ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μ.Π.Σ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Πυρήνες» μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας στο LHC II – Ο ρόλος των πολυαμινών

Θεόδωρος Κ. Τσιάβος

Υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κυριάκου Κοτζαμπάση

Επιμέλεια : Δρ. Νικόλαος Ιωαννίδης

Ηράκλειο

Σεπτέμβριος 2009

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

Κυριάκος Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ηλέκτρα Γκιζελή, Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Στέργιος Πυρίντσος, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών & Φωτοβιολογίας, του τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου, κ. Κ. Κοτζαμπάση για την πολύτιμη καθοδήγησή του και την ηθική υποστήριξη καθ’ όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, όπως επίσης και το διδάκτορα Ν. Ιωαννίδη για την άψογη συνεργασία μας και την πολύτιμη συνεισφορά του στην εργασία αυτή.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς μου επιτροπής Επίκουρους Καθηγητές κα Η. Γκιζελή και κ. Στ. Πυρίντσο. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κα Γκιζελή και τον Μ. Σαϊτάκη για τη συνεργασία μας στη δημιουργία των λιποσωμάτων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ν. Χανιωτάκη του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και τη διδάκτορα Β. Βαμβακάκη για την εκπαίδευσή μου πάνω στις φασματοσκοπίες IR και Raman και τη συλλογή των φασμάτων Raman της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά και τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας & Βιοτεχνολογίας Φυτών Π. Μόσχου και Ε. Ανδρόνη και τα μέλη του εργαστηρίου Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας Α. Δελή και Σ. Αρναουτέλη για την παραχώρηση απαραίτητων μηχανημάτων και υλικών για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της εργασίας αυτής.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την ηθική και κυρίως την υλική υποστήριξη, χωρίς την οποία δε θα μπορούσα να πραγματοποιήσω τους στόχους μου.

Περιεχόμενα **Σελίδα**

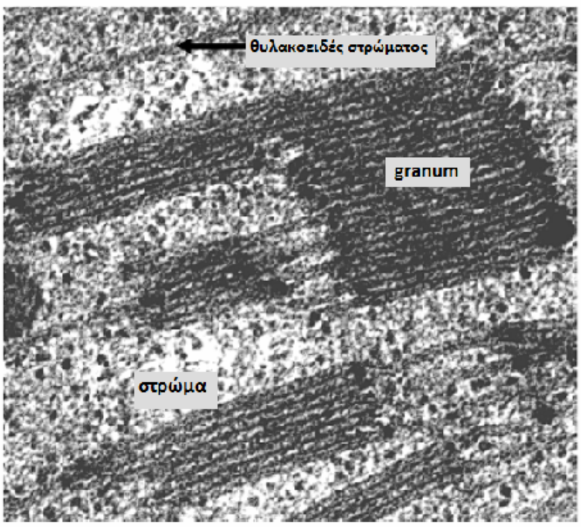
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φωτοσύνθεση

Σχεδόν όλη η ελεύθερη ενέργεια που καταναλώνεται από τα βιολογικά συστήματα πηγάζει από την ηλιακή ενέργεια που παγιδεύεται από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης. Αυτό γίνεται κατανοητό αν αναλογιστεί κανείς πως οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί αποτελούν τόσο στα υδατικά, όσο και στα χερσαία οικοσυστήματα, τη βάση της τροφικής πυραμίδας. Το ποσό της ελεύθερης ενέργειας που αποθηκεύεται μέσω της φωτοσύνθεσης είναι αστρονομικό και φτάνει τα 10^{17} Kcal κάθε χρόνο, ποσότητα που αντιστοιχεί στη μετατροπή περισσότερων των 10^{10} τόνων άνθρακα σε υδατάνθρακα και άλλες μορφές οργανικής ύλης.

Κατά την οξυγονική φωτοσύνθεση, τα φυτά και ορισμένα είδη βακτηρίων δεσμεύουν από την ατμόσφαιρα διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο χρησιμοποιούν για τη σύνθεση υδατανθράκων, απελευθερώνοντας ταυτόχρονα οξυγόνο. Η πορεία της φωτοσύνθεσης περιλαμβάνει δύο είδη αντιδράσεων, τις φωτεινές και τις σκοτεινές. Στις φωτεινές αντιδράσεις με τη βοήθεια της ηλιακής ενέργειας παράγεται NADPH και μια ηλεκτροχημική διαβάθμιση που διατίθεται για την παραγωγή ATP. Τα δύο αυτά μόρια «επενδύονται» στο στάδιο των σκοτεινών αντιδράσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν την αναγωγή του CO_2 και τη σύνθεση των υδατανθράκων. Ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης είναι πολύπλοκος και απαιτεί τη συμμετοχή και αλληλεπίδραση πολλών πρωτεϊνών και μικρών μορίων . Μεταξύ των ηλεκτρονιομεταφορέων που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία συμπεριλαμβάνονται η χλωροφύλλη a, η φαιοφυτίνη, κινόνες, τα κυτοχρώματα b και f, κέντρα Fe-S της πρωτεΐνης Rieske, η πλαστοκυανίνη, η φερρεδοξίνη και μια φλαβοπρωτεΐνη (FP) (Εικ.1.2).

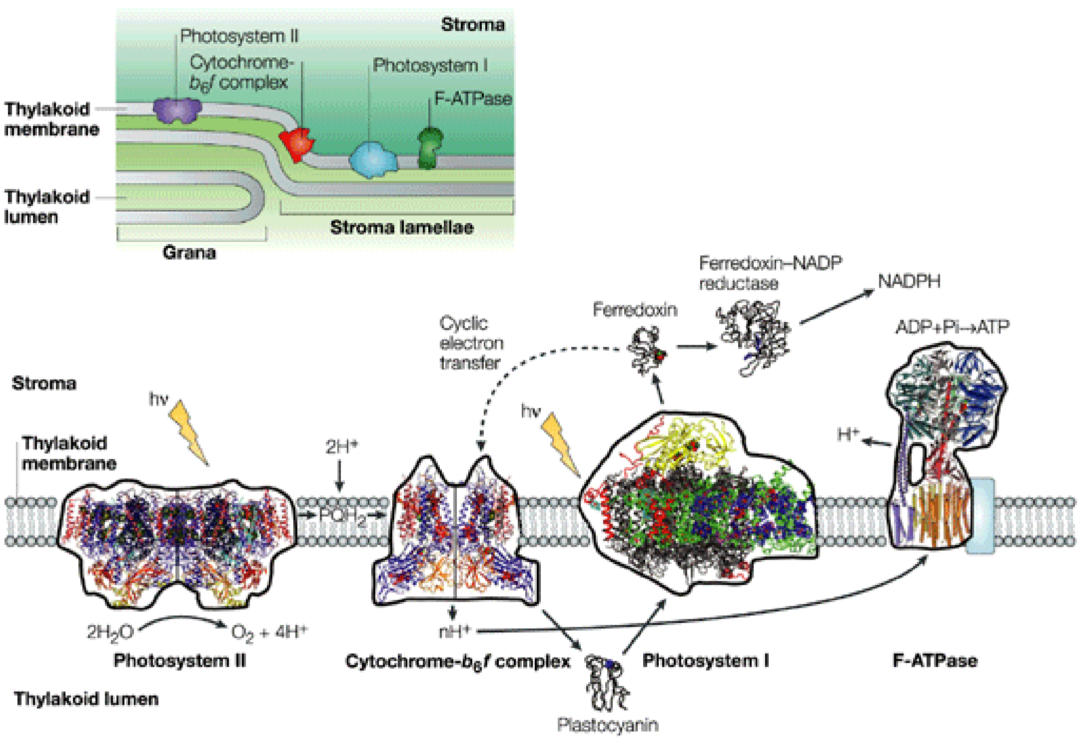
Χωροταξικά, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός των φυτών εντοπίζεται μέσα σε ειδικά οργανίδια του κυττάρου, τους χλωροπλάστες. Αυτοί έχουν συνήθως μήκος 5μm και περιβάλλονται από μια διπλή μεμβράνη, τον πλαστιδιακό φάκελο. Η εξωτερική μεμβράνη του χλωροπλάστη είναι διαπερατή στους περισσότερους μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους, ενώ η εσωτερική είναι επιλεκτικά διαπερατή στα περισσότερα μόρια και ιόντα. Ο χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικός, ενώ ο χώρος που περιβάλλει η εσωτερική μεμβράνη αποτελεί το θεμελιώδες υλικό του πλαστιδίου και ονομάζεται στρώμα. Το στρώμα περιέχει διαλυτά



Εικόνα 1.1 Χλωροπλάστης από φυτό καπνού.

ένζυμα, που καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης, και αναπτυγμένο σύστημα μεμβρανών, το οποίο αποτελεί συνέχεια της εσωτερικής μεμβράνης. Οι αναδιπλώσεις αυτές ονομάζονται ελασμάτια (lamellae). Αυτά, σε κανονικά διαστήματα, διαπλατύνονται και δημιουργούν μεμβρανώδεις σάκους, τα θυλακοειδή, που περιέχουν έναν εσωτερικό υδάτινο χώρο, τον μικροχώρο (lumen). Τα θυλακοειδή, τέλος, οργανώνονται σε μεμβρανικές στιβάδες, τα grana (Εικ.1.1). Οι μεμβράνες των θυλακοειδών περιέχουν τον μηχανισμό μεταγωγής της ενέργειας. Εκεί βρίσκονται οι φωτοσυνθετικές μονάδες που αποτελούνται από πρωτεΐνες και φωτοσυνθετικές χρωστικές οργανωμένες σε σύμπλοκα.

Μια φωτοσυνθετική μονάδα αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα χρωστικών/πρωτεϊνών : το φωτοσύστημα II (PS II), με το σύμπλοκο συλλογής φωτός (Light Harvesting Complex, LHC II), το φωτοσύστημα I (PS I), με το αντίστοιχο σύμπλοκο συλλογής φωτός, LHC I, το κυτόχρωμα b_6/f (cyt b_6/f) και την συνθάση του ATP (ATPase) (Εικ. 1.1). Τα παραπάνω είναι άνισα κατανεμημένα στις στοιβαγμένες και μη στοιβαγμένες περιοχές της μεμβράνης των θυλακοειδών. Το PS I και η συνθάση του ATP βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στις μη στοιβαγμένες περιοχές, ενώ το PS II εντοπίζεται κυρίως στις στοιβαγμένες περιοχές. Το cyt b_6/f είναι ισότιμα κατανεμημένο και στις δύο περιοχές. Παρόλα αυτά, τα φωτοσυνθετικά αυτά συγκροτήματα λειτουργούν συντονισμένα, σαν μια μονάδα (Εικ.1.2).



Εικόνα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής των τεσσάρων πρωτεϊνικών συμπλόκων στις θυλακοειδείς μεμβράνες του χλωροπλάστη (επάνω) και η δομή τους (κάτω). Παρουσιάζεται επίσης η δομή κάποιων πομπών και δεκτών ηλεκτρονίων (όπως πλαστοκυανίνη και η φερρεδοξίνη) καθώς και τα κύρια μονοπάτια μεταφοράς των ηλεκτρονίων και των πρωτονίων. [N. Nelson and A. Ben-Shem / Nature Reviews Molecular Cell Biology 5 (2004) 971-982]

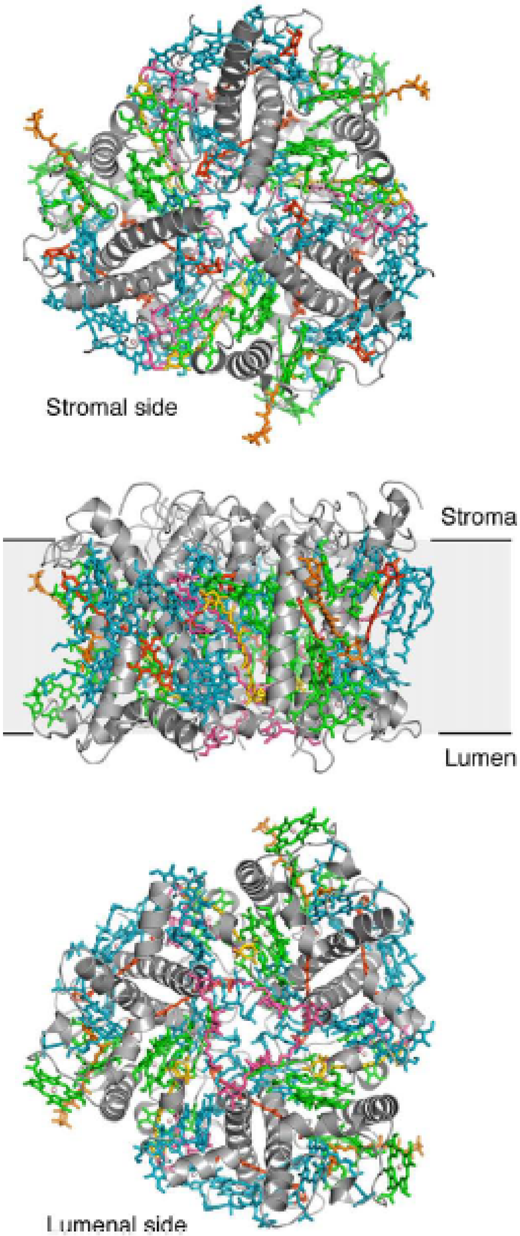
1.2 Σύμπλοκο συλλογής φωτός του φωτοσυστήματος ΙΙ (LHC II)

Το LHC II ανήκει σε μια μεγάλη ομάδα χλωροπλαστιδιακών μεμβρανικών πρωτεϊνών και αντιστοιχεί στο 30% περίπου της ολικής πρωτεΐνης στις μεμβράνες του χλωροπλάστη (Peter and Thornber, 1991) με αποτέλεσμα να αποτελεί την πιο άφθονη μεμβρανική πρωτεΐνη στον πλανήτη. Οι LHC αποπρωτεΐνες είναι το προϊόν της *Lhc* υπεροικογένειας γονιδίων που περιλαμβάνει τουλάχιστον 30 ομόλογα γονίδια στην *Arabidopsis* (Jansson, 1999). Η οικογένεια περιλαμβάνει όχι μόνο τα τρία πολυπεπτίδια του κύριου LHC II (LHC IIb), Lhcb1, Lhcb2 και Lhcb3, αλλά και τα μονομερή μέρη του επονομαζόμενου δευτερεύοντος LHC II, γνωστά ως CP24, CP26 και CP29 (Camm and Green, 2004), τα οποία προέρχονται από τα γονιδιακά προϊόντα Lhcb6, Lhcb5 και Lhcb4 αντίστοιχα (Jansson et al., 1992). Άλλα μέλη της οικογένειας είναι τα σύμπλοκα της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PS I, Lhca1, Lhca2, Lhca3 και Lhca4 και τα σχετικά με αυτά Lhca5 και Lhca6 (Jansson, 1999). Μέλη της οικογένειας με πιο μακρινή συγγένεια είναι οι επαγόμενες από το φως φωτοπροστατευτικές πρωτεΐνες ELIPS (Meyer and Kloppstech, 1984; Adamska, 1997) και το συστατικό του PS II PsbS (Wedel et al., 1992; Kim et al., 1992), το οποίο στην ώριμη μορφή του παρουσιάζει μόνο 15% ομοιότητα με το Lhcb1. Το LHC II, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας κωδικοποιείται στον πυρήνα (Kung et al., 1972).

Στη μεμβράνη των θυλακοειδών το LHC II αθροίζεται σε τριμερή. Τα τρία κύρια υποσύμπλοκα Lhcb1, Lhcb2 και Lhcb3 φαίνεται να συνδυάζονται τυχαία σε τριμερή διάταξη αν και εμφανίζουν διαφορετική τάση για φωσφορυλίωση και για σχηματισμό τριμερών (Standfuss and Kuhlbrandt, 2004). Έχει αποδειχτεί ότι το μοτίβο WYGPDR που ενυπάρχει στο LHC II και στο CP26 (Hobe et al., 1995), αλλά απουσιάζει από τα CP24, CP29 και τις Lhca πρωτεΐνες (Green and Pichersky, 1994), είναι απαραίτητο για το σχηματισμό τριμερών. Η συναρμολόγηση των μονομερών σε τριμερή συμβαίνει αυθόρμητα με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των ελεύθερων μονομερών LHC II στη μεμβράνη των θυλακοειδών να είναι μηδαμινή, ενώ η κατάσταση των μερών του δευτερεύοντος LHC II δεν είναι τόσο σαφής. Για παράδειγμα, όταν απουσιάζουν οι Lhcb1 και Lhcb2, τριμερή των CP26 φαίνεται να υποκαθιστούν το κύριο LHC II και η μακρο-οργάνωση του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου LHC II/PS II διατηρείται (Ruban et al., 2003).

Το χαρακτηριστικό σκούρο πράσινο χρώμα των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων τύπου LHC είναι απόρροια της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε χλωροφύλλη (υπολογίζεται ότι η τοπική συγκέντρωση χλωροφύλλης στο τριμερές είναι περίπου 300mM). Ίσως η πιο αξιοσημείωτη ιδιότητα του LHC II είναι η ικανότητά του να προσδένει ένα σύνολο 54 χρωστικών πέντε διαφορετικών ειδών στο μικρό όγκο που καταλαμβάνει ένα τριμερές, καθώς και να τις κατανέμει προσδίδοντας τους το σωστό προσανατολισμό. Κάθε μία εκ των Lhcb1, Lhcb2 και Lhcb3 προσδένει ως συμπαράγοντες 14 μόρια χλωροφύλλης (8 μόρια χλωροφύλλης a και 6 μόρια χλωροφύλλης b), 4 μόρια τριών διαφορετικών καροτενοειδών (2 λουτεΐνες, 1 νεοξανθίνη και 1 βιολαξανθίνη) και δύο διαφορετικά λιπίδια, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση της δομής τους (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005). Στο τριμερές οι χλωροφύλλες εντοπίζονται σε δύο στρώματα κοντά στις δύο επιφάνειες της μεμβράνης. Πέντε χλωροφύλλες a και τρεις χλωροφύλλες b συναντώνται κοντά στην περιοχή του στρώματος ενώ οι υπόλοιπες τρεις χλωροφύλλες a και τρεις χλωροφύλλες b στην πλευρά του μικροχώρου. Οι αποστάσεις μεταξύ των κέντρων δύο γειτονικών χλωροφυλλών κυμαίνονται μεταξύ 10Å και 13Å.

Όπως υποδηλώνει το όνομά του, η πρωταρχική λειτουργία του LHC II είναι να κάνει αποδοτικότερη τη φωτοσυνθετική διαδικασία στα πράσινα φυτά, απορροφώντας την ηλιακή ενέργεια και μεταφέροντάς την στα κέντρα αντίδρασης των δύο φωτοσυστημάτων (van Amerongen and Dekker, 2003). Ο ρόλος του δε μένει στη συλλογή της ενέργειας αλλά προχωρά και στη διατήρηση της ενεργειακής ισορροπίας μεταξύ των PS II και PS I στη μεμβράνη των θυλακοειδών κάτω από διαφορετικές συνθήκες φωτός (Allen, 2003). Επιπλέον, το LHC II ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού διατηρώντας τη δομή των grana (Mullet, 1983; Allen and Forsberg, 2001; Standfuss et al., 2005). Ένας τέταρτος πολύ σημαντικός ρόλος του LHC II είναι αυτός της φωτοπροστασίας του PS II, διαχέοντας θερμικά την περίσσεια ενέργεια υπό συνθήκες πίεσης διέγερσης (Horton, 2005). Τέλος, έχει προταθεί ότι το LHC II μπορεί να λειτουργήσει σαν κανάλι μεταφοράς πρωτονίων (Iwaszko et al., 2004), ένας ρόλος που εξετάζεται και στην παρούσα εργασία.

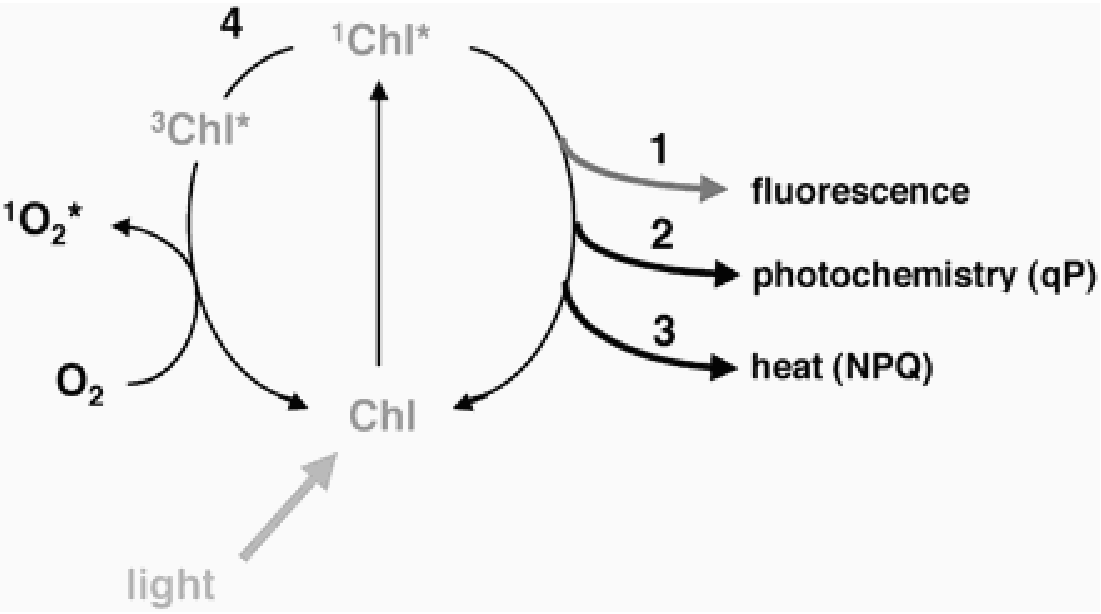


Εικόνα 1.3 Δομή του LHC II: Το τριμερές σύμπλοκο όπως φαίνεται από την πλευρά του στρώματος (επάνω), μέσα στη μεμβράνη (κέντρο) και από την πλευρά του μικροχώρου (κάτω). Γκρι: πολυπεπτίδιο, κυανό: χλωροφύλλη a, πράσινο: χλωροφύλλη b, σκούρο πορτοκαλί: λουτεϊνη, ανοιχτό πορτοκαλί: νεοξανθίνη, κίτρινο: βιολαξανθίνη, ροζ: λιπίδιο. [T. Barros, W. Kuehlbrandt / Biochimica et Biophysica Acta 1787 (2009) 753-772]

1.3 Ο μηχανισμός μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας (NPQ)

Ένα μόριο χλωροφύλλης *in vivo* που βρίσκεται σε μια διεγερμένη κατάσταση Sn (^{1}Chl*) λόγω απορρόφησης ηλιακής ακτινοβολίας μπορεί να αποδιεγερθεί και να φτάσει στην ενεργειακά βασική του κατάσταση μέσω ενός από τα παρακάτω μονοπάτια. Η ενέργεια διέγερσης μπορεί να εκπεμφθεί εκ νέου σαν φθορισμός της χλωροφύλλης (Εικ.1.4) ή μπορεί να μεταφερθεί στα ενεργά κέντρα και να τροφοδοτήσει φωτοσυνθετικές αντιδράσεις, δηλαδή να χρησιμοποιηθεί στη φωτοχημεία (Εικ.1.4). Ο τελευταίος μηχανισμός μειώνει το μέγεθος του φθορισμού και για αυτό αναφέρεται ως φωτοχημική απόσβεση (photochemical quenching, qP) του φθορισμού της χλωροφύλλης.

