = 1/2, I = 0$ . Από κάτω φαίνεται το αντίστοιχο φάσμα EPR. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται το φάσμα για  $S = 1/2, I = 0$ , 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.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 4.1 Απομόνωση και επεξεργασία δειγμάτων φωτοσυστήματος II

Για την παρασκευή δειγμάτων ΦΣ II χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες θυλακοειδών από χλωροπλάστες σπανακιού. Η απομόνωση έγινε με την μέθοδο των Berthold, Babcock και Yokum (*Berthold et al. 1981*) (μεμβράνες BBY) με κάποιες τροποποιήσεις (*Ford & Evans 1983*).

##### 4.1.1 Σύσταση Διαλυμάτων

###### *Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης*

400 mM σουκρόζη

15 mM NaCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

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 MgCl<sub>2</sub>

40 mM MES (pH = 6.5)

###### *Διάλυμα TRITON*

Ρυθμιστικό διάλυμα εκπλύσεως

20% κ.ο. Triton X-100

#### 4.1.2 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 4 °C. Το ίζημα επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και φυγοκεντρείται για 10 min σε 10000 g στους 4 °C. 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 0 °C 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 1.1β].

5. Το αιώρημα φυγοκεντρείται σε 10000 g στους 3 °C για 5 min. Το ίζημα περιέχει άμυλο, πρωτεΐνες και DNA.

6. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται για 30 min στους 2 °C 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.

#### 4.1.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της χλωροφύλλης:

1. Το αιώρημα των μεμβρανών εκχυλίζεται σε διάλυμα με 80% ακετόνη και 20% νερό.
2. Φυγοκεντρείται σε χαμηλές στροφές.
3. Μετράται η απορρόφηση του υπερκλειμένου στα 663 nm και 645 nm (μέγιστα απορρόφησης των chl<sub>a</sub> και β αντίστοιχα).

Η ολική συγκέντρωση χλωροφύλλης δίνεται από τη σχέση:

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

όπου  $A_{645}$  και  $A_{663}$  είναι η απορρόφηση στα 645 και 663 nm, αντίστοιχα.

#### 4.1.4 Φωτισμός δειγμάτων

Για τον συνεχή φωτισμό των δειγμάτων χρησιμοποιείται λυχνία ισχύος 360 W, αφού μπροστά της τοποθετηθεί φίλτρο για το IR. Ο φωτισμός των δειγμάτων έξω από την κοιλότητα γίνεται σε γυάλινο θερμομονωτικό δοχείο με ακετόνη, η θερμοκρασία της οποίας ρυθμίζεται με υγρό άζωτο.

Για το φωτισμό των δειγμάτων με παλμό χρησιμοποιήθηκε λαμπτήρας ισχύος 1200 W και διάρκειας παλμού 2 ms. Για τον φωτισμό του δείγματος μέσα στην κοιλότητα τοποθετείται οπτική ίνα μπροστά στον λαμπτήρα.

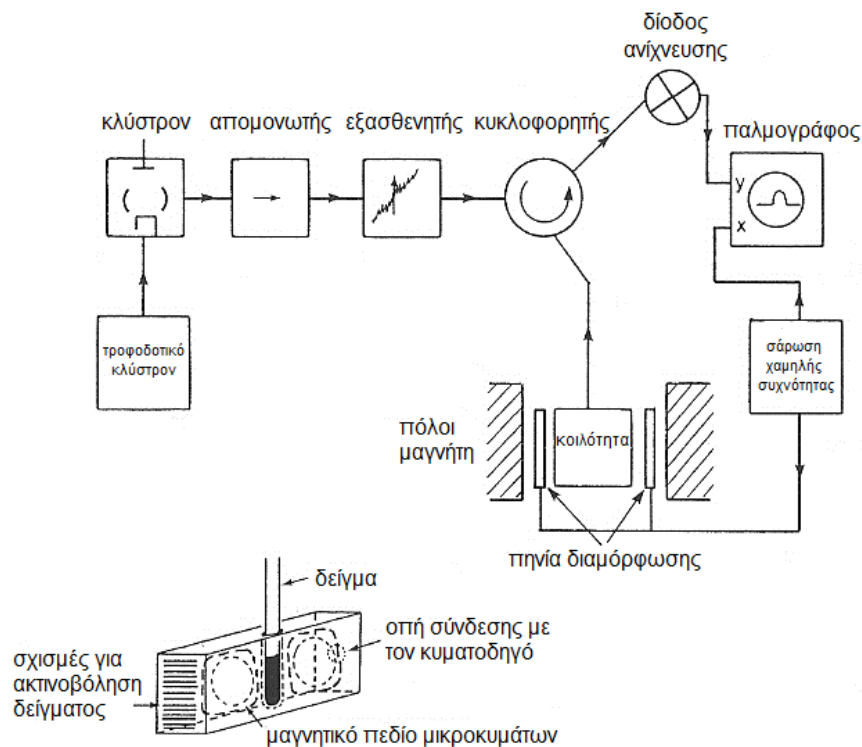
#### 4.1.5 Προσθήκη γλυκερόλης στα δείγματα

1. Το δείγμα φυγοκεντρείται σε 20.000 g σε θερμοκρασία 4° C με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 50% γλυκερόλη v/v, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> και 40 mM MES (pH = 6.5). Η φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά.

2. Το ίζημα αραιώνεται με το παραπάνω ρυθμιστικό ώστε η συγκέντρωση να είναι 4-6 mg chl/mL.

#### 4.2 Φασματόμετρο EPR

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο EPR τύπου Bruker ER 200D-SRC, το οποίο αναβαθμίστηκε εκτεταμένα στο εργαστήριο. Για τις μετρήσεις χαμηλών θερμοκρασιών χρησιμοποιήθηκε κρυοστάτης τύπου ESR-900 της εταιρίας OXFORD INSTRUMENTS.



Εικόνα 43.1: Σχηματική απεικόνιση ενός απλού φασματομέτρου EPR και μιας κοιλότητας συντονισμού.

Στην *εικόνα 4.1* φαίνεται ένα απλοποιημένο διάγραμμα του φασματομέτρου EPR. Το δείγμα τοποθετείται στην κοιλότητα συντονισμού, η οποία βρίσκεται ανάμεσα στους πόλους του ηλεκτρομαγνήτη. Τα μικροκύματα παράγονται στην γέφυρα μικροκυμάτων 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. Τα μικροκύματα που ανακλώνται από την κοιλότητα ανιχνεύονται από μια δίοδο.

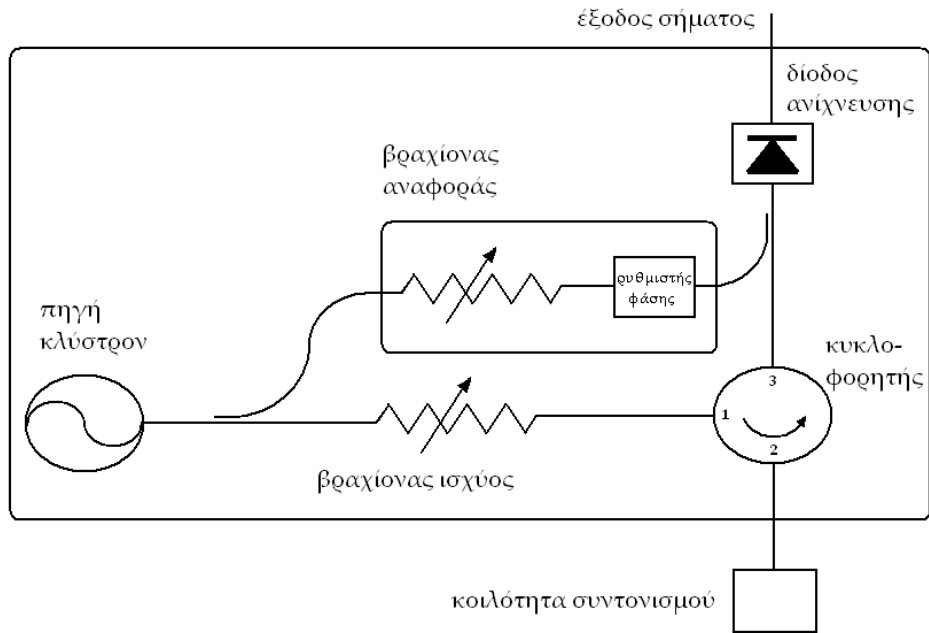
Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικότερα τα μέρη του φασματομέτρου:

#### *4.2.1 Γέφυρα μικροκυμάτων*

Τα μικροκύματα δημιουργούνται σε μια 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 ηλεκτρικό ρεύμα.

Η δίοδος λειτουργεί σωστά όταν το ρεύμα στην έξοδό της είναι ανάλογο της τετραγωνικής ρίζας της ισχύος των μικροκυμάτων και αυτό συμβαίνει σε τιμές ρεύματος περίπου 200  $\mu\text{A}$ . Γι' αυτό υπάρχει ένας βραχίονας αναφοράς που δίνει επιπλέον ισχύ στην δίοδο. Ο βραχίονας αναφοράς έχει έναν ρυθμιστή φάσης ώστε τα μικροκύματα που στέλνει στη δίοδο να βρίσκονται σε φάση με τα μικροκύματα που έρχονται από την κοιλότητα.

Η συχνότητα των μικροκυμάτων είναι 9.408 GHz (X-band) και η συχνότητα διαμόρφωσης 100 KHz.



**Εικόνα 43.2:** Σχηματική απεικόνιση της γέφυρας μικροκυμάτων.

#### 4.2.2 Κοιλότητα συντονισμού

Το δείγμα τοποθετείται στην κοιλότητα συντονισμού, η οποία έχει σχήμα ορθογώνιου παραλληλεπιπέδου με τις κατάλληλες διαστάσεις να ισούνται με πολλαπλάσιο του μισού του μήκους κύματος των μικροκυμάτων. Μ' αυτό τον τρόπο δημιουργούνται στάσιμα κύματα και η πυκνότητα της ενέργειας είναι χιλιάδες φορές υψηλότερη μέσα στην κοιλότητα από ό,τι στον κυματοδηγό. Το μαγνητικό πεδίο της ακτινοβολίας ταλαντώνεται κάθετα στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.

#### 4.2.3 Μαγνήτης

Το μαγνητικό πεδίο στο χώρο του δείγματος δημιουργείται από ηλεκτρομαγνήτη και μπορεί να φτάσει μέχρι και 1.3 T. Η ένταση του



μαγνητικού πεδίου μετράται με NMR μαγνητόμετρο τις Bruker. Στους πόλους του μαγνήτη είναι τοποθετημένα δύο ζεύγη πηνίων Helmholtz.

Το πρώτο αυξάνει το λόγο σήματος/θόρυβο δημιουργώντας 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. Μ' αυτό τον τρόπο, τελικά, καταγράφουμε την πρώτη παράγωγο της απορροφούμενης μικροκυματικής ισχύος συναρτήσεως του μαγνητικού πεδίου.

Το 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.

#### 4.2.4 Ανιχνευτής 'Lock in'

Ο ανιχνευτής 'Lock in' λαμβάνει το σήμα από τη γέφυρα ενισχυμένο και διαμορφωμένο, διαμορφώνει το μαγνητικό πεδίο και τα στέλνει στον υπολογιστή.

#### 4.2.5 Ηλεκτρονικός υπολογιστής

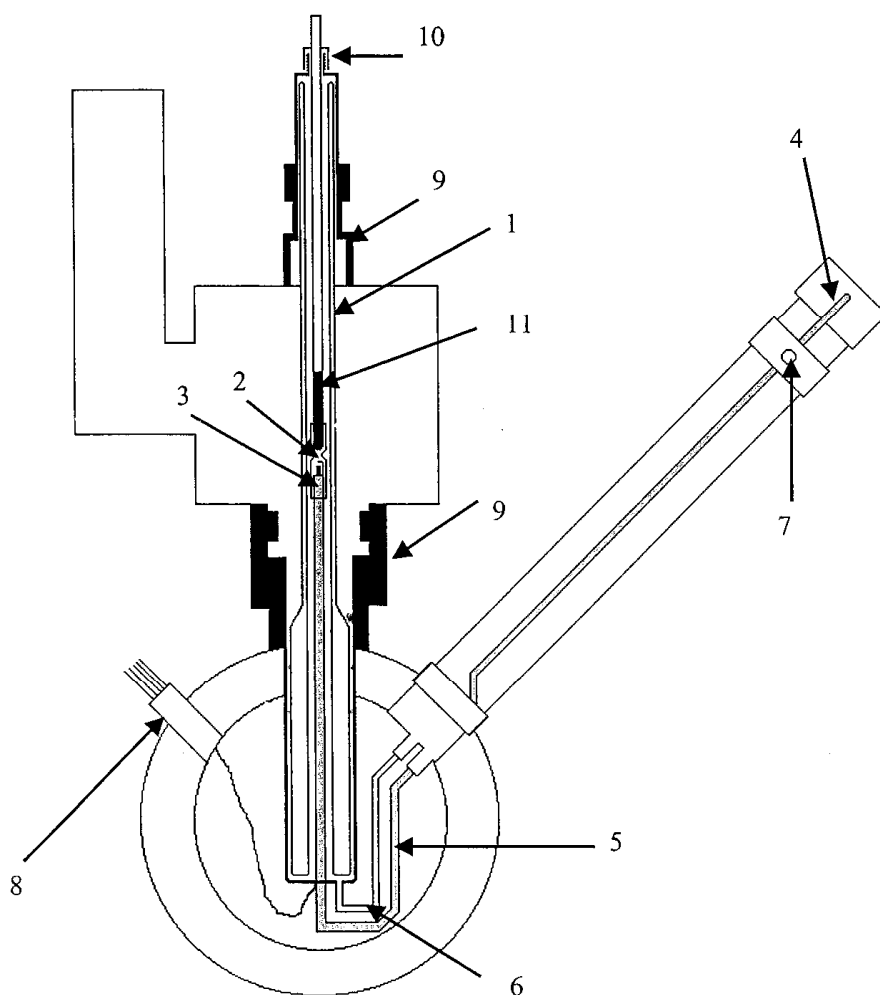
Τα φάσματα που έρχονται από τον ανιχνευτή 'Lock in' καταγράφονται στον υπολογιστή μέσω του προγράμματος Labview, στο οποίο είναι ενσωματωμένος ο ρυθμιστής πεδίου και η μονάδα χρόνου.

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.

Στα πειράματα με γρήγορη σάρωση (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.

### **4.3 Κρυοστάτης**

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.



Εικόνα 4.3: Σχηματική απεικόνιση του κρουστάτη. (1) κυρίως σώμα κρουστάτη (WILMAD). Αποτελείται από χαλαζία υψηλής καθαρότητας, για να μη δίνει σήμα EPR. Έχει διπλά τοιχώματα και φέρει άνοιγμα απ' 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 αερίου 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 κρουστάτη πάνω στην κοιλότητα συντονισμού, (10) είσοδος δείγματος και διάταξη στεγανοποίησης εισόδου, (11) δείγμα.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

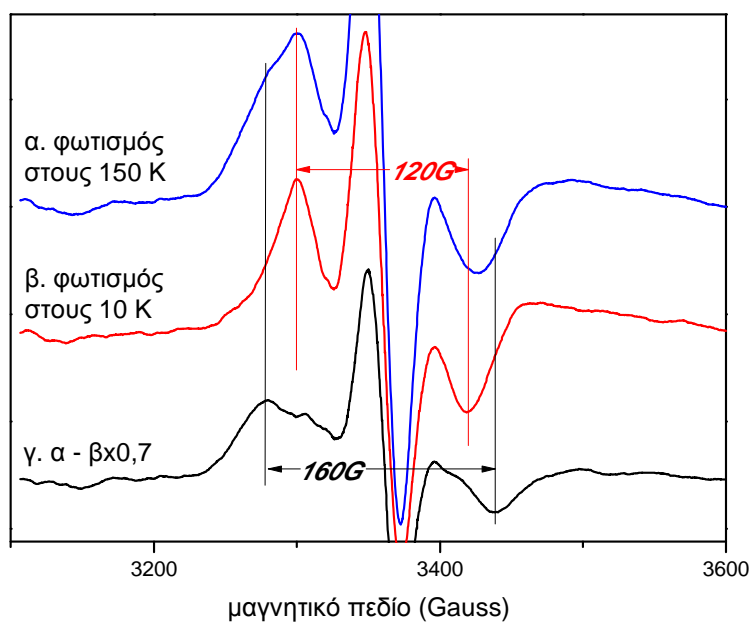
Τα αποτελέσματα είναι χωρισμένα σε δύο υποκεφάλαια. Το πρώτο αναφέρεται στην παγίδευση της βραχύβιας μεταβατικής κατάστασης  $S_2Yz'$  σε θερμοκρασίες 10 K – 150 K, ενώ το δεύτερο στην μελέτη των μεταβολών, που πραγματοποιούνται στο σύμπλοκο διάσπασης του νερού κατά τη διάρκεια της μετάβασης  $S_2 \rightarrow S_3$ .

### 5.1 Οι δύο διαμορφώσεις της μεταβατικής κατάστασης $S_2Yz'$

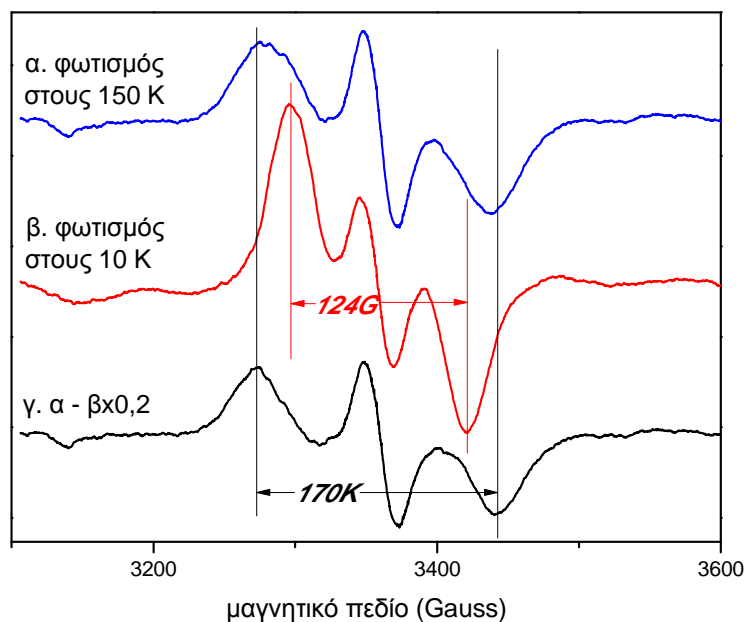
#### 5.1.2 Το φάσμα της $S_2Yz'$ στους 10 K μετά από φωτισμό στους 150 K σε δείγματα χωρίς και με γλυκερόλη

Η  $S_2Yz'$  δεν μπορεί να δημιουργηθεί με φωτισμό στους 10 K, λόγω θερμικών περιορισμών, που οφείλονται στο θετικό φορτίο του συμπλόκου του Mn στην  $S_2$  (βλέπε υποκεφάλαιο 2.4.5). Μπορεί, όμως, να παγιδευτεί με φωτισμό σε θερμοκρασίες 77 K – 190 K και γρήγορο πάγωμα στους 10 K (Ioannidis et al. 2006), όπου και επανασυνδέεται με χρόνο ημιζωής της τάξης μερικών min.

Το φάσμα του συστήματος μετάλλου-ρίζας με πιο προσεκτική μελέτη, φάνηκε ότι αποτελείται από δύο συνιστώσες: μία φαρδιά και μία στενή. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (~ 77 K – 150 K) φωτισμού επικρατεί η φαρδιά συνιστώσα, ενώ σε ψηλότερες (~180 K – 230 K) η στενή. Με φωτισμό στους 10 K, αφού πέσει το σήμα, που παγιδεύτηκε σε ψηλή θερμοκρασία, δημιουργείται μόνο η στενή συνιστώσα.



**Εικόνα 5.1:** Οι δύο διαμορφώσεις της  $S_2Yz'$  σε δείγμα με DCBQ. α. διαφορά του φάσματος που μετρήθηκε 4 περίπου min μετά τον φωτισμό στους 150 K μείον το αρχικό σκοτάδι, β. διαφορά του φάσματος αμέσως μετά το φωτισμό στους 10 K μείον το αρχικό σκοτάδι. Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW, σταθερά χρόνου: 300 s, χρόνος σάρωσης: 50 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.



**Εικόνα 5.2:** Οι δύο διαμορφώσεις της  $S_2Yz'$  σε δείγμα με 50% γλυκερόλη v/v και DCBQ. α. διαφορά του φάσματος που μετρήθηκε 4 περίπου min μετά τον φωτισμό στους 150 K μείον το τελικό σκοτάδι, β. διαφορά του φάσματος αμέσως μετά το φωτισμό στους 10 K μείον το τελικό σκοτάδι. Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων:

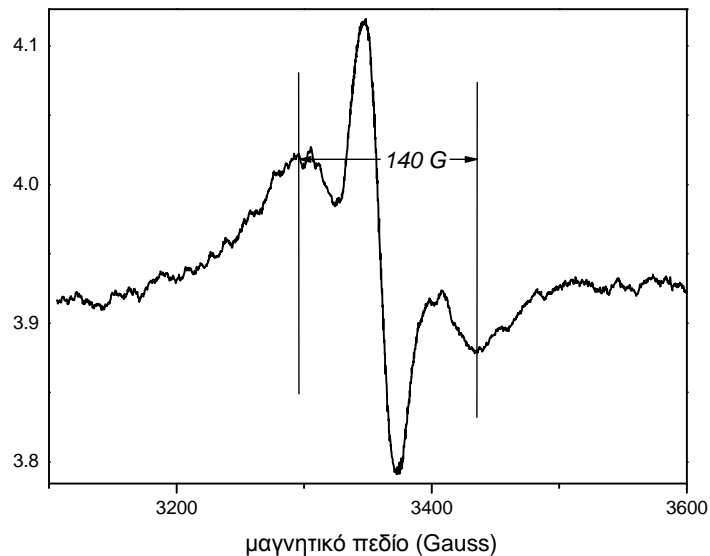
100 mW, σταθερά χρόνου: 300 s, χρόνος σάρωσης: 50 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

Στις εικόνες 5.1 και 5.2 παρουσιάζεται το σήμα που παγιδεύεται με φωτισμό στους 150 K σε δείγματα χωρίς και με γλυκερόλη αντίστοιχα. Με μπλε είναι σχεδιασμένο το σήμα που παγιδεύεται στους 150 K και περιέχει και τις δύο συνιστώσες. Στο απλό δείγμα υπάρχει μεγάλο ποσοστό της στενής συνιστώσας, ενώ στο δείγμα με γλυκερόλη μικρό. Με κόκκινο φαίνεται το σήμα που δημιουργείται με φωτισμό στους 10 K, αφού πέσει το σήμα των 150 K, και αποτελείται από τη στενή συνιστώσα μόνο. Έχει εύρος 120 G στα απλά δείγματα και 124 G στο δείγμα με γλυκερόλη. Με αφαίρεση κατάλληλου ποσοστού του σήματος των 10 K από το σήμα των 150 K παίρνουμε το φάσμα της φαρδιάς συνιστώσας που έχει εύρος 160 G στο απλό δείγμα και 170 G στο δείγμα με γλυκερόλη.

#### *5.1.2 Διαφορές μεταξύ των δειγμάτων χωρίς και με γλυκερόλη*

Το ποσοστό της φαρδιάς και της στενής συνιστώσας που παγιδεύεται σε διάφορες θερμοκρασίες διαφέρει στα απλά δείγματα και στα δείγματα με 50% γλυκερόλη. Στα δείγματα με γλυκερόλη η στενή συνιστώσα παγιδεύεται σε πιο ψηλές θερμοκρασίες (190 K) σε σχέση με τα απλά δείγματα, που παγιδεύεται από τις 130 K. Επίσης, το ποσοστό της στενής συνιστώσας που παγιδεύεται σε δείγματα με γλυκερόλη σε σχέση με το σήμα που παίρνουμε με φωτισμό στους 10 K είναι πιο μικρό από τα απλά δείγματα. Φαίνεται, λοιπόν, ότι στα δείγματα με γλυκερόλη η στενή συνιστώσα πέφτει πιο γρήγορα από ό,τι στα απλά δείγματα και δεν την προλαβαίνουμε.

Σε δείγματα με γλυκερόλη απ' ευθείας φωτισμός στους 10 K στην  $S_2$  επάγει ασθενές σήμα με εύρος 140 G (εικόνα 5.3). Πιθανόν το σήμα προέρχεται από μειονότητα κέντρων, στα οποία το περιβάλλον του συμπλόκου Mn είναι λιγότερο ηλεκτροθετικό λόγω μερικής αποπρωτονίωσης.



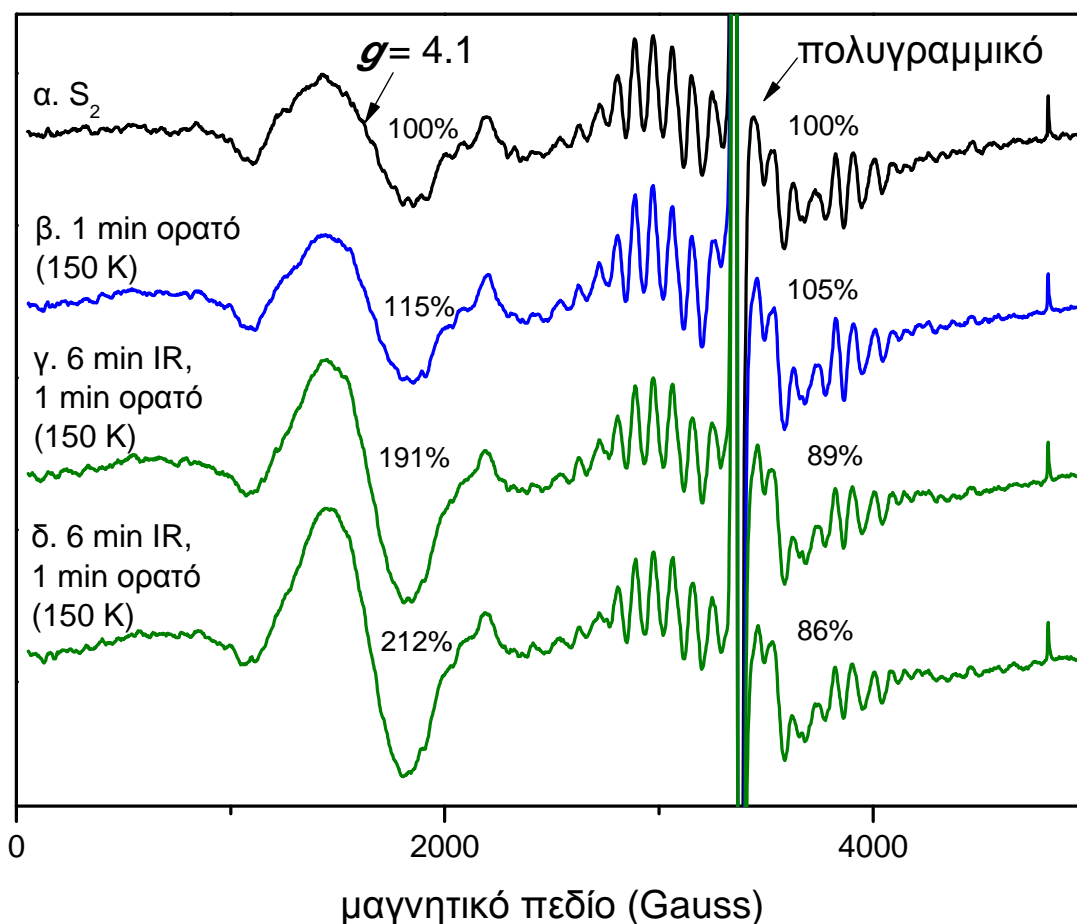
**Εικόνα 5.3:** Το σήμα που δημιουργείται με φωτισμό στους 10 K στην  $S_2$  σε δείγμα με 50% γλυκερόλη και DCBQ. Το φάσμα είναι η διαφορά του φάσματος αμέσως μετά το φωτισμό μείον το τελικό σκοτάδι. Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW, σταθερά χρόνου: 300 s, χρόνος σάρωσης: 50 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

### 5.1.3 Οι δύο συνιστώσες δεν οφείλονται σε ανομοιογένεια της $S_2$

Είναι γνωστή η ανομοιογένεια της κατάστασης  $S_2$ , η οποία εκφράζεται με δύο διαφορετικά φάσματα EPR, το πολυγραμμικό και το  $g = 4.1$ . Η ανομοιογένεια εξαλείφεται παρουσία γλυκερόλης (υπάρχει μόνο το πολυγραμμικό σήμα). Το γεγονός, ότι τόσο η φαρδιά όσο και η στενή συνιστώσα εμφανίζονται και στα δύο είδη δειγμάτων (εικόνες 5.1 και 5.2) συνηγορεί εναντίον της υπόθεσης ότι τα δύο σήματα  $S_2Y_Z'$  οφείλονται σε ανομοιογένεια της  $S_2$ . Έγινε και το πιο κάτω πείραμα:

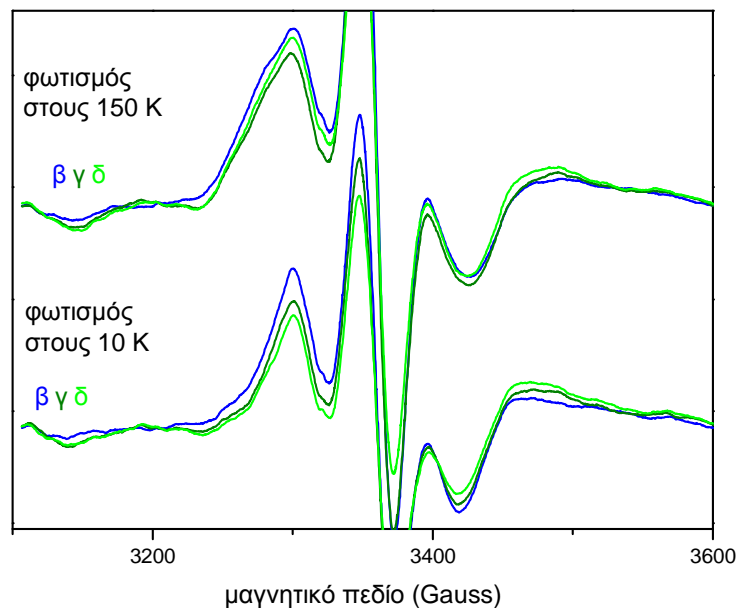
Στην *εικόνα 5.4* φαίνεται ένα πείραμα που έγινε για να φανεί αν οι δύο διαφορετικές συνιστώσες της  $S_2Y_Z'$  οφείλονται στις δύο διαφορετικές διαμορφώσεις του συμπλόκου του Mn στην  $S_2$  (πολυγραμμικό και  $g = 4.1$ ). Με μαύρο είναι σχεδιασμένο το φάσμα της  $S_2$ , όπου φαίνονται τα δύο

διαφορετικά σήματα. Στη συνέχεια το δείγμα φωτίστηκε στους 150 K για 1 min και μετρήθηκε στους 10 K και στη συνέχεια φωτίστηκε στους 150 K για 6 min με υπέρυθρο και κατόπιν για 1 min με λευκό φως. Με τον υπέρυθρο φωτισμό αυξάνεται η  $g = 4.1$  περίπου στο διπλάσιο με μείωση του πολυγραμμικού σήματος. Εάν λοιπόν οι δύο διαφορετικές διαμορφώσεις της  $S_2Y_Z\dot{\cdot}$  οφείλονται στο  $g = 4.1$  και το πολυγραμμικό θα περιμέναμε να δούμε διαφορές στη μορφή ή/και το μέγεθος των δύο συνιστωσών της  $S_2Y_Z\dot{\cdot}$ . Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε. Στην εικόνα 5.5 φαίνονται τα σήματα μετά τον φωτισμό με το λευκό φως (μπλε) και μετά τον υπέρυθρο φωτισμό (πράσινο), τα επάνω φάσματα είναι αυτά που μετρήθηκαν αμέσως μετά το πάγωμα, ενώ τα κάτω μετά από φωτισμό στους 10 K. Οι διαφορές είναι ασήμαντες.