Κάτω όμως από συνθήκες έντονου φωτισμού προκαλείται περίσσεια πίεσης διέγερσης (excitation pressure) στο PS II που οδηγεί σε αύξηση του χρόνου ημιζωής της διεγερμένης χλωροφύλλης. Η αποδιέγερση του μορίου ^{1}Chl* σε αυτήν την περίπτωση γίνεται μέσω ενός ενδιάμεσου ενεργειακού επιπέδου, αυτό της χλωροφύλλης στην τρίτη διεγερμένη κατάσταση ^{3}Chl* το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στην παραγωγή οξυγόνου απλής διεγερμένης κατάστασης $^1O_2$* (singlet oxygen), μιας ενεργής μορφής οξυγόνου που είναι τοξική (Εικ.1.4). Αν δεν ακολουθήσει άμεσα αποτοξίνωση, το $^1O_2$* μπορεί να προκαλέσει τροποποίηση πρωτεϊνών και υπεροξείδωση λιπιδίων. Επιπλέον, η υπεροξείδωση των λιπιδίων γίνεται αυτοκαταλυτική καταλήγοντας σε μαζική φωτοκαταστροφή μεμβρανών (Niyogi, 1999). Περίσσεια φωτός επίσης εξαντλεί τη δεξαμενή του $NADP^+$ προκαλώντας μια αύξηση του ρυθμού ροής των ηλεκτρονίων από το δότη του PS I στο οξυγόνο, δημιουργώντας υπεροξείδιο και υπεροξείδιο του υδρογόνου (Asada, 1999).



Εικόνα 1.4. Πιθανά μονοπάτια της διεγερμένης χλωροφύλλης (Mueller et al., 2001).

Προς αποφυγή αυτών των καταστρεπτικών συνεπειών της περίσσειας φωτός, οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει φωτοπροστατευτικούς μηχανισμούς, οι οποίοι μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες. Υπάρχουν μηχανισμοί που εμπλέκουν αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης και άλλοι που δεν σχετίζονται με κάποια αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης για να λειτουργήσουν. Οι τελευταίοι αποτελούν την καθεαυτό αυτορύθμιση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αφού μέσω μιας αλυσίδας μοριακών γεγονότων επιτρέπουν βραχυπρόθεσμη προσαρμογή. Στην πρώτη γραμμή απόκρισης του φυτού σε συνθήκες υψηλού φωτισμού είναι η θερμική διάχυση της περίσσειας ενέργειας στο LHC II (Εικ.1.4) που οδηγεί και αυτή σε μείωση του φθορισμού και αναφέρεται ως μη-φωτοχημική απόσβεση (non-photochemical quenching NPQ ή qN) του φθορισμού της χλωροφύλλης. Αυτή η διαδικασία μειώνει τη μεταφορά ενέργειας στο PS II και ελαχιστοποιεί το σχηματισμό ^{3}Chl* στο LHC II. Αυτό το πετυχαίνει μειώνοντας το χρόνο ημιζωής της ^{1}Chl* μετατρέποντας την επιπλέον ενέργεια σε θερμότητα. Έτσι, αποτρέπεται η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου.

Η ενεργοποίηση του NPQ στα ανώτερα φυτά οφείλεται κατά 80% στην ενεργοποίηση/φόρτιση της μεμβράνης των θυλακοειδών (energization quenching ή συντελεστής qE του μηχανισμού NPQ) (Wraight et al., 1970; Kramer et al., 2003). Σε συνθήκες υψηλού φωτισμού η μεμβράνη των θυλακοειδών φορτίζεται κυρίως λόγω της γραμμικής ροής ηλεκτρονίων. Έτσι, υπάρχει διαφορά στις συγκεντρώσεις πρωτονίων μεταξύ στρώματος και μικροχώρου και κατ’ επέκταση δημιουργείται pmf (ΔpH+Δψ), της οποίας το ωσμοτικό μέρος (ΔpH) πυροδοτεί εντός δευτερολέπτων τη διαδικασία διάχυσης της ενέργειας (Horton et al., 1996 ; Niyogi, 1999). Η δημιουργία ΔpH προκαλεί πρωτονίωση εκτεθειμένων καρβοξυλομάδων καταλοίπων των CP26 (Horton and Ruban, 1992), CP29 (Pesaressi et al., 1997) και της PsbS υπομονάδας του PS II (Li et al., 2000). Η πρωτονίωση οδηγεί σε αλλαγές της στερεοδιαμόρφωσης των πρωτεϊνών του LHC II και στη δημιουργία ενός συμπλόκου διάχυσης της ενέργειας, χαρακτηριστικό γνώρισμα του οποίου είναι η διαφορά στην απορρόφηση στα 535nm (ΔA_{535}) (Horton et al., 1991). Η έρευνα εστιάζεται πλέον στην ταυτότητα αυτού του κέντρου διάχυσης αφού δεν είναι ακόμη σαφές αν η μείωση του φθορισμού της χλωροφύλλης οφείλεται σε αλληλεπίδραση κάποιων χλωροφυλλών με κάποιες ξανθοφύλλες (Horton et al., 2005; Holt et al., 2005; Ahn et al., 2008) ή με τη λουτεΐνη (Ruban et al., 2007; Ilioaia et al., 2008) ή με άλλες γειτονικές χλωροφύλλες (Crofts and Yerkes, 1994) ή με κάτι διαφορετικό ικανό να προκαλέσει τη μετατροπή ενός συστατικού με χρόνο ζωής φθορισμού τα 2ns σε συστατικό με χρόνο ζωής φθορισμού τα 0.6ns.

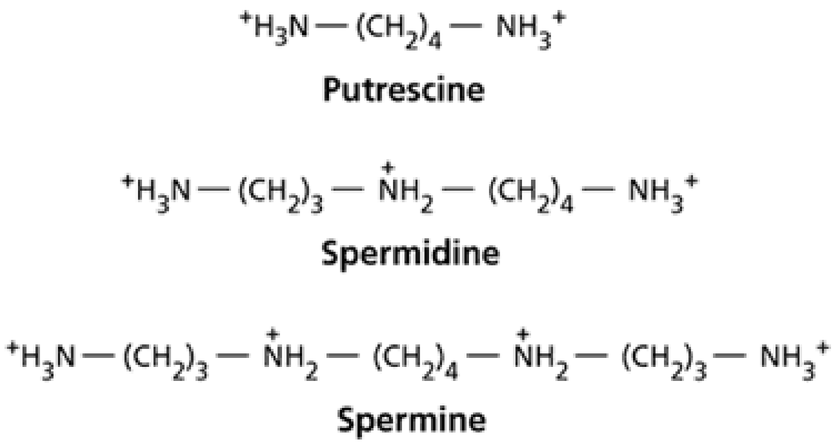
Ο μηχανισμός NPQ μπορεί να διαιρεθεί σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικούς συντελεστές σύμφωνα με τις κινητικές «χαλάρωσής» τους στο σκοτάδι μετά από μια περίοδο φωτισμού, καθώς και με την απόκρισή τους στους διαφορετικούς ανασταλτικούς παράγοντες. Έτσι, εκτός από τον συντελεστή qE, ένας δεύτερος συντελεστής είναι ο λεγόμενος μηχανισμός μετακίνησης της κεραίας “state transitions” ή qT (Allen J.F., 1992). Αυτός σχετίζεται με την ανακατανομή της ενέργειας διέγερσης μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων που επάγεται σε μεταβαλλόμενες συνθήκες φωτισμού. Όταν το PS II διεγείρεται υπερβολικά, ένα μέρος του LHC II μεταφέρεται στο PS I μειώνοντας με τον τρόπο αυτό την ενέργεια που δέχεται το PS II και κατ' επέκταση και τον κίνδυνο καταστροφής του. Τέλος, υπάρχει και ο συντελεστής qI που ενεργοποιείται λόγω φωτοαναστολής και εμφανίζει πολύ αργές κινητικές χαλάρωσης διάρκειας ωρών (Aro et al., 1993). Συνηθίζεται, όπως και σε αυτήν την εργασία από εδώ και στο εξής, να αναφερόμαστε με τον όρο NPQ για τον πρώτο συντελεστή.

Η σημασία του μηχανισμού μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας είναι μεγάλη και έγκειται στην ικανότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού να προστατεύεται από το έντονο φως και να επιβιώνει σε ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Στηρίζεται στην αρχή πως οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί πρέπει να διατηρούν την ισορροπία παροχής και κατανάλωσης ενέργειας ούτως ώστε να προστατεύονται από τα ζημιογόνα αποτελέσματα της περίσσειας φωτονιακής ενέργειας και να διατηρούν σε ανεκτά για τη ζωή επίπεδα τα ATP και NADPH. Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός επιτυγχάνει μεγάλη απόδοση (μεγάλο λόγο ηλεκτρονίων που μετακινήθηκαν από το PSII στο PSI προς φωτόνια που απορροφήθηκαν) όταν η ένταση φωτισμού είναι χαμηλή και από την άλλη επιτυγχάνει την ελαχιστοποίηση των ζημιών (χάρη στην υψηλή μη-φωτοχημική διαχείριση της φωτονιακής ενέργειας) όταν η ένταση φωτισμού αυξάνεται. Με άλλα λόγια, το ποσοστό της ενέργειας που φτάνει στα κέντρα αντίδρασης δεν είναι σταθερό αυξανόμενης της έντασης φωτισμού, αλλά ρυθμίζεται με τους παραπάνω μηχανισμούς ώστε να μειώνεται ο κίνδυνος φωτοαναστολής.

1.4 Πολυαμίνες

Οι πολυαμίνες είναι μικρού μοριακού βάρους αλειφατικά μόρια, ευρέως διαδεδομένα σε σχεδόν όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. . Όπως λέει και το όνομά τους είναι οργανικά μόρια με περισσότερες της μιας αμινομάδες (Εικ.1.5). Η αρχική ανακάλυψή τους έγινε στα 1678 όταν περιγράφτηκε ο τριεδρικός κρύσταλλος του ανθρώπινου ορού του σπέρματος (van Leeuwenhoek, 1678). Επειδή η περιγραφόμενη πολυαμίνη υπάρχει σε μεγάλη συγκέντρωση στο σπέρμα ορίστηκε το όνομα σπερμίνη [N,N'-bis(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine; Spermine ή Spm] (Ladenburg and Abel, 1888). Συμφώνως, δόθηκε το όνομα σπερμιδίνη [N-(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine; Spermidine ή Spd] σε μια προηγουμένως χημικά συντιθέμενη πολυαμίνη (Dudley et al., 1927). Η τετραμίνη σπερμίνη, η τριαμίνη σπερμιδίνη και η διαμίνη πουτρεσίνη (butane-1,4-diamine; Putrescine ή Put) αποτελούν τις τρεις κύριες πολυαμίνες. Τα κύτταρα των προκαρυωτικών οργανισμών περιέχουν κυρίως πουτρεσίνη και σπερμιδίνη ενώ τα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών περιέχουν και σπερμίνη (Bais and Ravishankar, 2002).

Από την ανακάλυψή τους και μετά, οι κυτταρικές, φυσιολογικές λειτουργίες των τριών κύριων πολυαμινών αποτελούν αντικείμενο πολυάριθμων μελετών. Λόγω του θετικού τους φορτίου, τα εν λόγω μόρια, μπορούν να προσδένουν διάφορα μακρομόρια του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των DNA, RNA, χρωματίνης και πρωτεϊνών με ηλεκτροστατικούς δεσμούς που μπορεί να προκαλέσουν σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση. Επιπλέον, ομοιοπολικοί δεσμοί μπορεί να οδηγήσουν σε διασύνδεση πρωτεϊνών που σχηματίζουν κυτταροτοξικά παράγωγα. Έτσι, γίνεται κατανοητό πως οι πολυαμίνες εμπλέκονται σε αναρίθμητες θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες, όπως είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, η μετάφραση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαμόρφωση του κυτταρικού σήματος και η σταθεροποίηση μεμβρανών (Tabor and Tabor, 1984; Cohen, 1998; Igarashi and Kashiwagi, 2000). Οι πολυαμίνες ρυθμίζουν επίσης τον κυτταρικό θάνατο και ιδίως την απόπτωση (Thomas and Thomas, 2001; Seiler and Raul, 2005).



Εικόνα 1.5 Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής δομής των κύριων πολυαμινών. Αυτές διαφέρουν τόσο στον αριθμό των θετικών φορτίων που εμφανίζουν σε φυσιολογικές ενδοκυτταρικές τιμές pH (4 στη σπερμίνη, 3 στη σπερμιδίνη και 2 στην πουτρεσίνη), όσο και στο μέγιστο μήκος του μορίου (1,46nm, 1,112nm και 0,65nm αντίστοιχα)

Ειδικά για τα θηλαστικά, οι πολυαμίνες και ο μεταβολισμός τους έχουν σαφή ιατρική και φαρμακευτική σημασία. Βρίσκονται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στον εγκέφαλο των θηλαστικών και πιστεύεται πως εμπλέκονται σε παθοφυσιολογικές διαταραχές όπως η εγκεφαλική ισχαιμία (Li et al., 2007). Επίσης, έχει βρεθεί ότι συνεισφέρουν στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του εντέρου, στην ωρίμανση της εντερικής βλεννώδους μεμβράνης και στην επιδιόρθωσή της μετά από τραυματισμό (Seiler and Raul, 2007). Επιπλέον, το μεταβολικό μονοπάτι των πολυαμινών αποτελεί αναγνωρισμένο στόχο φαρμάκων στην παρεμπόδιση του καρκίνου, καθώς υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της αναλογίας σε πολυαμίνη και της κυτταρικής αύξησης (Saunder and Wallace, 2007; Casero and Marton, 2007).

Οι φυτικές πολυαμίνες έχει προταθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μορφογένεση, την αύξηση, την εμβρυογένεση, την ανάπτυξη των οργάνων, στο γηρασμό των φύλλων και σε πληθώρα αποκρίσεων σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Kumar et al., 1997; Walden et al., 1997; Malmberg et al., 1998; Bouchereau et al., 1999; Liu et al., 2000; Alcazar et al., 2006; Groppa and Benavides 2007; Kusano et al., 2007b). Σε κυτταρικό επίπεδο, οι λειτουργίες αυτές μεταφράζονται σε σταθεροποίηση μεμβρανών, πρωτεϊνών και χλωροφυλλών

(Besford et al., 1993), παρεμποδισμό της απώλειας χλωροφύλλης σε γηρασμένα κύτταρα (Legocka and Zajchert, 1999), ανίχνευση και καταστροφή των ελεύθερων ριζών, αύξηση της σύνθεσης πρωτεϊνών, RNA και DNA, καθώς και αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας (Walden et al., 1997). Οι πολυαμίνες είναι επίσης υπεύθυνες για επιθυμητά χαρακτηριστικά αγρο-οικονομικής σημασίας, όπως η σύσταση του φυτού σε θρεπτικά συστατικά και η ποιότητα των φρούτων (Mehta et al., 2002; Matto et al., 2006).

Η βιοσύνθεση των πολυαμινών στα φυτά φαίνεται ότι ελέγχεται από το φως (Kramer et al., 1992) και κατά τη διάρκεια της φωτοπροσαρμογής ο λόγος Spm/Put επιδρά στην οργάνωση και λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ενώ ο φωτοϋποδοχέας για την προσαρμογή των πολυαμινών και την φωτοπροσαρμογή πιθανόν είναι κοινός (Kotzabasis et al., 1999; Navakoudis et al., 2007). Λεπτομερέστερη έρευνα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στα θυλακοειδή του σπανακιού έδειξε, όχι μόνο την ύπαρξη και των 3 κύριων πολυαμινών σ' αυτές τις μεμβράνες, αλλά επιπλέον, ότι οι πολυαμίνες βρίσκονται συνδεμένες στο LHC II και το PS II (Kotzabasis et al., 1993). Στο πλαίσιο αυτών των παρατηρήσεων προτάθηκε ότι οι πολυαμίνες ίσως παίζουν σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση των συμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Doernemann et al., 1996).

Η αλλαγή των επιπέδου των ενδοκυτταρικών πολυαμινών μπορεί να αυξήσει την ανοχή του φυτού (φωτοσυνθετικού μηχανισμού) κατά τη διάρκεια καταπόνησης στο όζον (Navakoudis et al., 2003), τη UVB ακτινοβολία (Sfichi et al., 2004), στο ψύχος (Sfakianaki et al., 2006) και σε ιοντικές καταπονήσεις (Demetriou et al., 2007). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η σπερμίνη και η σπερμιδίνη *in vitro* οδηγούν σε αποσυναρμολόγηση του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου, ενώ η φασματοσκοπία FTIR (Fourier transformed infrared difference spectroscopy) έχει δείξει μεγάλες διαφοροποιήσεις στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών του PS II ως αποτέλεσμα της αύξησης του θετικού φορτίου (Bograh et al., 1997; Beauchemin et al., 2007; Beauchemin et al., 2007). Πρόσφατα, έχει αποκαλυφθεί ο θετικός ρόλος της πουτρεσίνης στη φωτοφωσφορυλίωση (Ioannidis et al., 2006) αλλά και ότι σε αντίθεση με αυτή, οι Spd και Spm προκαλούν επαγωγή του NPQ ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς φωτοπροστασίας ακόμα και σε χαμηλής έντασης φωτισμό (Ioannidis and Kotzabasis, 2007).

ΣΚΟΠΟΣ

Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας εστιάζεται στη συγκριτική μελέτη και διαλεύκανση του ρυθμιστικού ρόλου των πολυαμινών στο μηχανισμό μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας (NPQ) από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό, που αποτελεί κεντρικό μηχανισμό ανθεκτικότητας / ευαισθησίας των φυτικών οργανισμών σε οποιαδήποτε μορφή καταπόνησης και ως εκ τούτου θέμα αιχμής τα τελευταία χρόνια. Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην καταγραφή των πιθανών *in vitro* βιοενεργητικών αλληλεπιδράσεων επιμέρους φωτοσυνθετικών (και μη) χρωστικών με τις τρεις κύριες πολυαμίνες, πουτρεσίνη, σπερμιδίνη και σπερμίνη. Επίσης, επιχειρείται μια προσπάθεια προσομοίωσης των *in vivo* συνθηκών της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του φωτοσυστήματος II (LHC II), όπου λαμβάνει χώρα ο μηχανισμός NPQ, στο χλωροπλάστη με τη δημιουργία λιποσωμάτων στα οποία θα ενσωματωθεί το απομονωμένο και λειτουργικό LHC II. Η παρασκευή αυτών των μεμβρανικών συστημάτων επιτρέπει να μελετήσουμε την ικανότητα του LHC II να λειτουργεί ως κανάλι μεταφοράς πρωτονίων, αλλά και το ρόλο όλων των επιμέρους πολυαμινών στη μεταφορά πρωτονίων και ιόντων γενικά δια μέσου του LHC II. Απώτερος σκοπός όλων των παραπάνω είναι ο έλεγχος της υπόθεσής μας περί δημιουργίας του κέντρου διάχυσης της ενέργειας από την αλληλεπίδραση κάποιας συγκεκριμένης χλωροφύλλης του LHC II με κάποια πολυαμίνη.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ

2.1 Οργανισμός και συνθήκες καλλιέργειας

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* L. *cv. Xanthi* ηλικίας 6-8 εβδομάδων που αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο κάτω από ρυθμιζόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού.

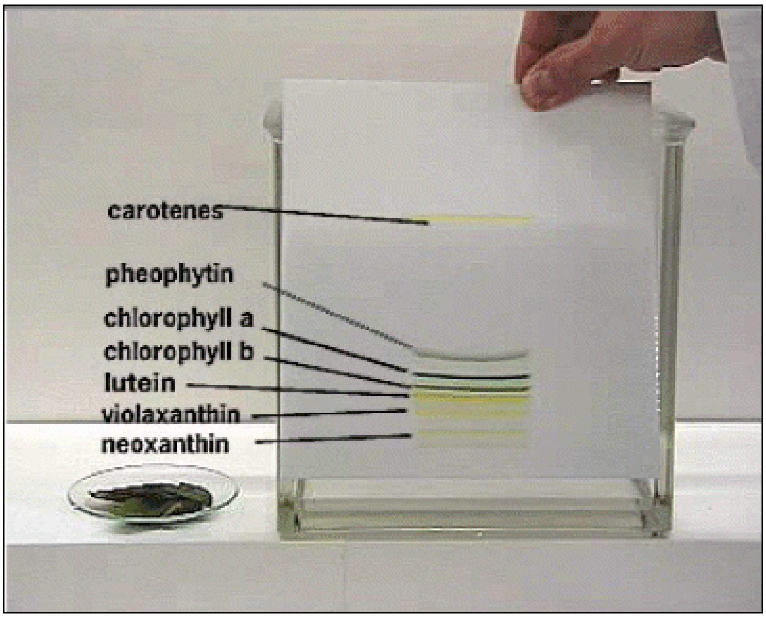
2.2.1 Απομόνωση και διαχωρισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Η απομόνωση των χλωροφυλλών a, b (Chl a&b) και της φαιοφυτίνης (Pheo) έγινε με τη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Η εκχύλιση των χρωστικών από φύλλα καπνού έγινε με ζεστή μεθανόλη, με προσθήκη ελάχιστης ποσότητας $Mg(CO_2)_3$ ώστε να παρεμποδιστεί η απώλεια του μαγνησίου των χλωροφυλλών. Το εκχύλισμα φυγοκεντρίθηκε για 5min σε 3000xg για την απαλλαγή του δείγματος από συσσωματώματα, πρωτεΐνες και λιπίδια και συλλέχτηκε το υπερκείμενο. Στο δοχείο χρωματογραφίας είχε τοποθετεί περίπου μια ώρα νωρίτερα το μείγμα ανάπτυξης, ώστε η ατμόσφαιρα του δοχείου να είναι κορεσμένη. Η σύσταση του μείγματος είχε ως εξής: πετρελαϊκός αιθέρας : 2-προπανόλη : dH_2O 100:10:0,25 v/v/v. Οι πλάκες χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν TLC aluminium sheets 20x20 silica gel 60 (Merck). Το δείγμα «φορτώθηκε» στην πλάκα αλουμινίου και ευθυγραμμίστηκε με προσωρινή ανάπτυξη της πλάκας σε ακετόνη. Η πλάκα τοποθετήθηκε στο δοχείο της TLC και αφέθηκε να αναπτυχθεί για 30 λεπτά περίπου. Οι ζώνες αποκολλήθηκαν μηχανικά με μια σπάτουλα και οι αντίστοιχες χρωστικές εκχυλίστηκαν σε 100% (v/v) αιθανόλη. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 5min στα 1500xg και το απαλλαγμένο από το υλικό προσρόφησης υπερκείμενο συλλέχτηκε, χαρακτηρίστηκε φασματοσκοπικά και αποθηκεύτηκε στους -20^0C. Όλη η διαδικασία απομόνωσης των χρωστικών πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες χαμηλής έντασης πράσινου φωτός, για να αποφευχθεί η φωτοοξείδωση των χλωροφυλλών.

2.2.2 Ποιοτικός προσδιορισμός χρωστικών

Ο προσδιορισμός των χρωστικών έγινε υπολογίζοντας τις τιμές Rf. Το Rf ορίζεται ως το πηλίκο του διαστήματος που έτρεξε η ουσία προς το διάστημα που έτρεξε το υγρό ανάπτυξης. Η τιμή Rf κάθε ουσίας είναι χαρακτηριστική και συγκεκριμένη για την ουσία στο διάλυμα ανάπτυξης (Εικ. 2.1). Παρακάτω παρατίθενται οι φωτοσυνθετικές χρωστικές με σειρά μειούμενης τιμής Rf (αντίστροφη σειρά προσρόφησης στη χρωματογραφική πλάκα) :

Καροτένια (1-2 κιτρινο-πορτοκαλί μπάντες)
Φαιοφυτίνη a (γκρι)
Χλωροφύλλη a (γαλαζοπράσινη)
Χλωροφύλλη b (κιτρινοπράσινη)
Ξανθοφύλλες (μέχρι και 3 κίτρινες μπάντες)



Εικόνα 2.1. Απεικόνιση της χρωματογραφικής πλάκας μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας. Πάνω στην πλάκα διακρίνονται οι χρωστικές με σειρά μειούμενης τιμής Rf. Χαρακτηριστικό είναι το διαφορετικό χρώμα κάθε χρωστικής.

2.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός χρωστικών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των χρωστικών έγινε φασματοφωτομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο των Lambert-Beer και τον ακόλουθο τύπο:

$$C = \frac{E}{\varepsilon \times d} ,$$

όπου E = απορρόφηση (OD)

ε = molar extinction coefficient ($L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$)

και d = πλάτος κυψελίδας (cm)

Τα διαλύματα σε 100% (v/v) ακετόνη των χλωροφυλλών a, b και της φαιοφυτίνης που απομονώθηκαν με τη μέθοδο της TLC φωτομετρήθηκαν στα 663,2 , 644,8 και 665,4 nm αντίστοιχα, σύμφωνα με τον πίνακα 2.1 (Afzal et al., 2004). Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις απορρόφησης ήταν τύπου 551S UV/VIS Spectrophotometer (Perkin Elmer).

Πίνακας 2.1 Molar extinction coefficients ε (L x mol-1 x cm-1) των χλωροφυλλών a και b και της φαιοφυτίνης a.

Solvent	λ_{max} nm	ε ($L mol^{-1} cm^{-1}$) C_a	ε ($L mol^{-1} cm^{-1}$) C_b
Diethyl ether	660.6	$3.06x10^4$	$9.32x10^4$
	642.2	$1.06x10^4$	$3.22x10^4$
	614.8	$5.46x10^3$	-
Diethyl ether (water-free)	660.0	$3.10x10^4$	$8.36x10^4$
	641.8	$1.15x10^4$	$3.10x10^4$
	614.4	$5.70x10^3$	-
Diethyl ether (H_2O-saturated)	661.6	$3.02x10^4$	$7.72x10^4$
	643.2	$1.14x10^4$	$3.00x10^4$
	615.8	$6.64x10^3$	-
Acetone (100%)	661.6	$2.86x10^4$	$7.20x10^4$
	644.8	$1.20x10^4$	$3.00x10^4$
	616.0	$6.35x10^3$	-
Acetone (80%)	663.2	$2.70x10^4$	$6.90x10^4$
	646.8	$1.2.0x10^4$	$3.04x10^4$
	618.2	$6.70x10^3$	-
Ethanol (95%)	664.2	$2.70x10^4$	$7.40x10^4$
	648.6	$1.20x10^4$	$3.30x10^4$
	617.8	$6.80x10^3$	-
	600.6	-	$1.40x10^4$
Methanol (100%)	665.2	$2.60x10^4$	$6.71x10^4$
	652.4	$1.50x10^4$	$3.90x10^4$
	617.6	$7.05x10^3$	-
	602.6	-	$1.50x10^4$
Methanol (90%)	665.2	$2.62x10^4$	$5.70x10^4$
	652.4	$1.54x10^4$	$3.42x10^4$
	618.2	$7.00x10^3$	-
	602.8	-	$1.24x10^4$

Solvent	λ_{max} nm	ε ($L mol^{-1} cm^{-1}$) Pheo-a
Diethyl ether	666.6	$1.82x10^4$
	654.2	$7.74x10^4$
	609.0	$2.7x10^3$
Diethyl ether (H_2O-saturated)	666.6	$5.40x10^4$
	654.2	$2.81x10^4$
	609.0	$1.05x10^4$
Acetone (100%)	653.4	$1.22x10^4$
	652.6	$1.20x10^4$
	601.0	$2.70x10^3$
Acetone (80%)	665.4	$1.66x10^4$
	653.4	$1.11x10^4$
	608.2	$3.73x10^3$
Ethanol (95%)	662.2	$1.43x10^4$
	654.2	$1.33x10^4$
	607.0	$3.97x10^3$
Methanol (100%)	654.2	$1.44x10^4$
	647.6	$9.90x10^3$
	602.0	$3.05x10^3$
Methanol (90%)	665.2	$8.71x10^3$
	653.4	$4.73x10^3$
	604.0	$1.85x10^3$

2.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις απορρόφησης

Αρχικά η συγκέντρωση των διαλυμάτων των χρωστικών που βρίσκονταν διαλυμένες σε αιθανόλη προσαρμόστηκε στα 30μΜ, αφού μετά από φασματοσκοπική μελέτη η συγκεκριμένη συγκέντρωση επιλέχτηκε ως η καταλληλότερη γιατί το σήμα της απορρόφησης δεν ξεπερνούσε τη μονάδα. Τα διαλύματα των χρωστικών αναμείχθηκαν με διαλύματα πολυαμίνης (free base) σε αναλογία 1:1 ώστε τελικά να προκύψουν διαλύματα με ίδια συγκέντρωση χλωροφύλλης και διαφορετική συγκέντρωση πολυαμίνης. Η συγκέντρωση που επιλέχτηκε για τα πειράματα με τη χλωροφυλλίνη ήταν η ίδια με αυτή των χλωροφυλλών όμως στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν πολυαμίνες σε μορφή άλατος και όλες οι μετρήσεις έγιναν εξολοκλήρου σε απιονισμένο νερό. Η ρύθμιση του pH, όποτε χρειάστηκε, έγινε με προσθήκη κατάλληλων συγκεντρώσεων HCl ή NaOH.

Οι λήψεις των φασμάτων απορρόφησης των χρωστικών έγιναν σε ένα Ocean Optics USB4000 φωτόμετρο. Η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε ήταν χαλαζία quartz. Όλη η διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων των χρωστικών και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες χαμηλής έντασης πράσινου φωτός, για να αποφευχθεί η φωτοοξείδωση των χλωροφυλλών.

2.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις φθορισμού

Για τη μελέτη της επίδρασης των πολυαμινών στο φθορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων με αυτή που αναφέρθηκε για τις μετρήσεις απορρόφησης, με τη διαφορά ότι αυτά αραιώθηκαν κατά έναν παράγοντα 10^3.

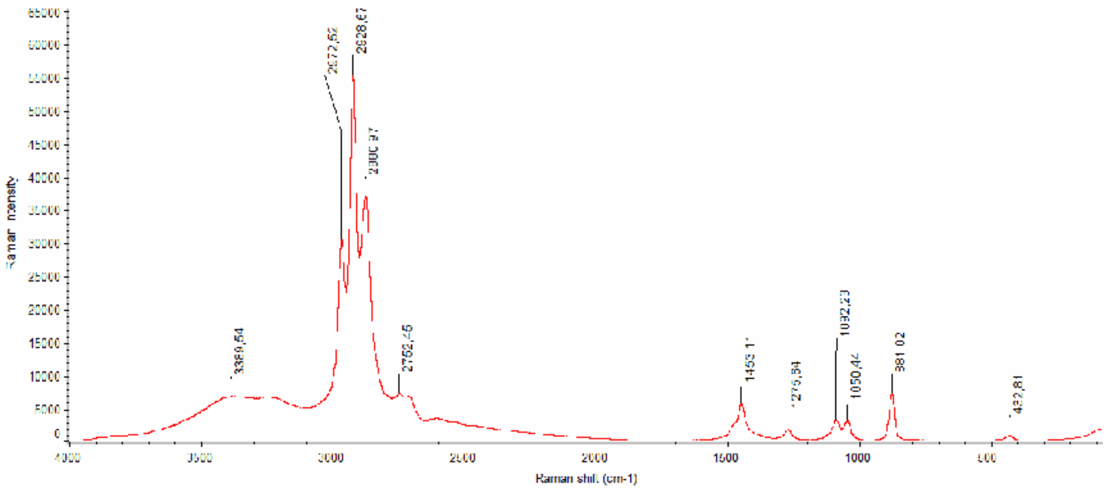
Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού των χλωροφυλλών πάρθηκαν στο υπερευαίσθητο φθοροφωτόμετρο LS50B (Perkin Elmer) με υψηλό λόγο σήματος προς θόρυβο (500:1) ενώ για τη συλλογή τους χρησιμοποιήθηκε γυάλινη κυψελίδα οπτικά καθαρή και από τις τέσσερις πλευρές της. Η προετοιμασία των δειγμάτων και η λήψη των φασμάτων έγινε σε απόλυτο σκοτάδι ή σε χαμηλής έντασης πράσινο φως.

2.3.3 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις σκέδασης Raman

Οι χλωροφύλλες a και b προμηθεύτηκαν από την εταιρία Fluka (Fluka chemie GMBH). Για τη μελέτη τους με φασματοσκοπία Raman, λόγω της μικρής διαλυτότητάς τους σε υδατικά μέσα, οι χλωροφύλλες διαλύθηκαν σε αιθανόλη σε συγκέντρωση $25x10^{-3}$M. Ελεύθερες βάσεις πολυαμινών χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό των συμπλόκων Chl-PA που περιείχαν Chl:PA σε αναλογίες 1:1, 1:2 ή 1:30. Για τη μελέτη της χλωροφυλλίνης (Scc), το κατάλληλο ποσό κάθε πολυαμίνης (σε μορφή αλατιού) που εξετάστηκε, διαλύθηκε σε απιονισμένο νερό και προστέθηκε στο διάλυμα της χλωροφυλλίνης, το οποίο ήταν επίσης απιονισμένο νερό. Με αυτόν τον τρόπο αποκτήθηκαν οι επιθυμητές μοριακές αναλογίες Scc:PA που αντιστοιχούν σε 1:1 και 1:2 με τελική συγκέντρωση χλωροφυλλίνης στα $5{,}5x10^{-4}$M. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχτηκε καθώς το σήμα του φθορισμού ήταν μικρό και επέτρεπε τη συλλογή φασμάτων Raman.

Οι μετρήσεις Raman διεξάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με τη χρήση ενός Nicolet Almega XR Raman φωτόμετρου εξοπλισμένο με ένα 473 nm μπλε λέιζερ (15 mW) ως πηγή διέγερσης και 672 lines/mm grating (σχάρα διάθλασης) από μια θερμοηλεκτρικά ψυχόμενη (-49^{o}C) CCD κάμερα. Η δέσμη εστιάστηκε στα δείγματα μέσω ενός ομοεστιακού (confocal) μικροσκοπίου εξοπλισμένο με 10x, 50x, και 100x φακούς. Τα φάσματα των χλωροφυλλών a και b σε αιθανόλη καταγράφηκαν με τη συγκέντρωση 2 φασμάτων, ενώ ο χρόνος έκθεσης του κάθε δείγματος ήταν 1 sec (Εικ. 2.2). Η ένταση του λέιζερ διέγερσης ήταν 100%. Για τη συλλογή των φασμάτων της χλωροφυλλίνης σε νερό οι παράμετροι συλλογής ρυθμίστηκαν στην αυτόματη επιλογή. Η ένταση του λέιζερ ήταν επίσης 100%. Όλα τα φάσματα πάρθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Nicolet OMNIC στην περιοχή ανάμεσα στους 400 και

$4000cm^{-1}$. Η προετοιμασία των δειγμάτων και η λήψη των φασμάτων έγινε σε απόλυτο σκοτάδι.



Εικόνα 2.2 Φάσμα Raman της αιθανόλης. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 473nm, η ένταση του λέιζερ 100% ενώ η εστίαση ήταν με 50x φακό.

2.4.1 Απομόνωση συμπλόκων LHC II

Α. Απομόνωση θυλακοειδών χαμηλής περιεκτικότητας σε αλάτι

Το LHC II απομονώθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Krupa et al. (1987). 15 φύλλα καπνού ομογενοποιήθηκαν σε 50mM tricine/NaOH (pH 7,8), 400mM sorbitol. Το ομογενοποιημένο διάλυμα φιλτραρίστηκε από τέσσερις γάζες και το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε 7000xg για 5min στους 4^oC. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 5mM EDTA/NaOH (pH 7,8), 50mM sorbitol και φυγοκεντρήθηκε σε 10000xg για 10min στους 4^oC. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε τόσο όγκο κρύου απιονισμένου νερού ώστε η συγκέντρωση ολικής χλωροφύλλης να είναι 0,8mg/ml.

Β. Διαλυτοποίηση και κατακρήμνιση του LHC II

Η μεμβράνη των θυλακοειδών διαλυτοποιήθηκε με προσθήκη 0,7% (w/v) Triton X-100 και ανάδευση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 30000xg για 40min στους 4^oC και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Το LHC II κατακρημνίστηκε με προσθήκη KCl και $MgCl_2$ σε τελικές συγκεντρώσεις 100mM και 20mM αντίστοιχα και το μείγμα επωάστηκε για 10min υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα «φορτώθηκε» σε τουλάχιστον τρεις φορές μεγαλύτερο όγκο 0,5M sucrose και φυγοκεντρήθηκε σε 10000xg για 10min στους 4^oC. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50mM tricine/NaOH (pH 7,8), 100mM sorbitol και η συγκέντρωση ολικής χλωροφύλλης ρυθμίστηκε στα 0,8mg/ml. Στο διάλυμα προστέθηκε Triton X-100 σε τελική αναλογία απορρυπαντικού/χλωροφύλλης 10/1 και ακολούθησε ανάδευση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μείγμα προστέθηκαν KCl και $MgCl_2$ όπως παραπάνω και μετά από ανάδευση 10min, αυτό φυγοκεντρήθηκε σε διαβάθμιση ζάχαρης σε 30000xg για 10min στους 4^oC. Αν ο λόγος χλωροφύλλης a/b δεν ήταν κάτω από 1,4 μετά από αυτό το στάδιο, τα δύο παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονταν με φυγοκέντρηση σε 10000xg για 10min στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50mM tricine/NaOH (pH 7,8), 100mM sorbitol και η ολική συγκέντρωση χλωροφύλλης προσαρμόστηκε στα 0,8mg/ml. Ακολούθησε και πάλι κατακρήμνιση με KCl και $MgCl_2$ αλλά χωρίς προσθήκη Triton X-100 και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε σε διαβάθμιση ζάχαρης σε 10000xg για 10min στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε μικρό όγκο απιονισμένου νερού και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου σε 5000xg για 3min στους 4°C. Το ίδιο βήμα επαναλήφθηκε ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα και το απορρυπαντικό. Τέλος, το LHC II διαλύθηκε σε 10mM tricine/NaOH (pH 7,5) σε συγκέντρωση ολικής χλωροφύλλης 0,25mg/ml και αποθηκεύτηκε υπό υγρό άζωτο στους -80°C. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες χαμηλής έντασης πράσινου φωτός.

	Θυλακοειδή	Πρώτη κατακρήμνιση	Δεύτερη κατακρήμνιση	Τρίτη κατακρήμνιση
Χλωροφύλλη a/b	2,8	2,25	1,42	1,36

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών χλωροφυλλών έγινε φασματοφωτομετρικά σύμφωνα με τις εξισώσεις των Porra et al. (1989) για 80% (v/v) διαλύματα ακετόνης:

$$\text{chlorophyll a } [\mu g/mL] = 12.25x(A_{663.6}-A_{750}) - 2.55x(A_{646.6}-A_{750})$$

$$\text{chlorophyll b } [\mu g/mL] = 20.31x(A_{646.6}-A_{750}) - 4.91x(A_{663.6}-A_{750})$$

2.5.1 Δημιουργία λιποσωμάτων (IUVs)

Λιπίδια φωσφατιδυλοχολίνης (egg-PC) διαλυμένα σε χλωροφόρμιο μεταφέρθηκαν σε γυάλινη φιάλη και ο οργανικός διαλύτης αφαιρέθηκε με τη χρήση αέριου αζώτου επί 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Για την παρασκευή των λιποσωμάτων και την ενσωμάτωση του φθορισμομετρικού δείκτη πυρανίνη (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate ή PTS) στο εσωτερικό τους ακολουθήθηκε η τεχνική της ενυδάτωσης της λιπιδικής μεμβράνης (lipid film' s hydration technique). Έτσι, το λεπτό στρώμα λιπιδίων που δημιουργήθηκε στα τοιχώματα της φιάλης επαναδιαλύθηκε σε 0,4ml 0,1M KCl που περιείχε $5{,}5x10^{-4}$M από τη χρωστική (πυρανίνη), για να προκύψει συγκέντρωση λιπιδίων 2,5mg/ml και το διάλυμα αφέθηκε να αναδεύεται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα στη συνέχεια πέρασε από φίλτρο πολυανθρακικού εστέρα 0,1μm 21 φορές. Με τη διήθηση του διαλύματος τα λιποσώματα μεγάλου μεγέθους σπάνε και τελικά σχηματίζονται λιποσώματα με παρόμοιο μέγεθος χωρίς απώλεια διαλύματος. Επιπλέον, με τον τρόπο αυτό παρασκευάζονται δομές με μία μόνο λιπιδική διπλοστοιβάδα (unilamellar).

2.5.2 Ενσωμάτωση των συμπλόκων LHC II στα λιποσώματα

Το παραπάνω διάλυμα των λιποσωμάτων αναμειγνύεται με ίσο όγκο διαλύματος LHC II και το μείγμα αναδεύεται έντονα για 5min. Στη συνέχεια ακολουθεί διαδοχική ψύξη και τήξη του διαλύματος τοποθετώντας το για 5s σε υγρό άζωτο (-195°C) και στη συνέχεια αφήνοντάς το να ξεπαγώσει αργά στους 4°C. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές. Κατά την ψύξη του διαλύματος η μεμβράνη των σχηματιζόμενων λιποσωμάτων σπάει σε ορισμένα σημεία λόγω της διόγκωσης του νερού στο εσωτερικό τους ενώ κατά τη διαδικασία της τήξης η μεμβράνη των λιποσωμάτων επανασχηματίζεται. Με τη διαδοχική ψύξη και τήξη του μείγματος επιτυγχάνεται η βέλτιστη ενσωμάτωση του LHC II στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Το μείγμα στη συνέχεια εκτίθεται σε υπερήχους για 5min στους 4^oC ώστε να διατηρηθεί ένας ομοιογενής σε μέγεθος και μορφή πληθυσμός λιποσωμάτων.