Εικόνα 5.4: α.  $S_2$ : 30 min φωτισμός τις 77 K για να οξειδωθεί το  $cyt\ b_{559}$ , 35 s σκοτάδι τις  $-8\text{ }^\circ\text{C}$ , 4 min φωτισμός τις  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 sec σκοτάδι τις  $-6\text{ }^\circ\text{C}$ . Το δείγμα έχει DCBQ ως εξωτερική κινόνη. Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 50 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

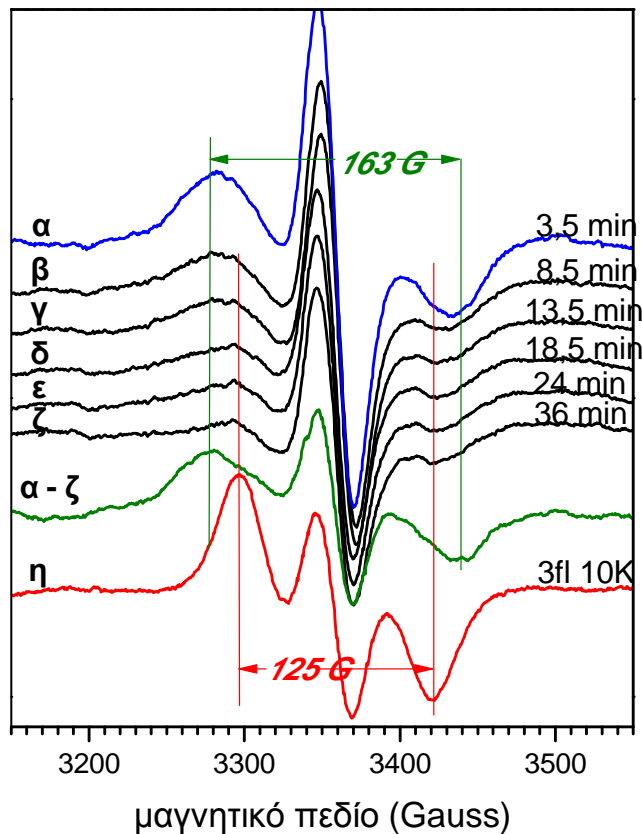




**Εικόνα 5.5:** Τα αντίστοιχα φάσματα της μικρής περιοχής της εικόνας 5.4. Τα επάνω φάσματα είναι ο φωτισμός στους 150 K μείον το αρχικό σκοτάδι, ενώ τα κάτω ο φωτισμός στους 10 K μείον το αρχικό σκοτάδι. Οι ενδείξεις β, γ, δ αντιστοιχούν στα φάσματα της προηγούμενης εικόνας. Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW, σταθερά χρόνου: 300 s, χρόνος σάρωσης: 50 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

#### 5.1.4 Κινητική επανασύνδεσης της $S_2YZ^{\bullet}$ με την $Q_A^-$ στους 10 K

Στην εικόνα 5.6 φαίνεται η κινητική επανασύνδεσης της  $S_2YZ^{\bullet}$  με την  $Q_A^-$  στους 10 K σε δείγμα με γλυκερόλη και PPBQ. Η PPBQ επιβραδύνει την επανασύνδεση, λόγω του ότι οξειδώνει τον σίδηρο, ο οποίος λειτουργεί σαν αποδέκτης του ηλεκτρονίου της  $Q_A^-$ . Με μπλε είναι σχεδιασμένο το φάσμα της  $S_2YZ^{\bullet}$  που παγιδεύεται με φωτισμό στους 150 K. Η φαρδιά συνιστώσα πέφτει πιο γρήγορα και μετά από 36 min έχει πέσει εντελώς, ενώ ένα μικρό ποσοστό της στενής παραμένει. Με κόκκινο είναι σχεδιασμένο το φάσμα μετά τον φωτισμό στους 10 K.

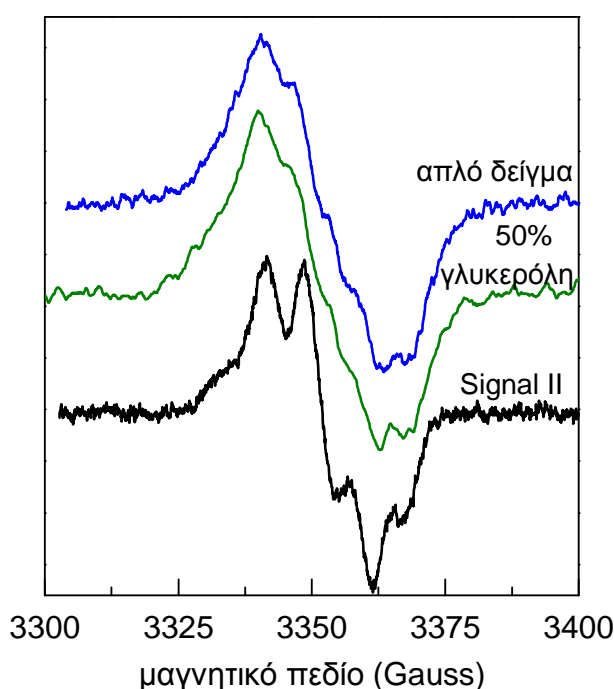


Εικόνα 5.6: Κινητική μείωσης της  $S_2YZ'$ , που δημιουργείται στους 150 K, στους 10 K σε δείγμα με γλυκερόλη και PPBQ. α-ζ: φάσματα, που μετρήθηκαν στους χρόνους που αναγράφονται μετά τον φωτισμό στους 150 K, μείον το αρχικό σκοτάδι, η: φωτισμός στους 10 K μείον το τελικό σκοτάδι. Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW, σταθερά χρόνου: 300 s, χρόνος σάρωσης: 50 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

### 5.1.5 Φάσμα υψηλής ευκρίνειας της $S_2YZ'$ σε δείγματα με 50% γλυκερόλη

Έχει δειχθεί, ότι σε θερμοκρασίες πάνω από τους 77 K η μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ της  $Tyr_z$  και του συμπλόκου Mn μηδενίζεται κατά μέσον όρο λόγω θερμικής αύξησης του ρυθμού χαλάρωσης του σπιν του Mn (Zachariou *et al.* 2007). Αναδεικνύεται έτσι το φάσμα της  $Tyr_z$  αδιατάρακτο απ' το Mn.

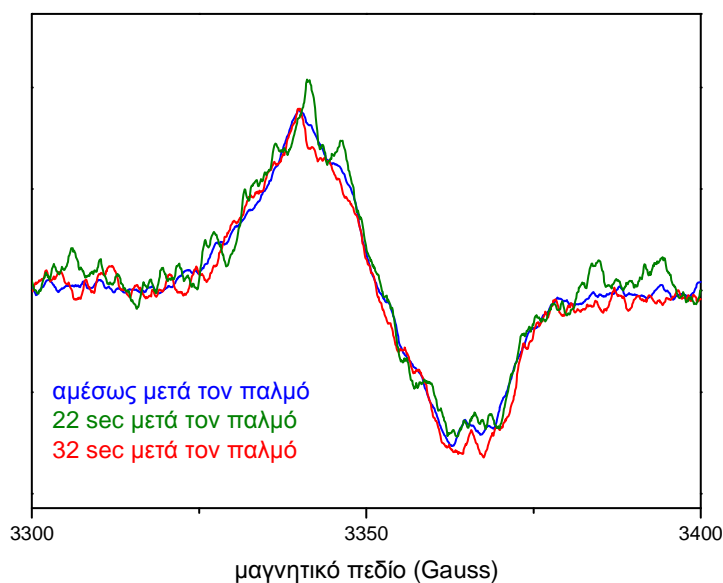
Στην εικόνα 5.7 φαίνεται το φάσμα υψηλής ευκρίνειας της  $Tyr_z$  χρησιμοποιώντας γρήγορη σάρωση μετά από ένα παλμό σε θερμοκρασία 150 K. Με μπλε είναι σχεδιασμένο το φάσμα του απλού δείγματος (Ioannidis et al. 2008) και με πράσινο του δείγματος με γλυκερόλη. Τα δύο φάσματα είναι ίδια και λίγο φαρδύτερα από της τυροσίνης D. Αυτό δείχνει ότι δεν υπάρχει σε αυτή τη θερμοκρασία κάποια διαφορά στο φάσμα της τυροσίνης λόγω των δύο διαφορετικών διαμορφώσεων (αφού τα δύο είδη δειγμάτων έχουν διαφορετικό ποσοστό της κάθε συνιστώσας).



**Εικόνα 5.7:** Το φάσμα της  $S_2Y_z'$  στους 150 K σε δείγμα χωρίς καμία τροποποίηση (Ioannidis et al. 2008) και σε δείγμα με 50% v/v γλυκερόλη, σε σύγκριση με το φάσμα της  $Y_D'$ . Το φάσμα της γλυκερόλης είναι η διαφορά του πρώτου ή δεύτερου φάσματος αμέσως μετά από παλμό φωτός μείον το τελικό σκοτάδι, μέσος όρος 5 πειραμάτων. Συνθήκες EPR: (γρήγορη σάρωση) πλάτος διαμόρφωσης: 4 Gpp, ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW ( $Y_z'$ ) και 0.013 mW ( $Y_D'$ ), συχνότητα μικροκυμάτων: 9.41 GHz, συχνότητα διαμόρφωσης: 100 KHz, εύρος σάρωσης: 100 G, χρόνος σάρωσης: 500 ms, σταθερά χρόνου: 3 ms.

Σε αυτή τη θερμοκρασία η κινητική επανασύνδεσης της  $Tyr_z$  έχει δύο φάσεις, μια αργή και μια γρήγορη. Στους 135 K σε δείγματα με γλυκερόλη

οι χρόνοι ημιζωής της κάθε φάσης είναι 18 s στο 40% των κέντρων και 1.3 s στο 60% των κέντρων (Ioannidis et al. 2008). Για να δούμε αν υπάρχει διαφορά στο φάσμα της κάθε φάσης της κινητικής συγκρίναμε το φάσμα της εικόνας 5.7 με το φάσμα της αργής φάσης της κινητικής και είναι ίδια (εικόνα 5.8). Οπότε, ή και οι δύο διαμορφώσεις έχουν την ίδια κινητική σε αυτή τη θερμοκρασία (μάλλον απίθανο) ή το φάσμα τους είναι το ίδιο.



**Εικόνα 5.8:** Σύγκριση του φάσματος της εικόνας 5.7 (αμέσως μετά τον παλμό, μπλε) με τα φάσματα της αργής συνιστώσας της κινητικής (22 sec (πράσινο) και 32 sec (κόκκινο)). Τα φάσματα είναι κανονικοποιημένα. Συνθήκες EPR: (γρήγορη σάρωση) πλάτος διαμόρφωσης: 4 Gpp, ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW, συχνότητα μικροκυμάτων: 9.41 GHz, συχνότητα διαμόρφωσης: 100 KHz, εύρος σάρωσης: 100 G, χρόνος σάρωσης: 500 ms, σταθερά χρόνου: 3 ms. Θερμοκρασία: 150 K.

### 5.1.6 Συζήτηση

Το φάσμα της μεταβατικής κατάστασης  $S_2Y_Z'$  που δημιουργείται με φωτισμό στους 77 K – 190 K αποτελείται από δύο συνιστώσες: μία φαρδιά (εύρος 160 G στα κανονικά δείγματα και 170 G στα δείγματα με γλυκερόλη), η οποία επικρατεί σε χαμηλές θερμοκρασίες φωτισμού (~ 77 K

– 150 K) και μια στενή (εύρος 120 G στα κανονικά δείγματα και 124 G στα δείγματα με γλυκερόλη) που επικρατεί σε ψηλότερες θερμοκρασίες (~180 K – 230 K). Οι δύο συνιστώσες δεν οφείλονται στην ανομοιογένεια της  $S_2$  (πολυγραμμικό και  $g = 4.1$ ). Προέρχονται και οι δύο από κέντρα που χαρακτηρίζονται από πολυγραμμικό, εφόσον παρατηρούνται και σε δείγματα με γλυκερόλη.

Οι δύο διαφορετικές συνιστώσες φαίνεται να οφείλονται σε διαφορετικές διαμορφώσεις της μεταβατικής κατάστασης  $S_2YZ^\cdot$  και παρουσιάζουν θερμικούς φραγμούς. Η μεταφορά  $H^+$  εξαρτάται από την θερμοκρασία (σταματούν σε χαμηλές θερμοκρασίες) και οι δύο διαφορετικές διαμορφώσεις φαίνεται να σχετίζονται με αυτές. Η φαρδιά συνιστώσα που δημιουργείται με φωτισμό σε πιο χαμηλές θερμοκρασίες οφείλεται σε πιο περιορισμένη μεταφορά  $H^+$ , ενώ σε πιο ψηλές θερμοκρασίες, που δημιουργείται η στενή, γίνονται πιο εκτεταμένες μεταφορές  $H^+$ .

Στην εικόνα 5.9 φαίνεται ένα μοριακό μοντέλο, που εξηγεί τις δύο διαμορφώσεις τις  $S_2YZ^\cdot$ . Η  $Tyr_Z$  συνδέεται με δεσμό υδρογόνου με την  $His^{190}$  και αυτή με τη σειρά της με την  $Asn^{298}$ . Το μήκος των δύο αυτών δεσμών στην  $S_1$  (σ' αυτή την κατάσταση έχει ληφθεί η δομή) είναι 2.5 και 2.6 Å, αντίστοιχα (Umeha et al. 2011). Όταν η  $Tyr_Z$  οξειδώνεται, το  $H^+$  μεταφέρεται προς την  $His^{190}$  και το  $H^+$  της  $His^{190}$  προς την  $Asn^{298}$  (Ioannidis et al. 2008). Η φαρδιά συνιστώσα προέρχεται από κέντρα στα οποία το  $H^+$  πηγαίνει μέχρι την  $His^{190}$ , ενώ σε κέντρα που δίνουν την στενή συνιστώσα μεταφέρεται και το  $H^+$  της  $His^{190}$  προς την  $Asn^{298}$ . Όταν η  $Tyr_Z$  επανασυνδέεται σε θερμοκρασίες υγρού ηλίου, τα κέντρα τα οποία εμφανίζουν την φαρδιά συνιστώσα μεταπίπτουν στην κανονική  $S_2$ , ενώ τα κέντρα τα οποία εμφανίζουν την στενή μεταπίπτουν στην  $S_2^t$ . Η  $S_2^t$  είναι μια διαμόρφωση της  $S_2$ , στην οποία το  $H^+$  της  $His^{190}$  έχει παγιδευτεί στην  $Asn^{298}$ . Το  $pK$  της  $His^{190}$  είναι κατά συνέπεια αυξημένο και ο δεσμός υδρογόνου με την  $Tyr_Z$  ισχυροποιημένος και η ιστιδίνη δρα συνεπώς σαν καλός αποδέκτης του πρωτονίου κατά την οξείδωση της  $Tyr_Z$ . Φωτισμός στους 10 K επάγει ως εκ τούτου μόνο την στενή συνιστώσα του σήματος  $S_2YZ^\cdot$ .

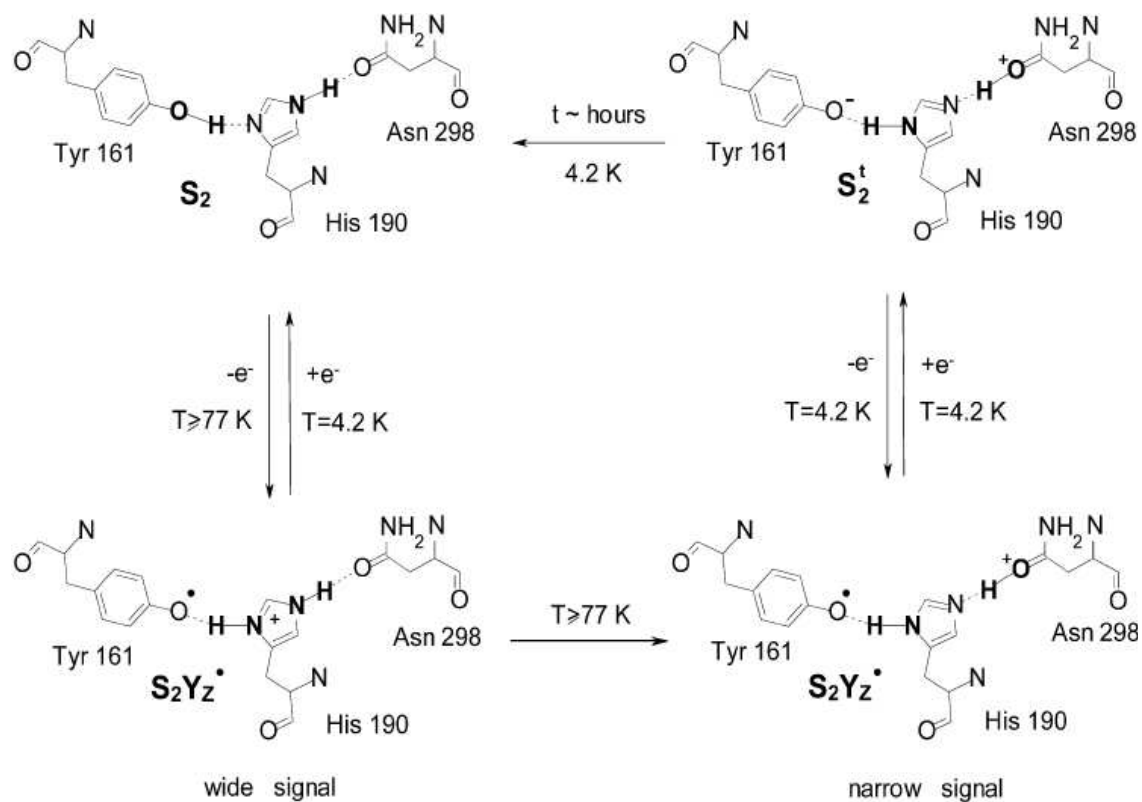
Σύμφωνα με το μοντέλο της εικόνας 5.9, η φαρδιά συνιστώσα είναι μεταβατική κατάσταση πριν δημιουργηθεί η στενή που είναι πιο σταθερή. Κάτι παρόμοιο έχει περιγραφεί και για την τυροσίνη D (*Faller et al. 2003*). Με φωτισμό στους 1.8 K, το περιβάλλον της Tyr<sub>D</sub><sup>•</sup> που δημιουργείται είναι πολύ ηλεκτροθετικό, λόγω του H<sup>+</sup> του δεσμού Tyr<sub>D</sub> – His που βρίσκεται προς τη μεριά της ιστιδίνης. Με επώαση στους 77 K χαλαρώνει το θετικό φορτίο είτε με κίνηση της ιστιδίνης είτε με απομάκρυνση του άλλου H<sup>+</sup> της.

Μια τροποποιημένη S<sub>2</sub>Yz<sup>•</sup>, η S<sub>2</sub>''Yz<sup>•</sup>, έχει παρατηρηθεί στο σκοτάδι στην S<sub>3</sub> σε υψηλό pH στους 5 K (*Geijer et al. 2001, Sjöholm et al. 2010*). Σε υψηλό pH μειώνεται το δυναμικό της Tyr<sub>Z</sub> και δίνει ηλεκτρόνιο στο σύμπλοκο του Mn, το οποίο ανάγεται σε μια τροποποιημένη S<sub>2</sub>'' που της λείπει ένα H<sup>+</sup>. Το σήμα αυτό έχει εύρος 125 G που ταιριάζει με το εύρος της στενής συνιστώσας.

Η φαρδιά συνιστώσα πέφτει πιο γρήγορα τις 10 K, ενώ ένα ποσοστό τις στενής παραμένει. Στους 10 K η S<sub>2</sub>Yz<sup>•</sup> μειώνεται με επανασύνδεση με την Q<sub>A</sub><sup>-</sup>. Η φαρδιά συνιστώσα μειώνεται πιο γρήγορα ενώ η στενή πιο αργά. Αυτό πιθανόν συμβαίνει επειδή στην περίπτωση της φαρδιάς συνιστώσας το οξειδοαναγωγικό ζεύγος είναι το Tyr<sub>Z</sub><sup>•</sup>/ Tyr<sub>Z</sub>H, ενώ για την στενή είναι το Tyr<sub>Z</sub><sup>•</sup>/ Tyr<sub>Z</sub><sup>-</sup>, το οποίο έχει χαμηλότερο δυναμικό.

Στα δείγματα με γλυκερόλη παγιδεύεται μικρότερο ποσοστό της στενής συνιστώσας και σε ψηλότερες θερμοκρασίες. Ακόμη, με φωτισμό στους 10 K δημιουργείται σήμα με εύρος 140 G, το οποίο προέρχεται πιθανόν από κέντρα στα οποία το περιβάλλον του συμπλόκου Mn είναι λιγότερο ηλεκτροθετικό λόγω μερικής αποπρωτονίωσης. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στο ότι η γλυκερόλη τροποποιεί το πρωτεϊνικό περιβάλλον της τυροσίνης Z και του συμπλόκου του Mn.

Το φάσμα της Tyr<sub>Z</sub> αδιατάρακτο από το Mn, στους 150 K, είναι το ίδιο στα δείγματα με γλυκερόλη και στα απλά δείγματα. Επομένως, είναι το ίδιο και για τις δύο διαμορφώσεις εφόσον τα δείγματα με γλυκερόλη και τα απλά δείγματα έχουν διαφορετικό ποσοστό της κάθε συνιστώσας.



Εικόνα 5.9: Μοριακό μοντέλο που ερμηνεύει τις δύο συνιστώσες της  $S_2Y_z$ .

## 5.2 Αλλαγές στο σύμπλοκο Mn κατά τη μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$ και η παγίδευση της $S_2Y_z$

### 5.2.1 Εισαγωγικά

Όπως προαναφέραμε η κατάσταση  $S_2$  χαρακτηρίζεται από δύο εναλλακτικά σήματα EPR που αντιστοιχούν στη θεμελιώδη κατάσταση του συμπλόκου του Mn: ένα πολυγραμμικό (multiline) με  $g = 2$ , το οποίο προέρχεται από κέντρα με  $S = \frac{1}{2}$  και μία απλή παράγωγο με  $g = 4.1$  που προέρχεται από κέντρα με  $S = \frac{5}{2}$ . Και οι δύο μορφές αντιστοιχούν σε αριθμούς οξειδωσης Mn(III) Mn(IV)<sub>3</sub>, αλλά το πολυγραμμικό σήμα αποδίδεται σε κατανομή σθένους  $^1\text{Mn(III)}\text{-}^2\text{Mn(IV)}\text{-}^3,4\text{Mn(IV)}$ , ενώ το  $g = 4.1$

σε  ${}^1\text{Mn(IV)}\text{-}{}^2\text{Mn(III)}\text{-}{}^3,4\text{Mn(IV)}$  (Boussac et al. 1996, Ioannidis et al. 2006). Με EXAFS έχει φανεί ότι η απόσταση μεταξύ δύο δι-μ-οξο-γεφυρωμένων ιόντων Mn του συμπλόκου είναι μεγαλύτερη στο  $g = 4.1$  σε σχέση με το πολυγραμμικό (2,85 Å και 2,72 Å αντίστοιχα) (Liang et al. 1994). Ακόμη, έχει προταθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις ανταλλαγής μεταξύ των  ${}^3\text{Mn}\text{-}{}^4\text{Mn}$  καθορίζουν το σπιν της θεμελιώδους κατάστασης, και επομένως μικρές δομικές αλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγή του σπιν του συμπλόκου (Pantazis et al. 2009).

Στα κυανοβακτήρια δεν παρατηρείται η μορφή  $g = 4.1$  (McDermott et al. 1988). Αλλά και στα φυτά όταν χρησιμοποιείται γλυκερόλη ως κρυοπροστατευτικό, αντί για σουκρόζη, ή και σε δείγματα με σουκρόζη στα οποία όμως έχει προστεθεί μεθανόλη, όλα τα κέντρα χαρακτηρίζονται από το πολυγραμμικό σήμα.

Η ετερογένεια της  $S_2$  φαίνεται να υπάρχει ήδη από την  $S_1$ . Στην  $S_1$  έχουν παρατηρηθεί δύο μορφές της  $S_1Yz'$  με φωτισμό στους 10 K, η μία με  $g = 2.035$  που δίνει το πολυγραμμικό όταν προχωρήσει στην  $S_2$  και η δεύτερη με εύρος 26 G, η οποία δημιουργεί το  $g = 4.1$  (Sioros et al. 2007).

Το πολυγραμμικό μπορεί να μετατραπεί σε  $g = 4.1$  με υπέρυθρο φωτισμό σε θερμοκρασία 150 K – 200 K και επανέρχεται στην αρχική κατάσταση σε λίγα λεπτά στους 200 K. Η μετατροπή αποδίδεται σε μεταφορά ηλεκτρονίου από το  $\text{Mn}^{\text{III}}$  προς ένα  $\text{Mn}^{\text{IV}}$  ή σε μετατροπή του σπιν του  $\text{Mn}^{\text{III}}$  ή σε μετάπτωση d-d του  $\text{Mn}^{\text{III}}$  (Boussac et al. 1996).

Οι δύο μορφές της  $S_2$  ταλαντώνονται με τον ίδιο τρόπο όταν δίνουμε διαδοχικούς παλμούς φωτός (Zimmermann & Rutherford 1986), δηλαδή φαίνεται και οι δύο να προχωρούν στην  $S_3$ . Η  $S_3$  δεν παρουσιάζει ετερογένεια. Έχει βρεθεί το πλήρες φάσμα της που με προσομοίωση φάνηκε ότι αντιστοιχεί σε  $S = 3$  (Boussac et al. 2009, Spanakis et al. 2007). Το πιο ευδιάκριτο σημείο του φάσματος της  $S_3$  βρίσκεται σε  $g = 10$  και είναι το ίδιο στα κυανοβακτήρια, που εμφανίζουν μόνο πολυγραμμικό, και τα φυτά, που εμφανίζουν και τις δύο μορφές της  $S_2$ . Φαίνεται, το σήμα της  $S_3$  λοιπόν να προέρχεται από το πολυγραμμικό σήμα. Έτσι λοιπόν, το



ερώτημα που προκύπτει είναι τι συμβαίνει με τα κέντρα στην διαμόρφωση  $g = 4.1$  κατά τη μετάβαση  $S_2 \rightarrow S_3$ .