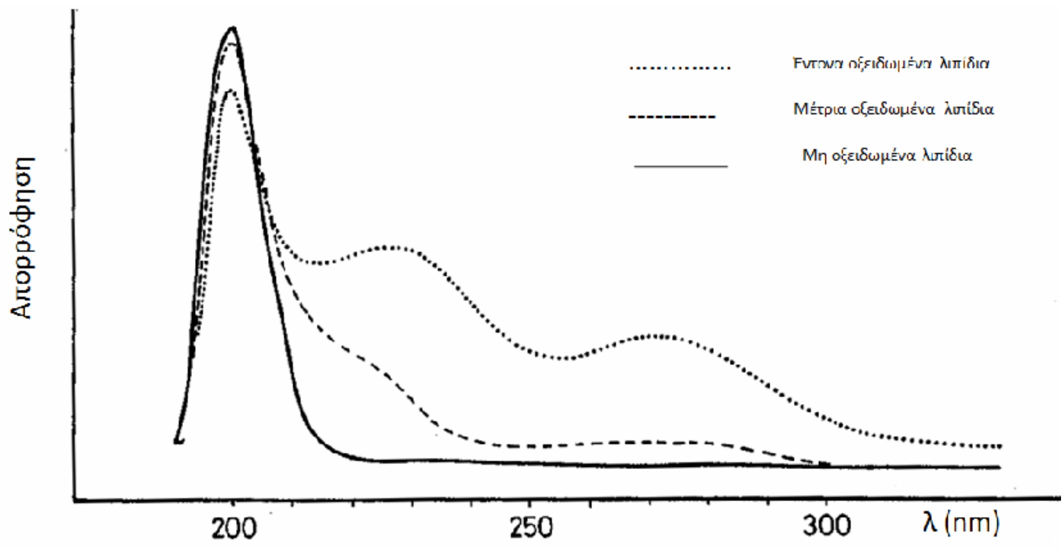
Τέλος, τόσο η χρωστική πυρανίνη, όσο και τα σύμπλοκα LHC II που δεν εισήχθησαν/ενσωματώθηκαν στα λιποσώματα και παρέμειναν ελεύθερα στο διάλυμα, διαχωρίστηκαν και απομακρύνθηκαν με χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή (Sephadex G-100). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είχε διάμετρο 0,8cm και μήκος 8cm ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ίδιας σύστασης και pH με αυτό στο εσωτερικό των λιποσωμάτων. Για τον ισομερισμό των κλασμάτων κατά τη χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε περισταλτική αντλία που η ροή της ρυθμίστηκε στα 0,25ml/min. Ο ρυθμός αυτός επιλέχτηκε γιατί προσδίδει μεγάλη καθαρότητα μεταξύ των διαφορετικών κλασμάτων, δεν χάνεται μεγάλη ποσότητα του επιθυμητού υλικού καθώς δεν υπάρχει μεγάλη επικάλυψη των κρίσιμων κλασμάτων, διαρκεί σχετικά λίγο (περίπου μία ώρα για τον πλήρη διαχωρισμό του δείγματος) και ο τελικός όγκος των κλασμάτων είναι ιδανικός για τη μέτρηση της απορρόφησης είτε με ELISA plate είτε με γυάλινη κυψελίδα quartz χωρητικότητας 2,5ml.

Από τα UV-Vis φάσματα των κλασμάτων ανιχνεύτηκε η σύστασή τους και παρατηρήθηκε ότι τα κλάσματα που περιείχαν την ελεύθερη χρωστική συλλέγονταν περίπου 15-20min αργότερα από αυτά που περιείχαν τα λιποσώματα. Τα συσσωματώματα των συμπλόκων του LHC II δεν περνούσαν από το υλικό της στήλης. Παρατηρούνται δύο κορυφές στην κινητική αυτή, η μία γύρω στα 16min και η άλλη γύρω στα 43min. Η ερμηνεία που δίνεται είναι ότι τα λιποσώματα με την ενσωματωμένη χρωστική στο εσωτερικό τους απελευθερώνονται από τη στήλη στο διάστημα μεταξύ 10-25min ενώ η ελεύθερη χρωστική στο διάστημα μεταξύ 30-55min.

Η ύπαρξη του ενσωματωμένου LHC II στα λιποσώματα επιβεβαιώθηκε από την καταγραφή του φθορισμού του στα 670nm.

2.5.3 Ποιοτικός έλεγχος των λιποσωμάτων

Ο ποιοτικός έλεγχος της κατάστασης των λιποσωμάτων έγινε επίσης φασματοφωτομετρικά κατά τη λήψη των φασμάτων των κλασμάτων που προέκυψαν από τη χρωματογραφία διήθησης. Αλλαγές στη UV περιοχή του φάσματος απορρόφησής των λιπιδίων αποτελούν ένδειξη για αλυσιδωτές αντιδράσεις που μπορεί να λάβουν χώρα και να οδηγήσουν στην οξείδωσή τους. Η ύπαρξη συζυγών διενίων φανερώνεται από την εμφάνιση μιας κορυφής στα 230nm, ενώ ο σχηματισμός συζυγών τριενίων (σαν αποτέλεσμα της απομάκρυνσης δύο ατόμων υδρογόνου ανά μόριο) δίνει μια νέα κορυφή στα 270-280nm (Εικ. 2.3).



Εικόνα 2.3. UV φάσματα οξειδωμένων και μη οξειδωμένων λιπιδίων φωσφατιδυλοχολίνης. Αλλαγές στη UV απορρόφηση των λιπιδίων είναι σήμα για αλυσιδωτές αντιδράσεις που οδηγούν στην οξείδωσή τους.

2.6 Καταγραφή της διακίνησης ιόντων στα λιποσώματα

Μετά τη συλλογή των κλασμάτων που προέκυψαν από τη χρωματογραφία διήθησης, το διάλυμα αραιώθηκε τόσο ώστε ο φθορισμός του να βρίσκεται στα επιθυμητά επίπεδα και έγινε έλεγχος και ρύθμιση του pH στο 6,7.

Η διακίνηση ιόντων δια μέσου της μεμβράνης των λιποσωμάτων παρακολουθήθηκε φθορισμομετρικά με τη χρήση του φθοροφωτόμετρου LS50B (Perkin Elmer). Όλες οι μετρήσεις πάρθηκαν με τη χρήση γυάλινης κυψελίδας, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό απόλυτο σκοτάδι. Η εκπομπή της πυρανίνης ανιχνεύτηκε στα 511nm και η διέγερσή της καταγράφηκε στα 402nm και 450nm (στα κύρια μέγιστα του φάσματος διέγερσής της που αντιστοιχούν στη πρωτονιωμένη και μη-πρωτονιωμένη μορφή της). Για την καταγραφή της κινητικής των αλλαγών του επιπέδου του pH στο εσωτερικό των λιποσωμάτων μετά την οξίνιση του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε ο λόγος Ex402nm(Em511nm)/Ex450nm(Em511nm). Για να αποφευχθεί η πιθανή δημιουργία ηλεκτροστατικού φραγμού κατά τη διακίνηση των ηλεκτρονίων στο εσωτερικό των λιποσωμάτων 2μl αιθανολικού διαλύματος βαλινομυκίνης (ενός μεταφορέα ιόντων K^+) προστέθηκε 30sec μετά την εκκίνηση της καταγραφής έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της βαλινομυκίνης στο διάλυμα να είναι 75μM. Η διαβάθμιση πρωτονίων προκλήθηκε με την ένθεση στο διάλυμα 10μl 0,1M HCl 1min μετά την προσθήκη της βαλινομυκίνης.

2.7 Προέλευση υλικών

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας προήλθαν κυρίως από τις εταιρίες Sigma Chemicals, Merck και Fluka και ο βαθμός καθαρότητάς τους ήταν τουλάχιστον 99,9%.

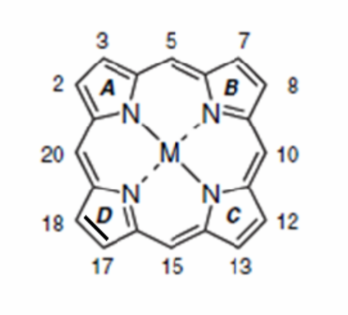
3. ΑΠΟΤΕΣΜΑΤΑ

3.1 Φασματοσκοπική μελέτη της αλληλεπίδρασης φωτοσυνθετικών μεταλλοπορφυρινών – πολυαμινών *in vitro*

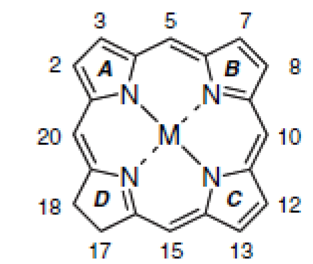
Για να ελέγξουμε την υπόθεση ότι το κέντρο ενεργειακής διάχυσης κατά το μηχανισμό NPQ *in vivo* μπορεί να δημιουργείται από την αλληλεπίδραση μίας χλωροφύλλης με κάποια πολυαμίνη, αλλά και για να ταυτοποιήσουμε τους χημικούς δεσμούς αυτής της μοριακής αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε μια σειρά αναλυτικών πειραμάτων. Εξετάστηκε η επίδραση των τριών κύριων πολυαμινών στις παρακάτω χρωστικές [χλωροφύλλη a (chla), χλωροφύλλη b (chlb), φαιοφυτίνη (pheo) και χλωροφυλλίνη (Sodium Copper Chlorophyllin, scc)] μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis, Raman και φθορισμού. Οι χρωστικές αυτές επιλέχθηκαν κυρίως με κριτήριο το σημαντικό ρόλο τους στη συλλογή του φωτός κατά τη φωτοσύνθεση αλλά και με κριτήριο την υδατοδιαλυτότητα (περίπτωση Scc) ώστε να προσομοιωθούν σε *in vitro* σύστημα οι *in vivo* συνθήκες. Μεταξύ άλλων, στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η επίδραση των πολυαμινών στο φθορισμό της χλωροφύλλης, παράμετρο με ξεχωριστή αξία για τη φωτοσυνθετική έρευνα. Για την εύρεση του είδους του δεσμού της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα με φασματοσκοπία ταλάντωσης αξιοποιώντας υπερσύγχρονα συστήματα οπτικής μικροσκοπίας Raman.

Οι πορφυρίνες και οι σχετιζόμενοι πολυπυρρολικοί μακροκυκλικοί δακτύλιοι είναι από τα πιο ευρέως μελετημένα μακροκυκλικά συστήματα. Αυτό οφείλεται τόσο στην παρουσία τους στη φύση, στο κρίσιμο βιολογικό ρόλο που έχουν σε πολλά βιολογικά συστήματα, στις ενδιαφέρουσες φυσικές και χημικές ιδιότητες, καθώς και στο γεγονός ότι ο βασικός πορφυρινικός σκελετός που βρίσκεται σε φυσικά συστήματα-αίμη, χλωροφύλλη, βακτηριοχλωροφύλλη- είναι ίσως από τα πιο παλιά βιοοργανικά μόρια στη Γη. Ο πορφυρινικός σκελετός αποτελείται από τέσσερις δακτυλίους πυρολλικού τύπου (A, B, C, D) οι οποίοι ενώνονται με τέσσερις μεθινικές γέφυρες. Οι γέφυρες άνθρακα μεταξύ των πυρολλίων ("*meso*" θέσεις) ονομάζονται *α, β, γ, δ* και οι περιφερειακές θέσεις αριθμούνται από 1 έως 20 (Εικόνα 3.1).

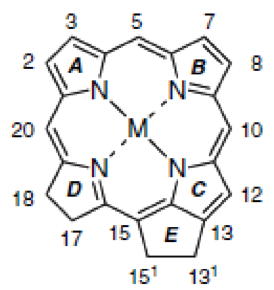
Οι πορφυρίνες χρησιμοποιούνται κατά κόρον ως αντικαταστάτες των χλωροφυλλών και άλλων σχετικών τετραπυρρολικών χρωμοφόρων σε πλήθος εφαρμογών λόγω του εύκολου χειρισμού τους και της υψηλής τους συμμετρίας. Τα μόρια των χλωροφυλλών αποτελούνται από έναν υποκατεστημένο τετραπυρρολικό δακτύλιο στον οποίο τα τέσσερα άτομα αζώτου των πυρρολικών δακτυλίων σχηματίζουν ένα σύμπλοκο συναρμογής με ένα κεντρικό άτομο μαγνησίου, είναι δηλαδή πορφυρίνες μαγνησίου. Πιο συγκεκριμένα, οι χλωροφύλλες είναι μόρια οξοφορβινών (oxophorbins), τα οποία περιέχουν τον ανηγμένο D πυρρολικό δακτύλιο που συναντούμε στα μόρια των χλωρινών (chlorins), τον ισοκυκλικό δακτύλιο E που υπάρχει στα μόρια των φορβινών (phorbines) μεταξύ των θέσεων 13 και 15 καθώς και μια καρβονυλομάδα στη θέση 13 (Εικόνα 3.1). Το διακριτό χαρακτηριστικό των χλωροφυλλών είναι η παρουσία φυτόλης, μιας πολύ υδρόφοβης αλκοόλης με είκοσι άτομα άνθρακα η οποία εστεροποιείται με την πλευρική αλυσίδα ενός οξέος.



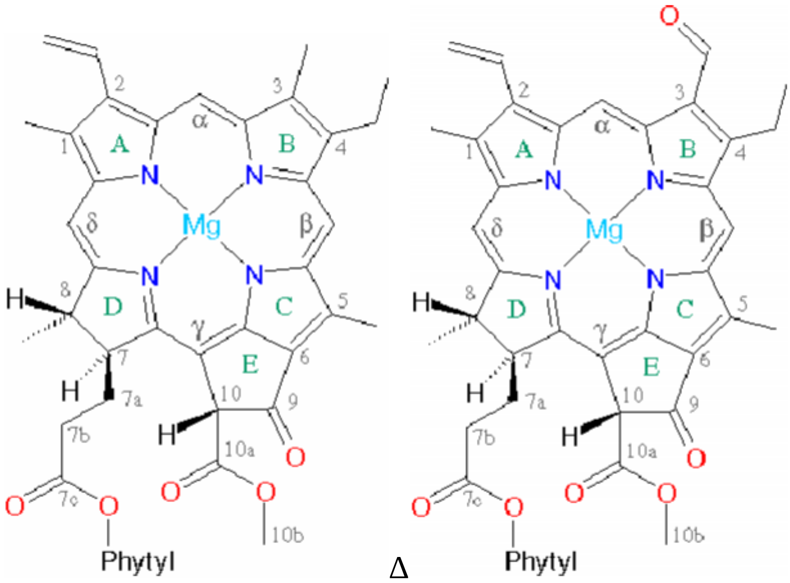
A



B



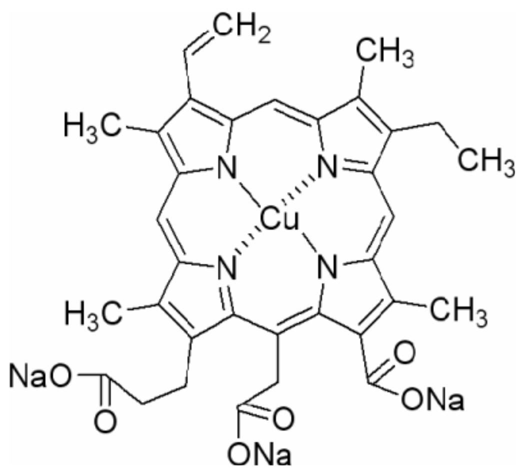
Γ



Δ

Εικόνα 3.1 Δομή και αρίθμηση κατά IUPAC A. της μεταλλοπορφυρίνης B. της μεταλλοχλωρίνης, η οποία περιέχει έναν ανηγμένο δακτύλιο και Γ. μιας μεταλλοφορβίνης, η οποία είναι μια μεταλλοχλωρίνη που περιέχει τον ισοκυκλικό δακτύλιο E. Δ. Δομή και αρίθμηση κατά Fischer της χλωροφύλλης a (αριστερά) και της χλωροφύλλης b (δεξιά). Φέρουν και οι δύο μια οξο ομάδα στη θέση 9 ενώ η δεύτερη φέρει μια φορμυλομάδα (-CHO) αντί μιας μεθυλομάδας ($-CH_3$) στη θέση 3.

Εκτός από τις χλωροφύλλες επιλέχθηκε για τα πειράματα της παρούσας εργασίας ένα δεύτερο παρεμφερές πορφυρινικό μόριο, η χλωροφυλλίνη ([Cu]-chlorophyllin ή sodium copper chlorophyllin, Scc). Κατά τη σύνθεση της χλωροφυλλίνης, το κεντρικό άτομο μαγνησίου της χλωροφύλλης αντικαθίσταται από χαλκό που μαζί με την απουσία της φυτόλης έχει ως αποτέλεσμα τη δομή που φαίνεται στο διπλανό σχήμα. Οι διαφοροποιήσεις αυτές οδηγούν σε δύο παραδοχές: Αρχικά, η απώλεια της φυτολικής ουράς καθιστά το μόριο της χλωροφυλλίνης υδατοδιαλυτό, κάτι που αποτελεί και το μεγάλο πλεονέκτημα του καθώς και τον κύριο λόγο που το επιλέξαμε.



Από την άλλη, η ύπαρξη χαλκού αντί μαγνησίου κάνει το μόριο να φθορίζει αισθητά λιγότερο από ό,τι η χλωροφύλλη, καθώς ο χαλκός έλκει τα ηλεκτρόνια περισσότερο από το μαγνήσιο.

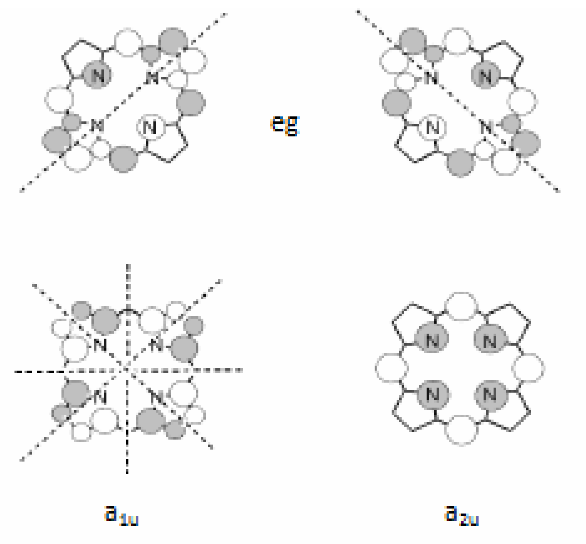
3.1.1 Φασματοσκοπία Υπεριώδους- Ορατού

Η φασματοσκοπία υπεριώδους (UV) είναι μια μέθοδος μελέτης της δομής οργανικών μορίων που εφαρμόζεται ειδικά σε συζυγιακά συστήματα (εναλλάξ διπλοί και απλοί δεσμοί). Η περιοχή του υπεριώδους που εμφανίζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον εκτείνεται από τα 200 έως τα 400nm. Η ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται δίπλα στην περιοχή του υπεριώδους, εκτεινόμενη από τα 400 έως τα 800nm περίπου. Οι έγχρωμες ενώσεις έχουν τόσο εκτεταμένα συζυγιακά συστήματα, ώστε οι απορροφήσεις «UV» να επεκτείνονται μέχρι την περιοχή του ορατού. Οι πορφυρίνες είναι ισχυρά έγχρωμες ενώσεις με έντονες ταινίες απορρόφησης στην ορατή περιοχή. Η παραπάνω ιδιότητα προέρχεται από τον εσωτερικό 16-μελή δακτύλιο με 18 *π* ηλεκτρόνια που αποτελεί την ηλεκτρονιακή “καρδιά” των πορφυρινών. Είναι υπεύθυνη για τα πορφυρινικού τύπου φάσματα Υπεριώδους-Ορατού και διαταράσσεται σε μικρό ή μεγάλο ποσοστό από τις διάφορες χημικές μετατροπές στη βασική δομή.

Κατά γενικό κανόνα, όσο μεγαλύτερη είναι η έκταση της συζυγίας του (ο αριθμός των π ηλεκτρονίων), τόσο μικρότερη είναι η απαιτούμενη ενέργεια που χρειάζεται ένα μόριο για να διεγερθεί. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές επιλέχτηκαν από τη φύση για τη δέσμευση της φωτονιακής ενέργειας επειδή είναι πλούσιες σε π ηλεκτρόνια και ως εκ τούτου χρειάζονται σχετικά μικρή φωτονιακή ενέργεια για να διεγερθούν. Οι χλωροφύλλες χαρακτηρίζονται από δύο κύρια επίπεδα διέγερσης, ένα μέσω της ερυθρής ακτινοβολίας ~665nm και ένα δεύτερο μέσω της κυανής ~440nm. Αυτό φαίνεται και από το φάσμα απορρόφησης της χλωροφύλλης, όπου τα κύρια μέγιστα είναι τα ίδια με τα απαιτούμενα μήκη κύματος για τη διέγερση του μορίου (Εικ. 3.4). Επειδή η απορρόφηση ακτινοβολίας προκαλεί διέγερση του μορίου, το φάσμα απορρόφησης υποδηλώνει την ποιότητα των φωτονίων που μπορούν να διεγείρουν το εν λόγω μόριο.