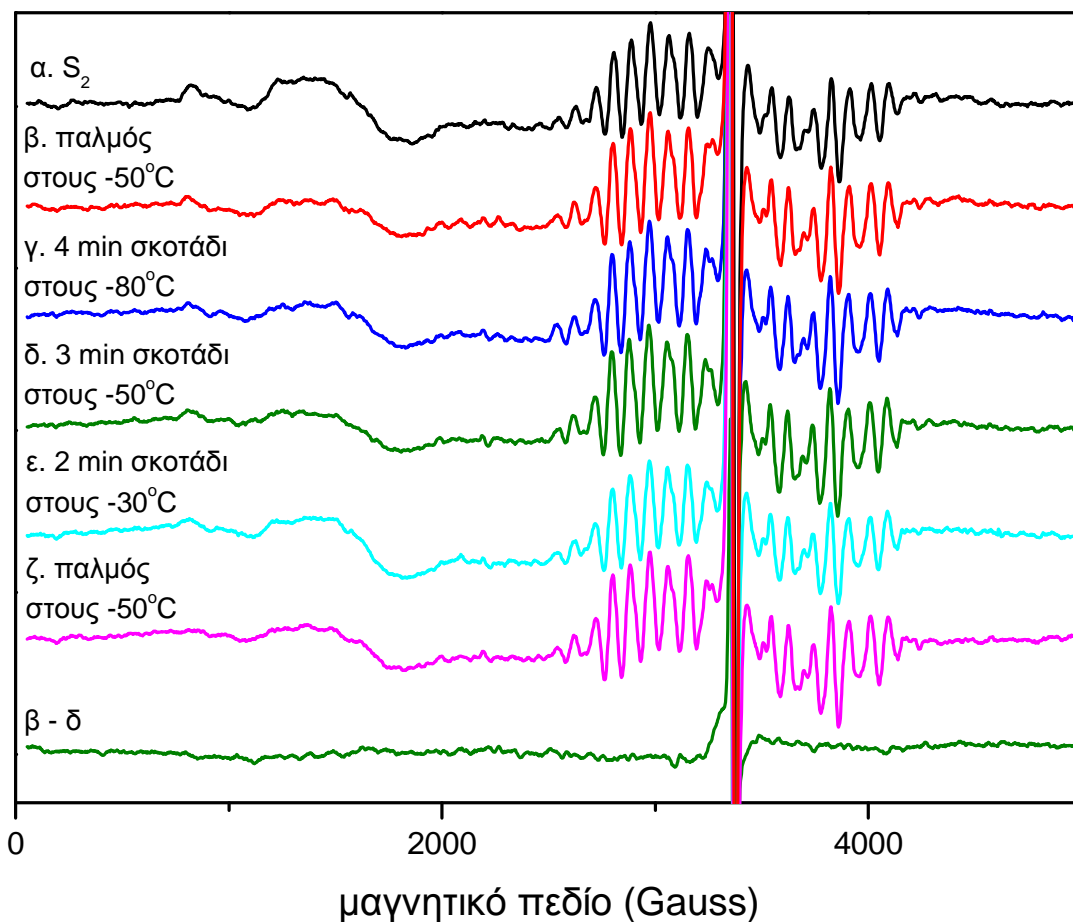
Η θερμοκρασία ημιαναστολής της μετάβασης  $S_2 \rightarrow S_3$  είναι 230 K (*Styring & Rutherford 1988*). Στην χαμηλή αυτή θερμοκρασία, η μετάβαση πραγματοποιείται βραδύτερα. Με φωτισμό κοντά σε αυτή τη θερμοκρασία και γρήγορο πάγωμα μπορούν πιθανόν να παγιδευτούν βραχύβια ενδιάμεσα μεταξύ της  $S_2$  ( $g = 4.1$ ) και της  $S_3$ .

### 5.2.2 Το $g = 4.1$ μετατρέπεται σε πολυγραμμικό με φωτισμό στους $-50^\circ\text{C}$

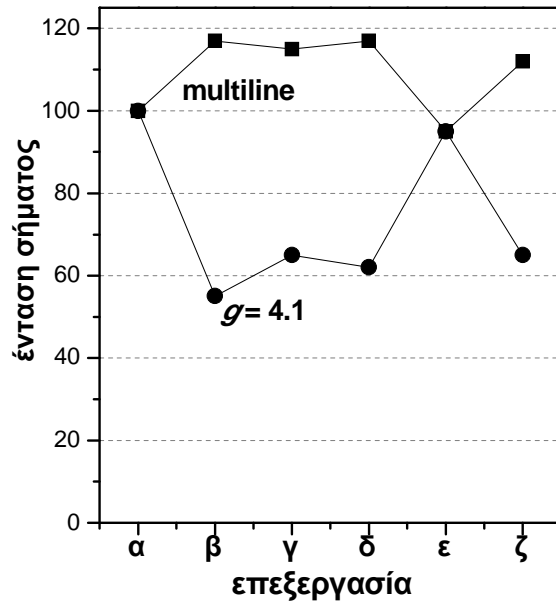
Στην *εικόνα 5.10*, παρουσιάζεται πείραμα, όπου το δείγμα φωτίστηκε σε θερμοκρασία  $-50^\circ\text{C}$ , κοντά δηλαδή στη θερμοκρασία ημιαναστολής της μετάβασης  $S_2 \rightarrow S_3$ . Παρατηρούμε τα εξής: Με το φωτισμό μειώνεται η ένταση του σήματος  $g = 4.1$  και αυξάνεται η ένταση του πολυγραμμικού σήματος. Φαίνεται λοιπόν ότι κέντρα που χαρακτηρίζονται από  $g = 4.1$ , μετατρέπονται σε κέντρα που χαρακτηρίζονται από το πολυγραμμικό σήμα. Στη συνέχεια το δείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία  $-80^\circ\text{C}$ ,  $-50^\circ\text{C}$  και τέλος  $-30^\circ\text{C}$ . Οι δύο μορφές της  $S_2$  επανέρχονται στην αρχική αναλογία στους  $-30^\circ\text{C}$ . Με νέο παλμό στους  $-50^\circ\text{C}$  παρατηρείται και πάλι μετατροπή του  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό.

Στην *εικόνα 5.11*, φαίνονται τα ποσοστά  $g = 4.1$  και πολυγραμμικό σε κάθε φάση του πειράματος σε σχέση με την αρχική  $S_2$ . Η εικόνα επιβεβαιώνει ποσοτικά την ποιοτική εκτίμηση της *εικόνας 5.10*. Με τον παλμό στους  $-50^\circ\text{C}$  μειώνεται η ένταση του  $g = 4.1$  και αυξάνεται το πολυγραμμικό, ενώ με επώαση στο σκοτάδι στους  $-30^\circ\text{C}$  το δείγμα επιστρέφει στην αρχική αναλογία  $g = 4.1$  και πολυγραμμικό. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν είναι επακριβώς γνωστά τα ποσοστά των κέντρων, τα οποία βρίσκονται στις δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις, πολυγραμμικό και  $4.1$ . Οι σχετικές αυξομειώσεις στην *εικόνα 5.11* υποδεικνύουν ότι στην συγκεκριμένη παρασκευή τα «πολυγραμμικά» κέντρα είναι περίπου διπλάσια των « $4.1$ », διότι μείωση του σήματος  $4.1$  κατά 40% προκαλεί

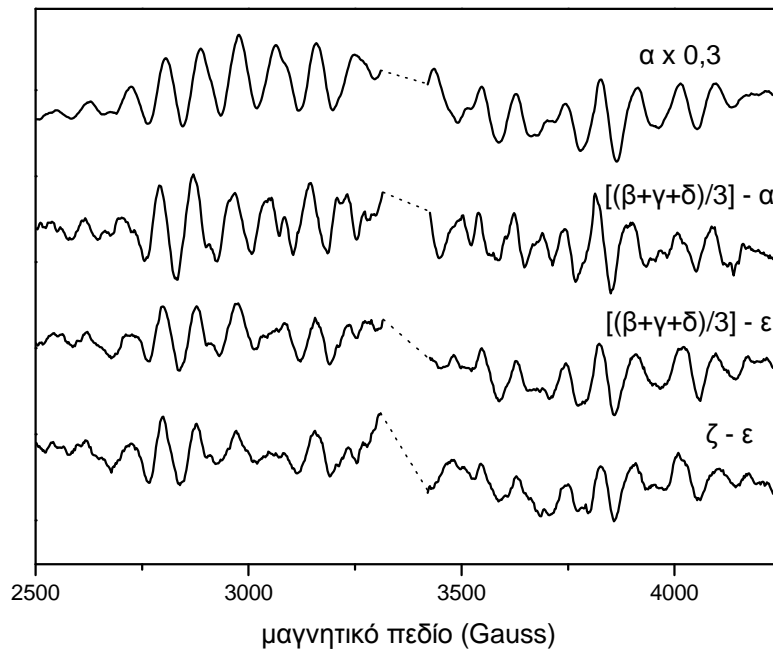
αύξηση του πολυγραμμικού σήματος κατά περίπου 20%. Η αντιστοιχία αυτή επιβεβαιώνεται προσεγγιστικά και από ανεξάρτητα πειράματα μελέτης του ποσοστού μετατροπής του πολυγραμμικού σήματος σε  $g = 4.1$  κατά τον φωτισμό με εγγύς υπέρυθρο στους 50 K.



**Εικόνα 5.10:** Μετατροπή του  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό με φωτισμό στους  $-50^\circ\text{C}$ . α: Δημιουργία της  $S_2$  με έναν παλμό στους  $-30^\circ\text{C}$  και 2 min σκοτάδι στην ίδια θερμοκρασία. β, ζ: παλμός στους  $-50^\circ\text{C}$  και γρήγορο πάγωμα. γ-ε: επώαση στο σκοτάδι στη θερμοκρασία που αναγράφεται στην εικόνα. Το δείγμα έχει DCBQ ως εξωτερική κινόνη. Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 50 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.



Εικόνα 5.11: Ποσοστό πολυγραμμικού σήματος και  $g = 4.1$  σε κάθε βήμα του πειράματος της εικόνας 5.10. Ως 100% έχει οριστεί το πολυγραμμικό και η  $g = 4.1$  της αρχικής  $S_2$ .



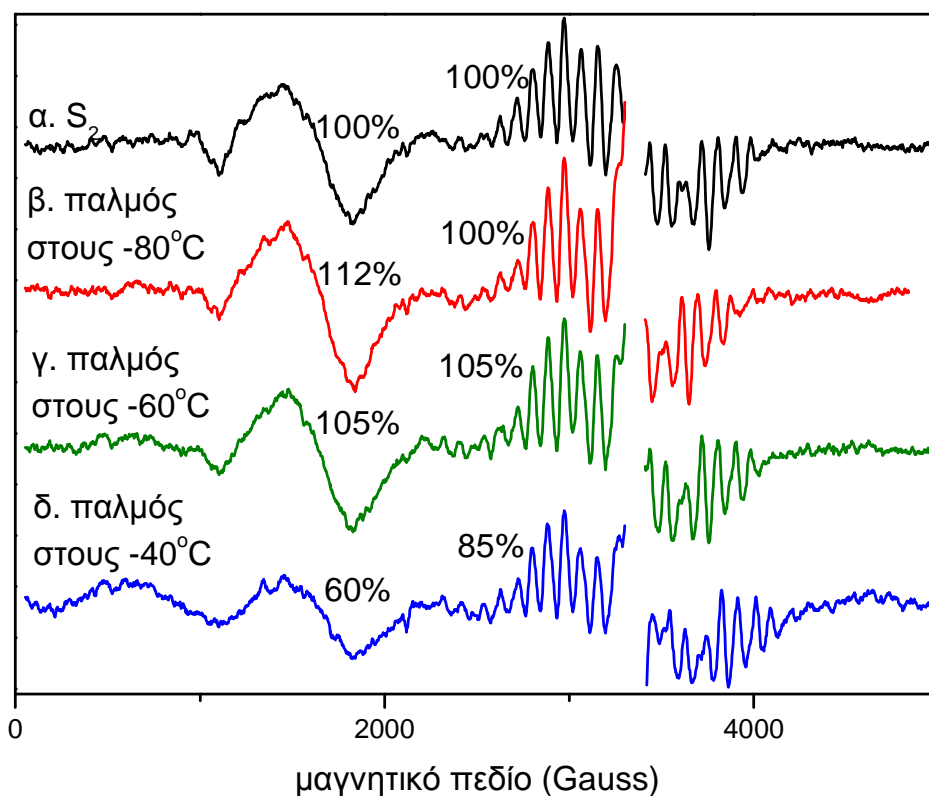
Εικόνα 5.12: Το τροποποιημένο πολυγραμμικό σήμα, που έχει προέλθει από την μετατροπή  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό, σε σύγκριση με το κανονικό. Οι ενδείξεις της εικόνας αντιστοιχούν στα φάσματα της εικόνας 5.10.

Στην εικόνα 5.12 φαίνονται οι διαφορές των φασμάτων που έχουν το επιπλέον πολυγραμμικό που έχει προέλθει από την  $g = 4.1$ , μείον το

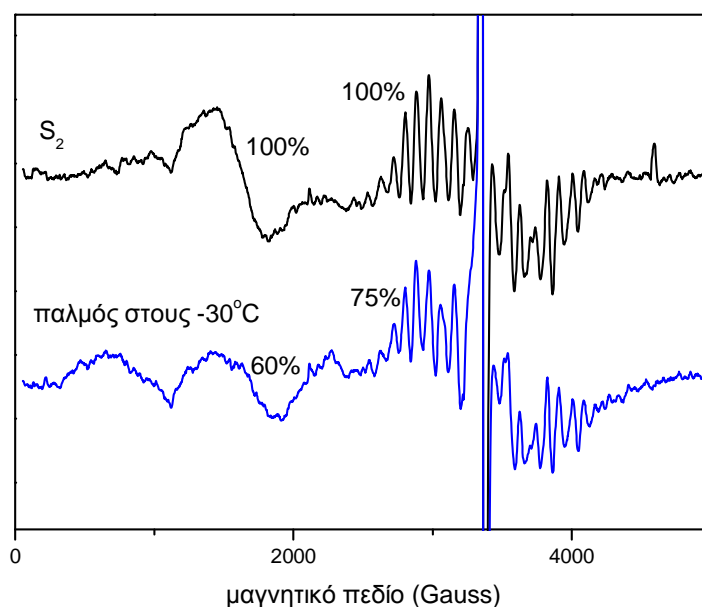
φάσμα της  $S_2$  ή του τελικού σκοταδίου όπου έχει επανέλθει η ισορροπία  $g = 4.1$  – πολυγραμμικού. Το πολυγραμμικό αυτό, που έχει προέλθει από την  $g = 4.1$  διαφέρει από το αρχικό της  $S_2$ . Οι ακριανές κορυφές του είναι πιο έντονες.

### 5.2.3 Εύρος θερμοκρασιών στις οποίες γίνεται η μετατροπή

Στις εικόνες 5.13 και 5.14 φαίνονται πειράματα, στα οποία έχει γίνει φωτισμός της  $S_2$  σε θερμοκρασίες  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  -  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  για να διευκρινιστεί σε τι εύρος θερμοκρασιών μπορούμε να παγιδεύσουμε τη μετατροπή. Στους  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  παρατηρείται αύξηση του  $g = 4.1$ , εις βάρος του πολυγραμμικού, φαινόμενο που οφείλεται, όπως περιγράψαμε πιο πάνω, στο υπέρυθρο φως. Παρατηρείται επίσης συνολική αύξηση του πληθυσμού της  $S_2$  εξαιτίας κάποιων κέντρων που είχαν παραμείνει στην  $S_1$ . Στους  $-60\text{ }^\circ\text{C}$  αποκαθίσταται η ισορροπία  $g = 4.1$  – πολυγραμμικού, καθώς δεν υπάρχει φαινόμενο υπέρυθρου. Στους  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  μειώνεται η  $g = 4.1$ , αλλά δεν παρατηρείται αύξηση του πολυγραμμικού, αλλά αντίθετα μείωση επειδή σε αυτή τη θερμοκρασία κάποια κέντρα προχωρούν στην  $S_3$  ( $g = 10$ ). Το ίδιο παρατηρείται και στους  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  (εικόνα 5.14). Επομένως, η καλύτερη θερμοκρασία για να φανεί η μετατροπή  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό είναι αυτή των  $-50\text{ }^\circ\text{C}$ .