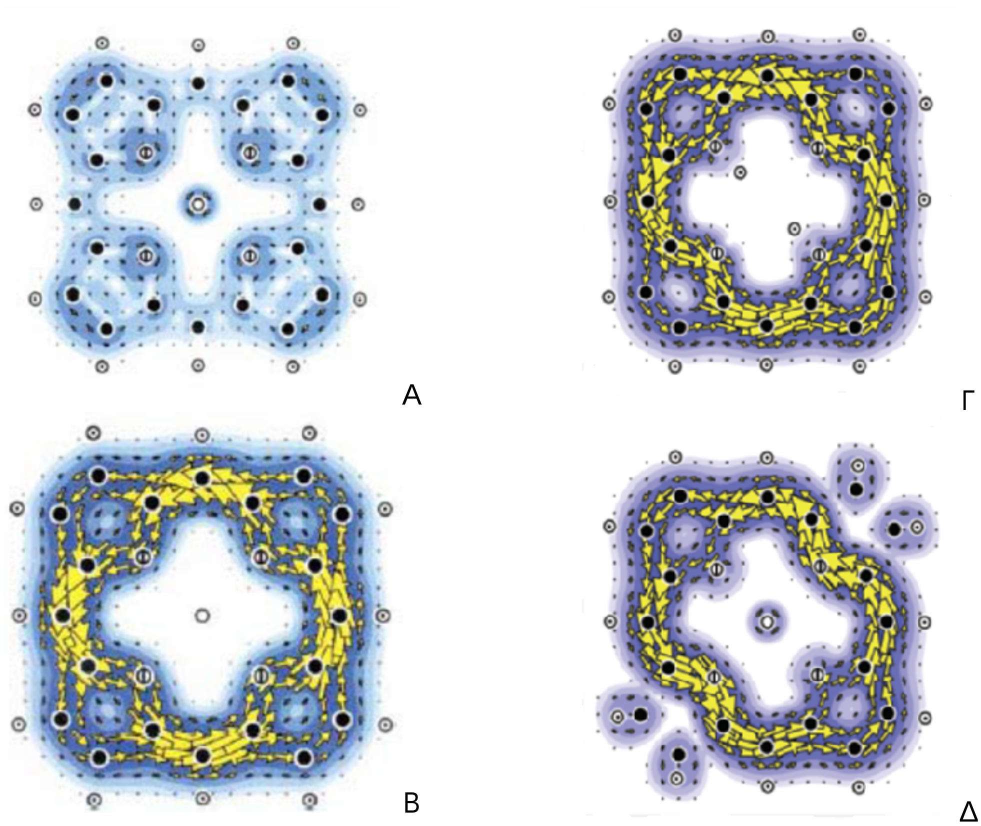
3.1.1.1 Ηλεκτρονιακά φάσματα των μεταλλοπορφυρινών

Σύμφωνα με το θεωρητικό μοντέλο των τεσσάρων μοριακών τροχιακών των Gouterman et al. (1978) για μια υψηλά συμμετρική πορφυρίνη, τα δύο υψηλότερα και αμέσως υψηλότερα κατειλημμένα μοριακά τροχιακά, ή HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) και τα δύο χαμηλότερα μη κατειλημμένα μοριακά τροχιακά, ή LUMO (Lowest Unoccupied



Εικόνα 3.2 Οι συμμετρίες των μοριακών τροχιακών HOMO και LUMO. Οι γραμμοσκιασμένες επιφάνειες αντιστοιχούν σε (+), ενώ οι μη γραμμοσκιασμένες σε (-) πρόσημο κυματοσυνάρτησης.

Molecular Orbital) έχουν συμμετρία a_{2u}, a_{1u} και e_g αντίστοιχα (Εικ. 3.2). Όταν ένα ηλεκτρόνιο προωθείται από ένα δεσμικό μοριακό τροχιακό π σε ένα αντιδεσμικό π*, αποκαλούμε το φαινόμενο αυτό διέγερση ππ*. Το ακριβές μήκος κύματος που απαιτείται για μια τέτοια διέγερση σε ένα συζυγιακό μόριο εξαρτάται από το ενεργειακό χάσμα μεταξύ των τροχιακών HOMO και LUMO (Εικ. 3.3). Έτσι, όλα τα βασικά χαρακτηριστικά των ηλεκτρονικών φασμάτων των πορφυρινών, οφείλονται σε ηλεκτρονικές μεταβάσεις που λαμβάνουν χώρα στα τροχιακά αυτά (ππ* καταστάσεις $a_{2u}e_g$ και $a_{1u}e_g$) (Kitigawa and Ozaki, 1987). Μελέτες που κάνουν χρήση του μοντέλου αυτού για τη Chl a και την BChl a δείχνουν ότι και για αυτά τα μόρια τα HOMO αντιστοιχούν σε a_{1u} συμμετρία, τα HOMO-1 σε a_{2u}, τα LUMO σε eg(x) και τα LUMO+1 σε eg(y) (Hanson, 1991; Kee et al., 2007).



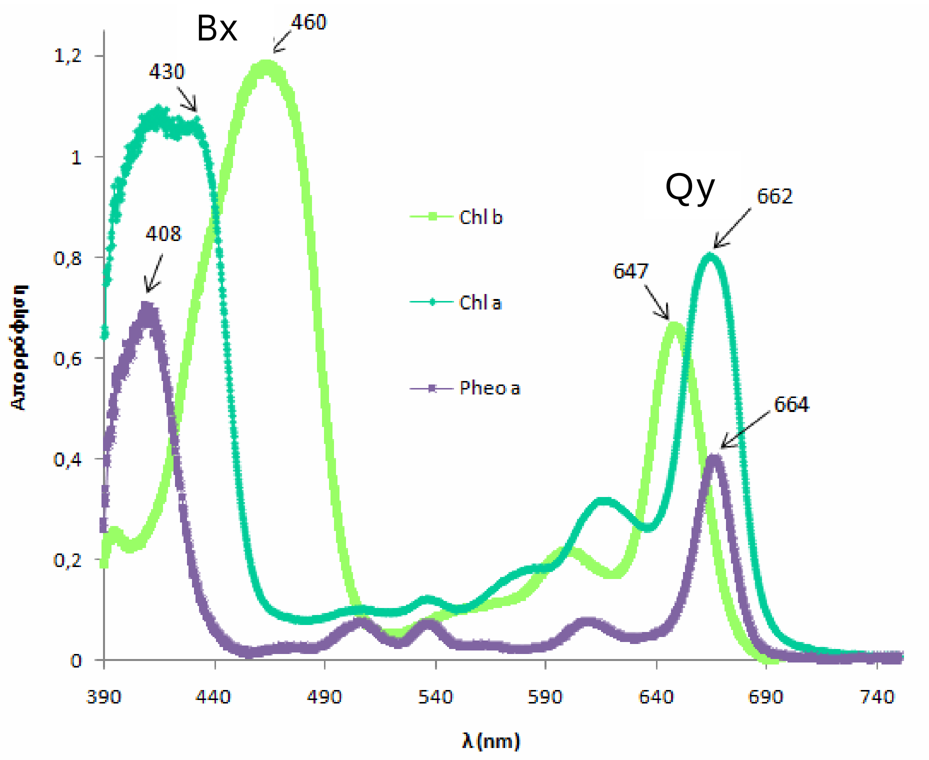
Εικόνα 3.3. Σφαιρικά ρεύματα δακτυλίων, προκληθέντα από ένα κάθετο μαγνητικό πεδίο. Α. Η συνεισφορά των 22 π-ηλεκτρονίων των εσωτερικών στοιβάδων και Β των HOMO $1a_{1u}$ $4a_{2u}$ μιας Mg-πορφυρίνης. Γ. Οι π-ηλεκτρονιακές κατανομές μιας ελεύθερης βάσης πορφυρίνης και Δ. μιας Mg-βακτηριοχλωρίνης. Η π ηλεκτρονιακή πυκνότητα οφείλεται κυρίως στα HOMO μοριακά τροχιακά από τα οποία προέρχονται και τα φάσματα Υπεριώδους-Ορατού (Steiner and Fowler,2002).

Στα φάσματα των πορφυρινών εμφανίζεται μια ισχυρή απορρόφηση μεταξύ 320nm και 450nm (Soret ή B-ταινία) και κάποιες άλλες μικρότερης έντασης απορροφήσεις από τα 450nm έως τα 700nm (Q-ταινίες). Η B-ταινία αναφέρεται σε ισχυρώς επιτρεπτή διεγερμένη κατάσταση και είναι το αποτέλεσμα της ανυσματικής πρόσθεσης των δίπολων της διεργασίας μετάβασης ππ*. Αντίθετα, η Q-ταινία αναφέρεται σε μια ημιεπιτρεπτή διεγερμένη κατάσταση, είναι το αποτέλεσμα της αφαίρεσης των δύο δίπολων και για αυτό καταλήγει σε αδύναμη απορρόφηση φωτός. Για απόλυτα συμμετρικές μεταλλοπορφυρίνες με συμμετρία D_{4h} τα ηλεκτρονιακά φάσματα απορρόφησης αποτελούνται από μία B-ταινία και 2 Q-ταινίες. Η B-ταινία είναι μία ισχυρή ταινία ανάμεσα στα 380-420 nm. Προέρχεται από τη διέγερση στην υψηλότερης ενέργειας απλή (S) κατάσταση, *B*(0,0). Φάσματα υψηλής διακριτικότητας στην αέρια φάση ή σε χαμηλή θερμοκρασία παρουσιάζουν μία επιπλέον ταινία μετατοπισμένη προς το μπλε. Αποδίδεται στη μετάβαση σ’ ένα υψηλότερο δονητικό επίπεδο και συμβολίζεται ως *B*(1,0). Οι Q-ταινίες εμφανίζονται μεταξύ 500-700nm. Η ταινία χαμηλότερης ενέργειας προέρχεται από την ηλεκτρονιακή μετάβαση *Q*(0,0) της χαμηλότερης ενεργειακά απλής (S) κατάστασης. Η υψηλότερης ενέργειας ταινία διαφέρει σχεδόν σταθερά ενεργειακά από την *Q*(0,0). Είναι υψηλότερη κατά ένα δονητικό επίπεδο διέγερσης και συμβολίζεται ως *Q*(1,0).

Στην ελεύθερη βάση μιας πορφυρίνης όμως, η παρουσία δύο H^+ οδηγεί σε αλλαγή της συμμετρίας από D_{4h} στις μεταλλοπορφυρίνες σε D_{2h}. Συνέπεια αυτού είναι το φάσμα στην ορατή περιοχή να αλλάζει από φάσμα δύο ταινιών σε φάσμα τεσσάρων ταινιών. Η *Q*(0,0) χωρίζεται στη Q_x(0,0) και Q_y(0,0) ενώ κάθε ταινία έχει ένα δονητικό υπερτονικό επίπεδο Q_x(1,0) και Q_y(1,0). Έτσι, η πλειοψηφία των μελετών που έχουν γίνει για τη χλωροφύλλη, δείχνουν τέσσερα μέγιστα απορρόφησης στην Q περιοχή του φάσματός της (Εικ. 3.14). Η ασύμμετρη κατανομή του απεντοπισμού των π-ηλεκτρονίων κατά μήκος των X και Y αξόνων που εμφανίζουν οι χλωροφύλλες σε σχέση με το μη-υποκατεστημένο μόριο μιας Mg-πορφυρίνης, καθώς και ο πέμπτος δακτύλιος του μορίου, προκαλούν τη διάσπαση των κορυφών του φάσματός τους στις B και Q περιοχές στις Bx, By, Qx και Qy. Επιπλέον, η Q μετάβαση κερδίζει ένταση σε σχέση με τις ελεύθερες χλωρίνες και τη φαιοφυτίνη (Houssier and Saver, 1970; Weiss, 1972; Frataga et al., 1988; Thomas et al., 1990; Hanson, 1991). Έχει αποδειχτεί ότι η φυτολική ουρά έχει μια πολύ μικρή επίδραση στις ιδιότητες των διεγερμένων καταστάσεων της Chl a (Sundholm, 2000). Ομοίως, οι ηλεκτρονιακές μεταβάσεις για το μόριο της SCC μπορούν να συσχετιστούν με αυτές της πορφυρίνης. Όπως όμως και στις χλωροφύλλες, η αναγωγή ενός πυρρολικού δακτυλίου οδηγεί στη διάσπαση των B και Q μεταβάσεων της πορφυρίνης σε x και y συστατικά (Hildebrandt and Spiro, 1988). Ωστόσο, η διάσπαση αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη για την Q από ότι για την B ταινία, τα συστατικά της οποίας συνήθως δε μπορούν να διαχωριστούν (Gurinovich et al., 1968).

Συγκρίνοντας τις Qy και Bx ζώνες του φάσματος απορρόφησης της χλωροφύλλης b με τις αντίστοιχες του φάσματος απορρόφησης της χλωροφύλλης a, παρατηρείται ότι η Qy ζώνη της δεύτερης είναι βαθυχρωμικά μετατοπισμένη κατά 15nm σε σχέση με την αντίστοιχη ζώνη της πρώτης. Αντίθετα, για την Bx ζώνη της χλωροφύλλης a, παρατηρείται μια υψιχρωμική μετατόπιση κατά 30nm σε σχέση με αυτή της χλωροφύλλης b (Εικ. 3.4). Με άλλα λόγια, αυτό δείχνει ότι για τη χλωροφύλλη a η ενέργεια της Bx ζώνης είναι αυξημένη ενώ αυτή της Qy ζώνης μειωμένη σε σχέση με τις αντίστοιχες ζώνες της χλωροφύλλης b. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο βαθμός απεντοπισμού των π-ηλεκτρονίων κατά μήκος του X άξονα είναι μικρότερος ενώ αυτός για τον Υ άξονα μεγαλύτερος όσον αφορά τη χλωροφύλλη a.

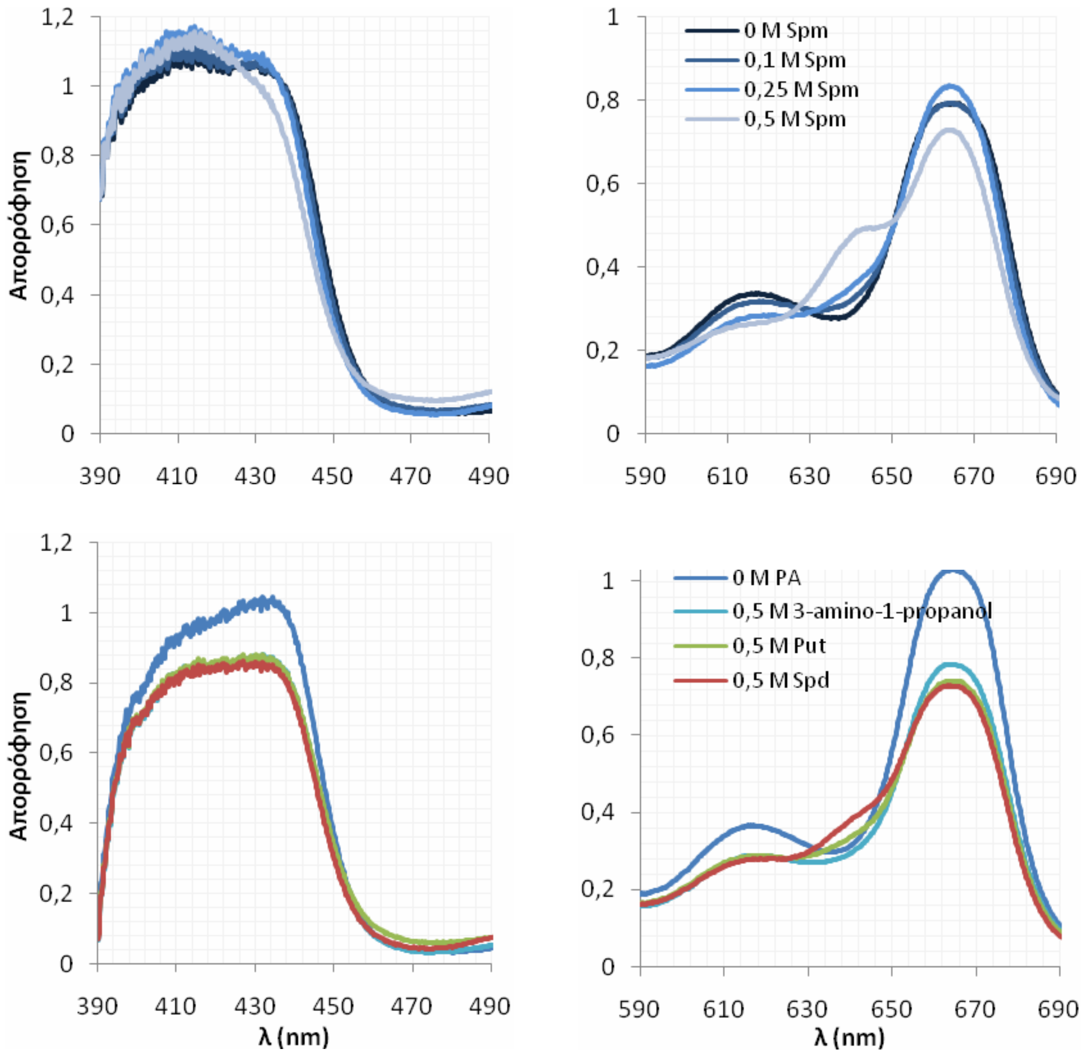
Ομοίως, η σύγκριση της χλωροφύλλης b με τη φαιοφυτίνη a δείχνει ότι οι Qy/Bx ζώνες είναι μετατοπισμένες βαθυχρωμικά/ υψιχρωμικά κατά 17nm/52nm αντίστοιχα. Αν και το μόριο της χλωροφυλλίνης διαφέρει σημαντικά από αυτό της χλωροφύλλης b, παρατηρείται και εδώ μια υψιχρωμική μετατόπιση της Bx ζώνης κατά 55nm. Έτσι, όλα τα παραπάνω δεδομένα αποκαλύπτουν ότι όποτε το κεντρικό Mg απουσιάζει από το μόριο ή είναι υποκατεστημένο από χαλκό, η ενέργεια της Bx ζώνης αυξάνεται, υποδηλώνοντας μια μείωση στο βαθμό απεντοπισμού των π-ηλεκτρονίων κατά μήκος του X άξονα και η ενέργεια της Qy ζώνης μειώνεται, που σημαίνει ο βαθμός απεντοπισμού του ηλεκτρονιακού νέφους κατά μήκος του Υ άξονα αυξάνεται.



Εικόνα 3.4. Φάσματα απορρόφησης των χλωροφυλλών a και b και της φαιοφυτίνης a σε αιθανόλη. Η συγκέντρωση των χρωστικών ήταν 30μM.

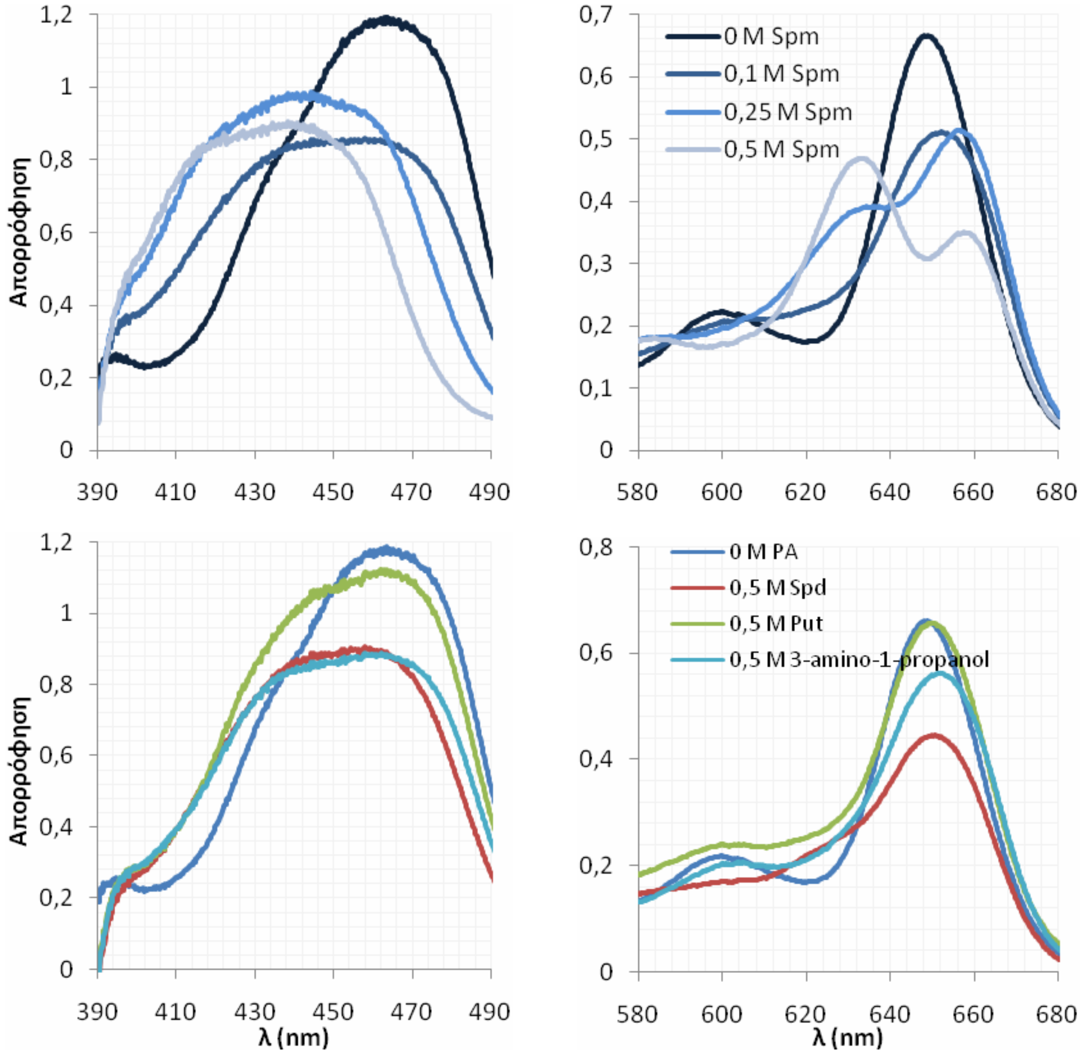
Η *in vitro* μελέτη της αλληλεπίδρασης των φωτοσυνθετικών τετραπυρρολικών χρωστικών με τις πολυαμίνες με φασματοσκοπία απορρόφησης αποτέλεσε την αφετηρία για τον έλεγχο πιθανής συμμετοχής ενός τέτοιου συμπλόκου στο μηχανισμό NPQ και οι λεπτομέρειες μιας τέτοιας αλληλεπίδρασης ελέγχθηκαν περαιτέρω με φασματοσκοπία Raman και φθορισμού. Πραγματοποιήθηκαν σειρές πειραμάτων που αντιστοιχούν σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς χρωστικής-πολυαμίνης ενώ για τη διαλεύκανση της αλληλεπίδρασης, εκτός από τις τρεις κύριες πολυαμίνες, σπερμίνη, σπερμιδίνη, πουτρεσίνη, που φέρουν τέσσερεις, τρεις και δύο αμινομάδες αντίστοιχα, οι χρωστικές μεταχειρίστηκαν και με οργανικά μόρια που φέρουν μία μόνο αμινομάδα όπως η 3-αμινο-1-προπανόλη. Ο οργανικός διαλύτης που επιλέχτηκε ως το καταλληλότερο περιβάλλον για τις χρωστικές, τις πολυαμίνες και την παρακολούθηση της αλληλεπίδρασής τους ήταν η αιθανόλη, ένας πολικός διαλύτη ο οποίος αλληλεπιδρά με τις χλωροφύλλες δημιουργώντας έναν πέμπτο δεσμό συναρμογής στο κεντρικό άτομο Mg του μορίου τους (Cotton et al., 1974; Fujiwara and Tasumi, 1986; Krawczyk, 1989).

3.1.1.2 Επίδραση των πολυαμινών στην απορρόφηση των χλωροφυλλών a και b και της φαιοφυτίνης a



Εικόνα 3.5. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης στο φάσμα απορρόφησης της χλωροφύλλης a (επάνω) και επίδραση 0,5M σπερμιδίνης, πουτρεσίνης και 3-αμινο-1-προπανόλης (κάτω). Αριστερά παρουσιάζεται η B περιοχή του φάσματος απορρόφησης και δεξιά η Qy περιοχή. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a ήταν 30μM.

Ξεκινώντας από τη χλωροφύλλη a, το φάσμα απορρόφησής της διαφοροποιείται κατά τη μεταχείριση με διαφορετικές συγκεντρώσεις σπερμίνης. Για συγκέντρωση σπερμίνης 0,1 M το φάσμα δε φαίνεται να επηρεάζεται ιδιαίτερα, εκτός από μια μικρή μείωση του σήματος στα 615nm που συνοδεύεται από μια αύξηση κατά 10% του σήματος στα 640nm. Για συγκέντρωση σπερμίνης 0,25 M η μείωση του σήματος στα 615nm γίνεται εντονότερη και η αύξηση του σήματος στα 640nm διπλασιάζεται. Η κορυφή Qy (0,0) αυξάνεται ενώ ούτε αυτή η συγκέντρωση διαφοροποιεί το φάσμα στη Bx περιοχή. Η απορρόφηση στα 662nm όμως μειώνεται κατά 8% και αυτή στα 435nm κατά 10% κατά τη μεταχείριση με 0,5 M σπερμίνης. Στη συγκέντρωση αυτή, το σήμα στα 615nm μειώνεται κατά 22% ενώ το σήμα στα 640nm αυξάνεται κατά 64% δημιουργώντας μια νέα κορυφή (Εικ 3.5).



Εικόνα 3.6. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης στο φάσμα απορρόφησης της χλωροφύλλης b (επάνω) και επίδραση 0,5M σπερμιδίνης, πουτρεσίνης και 3-αμινο-1-προπανόλης (κάτω). Αριστερά παρουσιάζεται η Β περιοχή του φάσματος απορρόφησης και δεξιά η Qy περιοχή. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης b ήταν 30μM.

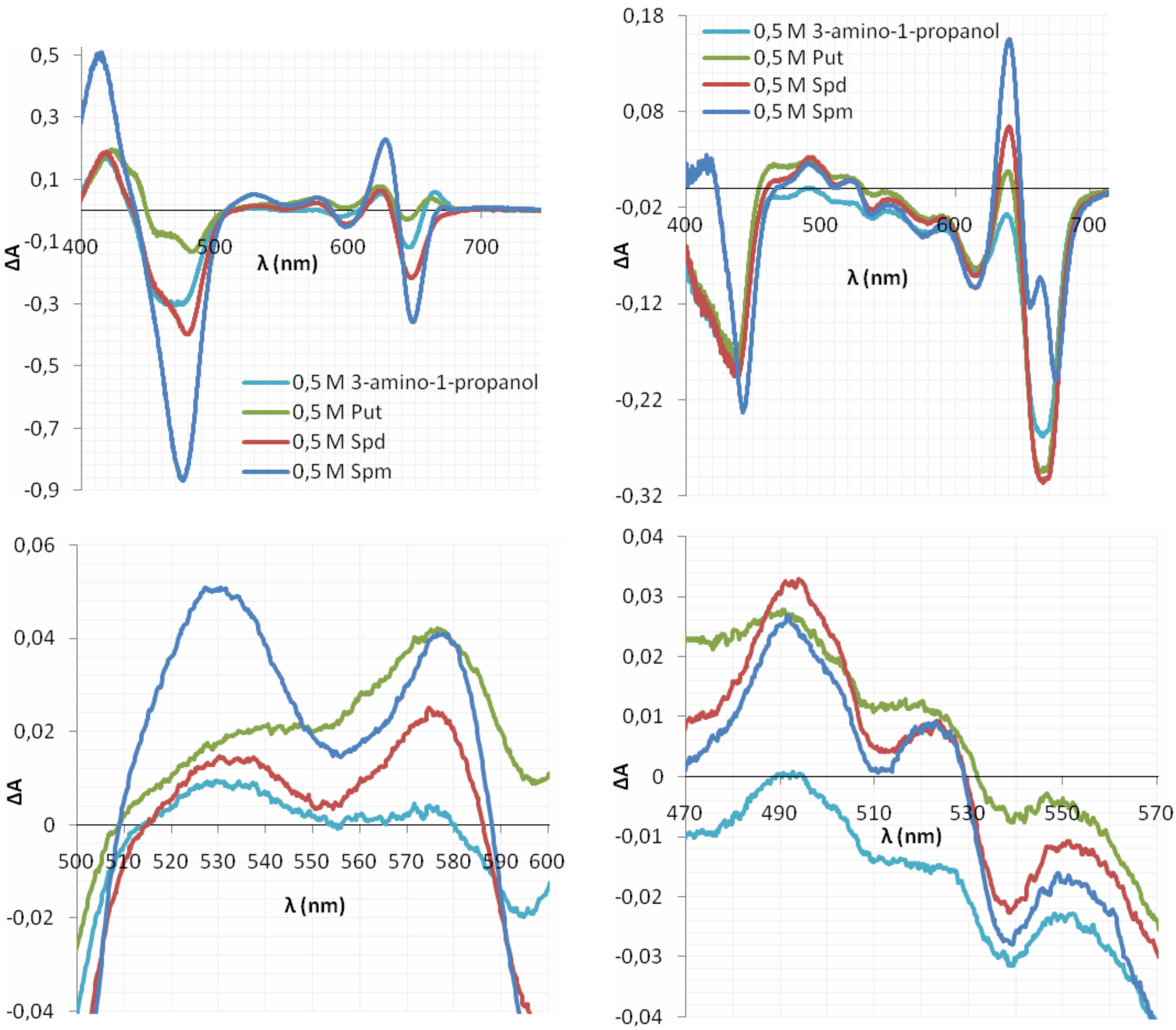
Αντίστοιχα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τις δύο μικρότερες πολυαμίνες και με την 3-αμινο-1-προπανόλη, έδειξαν μικρότερη ικανότητα των μορίων αυτών να αλληλεπιδρούν με τη χλωροφύλλη a. Τόσο η σπερμιδίνη, όσο και η πουτρεσίνη αλλά και η 3-αμινο-1-προπανόλη, σε συγκέντρωση 0,5 M, προκάλεσαν μείωση του σήματος στα 615nm της τάξης του 20-25%, όσο δηλαδή και η αντίστοιχη συγκέντρωση σπερμίνης. Αντίθετα όμως από τη σπερμίνη, 0,5 M 3-αμινο-1-προπανόλης δεν προκάλεσε αύξηση του σήματος στα 640nm αλλά μια μικρή μείωση, ενώ 0,5 M πουτρεσίνης κατάφερε να αυξήσει το σήμα της περιοχής μόλις κατά 6%. Η μόνη που φαίνεται να έχει αντίστοιχη δραστικότητα με τη σπερμίνη είναι η σπερμιδίνη, η οποία σε συγκέντρωση 0,5 M αύξησε το σήμα στα 640nm κατά 20% (Εικ. 3.5).

Η μεταχείριση της χλωροφύλλης b με διαφορετικές συγκεντρώσεις σπερμίνης προκάλεσε τις εντονότερες αλλαγές κατά μήκος όλου του φάσματος απορρόφησής της. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.6 παρατηρείται μια έντονη υψιχρωμική μετατόπιση και διαπλάτυνση της B ταινίας. Το μέγιστο απορρόφησης (460nm) του μάρτυρα μετατοπίζεται στα 450nm για συγκέντρωση σπερμίνης 0,1M, στα 440nm για συγκέντρωση σπερμίνης 0,25M και φτάνει στα 435nm περίπου όταν η συγκέντρωση σπερμίνης είναι 0,5M. Η κορυφή στα 460nm μειώνεται έως και κατά 50% στην μεγαλύτερη συγκέντρωση σπερμίνης. Αυτή η μετατόπιση της B ταινίας έως και 30nm προς την μπλε περιοχή του φάσματος απορρόφησης αντιστοιχεί στη μετάβαση από τη B στη By διεγερμένη κατάσταση του μορίου.

Παρατηρώντας τώρα την Qy περιοχή του φάσματος διακρίνουμε μια αισθητή μείωση και βαθυχρωμική μετατόπιση της Qy(0,0) κορυφής. Το μέγιστο απορρόφησης του μάρτυρα αντιστοιχεί σε μήκος κύματος 647nm. Η μεταχείριση με 0,1 M σπερμίνης οδηγεί στη μετατόπισή του κατά 4nm προς το κόκκινο και μείωση της απορρόφησης κατά 24%. Οι μεταχειρίσεις με 0,25 M και 0,5 M σπερμίνης μετατοπίζουν βαθυχρωμικά την κορυφή στα 647nm κατά 7nm και προκαλούν μείωση της απορρόφησης κατά 33% και 49% αντίστοιχα. Όπως είδαμε και στη χλωροφύλλη a, μία νέα κορυφή απορρόφησης δημιουργείται στα 630nm και σχετίζεται άμεσα με τις αλλαγές που συμβαίνουν στη Qy(0,0) κορυφή. Για συγκεντρώσεις σπερμίνης 0,1, 0,25 και 0,5 M, το σήμα απορρόφησης στα 630nm αυξάνεται κατά 30%, 85% και 115% αντίστοιχα (Εικ. 3.6). Με τις διαδοχικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις σπερμίνης παρατηρείται μια αυξανόμενη μείωση του σήματος στα 597nm.

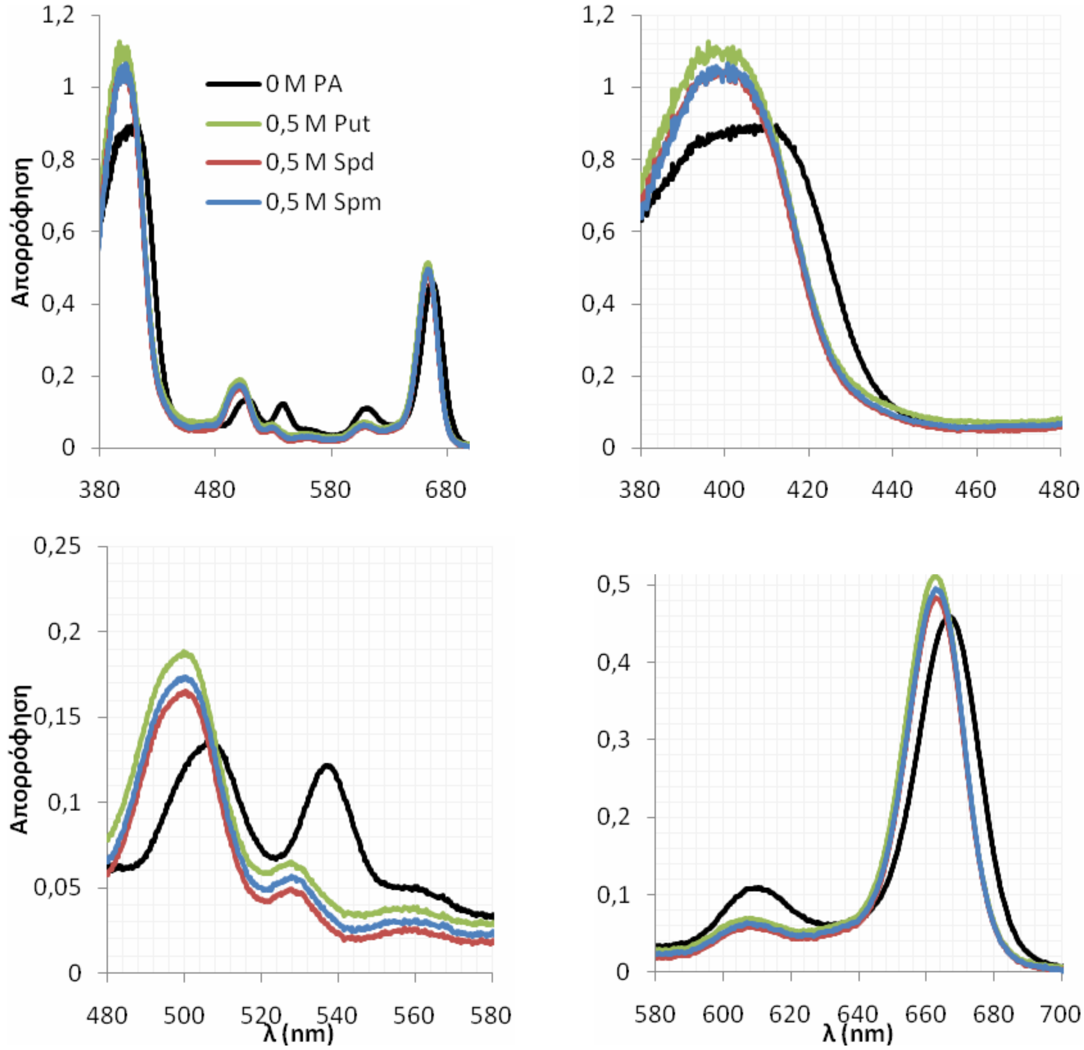
Σε αντίθεση με τη σπερμίνη, η επίδραση της σπερμιδίνης, της πουτρεσίνης και της 3-αμινο-1-προπανόλης στο φάσμα απορρόφησης της χλωροφύλλης b είναι μικρότερη. Τα τρία αυτά μόρια, σε συγκέντρωση 0,5 M μειώνουν το σήμα της Bx περιοχής αλλά αισθητά λιγότερο από ο,τι η σπερμίνη, ενώ πέρα από μια μικρή διαπλάτυνση της ταινίας δεν παρατηρείται μετατόπιση του μέγιστου απορρόφησης. Η Qy (0,0) κορυφή στα 647nm μετατοπίζεται και στις τρεις μεταχειρίσεις μόλις κατά 2-3nm ενώ παρατηρείται μείωση του σήματός της κατά 3%, 19% και 34% για 0,5 M πουτρεσίνης, 3-αμινο-1-προπανόλης και σπερμιδίνης αντίστοιχα. Το σήμα απορρόφησης στην ευρύτερη περιοχή των 633nm βελτιώνεται χωρίς ωστόσο να δημιουργείται κάποιο νέο μέγιστο απορρόφησης όπως συμβαίνει με τη σπερμίνη.

Οι διαφοροποιήσεις αυτές που προκαλούνται στο φάσμα απορρόφησης της χλωροφύλλης b γίνονται ακόμη πιο εμφανείς στα φάσματα διαφοράς (Εικ. 3.7) που αφορούν σε συγκέντρωση αμίνης 0,5 M. Αξιοσημείωτη είναι η αύξηση του σήματος στην Qx (ταινία με ιδιαίτερη διαγνωστική αξία στη φωτοσύνθεση *in vivo*) που εκτείνεται από τα 500nm μέχρι τα 600nm, όπου η σπερμίνη και έπειτα η σπερμιδίνη διαγράφουν δύο ξεκάθαρες κορυφές στα 525-530nm και στα 573-575nm. Το σήμα στα 527nm αυξάνεται κατά 69%, 95% και 163% για συγκεντρώσεις σπερμίνης 0,1M, 0,25M και 0,5M αντίστοιχα, ενώ η σπερμιδίνη σε συγκέντρωση 0,25M και 0,5M το αυξάνει κατά 20-30%. Το σήμα στα 574nm αυξάνεται έως και 66% για συγκέντρωση σπερμίνης 0,5M, ενώ η επίδραση της σπερμιδίνης είναι ίδια με τα 527nm. Η 3-αμινο-1-προπανόλη



Εικόνα 3.7 Φάσματα διαφοράς των χλωροφυλλών b (αριστερά) και a (δεξιά) πριν και μετά τη μεταχείριση με 0,5 M 3-αμινο-1-προπανόλης, put, spd και spm. Παρατίθεται όλο το φάσμα (επάνω) και μόνο η περιοχή Qx από τα 500nm έως τα 600nm (κάτω).

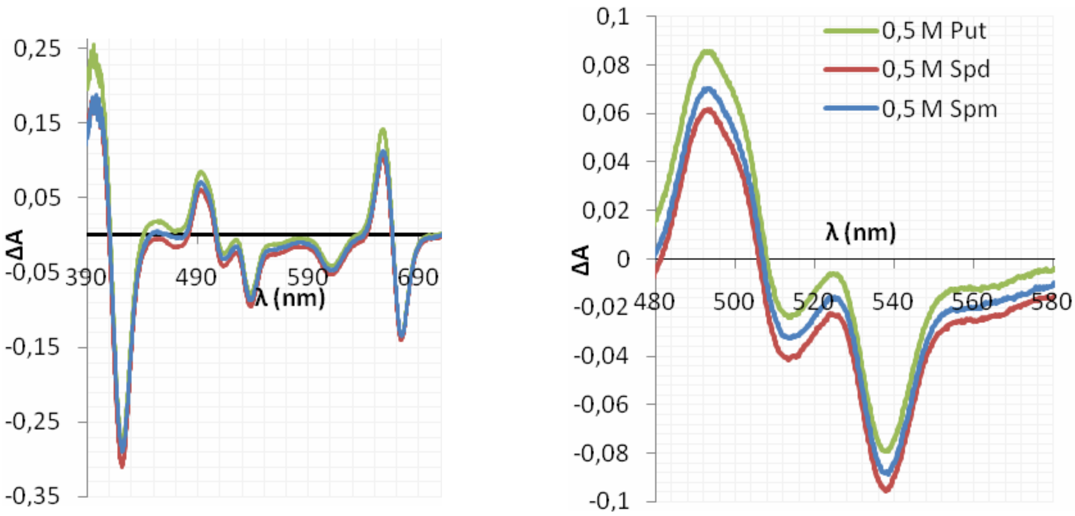
αυξάνει το σήμα στα 527nm κατά 16% ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει την απορρόφηση στα 574nm. Αντίθετα, η πουτρεσίνη σε συγκεντρώσεις 0,25M και 0,5M αυξάνει το σήμα στα 574nm κατά 26% και 46% αντίστοιχα. Ίδιες συγκεντρώσεις πουτρεσίνης αυξάνουν το σήμα στα 527nm κατά 30-50%, χωρίς ωστόσο να διαγράφουν μια ξεκάθαρη κορυφή στη συγκεκριμένη περιοχή. Τα αντίστοιχα φάσματα διαφοράς που αφορούν τη χλωροφύλλη a ανέδειξαν διάφορες αυξομειώσεις στην Qx περιοχή. Από αυτά ξεχωρίζει η θετική κορυφή που εμφανίζεται στα 520nm και η αρνητική κορυφή στα 537nm περίπου (Εικ.3.7). Από τα φάσματα διαφοράς προκύπτουν δύο έντονες αρνητικές κορυφές που για τη χλωροφύλλη b εντοπίζεται στα 473nm και για τη χλωροφύλλη a στα 438nm περίπου.



Εικόνα 3.8. Επίδραση 0,5 M σπερμίνης, σπερμιδίνης και πουτρεσίνης στο φάσμα απορρόφησης της φαιφυτίνης a σε αιθανόλη. Παρουσιάζεται όλο το φάσμα (επάνω αριστερά), η B περιοχή του φάσματος (επάνω δεξιά), η Qx περιοχή (κάτω αριστερά) και η Qy περιοχή (κάτω δεξιά). Η συγκέντρωση της φαιοφυτίνης ήταν 30μM.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται να παρατεθούν δίπλα σε αυτά που παρουσιάζονται στην εικόνα 3.8 και αφορούν τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις για τη φαιοφυτίνη, η οποία φέρει δύο H^+ αντί του μετάλλου Mg στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου της. Παρατηρούμε ότι και οι τρεις κύριες πολυαμίνες σε συγκέντρωση 0,5 M μετατοπίζουν υψιχρωμικά όλο το φάσμα απορρόφησής της, σχεδόν με τον ίδιο τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, η Bx ζώνη στενεύει και μετατοπίζεται κατά 9-10nm προς το μπλε με το νέο μέγιστο να απαντάται στα 400nm περίπου, ενώ η Qy(0,0) ζώνη μετατοπίζεται κατά 5nm περίπου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η Qx περιοχή του φάσματος όπου οι δύο κορυφές της φαιοφυτίνης στα 505nm και 536nm επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία της πολυαμίνης. Η πρώτη κορυφή μετατοπίζεται στα 499nm και η ένταση του σήματός της αυξάνεται κατά 30-40%. Η δεύτερη μετατοπίζεται υψιχρωμικά κατά 10nm ενώ η έντασή της μειώνεται. Οι δύο αυτές κορυφές αυξομειώνονται και μετατοπίζονται αναλογικά με τη συγκέντρωση πολυαμίνης που χορηγείται. Έτσι, σε συγκέντρωση σπερμίνης 0,1 M οι κορυφές στα 505nm και 536nm μετατοπίζονται προς το μπλε κατά 4nm και 2nm αντίστοιχα (δεδομένα δεν παρατίθενται). Οι διαφορές αυτές φαίνονται καλύτερα στα φάσματα διαφοράς όπου παρατηρούνται οι δύο αρνητικές κορυφές στα 510nm και 536nm και μια θετική κορυφή στα 490nm (Εικ. 3.9).