Εικόνα 5.13: Σύγκριση της μετατροπής του  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό με φωτισμό σε θερμοκρασίες  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-60^{\circ}\text{C}$  και  $-40^{\circ}\text{C}$ .  $S_2$  με 2 κύκλους φωτισμού στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και μετά επώασης για 30 sec στους  $-5^{\circ}\text{C}$ . Το δείγμα έχει DCBQ ως εξωτερική κινόνη. Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 50 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

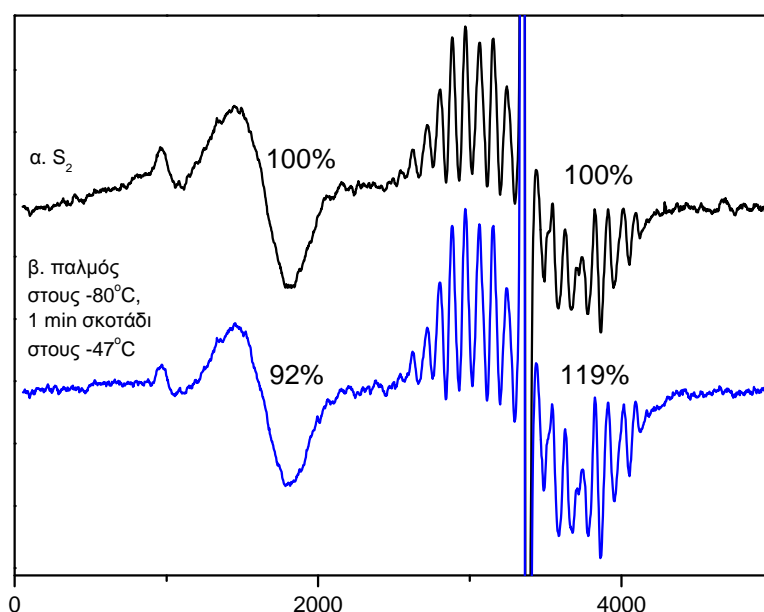


Εικόνα 5.14: Μετατροπή του  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό με φωτισμό στους  $-30^{\circ}\text{C}$ . Η  $S_2$  δημιουργήθηκε με φωτισμό στους  $-75^{\circ}\text{C}$  για 4 min και επώαση για 30 sec στο σκοτάδι. Το δείγμα έχει DCBQ ως εξωτερική κινόνη. Συνθήκες EPR: ισχύς

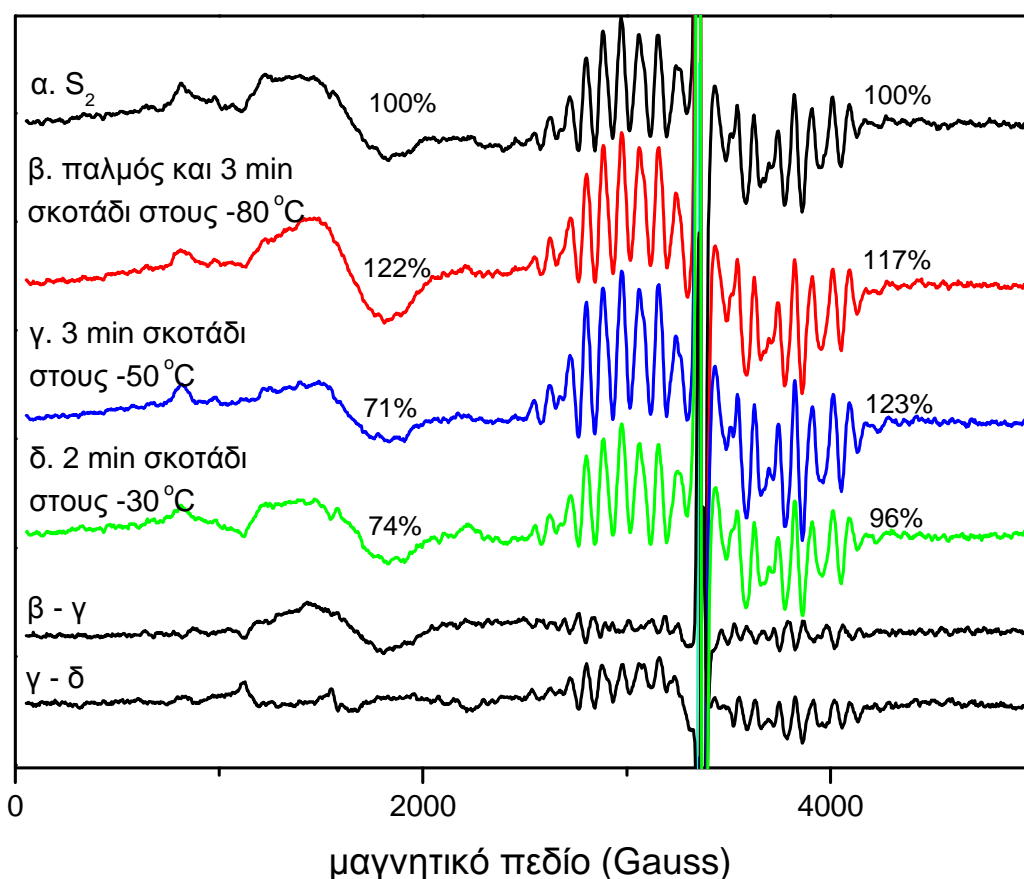
μικροκυμάτων: 50 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

5.2.4 Η μετατροπή μπορεί να γίνει και με φωτισμό σε χαμηλότερη θερμοκρασία και στη συνέχεια μεταφορά του δείγματος στους  $-50^{\circ}\text{C}$

Εάν φωτίσουμε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , όπου όπως φάνηκε δεν μετατρέπεται η  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό, και μεταφέρουμε αμέσως το δείγμα σε σκοτάδι σε θερμοκρασία  $-50^{\circ}\text{C}$ , γίνεται η μετατροπή (εικόνα 5.15). Στην εικόνα 5.16 φαίνεται να γίνεται η μετατροπή στους  $-50^{\circ}\text{C}$  μετά από φωτισμό στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και επώαση 3 min στην ίδια θερμοκρασία. Στην διαφορά β-γ φαίνεται το τροποποιημένο πολυγραμμικό.



Εικόνα 5.15: Μετατροπή του  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό με φωτισμό στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και γρήγορη μεταφορά του δείγματος στους  $-50^{\circ}\text{C}$ . Η  $S_2$  σχηματίστηκε με έναν παλμό στους  $-30^{\circ}\text{C}$  και 2 min σκοτάδι στην ίδια θερμοκρασία. Το δείγμα έχει DCBQ ως εξωτερική κινόνη. Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 50 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.



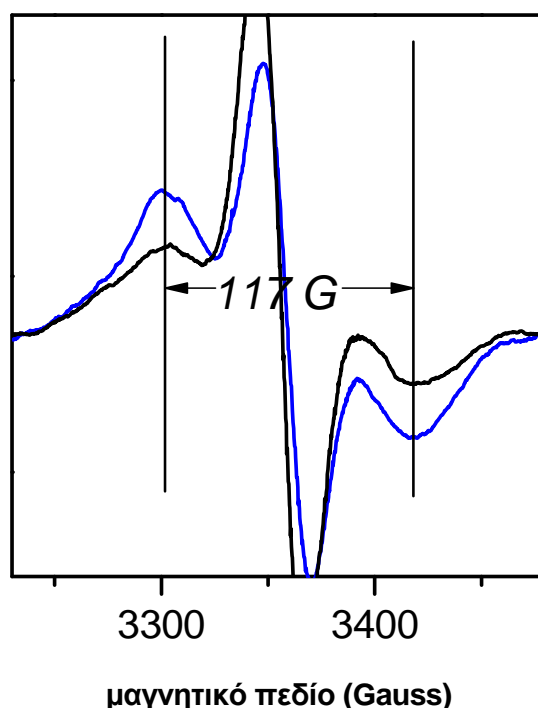
Εικόνα 5.16: Μετατροπή του  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό με φωτισμό στους  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  και επώαση για 3 min στην ίδια θερμοκρασία και στη συνέχεια μεταφορά του δείγματος στους  $-50\text{ }^\circ\text{C}$ . Η  $S_2$  σχηματίστηκε με έναν παλμό στους  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  και 2 min σκοτάδι στην ίδια θερμοκρασία. Το δείγμα έχει DCBQ ως εξωτερική κινόνη. Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 50 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

### 5.2.5 Παγίδευση της $S_2Yz'$ με φωτισμό στους $-50\text{ }^\circ\text{C}$ και γρήγορο πάγωμα

Συγχρόνως με την μετατροπή του  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό παρατηρείται και η δημιουργία ρίζας (διαφορά β-δ, εικόνα 5.10), η οποία μειώνεται με επώαση στους  $-50\text{ }^\circ\text{C}$ . Μπορούμε να την δούμε σε φάσμα μεγαλύτερης ευκρίνειας στην εικόνα 5.17, όπου συγκρίνεται με την  $S_2Yz'$  που δημιουργείται με φωτισμό στους 180 K (Ioannidis et al. 2006). Το εύρος του σήματος είναι 117 G. Στην εικόνα 5.18 φαίνεται το φάσμα της με

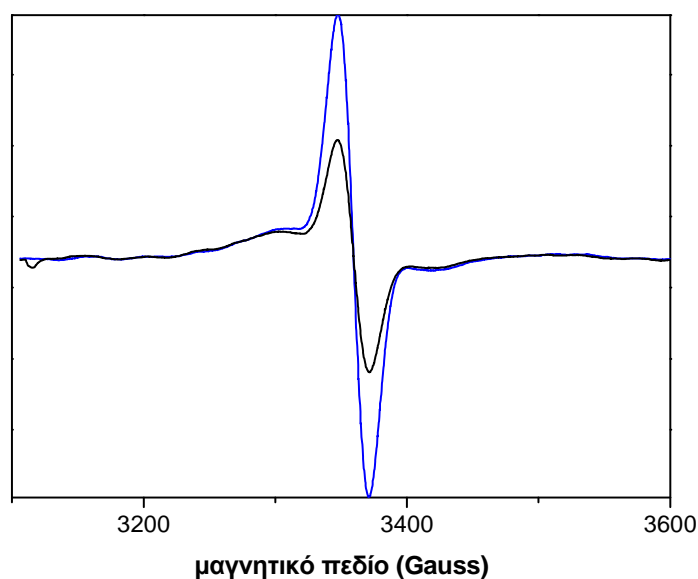
ισχύ 31 mW και 100 mW. Δεν παρουσιάζει κορεσμό και αυτό ενισχύει τον χαρακτηρισμό της ως  $S_2Y_Z'$ . Το σήμα στην περιοχή  $g = 2$  οφείλεται στην  $Tyr_D'$  και σε  $chl^+$  και  $car^+$ , τα οποία, όπως φαίνεται και στην εικόνα, κορέννυνται σε μεγάλη ισχύ. Η  $Tyr_Z'$  έχει μικρό χρόνο χαλάρωσης (relaxation) λόγω της αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο του Mn και για αυτό δεν κορέννεται σε μεγάλη ισχύ.

Η ρίζα είναι σταθερή στους 10 K. Αυτό οφείλεται πιθανόν στη μεταφορά του ηλεκτρονίου από την  $Q_A^-$  προς την εξωγενή κινόνη. Το ζεύγος  $Tyr_Z' Q_A^-$  μπορεί να επανασυνδεθεί στους 10 K. Όταν η ρίζα δημιουργείται σε θερμοκρασίες 77 K – 190 K (Ioannidis et al. 2006) πέφτει λόγω επανασύνδεσης σε 5 – 10 min στους 10 K. Στους  $\sim -50$  °C, όμως, γίνεται η μεταφορά ηλεκτρονίου  $Q_A^- \rightarrow Q_B/Q_B^-$  σε κάποια κέντρα (Fufezan et al. 2005) και αυτό σταθεροποιεί τον διαχωρισμό φορτίου και μας δίνει τη δυνατότητα να παγιδεύσουμε τη ρίζα.



Εικόνα 5.17: Η ρίζα της εικόνας 5.10 (διαφορά  $\beta$ - $\delta$ ) (μαύρο) σε σύγκριση με την  $S_2Y_Z'$  που δημιουργείται με φωτισμό στους 180 K (μπλε) (Ioannidis et al. 2006). Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW, σταθερά χρόνου: 300 s, χρόνος σάρωσης: 50 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

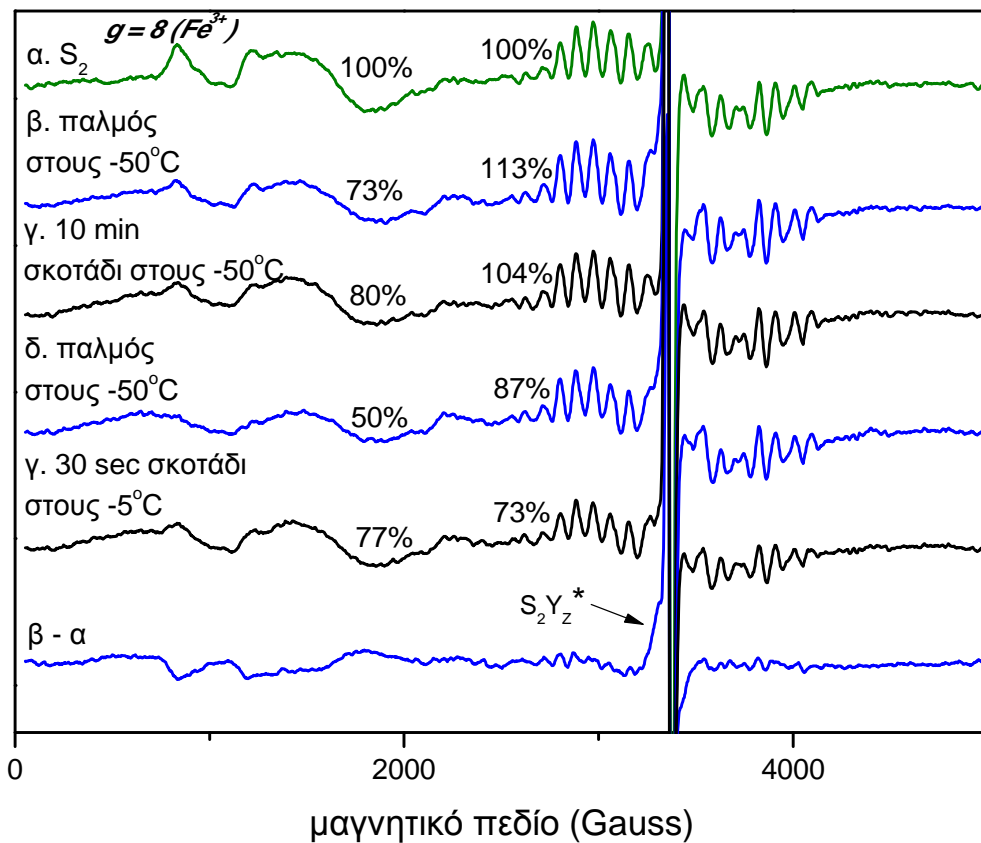




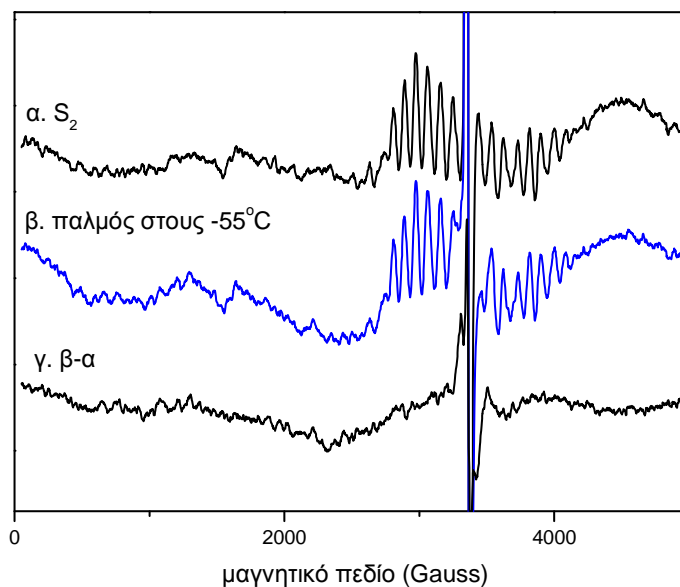
**Εικόνα 5.18:** Σύγκριση του φάσματος της  $S_2Y_z'$  με ισχύ μικροκυμάτων 100 mW (μαύρο) και 31 mW (μπλε). Τα φάσματα είναι η διαφορά του φάσματος μετά τον παλμό στους  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  και γρήγορο πάγωμα μείον την  $S_2$ . Τα φάσματα είναι κανονικοποιημένα. Το δείγμα περιέχει PPBQ. Συνθήκες EPR: σταθερά χρόνου: 300 s, χρόνος σάρωσης: 50 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

Σε δείγμα με PPBQ ως εξωτερική κινόνη παγιδεύτηκε μεγαλύτερη ρίζα λόγω δημιουργίας της κατάστασης  $S_2...Q_AFe^{3+}$  (Petrouleas & Diner 1987), που κάνει πιο αργή την επανασύνδεση της  $Tyr_Z$  με την  $Q_A^-$  (εικόνα 5.19). Σε  $g = 8$  φαίνεται το σήμα του οξειδωμένου σιδήρου και σε  $g = 10$  το σήμα της  $S_3$ . Ακόμη, παρατηρούμε ότι η μετατροπή  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό δεν αντιστρέφεται ακόμη κι αν αφήσουμε το δείγμα για 10 min στους  $-50\text{ }^\circ\text{C}$ , αντιστρέφεται όμως με επώαση για πολύ λιγότερο χρόνο σε ψηλότερη θερμοκρασία.

Η  $S_2Y_z'$  παγιδεύεται και σε δείγματα με γλυκερόλη με φωτισμό σε θερμοκρασία  $\sim -50\text{ }^\circ\text{C}$  (εικόνες 5.20, 5.21). Η ρίζα είναι σταθερή σε θερμοκρασία υγρού ηλίου, όπως και στα κανονικά δείγματα και το εύρος της είναι 117 G.

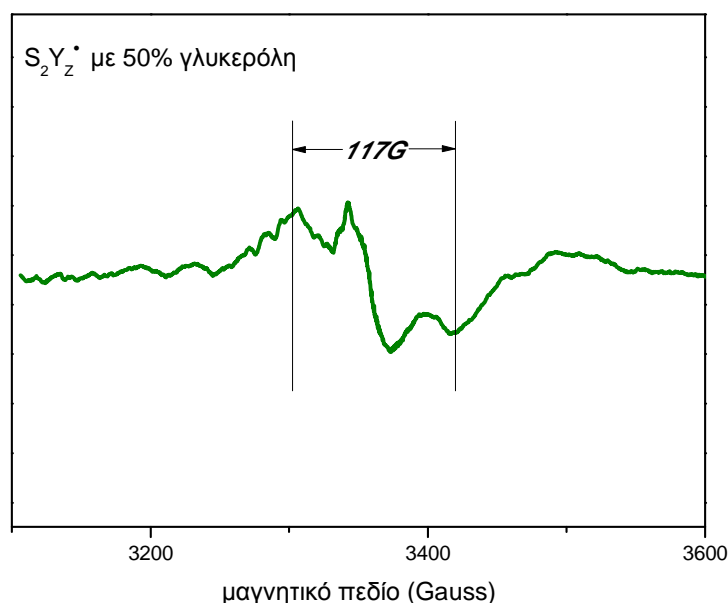


Εικόνα 5.19: Η μετατροπή  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό και η παγίδευση της  $S_2YZ'$  σε δείγμα με PPBQ ως εξωτερική κινόνη, το σήμα του οξειδωμένου σιδήρου φαίνεται στο φάσμα της  $S_2$  σε  $g = 8$ . Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 50 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.



Εικόνα 5.20: Η  $S_2YZ'$  που παγιδεύεται με φωτισμό στους  $-55^\circ\text{C}$  και γρήγορο πάγωμα, σε δείγμα με 50% γλυκερόλη ν/ν και DCBQ. Συνθήκες EPR: ισχύς

μικροκυμάτων: 50 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.



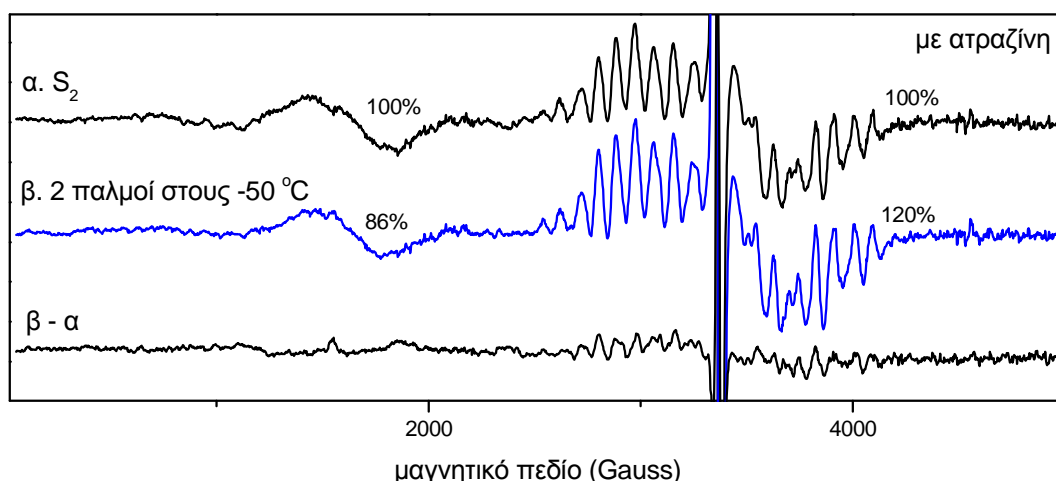
**Εικόνα 5.21:** Η  $S_2YZ^\bullet$  της προηγούμενης εικόνας, 6 min μετά τον φωτισμό μείον την  $S_2$ . Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 100 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 50 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

### 5.2.6 Πειράματα για να ελεγχθεί το πού οφείλεται η μετατροπή $g = 4.1$ σε πολυγραμμικό

Για να δούμε αν η μετατροπή του  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό οφείλεται σε διαχωρισμό φορτίου και στην  $S_2YZ^\bullet$  που δημιουργείται ή σε επίδραση του λευκού φωτός στο κέντρο  $Mn_4Ca$ , επαναλάβαμε τα πειράματα με προσθήκη ατραζίνης στα δείγματα, ή έχοντας δημιουργήσει την κατάσταση  $S_2Q_A^-$  με φωτισμό στους  $-80^\circ C$ . Η ατραζίνη προσδένεται στη θέση της  $Q_B$  και με αυτό τον τρόπο εμποδίζει το  $\Phi_S$  II να προχωρήσει πέρα από την  $S_2Q_A^-$ .

Τα αποτελέσματα είναι ασαφή. Με φωτισμό στους  $-50^\circ C$  και γρήγορο πάγωμα σε τέτοια δείγματα μειώνεται το  $g = 4.1$ , και αρχικά

αυξάνεται το πολυγραμμικό. Θα μπορούσαμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι η μετατροπή οφείλεται στο λευκό φως. Όμως, λόγω της  $Q_A^-$  γίνεται επανασύνδεση και το δείγμα πέφτει στην  $S_1$ . Η  $g = 4.1$  πέφτει πιο γρήγορα από το πολυγραμμικό στο σκοτάδι. Όμως στις διαφορές φαίνεται το χαρακτηριστικό πολυγραμμικό σήμα των κέντρων που από την  $g = 4.1$  πηγαίνουν σε πολυγραμμικό.



**Εικόνα 5.22:** Φωτισμός στους  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  σε δείγμα με ατραζίνη. Η  $S_2$  δημιουργήθηκε με δύο παλμούς στους  $-30\text{ }^\circ\text{C}$ . Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 50 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp. Θερμοκρασία: 10 K.

### 5.2.7 Συζήτηση

Κατά τη μετάβαση  $S_2 \rightarrow S_3$  το  $g = 4.1$  μετατρέπεται σε πολυγραμμικό. Αυτό δείχνει ότι η ετερογένεια που υπάρχει στην  $S_1$  και την  $S_2$  δεν παραμένει στην  $S_3$ , και επομένως κατά το σχηματισμό του  $O_2$  όλα τα κέντρα είναι ομοιογενή. Ακόμη, φαίνεται ότι για τη διάσπαση του νερού απαιτείται η διαμόρφωση του συμπλόκου με  $S = 1/2$ . Ταυτόχρονα με την μετατροπή αυτή σχηματίζεται και η  $S_2Y_2^{\cdot}$ .

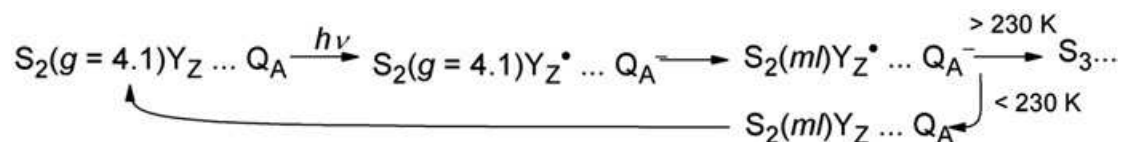
Το πολυγραμμικό που προέρχεται από το  $g = 4.1$  έχει πιο έντονες τις ακριανές κορυφές. Έχει αναφερθεί ότι η μορφή αυτή του πολυγραμμικού αποτελεί συνιστώσα του κανονικού πολυγραμμικού και είναι αυτή η συνιστώσα, που μετατρέπεται σε  $g = 4.1$  με φωτισμό με IR (Boussac 1997). Στην παρούσα περίπτωση συμβαίνει η αντίστροφη μετατροπή: Φωτισμός με ορατό μετατρέπει την 4.1 στο τροποποιημένο αυτό πολυγραμμικό σήμα. Το ερώτημα που δημιουργείται είναι αν η μετατροπή οφείλεται σε απ' ευθείας επίδραση του φωτός στο σύμπλοκο του Mn ή είναι αποτέλεσμα του διαχωρισμού φορτίου.

Στα πειράματα με ατραζίνη φαίνεται να αυξάνεται το πολυγραμμικό εις βάρος του  $g = 4.1$  και να δημιουργείται το τροποποιημένο πολυγραμμικό. Η μετατροπή αυτή όμως δεν συνεχίζεται μετά από πολλούς παλμούς (θα περιμέναμε όλο το  $g = 4.1$  να γίνει πολυγραμμικό). Η αύξηση του πολυγραμμικού μπορεί να οφείλεται σε κέντρα που έχουν μείνει στην  $S_1$ , ενώ το  $g = 4.1$  δεν αυξάνεται, αντίθετα μειώνεται επειδή επανασυνδέεται πιο γρήγορα με την  $Q_A^-$  σε σχέση με το πολυγραμμικό (Zimmermann & Rutherford 1986).

Το γεγονός ότι η μετατροπή γίνεται σε θερμοκρασίες κοντά στην μετάβαση  $S_2 \rightarrow S_3$  (-50 - -30 °C) υποδεικνύει ότι ο διαχωρισμός φορτίου και η δημιουργία της  $S_2Yz'$  οδηγεί τη μετατροπή. Αυτό πιθανόν γίνεται με μεταφορά  $H^+$  μέσω δεσμών υδρογόνου που συνδέουν την Tyr<sub>Z</sub> με το σύμπλοκο του Mn. Στην εικόνα 5.23 φαίνεται με ποιο τρόπο γίνεται πιθανώς η μετατροπή.

Η μετατροπή μπορεί να γίνει και με φωτισμό στους -80 °C και στη συνέχεια μεταφορά στους -50 °C ή φωτισμό στους -80 °C, επώαση για 3 min στην ίδια θερμοκρασία και μεταφορά στους -50 °C. Η  $S_2Yz'$ , που δημιουργείται με το φωτισμό στους -80 °C παραμένει, και στους -50 °C μπορεί να επάγει τη μετατροπή. Μετά από 3 min στους -80 °C, η τυροσίνη έχει πέσει, αλλά πιθανόν έχει γίνει μια αναδιάταξη στο σύμπλοκο του Mn που δεν επανέρχεται στην αρχική κατάσταση όταν πέσει η ρίζα και στους -50 °C δίνει το πολυγραμμικό. Αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι η  $S_2Yz'$  μέσω μετακινήσεων  $H^+$  οδηγεί τη μετατροπή.

Μια ανάλογη μετατροπή  $g = 4,1$  σε πολυγραμμικό έχει παρατηρηθεί παρουσία  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ . Σε δείγματα με  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  όλα τα κέντρα παρουσιάζουν  $g = 4,1$ . Με φωτισμό δημιουργείται η  $\text{S}_2\text{Yz}^*$  και ταυτόχρονα το  $g = 4,1$  μετατρέπεται σε πολυγραμμικό (*MacLachlan & Nugent 1993*). Και σε αυτή την περίπτωση συμβαίνει αυτό που περιγράφεται στην εικόνα 5.23, αλλά μέχρι την κατάσταση  $\text{S}_2(m)\text{Yz}^*$ .



**Εικόνα 5.23:** Μετατροπή του  $g = 4.1$  σε πολυγραμμικό κατά τη μετάβαση  $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ . Η μετατροπή οδηγείται από την  $\text{Tyr}_{\text{Z}}^*$ . Το ενδιάμεσο  $\text{S}_2 (g = 4.1) \text{Yz}^*$  δεν έχει παγιδευτεί.

### 5.3 Συμπεράσματα

Αντικείμενο της Διπλωματικής εργασίας υπήρξε η κατανόηση των μεταβολών, που πραγματοποιούνται στο σύμπλοκο διάσπασης του νερού κατά την μετάβαση  $\text{S}_2$  προς  $\text{S}_3$ . Στο πρώτο τμήμα παρατηρήσαμε ότι η μεταβατική κατάσταση  $\text{S}_2\text{Yz}^*$  εμφανίζει στα φάσματα EPR δύο διαφορετικές συνιστώσες, μία φαρδιά και μία στενή. Οι δύο συνιστώσες αντιπροσωπεύουν δύο διαδοχικές μεταφορές  $\text{H}^+$  κατά την οξειδωση της  $\text{Tyr}_{\text{Z}}$ . Η κατάσταση που δίνει τη φαρδιά συνιστώσα είναι μεταβατική πριν σχηματιστεί αυτή που δίνει τη στενή. Στα κέντρα που δίνουν τη φαρδιά συνιστώσα, το  $\text{H}^+$  της  $\text{Tyr}_{\text{Z}}^*$  έχει μετακινηθεί προς την  $\text{His}^{190}$ , ενώ στα κέντρα που δίνουν την στενή έχει επιπλέον μετακινηθεί το άλλο  $\text{H}^+$  της ιστιδίνης προς την  $\text{Asn}^{298}$ .