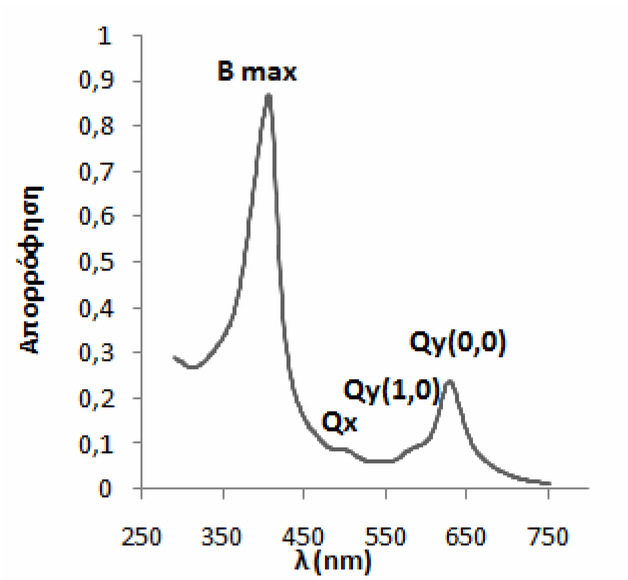
Αντίθετα με τα όσα περιγράφθηκαν για τις χλωροφύλλες, το φάσμα απορρόφησης της φαιοφυτίνης στην Qy περιοχή έχει να καταγράψει μόνο μια υψιχρωμική μετατόπιση της Qy(1,0) ταινίας κατά 4nm κατά τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις με τις πολυαμίνες. Στην περίπτωση αυτή, ούτε η σπερμιδίνη αλλά ούτε και η σπερμίνη οδήγησαν στη δημιουργία κάποιου νέου μέγιστου κοντά στα 640nm, που για αυτό το λόγο θεωρούμε ότι συνδέεται άμεσα με το κεντρικό άτομο Mg του μορίου των χλωροφυλλών. Η εμφάνιση της συγκεκριμένης κορυφής κατά πάσα πιθανότητα αντιστοιχεί στη δημιουργία του έκτου δεσμού συναρμογής μεταξύ του ατόμου Mg και κάποιας εκ των δύο μεγαλύτερων πολυαμινών, με κύρια υπαίτιο τη σπερμίνη. Επιπλέον, το γεγονός ότι και οι τρεις πολυαμίνες προκαλούν τις ίδιες ποιοτικά αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης της φαιοφυτίνης, ενώ η επίδρασή τους διαφέρει στην περίπτωση των χλωροφυλλών, αποτελεί ένδειξη διαφορετικού τρόπου πρόσδεσής τους στο μόριο της χρωστικής παρουσία και απουσία του κεντρικού ατόμου Mg.



Εικόνα 3.9. Φάσματα διαφοράς της φαιφυτίνης a πριν και μετά τη μεταχείριση με 0,5 M put, spd και spm. Παρατίθεται όλο το φάσμα (αριστερά) και μόνο η περιοχή Qx από τα 500nm έως τα 600nm (δεξιά).

3.1.1.3 Επίδραση των πολυαμινών στην απορρόφηση της χλωροφυλλίνης

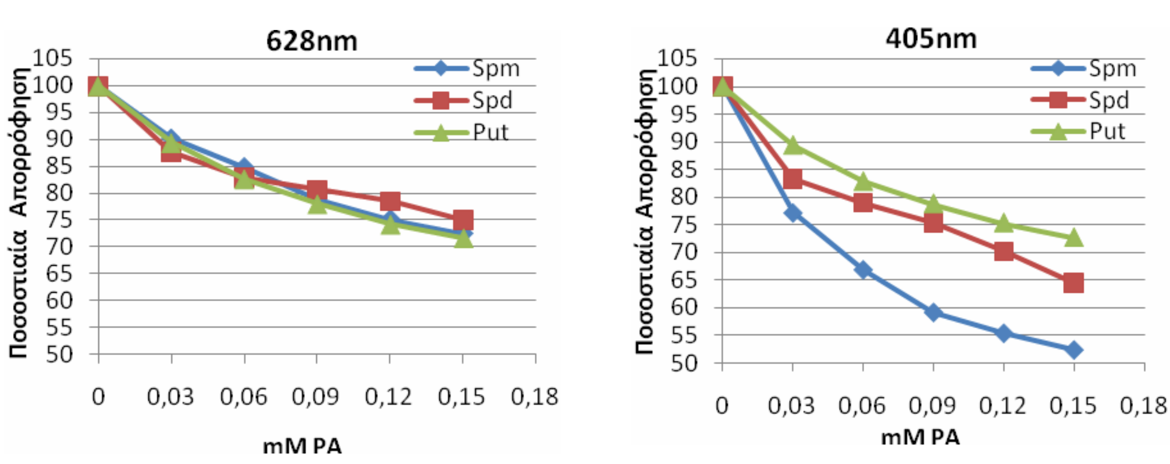
Το φάσμα απορρόφησης της χλωροφυλλίνης είναι ένα τυπικό φάσμα μεταλλοχλωρίνης (Gurinovich et al., 1968; Dolphin, 1978). Εμφανίζει μια έντονη Bx,y κορυφή στα 402nm, ενώ οι κορυφές στην Q-ταινία του φάσματος είναι



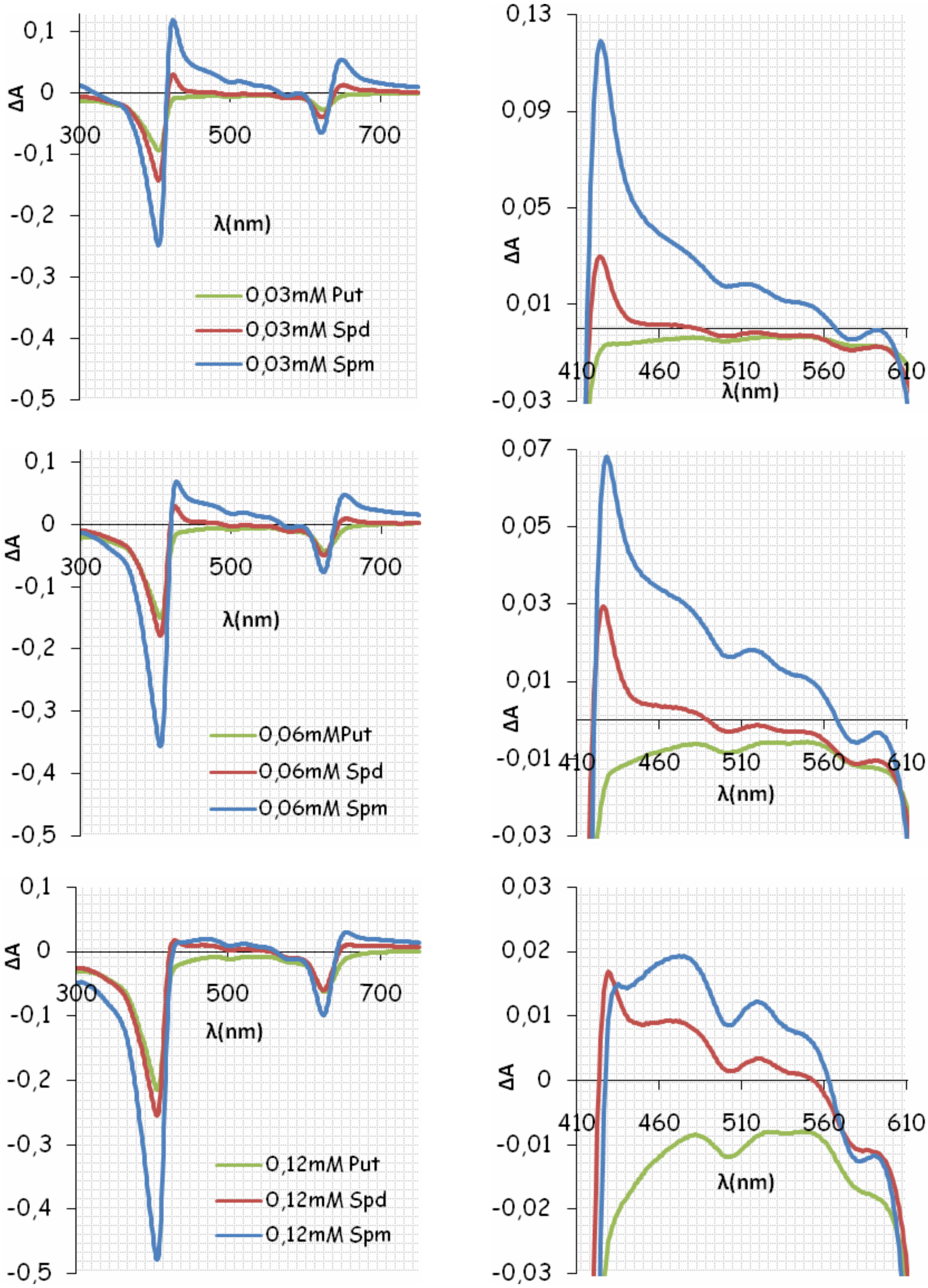
Εικόνα 3.10. Το φάσμα απορρόφησης της χλωροφυλλίνης. Επιλέχτηκε η συγκέντρωση στα 30μM διότι δίνει υψηλές τιμές απορρόφησης χωρίς να υπερβαίνει τη μονάδα, εξασφαλίζοντας ότι οι μετρήσεις θα γίνονται στη γραμμική περιοχή λειτουργίας του οργάνου.

αδύναμες με εξαίρεση την κορυφή στα 628nm που αντιστοιχεί στην ηλεκτρονιακή κατάσταση Qy(0,0). Η Qx μετάβαση είναι γενικά αδύναμη και αποδίδεται στην κορυφή στα 500nm (Andersson et al., 1987). Η άλλη αδύναμη κορυφή που εμφανίζεται γύρω στα 585nm αντιστοιχεί στο δονητικό υπερτονικό επίπεδο Qy(1,0) (Εικόνα 3.10).

Τα αποτελέσματα διαφέρουν ανάλογα με το ποια κορυφή εξετάζουμε. Η κορυφή στα 628nm φαίνεται να συμπεριφέρεται με τον ίδιο τρόπο μετά από προσθήκη σπερμίνης, σπερμιδίνης ή πουτρεσίνης. Η απορρόφηση στα 628nm μειώνεται με τον τρόπο που φαίνεται στην εικόνα 3.11 και η μείωση αυτή όταν η αναλογία μορίων πολυαμίνης / χλωροφυλλίνης στο διάλυμα είναι 5 : 1 φτάνει το 25 – 30 %. Αντίθετα, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η κορυφή στα 405nm. Η απορρόφηση μειώνεται κατά πολύ με προσθήκη σπερμίνης, λιγότερο με προσθήκη σπερμιδίνης και ακόμα πιο λίγο με προσθήκη πουτρεσίνης. Πιο συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.11, η πουτρεσίνη οδηγεί σε μείωση της απορρόφησης που αντιστοιχεί στα ίδια ποσοστά και συμβαίνει με τον ίδιο τρόπο που μειώνει την απορρόφηση της μικρής κορυφής των 628nm. Η σπερμιδίνη μειώνει τα επίπεδα της απορρόφησης περισσότερο και πιο απότομα από ότι είδαμε στην περιοχή των 628nm. Μειώνοντας την απορρόφηση της κύριας κορυφής μέχρι και 35% όταν βρίσκεται σε τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 0,15mM. Τέλος, η σπερμίνη μειώνει την απορρόφηση στα 405nm κατακόρυφα και σε επίπεδα που αγγίζουν το 50%.



Εικόνα 3.11. Διαγράμματα που παρουσιάζουν την ποσοστιαία μείωση του σήματος απορρόφησης της χλωροφυλλίνης από τη μεταχείριση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των τριών κύριων πολυαμινών. Η μείωση του σήματος της Qy κορυφής (αριστερά) και της B κορυφής (δεξιά). Η συγκέντρωση της χλωροφυλλίνης ήταν 30μM.



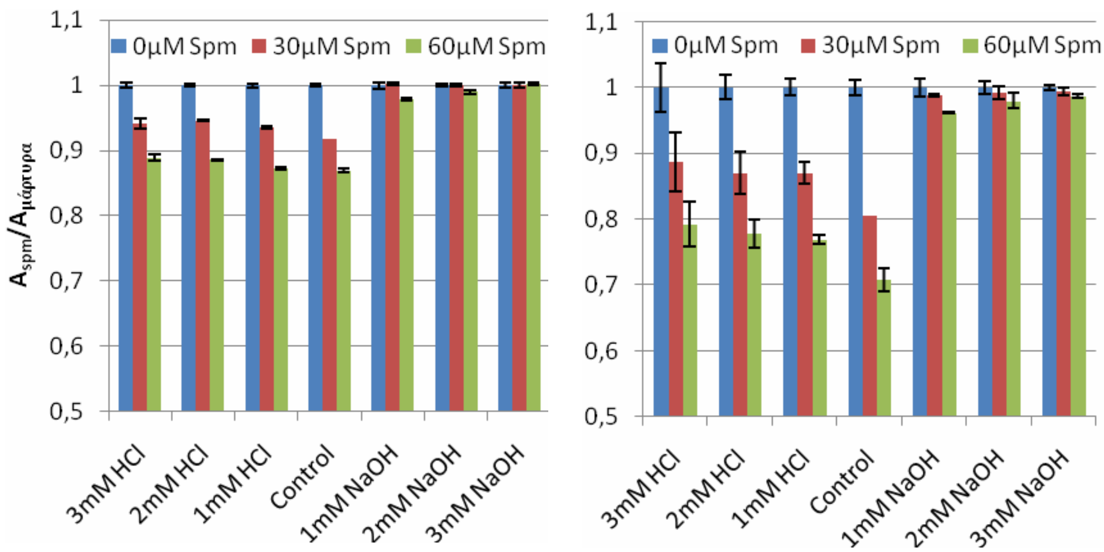
Εικόνα 3.12. Φάσματα διαφοράς της απορρόφησης της Scc πριν και μετά τη μεταχείριση με τις τρεις κύριες πολυαμίνες σε μοριακή αναλογία 1:1, 1:2 και 1:4. Παρατίθεται όλο το φάσμα (αριστερά) και μόνο η περιοχή Qx από τα 500nm έως τα 600nm (δεξιά). [Scc]=30μM.

Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν καθαρά πως η αλληλεπίδραση των πολυαμινών με τη χρωστική Scc, ακολουθεί τη σειρά Spm > Spd > Put. Προς επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων αντικαταστήσαμε τις πολυαμίνες με χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) ως αμίνη που φέρει μια μόνο αμινομάδα. Χλωριούχο αμμώνιο σε συγκέντρωση 1mM (περίπου 10 φορές υψηλότερη από εκείνη των πολυαμινών) προκάλεσε μόλις 7% μείωση της απορρόφησης υποδεικνύοντας ότι οι πολυαμίνες αλληλεπιδρούν με πολύ πιο ειδικό τρόπο με την Scc (δεδομένα δεν παρατίθενται).

Αν αφαιρέσουμε τα φάσματα απορρόφησης της χλωροφυλλίνης με τα φάσματα μεταχείρισής της με πολυαμίνες παίρνουμε τα διαγράμματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 3.12. Η πουτρεσίνη μειώνει το σήμα της απορρόφησης σε όλο το μήκος του φάσματος που μελετήσαμε και μόνο σε υψηλή συγκέντρωση 0,15mM αυξάνει ελάχιστα την απορρόφηση στην υπέρυθρη περιοχή. Η σπερμιδίνη μειώνει περισσότερο το σήμα στις περιοχές του φάσματος που εμφανίζονται οι δύο κορυφές ενώ ανάμεσα από αυτές, στη Qx περιοχή, το φάσμα διαγράφει μια αυξητική τάση, με μέγιστη αύξηση 8% για 0,12mM συγκέντρωση σπερμιδίνης. Στη συγκέντρωση αυτή η σπερμιδίνη φαίνεται να βελτιώνει την απορρόφηση στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος ακολουθώντας αυξητική πορεία από τα 650nm και μετά. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον το παρουσιάζει η σπερμίνη. Η επίδρασή της στην απορρόφηση της χλωροφυλλίνης είναι εμφανής σε όλο το μήκος του φάσματος.

Όπως έχουμε δείξει η σπερμίνη μειώνει περισσότερο από τις άλλες δύο πολυαμίνες την απορρόφηση της B κορυφής στα 405nm. Ένα δεύτερο στοιχείο που προκύπτει από αυτά τα διαγράμματα και συνηγορεί υπέρ μιας ειδικής σχέσης Spm / Scc είναι η αύξηση της απορρόφησης στην περιοχή των 430-560nm καθώς και η πολύ μεγάλη αύξηση του σήματος στην υπέρυθρη περιοχή. Σε συγκέντρωση 0,03mM αυξάνει το σήμα στην περιοχή των 430-560nm μέχρι και 30% ενώ σε συγκέντρωση 0,12mM μέχρι και 20%. Η διαφοροποίηση αυτή του φάσματος είναι χαρακτηριστική του συμπλόκου Spm / Scc καθώς καμιά από τις άλλες πολυαμίνες δεν δημιουργεί κάτι αντίστοιχο και συμφωνεί με τα προηγούμενα αποτελέσματα για τις χλωροφύλλες. Επιπρόσθετα, αύξηση της ιοντικής ισχύος (10mM NaCl) πολλές φορές παραπάνω από αυτή που προκαλεί η σπερμίνη και οι άλλες πολυαμίνες δεν προκαλεί αύξηση της απορρόφησης στην περιοχή των 500nm (δεδομένα δεν παρατίθενται), απορρίπτοντας το ενδεχόμενο μιας μη ειδικής αλληλεπίδρασης. Πιθανότατα η διαφοροποίηση του φάσματος στην περιοχή των 430-560nm σχετίζεται και εδώ με την κατάσταση συντονισμού του κεντρικού ατόμου χαλκού της χλωροφυλλίνης και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της αλληλεπίδρασης.

Για να καθορίσουμε ποια είναι η επίδραση του βαθμού πρωτονίωσης των διαφορετικών αμινομάδων στην παραπάνω αλληλεπίδραση, το διάλυμα τιτλοδοτήθηκε σε διαφορετικές τιμές pH με διαδοχική προσθήκη οξέως και βάσης. Αυτό που προέκυψε είναι ότι και οι τρεις πολυαμίνες μειώνουν την απορρόφηση σε όξινα pH με πιο ισχυρή την επίδραση της σπερμίνης στη B ταινία του φάσματος απορρόφησης (εικόνα 3.13). Η μείωση του σήματος χάνεται όσο πλησιάζουμε σε βασικότερα pH, δηλαδή όσο αυξάνεται η μορφή της ελεύθερης βάσης των πολυαμινών και μειώνονται οι πρωτονιωμένες μορφές. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στην υπόθεση μιας ιοντικής αλληλεπίδρασης. Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο που προέκυψε από τα παραπάνω πειράματα είναι πως η διαφοροποίηση της απορρόφησης του συμπλόκου Spm / Scc είναι αντιστρεπτή με διαδοχικές προσθήκες οξέος και βάσης στο διάλυμα (δεν παρατίθενται αποτελέσματα). Πιθανότατα η φόρτιση και αποφόρτιση των αμινομάδων που φέρει η spm να λειτουργούν σαν διακόπτης της απόκρισης (πρόσδεση στη χλωροφυλλίνη). Με τα παραπάνω ισχυροποιείται η άποψη υπέρ ενός αντιστρεπτού pH-εξαρτώμενου μηχανισμού αλληλεπίδρασης.

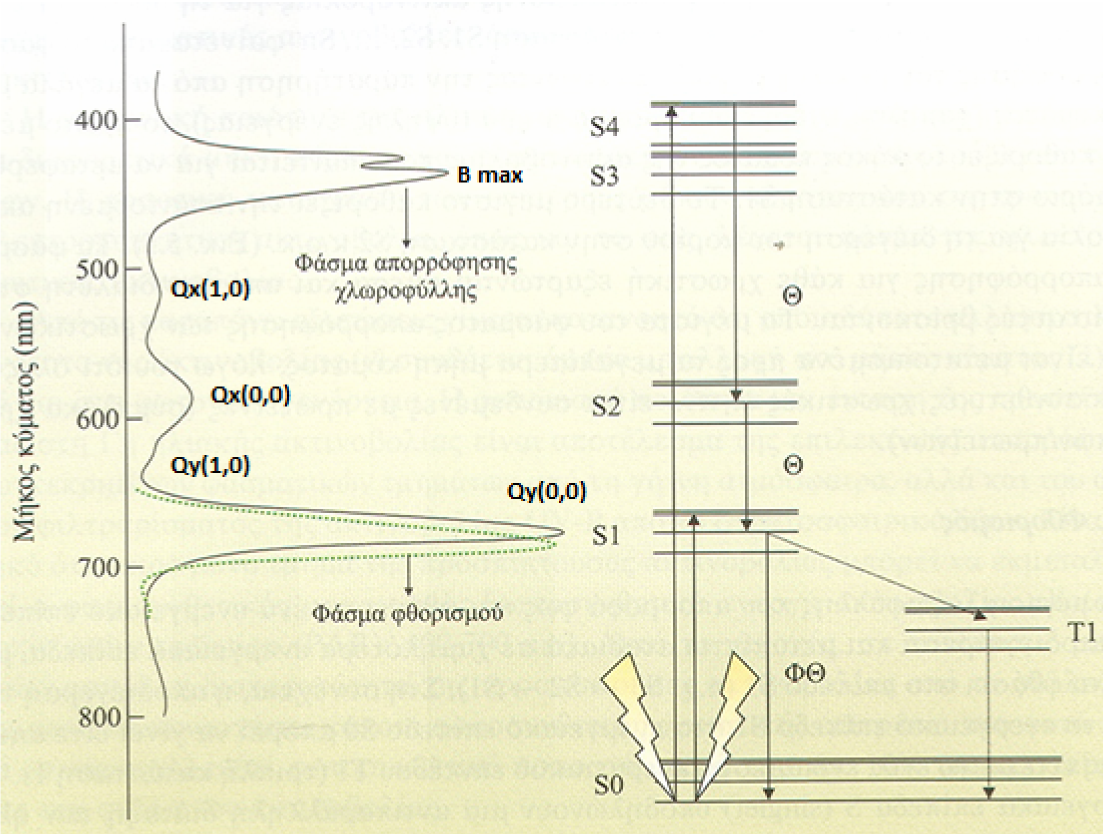


Εικόνα 3.13. Η ποσοστιαία διαφορά ως προς το μάρτυρα που προήλθε από προσθήκες διαφορετικών συγκεντρώσεων Spm σε διαφορετικά pH για τις δύο κύριες κορυφές του φάσματος της χλωροφυλλίνης. Η κορυφή των 628nm (αριστερά) και των 405nm (δεξιά). [SCC]=30μM.