Στο δεύτερο μέρος εξετάσαμε την κατάληξη των δύο ανομοιογενών διαμορφώσεων της  $\text{S}_2$  κατά τη μετάβαση στην  $\text{S}_3$ . Η ανομοιογένεια αυτή

έχει απασχολήσει τις ερευνητικές ομάδες στο παρελθόν. Οφείλεται σε διαφορετική κατανομή των σθενών των ιόντων. Διαπιστώσαμε ότι όλα τα κέντρα μετατρέπονται στη διαμόρφωση με συνολικό σπιν του συμπλόκου του Mn  $S = \frac{1}{2}$ , πριν τη μετάβαση, ώστε στις ανώτερες S καταστάσεις, κατά τις οποίες γίνεται και η απελευθέρωση του  $O_2$ , όλα τα κέντρα είναι ομοιογενή. Η κατάσταση χαμηλού σπιν του συμπλόκου του Mn είναι αυτή που μπορεί να καταλύσει τη διάσπαση του νερού.

## 5. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
lumen	αυλός
low barrier hydrogen bond	δεσμός υδρογόνου χαμηλού φράγματος
hydrogen-abstraction model	μοντέλο απόσπασης H
proton-rocking model	μοντέλο παλινδρόμησης H <sup>+</sup>
multiline	πολυγραμμικό σήμα



## 6. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ΦΣ II	Φωτοσύστημα II
ΣΔN	Σύμπλοκο διάσπασης του νερού
P680	Ειδικό ζεύγος χλωροφυλλών, όπου γίνεται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου
Tyr <sub>Z</sub> , Y <sub>Z</sub>	Τυροσίνη 161 της D1 υπομονάδας
Tyr <sub>D</sub> , Y <sub>D</sub>	Τυροσίνη 160 της D2 υπομονάδας
chl	χλωροφύλλη
car	καροτενοειδές
pheo	φαιοφυτίνη
cyt	κυτόχρωμα
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure
EPR	Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός
BBY	Μεμβράνες θυλακοειδών που περιέχουν ΦΣ II
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
HEPES	4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ
MES	2-μορφολινοαιθανοσουλφονικό οξύ
DCBQ	δι-χλωρο-p-βενζοκινόνη
PPBQ	φαινυλ-p-βενζοκινόνη

## 8. ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Α. Βασιλικού-Ντόβα, Σημειώσεις του μεταπτυχιακού μαθήματος: Φασματοσκοπικές μέθοδοι στη φυσική στερεάς κατάστασης, 2001.
2. Δ. Γανωτάκης, Κ. Κοτζαμπάσης, Κεφάλαιο 5: “Φωτοσύνθεση Ι: Μετατροπή της ηλιακής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια”, Φυσιολογία Φυτών, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2003.
3. Γ. Ζαχαρίου, “Αλληλεπιδράσεις σπιν-σπιν μεταλλικών κέντρων – ελευθέρων ριζών σε βιοανόργανα συστήματα. Μελέτη της φωτοσυνθετικής διάσπασης του νερού”, διδακτορική διατριβή, 2008.
4. Σ. Ι. Χαμόδρακας, Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής, εκδόσεις Συμμετρία, 1993, Κεφάλαιο 2.4: Μέθοδοι μαγνητικού συντονισμού.
5. G. T. Babcock, The oxygen-evolving complex in photosystem II as a metallo-radical enzyme. In "Photosynthesis: from Light to Biosphere", ed. by P. Mathis, Vol II, Kluwer Academic Publ. Dordrecht, 1995, 209-215.
6. J. Barber, Crystal structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II, *Inorganic Chemistry* 2008, 47, 1700-1710.
7. J. Barber, J. W. Murray, The structure of the  $Mn_4Ca^{2+}$  cluster of photosystem II and its protein environment as revealed by X-ray crystallography, *Philosophical Transactions of the Royal Society. Series B, Biological Sciences* 2008, 363, 1129-1138.
8. B. A. Barry, G. T. Babcock, Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolving system, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987, 84, 7099-7103.
9. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Βιοχημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2004.
10. J. Biesiadka, B. Loll, J. Kern, K. Irrgang, A. Zouni, Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3,2 Å resolution: a closer look at the Mn-cluster, *Biochimica et Biophysica Acta* 2004, 6, 4733-4736.

11. A. Boussac, J. Girerd, A. W. Rutherford, Conversion of the spin state of the manganese complex in photosystem II induced by near-infrared light, *Biochemistry* 1996, 35, 6984–6989.
12. A. Boussac, Inhomogeneity of the EPR multiline signal from the S<sub>2</sub>-state of the photosystem II oxygen-evolving enzyme, *J. Biol. Inorg. Chem.* 1997, 2, 580–585.
13. A. Boussac, M. Sugiura, A.W. Rutherford, P. Dorlet, Complete EPR spectrum of the S<sub>3</sub>-state of the oxygen-evolving Photosystem II, *Journal of the American Chemical Society* 2009, 131, 5050–5051.
14. R. D. Britt, Oxygen evolution. In *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (ed. D. R. Ort & C. F. Yocum), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer, 1996, 137–164.
15. H. Dau, M. Haumann, Time-resolved X-ray spectroscopy leads to an extension of the classical S-state cycle model of photosynthetic oxygen evolution, *Photosynthesis Research* 2007, 92, 327-343.
16. R. J. Debus, B. A. Barry, G. T. Babcock, L. McIntosh, Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988a, 85, 427-430.
17. R. J. Debus, B. A. Barry, I. Sithole, G. T. Babcock, L. McIntosh, Directed mutagenesis indicates that the donor to P680<sup>+</sup> in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide, *Biochemistry* 1988b, 27, 9071-9074.
18. B. Diner, G. T. Babcock, Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in photosystem II. In *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (ed. D. R. Ort & C. F. Yocum), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer, 1996, 213-247.
19. P. Faller, C. Goussias, A. W. Rutherford, S. Un, Resolving intermediates in biological proton-coupled electron transfer: A tyrosyl radical prior to proton movement, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, 100, 8732-8735.

20. K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, S. Iwata, Architecture of the photosynthetic oxygen evolving center, *Science* 2004, 303, 1831-1838.
21. R. C. Ford, M. C. W. Evans, Isolation of a photosystem 2 preparation from higher plants with highly enriched oxygen evolution activity, *Febs Letters* 1983, 160, 159-164.
22. C. Fufezan, C. Zhang, A. Krieger-Liszkay, W. Rutherford, Secondary quinone in Photosystem II of *Thermosynechococcus elongatus*: semiquinone-iron EPR signals and temperature dependence of electron transfer, *Biochemistry* 2005, 44, 12780-12789.
23. P. Geijer, F. Morvaridi, S. Styring, The  $S_3$  state of the oxygen-evolving complex in photosystem II is converted to the  $S_2Y_Z'$  state at alkaline pH, *Biochemistry* 2001, 40, 10881-10891.
24. C. Goussias, A. Boussac, A. W. Rutherford, Photosystem II and photosynthetic oxidation of water: an overview, *Philosophical Transactions of the Royal Society. Series B, Biological Sciences* 2002, 357, 1369-1381.
25. A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni, W. Saenger, Cyanobacterial photosystem II at 2.9 Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nature Structural and Molecular Biology* 2009, 16, 334-342.
26. B. Hahkamer, E. Morris, J. Nield, A. Carne, J. Barber, Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II, *Febs Letters* 2001a, 504, 142-151.
27. B. Hahkamer, E. Morris, J. Nield, C. Gerle, J. Barber, Three-dimensional structure of the Photosystem II core dimer of higher plants determined by electron microscopy, *Journal of Structural Biology* 2001b, 135, 262-269.
28. N. Ioannidis, V. Petrouleas, Electron Paramagnetic Resonance signals from the  $S_3$  state of the oxygen-evolving complex. A

- broadened radical signal induced by low-temperature near-infrared light illumination, *Biochemistry* 2000, 39, 5246-5254.
29. N. Ioannidis, J. H. A. Nugent, V. Petrouleas, Intermediates of the S<sub>3</sub> state of the oxygen-evolving complex of Photosystem II, *Biochemistry* 2002, 41, 9589-9600.
  30. N. Ioannidis, G. Zahariou, V. Petrouleas, Trapping of the S<sub>2</sub> to S<sub>3</sub> state intermediate of the oxygen-evolving complex of photosystem II, *Biochemistry* 2006, 45, 6252-6259.
  31. N. Ioannidis, G. Zahariou, V. Petrouleas, The EPR spectrum of tyrosine Z' and its decay kinetics in O<sub>2</sub>-evolving photosystem II preparations, *Biochemistry* 2008, 47, 6292-6300.
  32. K. Kawakami, Y. Umena, N. Kamiya, J. R. Shen, Structure of the catalytic, inorganic core of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2011, 104, 9–18.
  33. J. Kern, G. Renger, Photosystem II: Structure and mechanism of water: plastoquinone oxidoreductase, *Photosynthesis Research* 2007, 94, 183-202.
  34. W. Liang, M. J. Latimer, H. Dau, T. A. Roelofs, V. K. Yachandra, K. Sauer, M. P. Klein, Correlation between structure and magnetic spin state of the manganese cluster in the oxygen-evolving complex of Photosystem II in the S<sub>2</sub> state: determination by X-ray Absorption Spectroscopy, *Biochemistry* 1994, 33, 4923-4932.
  35. B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, J. Biesiadka, Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature* 2005, 438, 1040-1044.
  36. J. MacLachlan, J. H. A. Nugent, Investigation of the S<sub>3</sub> electron paramagnetic resonance signal from the oxygen-evolving complex of Photosystem 2: effect of inhibition of oxygen evolution by acetate, *Biochemistry* 1993, 32, 9772–9780.

37. E. McDermott, V. K. Yachandra, R. D. Guiles, J. L. Cole, S. L. Dexheimer, R. D. Britt, K. Sauer, M. P. Klein, Characterization of the Manganese O<sub>2</sub>-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* 1988, 27, 4021-4031.
38. J. P. McEvoy, G. W. Brudvig, Water splitting chemistry of photosystem II, *Chemical Reviews* 2006, 106, 4455-4483.
39. T. J. Meyer, M. H. V. Huynh, H. H. Thorp, The Possible Role of Proton-Coupled Electron Transfer (PCET) in Water Oxidation by Photosystem II, *Angewandte Chemie* 2007, 46, 5284 – 5304.
40. J. W. Murray, J. Barber, Structural characteristics of channels and pathways in photosystem II including the identification of an oxygen channel, *Journal of Structural Biology* 2007, 159, 228-237.
41. N. Nelson, C. F. Yocum, Structure and function of Photosystems I and II, *Annual Review of Plant Biology* 2006, 57, 521-565.
42. A. Pantazis, M. Orio, T. Petrenko, S. Zein, W. Lubitz, J. Messinger, F. Neese, Structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II: information on the S<sub>2</sub> state through quantum chemical calculation of its magnetic properties, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009, 11, 6788-6798.
43. V. Petrouleas, B. A. Diner, Light-induced oxidation of the acceptor-side Fe(II) of Photosystem II by exogenous quinones acting through the Q<sub>B</sub> binding site. I. Quinones, kinetics and pH-dependence, *Biochimica et Biophysica Acta* 1987, 893, 126-137.
44. V. Petrouleas, D. Koulougliotis, N. Ioannidis, Trapping of metalloradical intermediates of the S-states at liquid helium temperatures. Overview of the phenomenology and mechanistic implications, *Biochemistry* 2005, 44, 6723-6728.

45. Y. Sanakis, J. Sarrou, G. Zahariou, V. Petrouleas, Q-band EPR studies of the  $S_3$  state of the OEC of the Photosystem II, *Proceedings 14th Congress of Photosynthesis*, Glasgow, Scotland, 2007, 481–484.
46. R. A. Serway, *Physics for scientists and engineers*, εκδόσεις Κορφιάτη, 1990, υποκεφάλαια 42.3, 42.6.
47. P. E. M. Siegbahn, Structures and Energetics for  $O_2$  Formation in Photosystem II, *Accounts of Chemical Research* 2009, 42, 1871-1880.
48. G. Sioros, D. Koulougliotis, G. Karapanagos, V. Petrouleas, The  $S_1Y_2^{\cdot}$  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* 2007, 46, 210-217.
49. J. Sjöholm, K. G. V. Havelius, F. Mamedov, S. Styring, Effects of pH on the  $S_3$  state of the oxygen evolving complex in photosystem II probed by EPR split signal induction, *Biochemistry* 2010, 49, 9800–9808.
50. M. Sproviero, J. A. Gasco, J. P. McEvoy, G. W. Brudvig, V. S. Batista, Quantum mechanics / molecular mechanics study of the catalytic cycle of water splitting in Photosystem II, *Journal of the American Chemical Society* 2008, 130, 3428-3442.
51. S. Styring, A. W. Rutherford, 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* 1987, 26, 2401-2405.
52. S. Styring, A. W. Rutherford, 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* 1988, 933, 378-387.
53. M. Swartz, J. R. Bolton, D. C. Borg, *Biological applications of ESR*, John Wiley and sons, 1972.
54. M. Symons, *Chemical and Biochemical Aspects of Electron Spin Resonance Spectroscopy*, Van Nostrand Reinhold Company, 1978.

55. C. Tommos, G. T. Babcock, Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation, *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, 1458, 199-219.
56. Y. Umena, K. Kawakami, J. R. Shen, N. Kamiya, Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature* 2011, 473, 55–60 .
57. B. Weckhuysen, R. Heidler, R. Schoonheydt, Electron Spin Resonance Spectroscopy, *Mol. Sieves* 4, 2004, 295–335.
58. J. A. Weil, J. R. Bolton, J. E. Wertz, Electron Paramagnetic Resonance: Elementary theory and practical applications, John Wiley and sons, INC, 1994.
59. 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, X-ray damage to the Mn<sub>4</sub>Ca complex in single crystals of photosystem II: A case study for metalloprotein crystallography, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005, 102, 12047-12052.
60. J. Yano, J. Kern, K. Sauer, M. J. Latimer, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, W. Saenger, J. Messinger, A. Zouni, V. K. Yachandra, Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn<sub>4</sub>Ca cluster, *Science* 2006, 314, 821-825.
61. J. Yano, V. K. Yachandra, Oxidation state changes of the Mn<sub>4</sub>Ca cluster in Photosystem II, *Photosynthesis Research* 2007, 92, 289-303.
62. J. Yano, V. K. Yachandra, Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn<sub>4</sub>Ca cluster from X-ray spectroscopy, *Inorganic Chemistry* 2008, 47, 1711-1726.
63. G. Zahariou, N. Ioannidis, G. Sioros, V. Petrouleas, The collapse of the tyrosine Z'-Mn spin-spin interaction above ~100K 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* 2007, 46, 14335-14341.
64. L. Zimmermann, A. W. Rutherford, Electron paramagnetic resonance properties of the S<sub>2</sub> State of the oxygen-evolving complex of Photosystem II, *Biochemistry* 1986, 25, 4609–4615.
65. A. Zouni, H. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauß, W. Saenger, P. Orth, Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature* 2001, 409, 739-743.