3.1.2 Επίδραση των πολυαμινών στο φθορισμό των φωτοσυνθετικών τετραπυρρολών

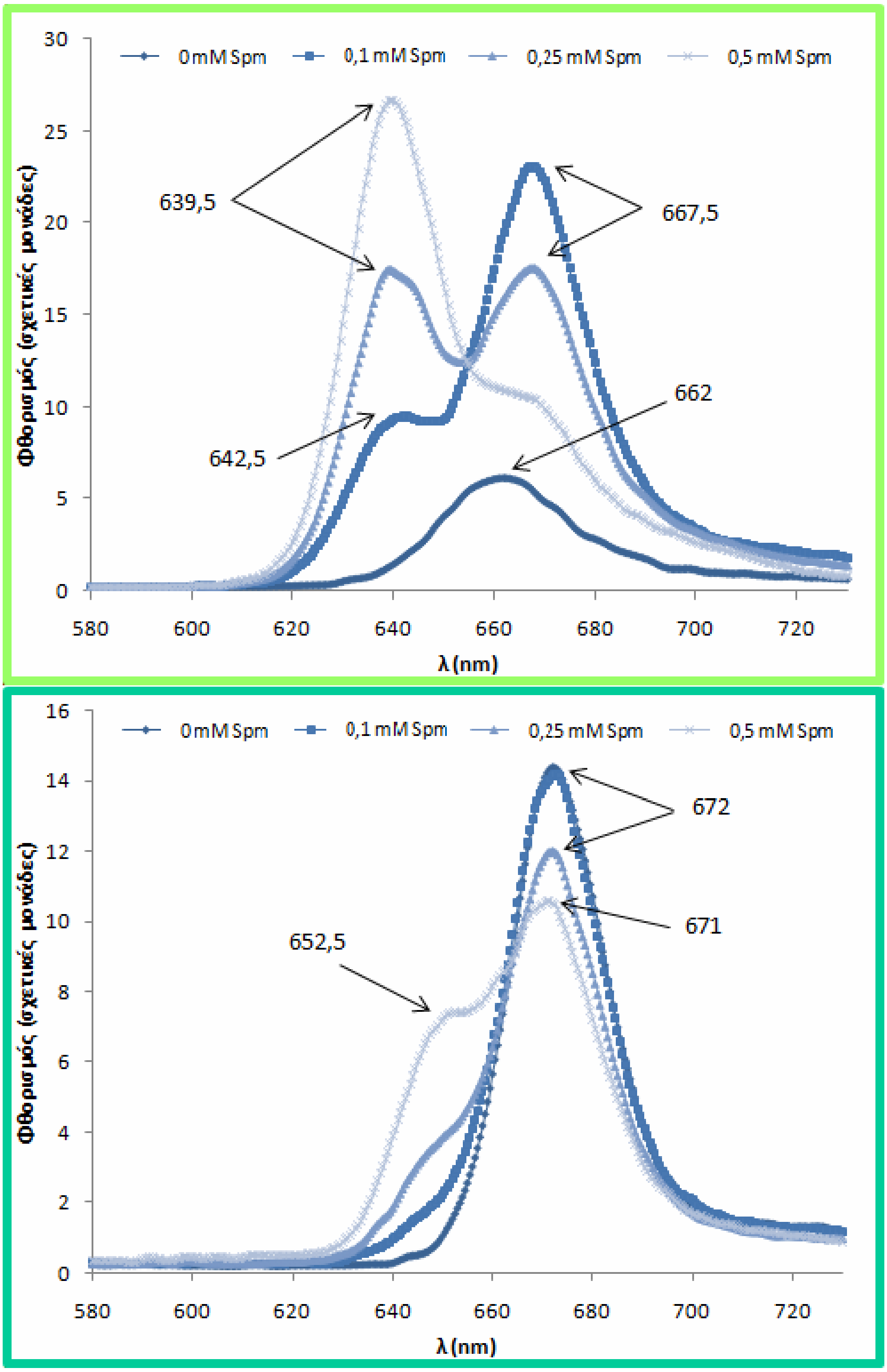
Ένα μόριο χλωροφύλλης που απορροφά φως και φτάνει από την ενεργειακά βασική του κατάσταση (S_0) σε ένα ενεργειακό επίπεδο S_n αποδιεγείρεται και μεταπίπτει σταδιακά σε χαμηλότερα ενεργειακά επίπεδα, μέχρι να φτάσει στο χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο S_1. Στη συνέχεια, η αποδιέγερσή του από το ενεργειακό επίπεδο S_1 στο ενεργειακό επίπεδο S_0 μπορεί να γίνει είτε απευθείας είτε μέσω ενός ενδιάμεσου ενεργειακού επιπέδου T_1 (τριπλή κατάσταση 1). Τα ενεργειακά επίπεδα S (singlet) υποδηλώνουν μια αντιπαράλληλη διάταξη των ηλεκτρονιακών spin, ενώ τα ενεργειακά επίπεδα T (triplet) παρουσιάζουν παράλληλα spin.

Η ενεργειακή μετάπτωση του μορίου από υψηλά επίπεδα S μέχρι το ενεργειακό επίπεδο S_1 συνοδεύεται από την απελευθέρωση ενέργειας υπό τη μορφή θερμότητας. Η απελευθέρωση ενέργειας από την S_1 στην S_0 μπορεί να παρουσιαστεί είτε ως εκπομπή θερμότητας είτε ως εκπομπή φωτονιακής ακτινοβολίας, η οποία μπορεί φυσικά να χρησιμοποιηθεί και για την διέγερση γειτονικών μορίων. Η εκπομπή ακτινοβολίας κατά την αποδιέγερση αυτή ονομάζεται φθορισμός και η φασματική κατανομή της ακτινοβολίας αυτής αποτελεί το φάσμα φθορισμού (Εικ. 3.14). Το μήκος κύματος αυτής της ακτινοβολίας είναι μεγαλύτερο (δηλαδή μικρότερης ενέργειας) από το αντίστοιχο που χρειάζεται για την ενεργειακή διέγερση του μορίου από το ενεργειακό επίπεδο S_0 στο S_1 (Ghanotakis and Kotzabasis., 2003). Επομένως, η διέγερση της χλωροφύλλης είτε με κυανή ακτινοβολία (S_3, S_4) είτε με ερυθρή (S_1) δίνει το ίδιο φάσμα φθορισμού. Ο φθορισμός σε απομονωμένα μόρια χλωροφύλλης διαρκεί πάρα πολύ λίγο (10^{-9} s) και λαμβάνει χώρα αμέσως μετά τη διέγερση του μορίου.

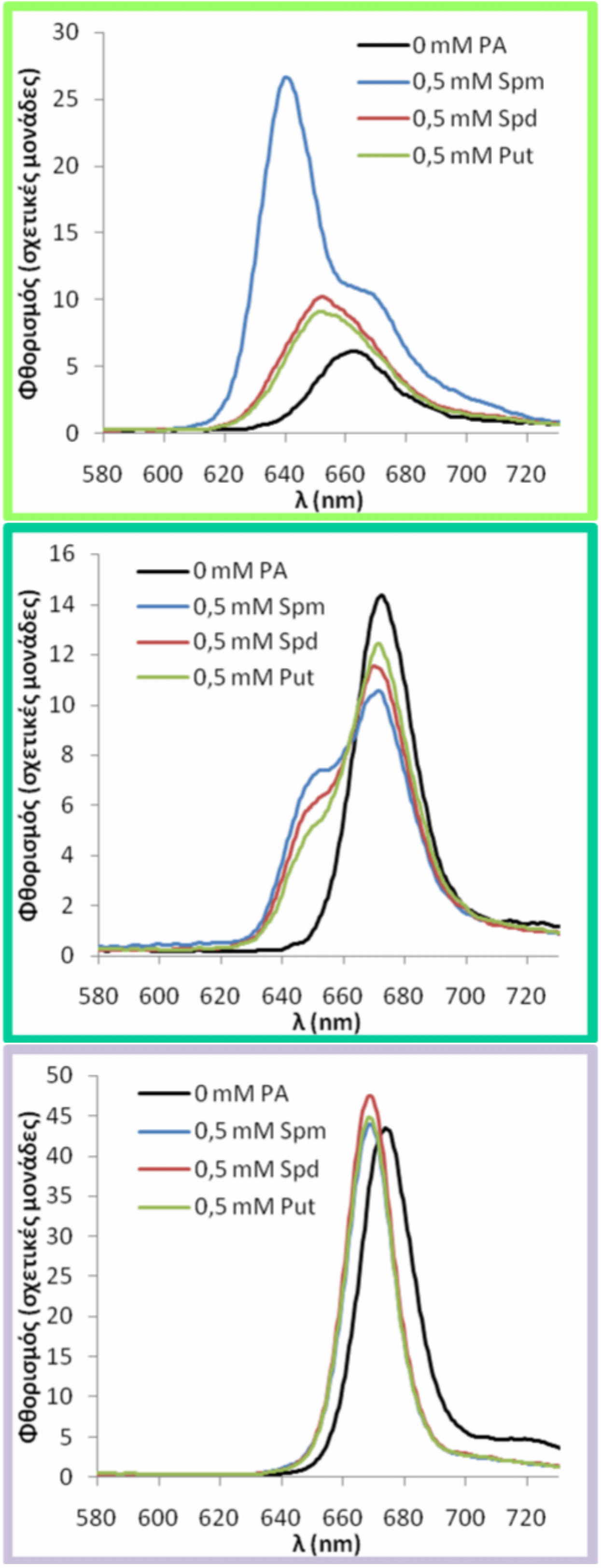


Εικόνα 3.14 Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων των χλωροφυλλών και σχέση του φάσματος απορρόφησης των χρωστικών με τα ενεργειακά επίπεδα (S_0, S_1, S_2, S_3 & S_4). Στο φάσμα απορρόφησης φαίνονται η B και οι τέσσερις Q ταινίες. Θ: Απελευθέρωση ενέργειας με τη μορφή θερμότητας. ΦΘ: Απελευθέρωση ενέργειας με τη μορφή φθορισμού.

Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού των απομονωμένων χλωροφυλλών a, b και της φαιοφυτίνης a πραγματοποιήθηκε παρουσία των τριών διαφορετικών πολυαμινών, στις συνθήκες που στην προηγούμενη ενότητα ανέδειξαν τη δημιουργία του συμπλόκου χρωστική : πολυαμίνη. Στην εικόνα 3.15 παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού των χλωροφυλλών a και b παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης. Από τα φάσματα απορρόφησης των χλωροφυλλών a και b εντοπίστηκαν τα ισοσβεστικά τους σημεία στα 425nm και 440nm αντίστοιχα. Στα σημεία αυτά η συνολική απορρόφηση δε μεταβάλλεται με τη μεταχείριση και για αυτό το λόγο τα παραπάνω μήκη κύματος χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση των χρωστικών. Τα μέγιστα φθορισμού σε αιθανόλη των χλωροφυλλών a και b αντιστοιχούν σε μήκη κύματος 672nm και 662nm αντίστοιχα.



Εικόνα 3.15 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης στην εκπομπή φθορισμού των χλωροφυλλών b (επάνω) και a (κάτω). Η συγκέντρωση χλωροφύλλης ήταν 0,03μΜ και οι συγκεντρώσεις σπερμίνης ήταν αυτές που αναγράφονται στα διαγράμματα. Το μήκος κύματος δέσμης διέγερσης ήταν 440nm για τη χλωροφύλλη b και 425nm για τη χλωροφύλλη a, το παράθυρο διέγερσης ήταν 15nm το παράθυρο εκπομπής ήταν 5nm και η σάρωση του φάσματος είχε ταχύτητα 500nm min^{-1}.

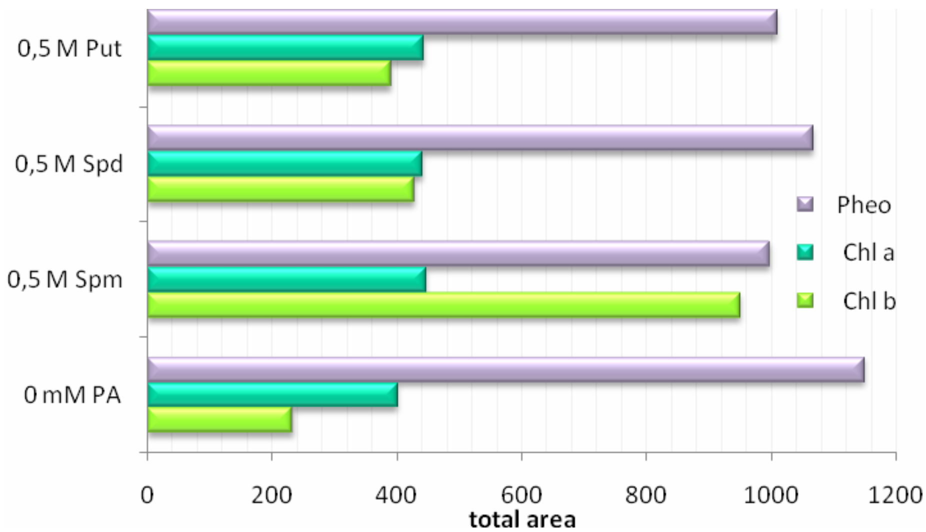


Εικόνα 3.16. Φασματοσκοπική μελέτη της αλληλεπίδρασης των πολυαμινών (σπερμίνης, σπερμιδίνης, πουτρεσίνης) με τη χλωροφύλλη b (επάνω), a (κέντρο) και τη φαιοφυτίνη a (κάτω). Η συγκέντρωση των φωτοσυνθετικών χρωστικών ήταν 0,03μM και των πολυαμινών 0,5mM (Όπως προέκυψαν μετά την αραίωση των αρχικών δειγμάτων κατά 1000 φορές). Το μήκος κύματος δέσμης διέγερσης ήταν 440nm για τη χλωροφύλλη b, 425nm για τη χλωροφύλλη a και 410nm για τη φαιοφυτίνη a. Το παράθυρο διέγερσης ήταν 15nm, το παράθυρο εκπομπής ήταν 5nm και η σάρωση του φάσματος είχε ταχύτητα 500nm min^{-1}.

Ο φθορισμός της χλωροφύλλης a στα 672nm μειώνεται καθώς μεταβαίνουμε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σπερμίνης ενώ δεν παρατηρείται καμιά αξιοσημείωτη μετατόπιση της συγκεκριμένης κορυφής. Ταυτόχρονα, αυξάνεται ο φθορισμός στα 652nm και σε 0,5M σπερμίνης αρχίζει να διαγράφεται μια νέα κορυφή. Αντίθετα, το μέγιστο φθορισμού της χλωροφύλλης b μετατοπίζεται κατά 5-6nm προς το κόκκινο, ενώ ο φθορισμός δεν αποσβήνεται αλλά αυξάνεται σε υψηλά επίπεδα σε συγκέντρωση σπερμίνης 0,1M. Στη συγκέντρωση αυτή ήδη φαίνεται να έχει δημιουργηθεί μια νέα κορυφή στα 642nm που φτάνει την ένταση της κορυφής στα 652nm της χλωροφύλλης a παρουσία 0,5M σπερμίνης. Παρουσία 0,25M σπερμίνης ο φθορισμός στα 667,5nm μειώνεται σε σχέση με την προηγούμενη μεταχείριση ενώ ο φθορισμός στα 652,5nm μετατοπίζεται στα 639,5nm και αυξάνεται (Εικ. 3.15). Φαίνεται πως στην κατάσταση αυτή στο διάλυμα υπάρχει ισορροπία μεταξύ του αρχικού αντιδρώντος (Chl b) και του τελικού προϊόντος που προκύπτει με την παρουσία της σπερμίνης (σύμπλοκο Chl b – Spm) αφού ο φθορισμός των δύο κορυφών βρίσκεται στα ίδια επίπεδα. Τέλος, με 0,5M σπερμίνης η κύρια κορυφή του φάσματος γίνεται αυτή στα 639,5nm ενώ ο φθορισμός στα 667,5nm μειώνεται κι άλλο, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μια αντιστροφή των εντάσεων των δύο κορυφών σε σχέση με τα 0,1M Spm. Τα αντίστοιχα πειράματα για τη φαιοφυτίνη a δείχνουν μόνο μια μετατόπιση του μέγιστου φθορισμού της από τα 673,5nm στα 669,5nm παρουσία 0,1M σπερμίνης και στα 668,5nm παρουσία 0,25M και 0,5M σπερμίνης, χωρίς καμιά άλλη αξιοσημείωτη μεταβολή (δεδομένα δεν παρατίθενται).

Για τη συγκριτική μελέτη της επίδρασης των πολυαμινών στο φθορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών, πραγματοποιήθηκαν τα αντίστοιχα πειράματα παρουσία σπερμιδίνης και παρουσία πουτρεσίνης. Η αλληλεπίδραση των χρωστικών με αυτές δεν οδηγεί στα ίδια φαινόμενα με αυτά που περιγράψαμε προηγουμένως, ή τα προκαλεί σε μικρότερο βαθμό. Στην εικόνα 3.16 παρουσιάζονται συγκριτικά τα φάσματα των χλωροφυλλών a, b και της φαιοφυτίνης a παρουσία των τριών πολυαμινών στη μέγιστη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε.

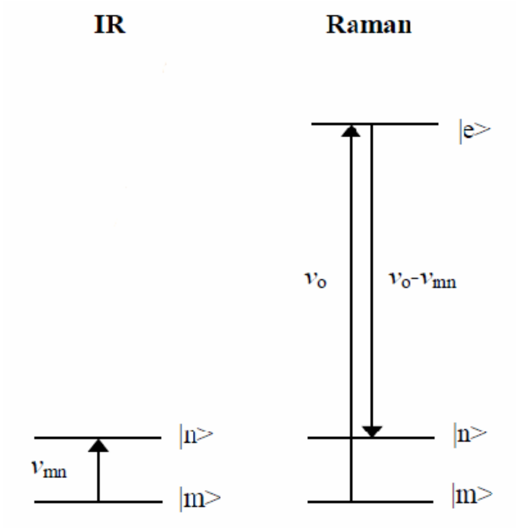
Η σπερμιδίνη και η πουτρεσίνη μετατοπίζουν το μέγιστο φθορισμού της χλωροφύλλης b στα 651,5nm και αυξάνουν το σήμα του. Αντίθετα, η επίδραση των πολυαμινών στην εκπομπή φθορισμού της χλωροφύλλης a φαίνεται να ακολουθεί την ισχύ Spm > Spd > Put. Η απόσβεση του σήματος στα 672nm είναι της τάξης του 27%, 21% και 15% αντίστοιχα ενώ ο φθορισμός στα 652nm αυξάνεται και στις τρεις μεταχειρίσεις με την ίδια ισχύ. Οι τρεις κύριες πολυαμίνες επιδρούν το ίδιο ασθενώς στο φθορισμό της φαιοφυτίνης a, σε σχέση με το φθορισμό της Chl b, υποδεικνύοντας το βασικό ρόλο του κεντρικού ατόμου Mg στην αλληλεπίδραση (Εικ. 3.17).



Εικόνα 3.17. Στο παραπάνω ραβδόγραμμα αναπαριστώνται τα μεγέθη του ολικού εμβαδού του φθορισμού από 620nm έως 720nm των μεταχειρίσεων της εικόνας 3.16.

3.1.3 Μετρήσεις με φασματοσκοπία Raman – IR

Η δονητική φασματοσκοπία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία μελέτης για την κατανόηση της φύσης των χημικών δεσμών και της γεωμετρίας των μορίων. Οι φασματοσκοπίες υπερύθρου (IR) και Raman ανήκουν στην κατηγορία της φασματοσκοπίας ταλάντωσης και βάσει των διαφορετικών κανόνων που τις διέπουν μπορούν να συνεισφέρουν στον πλήρη δονητικό χαρακτηρισμό ενός συστήματος με το συνδυασμό των πληροφοριών που καθεμιά προσφέρει.



Εικόνα 3.18. Απορρόφηση υπερύθρου και σκέδαση Raman, όπου |m> και |n> είναι δύο κβαντισμένες καταστάσεις μιας κανονικής δόνησης στη βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση και |e> μια διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση.

Η ενέργεια των δονητικών μεταβάσεων αντιστοιχεί περίπου στο ένα δέκατο της ενέργειας των ηλεκτρονιακών μεταβάσεων. Αν υποθέσουμε (όπως απεικονίζεται στο σχήμα 3.18) ότι |m> και |n> είναι δύο κβαντισμένες καταστάσεις μιας κανονικής δόνησης στη βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση και |e> μια διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση, που μπορεί να είναι και μη πραγματική (virtual), η IR απορρόφηση προέρχεται από την απευθείας μετάβαση από την |m> στη |n>, ενώ η σκέδαση Raman περιλαμβάνει δύο συνεχείς μεταβάσεις, από την |m> στην |e> και από την |e> στην |n>. Ενώ λοιπόν και οι δύο τεχνικές αποκαλύπτουν την ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στα κβαντισμένα δονητικά επίπεδα |m> και |n>, ισχύουν διαφορετικοί κανόνες επιλογής. Αν η μετάβαση ανάμεσα στα |m> και |n> συνοδεύεται από μεταβολή της διπολικής ροπής η δόνηση είναι IR ενεργή, ενώ αν συνοδεύεται από μεταβολή της πολωσιμότητας είναι Raman ενεργή. Σε μόρια που διαθέτουν κέντρο συμμετρίας, αντισυμμετρικές δονήσεις είναι IR ενεργές και συμμετρικές δονήσεις είναι Raman ενεργές.

Η επιλογή της φασματοσκοπίας Raman έγκειται στα πλεονεκτήματα που αυτή προσφέρει σε σχέση με τη φασματοσκοπία υπερύθρου. Το σημαντικότερο ίσως από αυτά είναι ότι το νερό δεν προκαλεί παρεμπόδιση με αποτέλεσμα να μπορούν να παρθούν φάσματα σε υδατικά διαλύματα. Επιπλέον, η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε μεταλλοπορφυρίνες όσο και σε πρωτεΐνες ενώ παρέχει τη δυνατότητα χρήσης αραιών διαλυμάτων με συγκεντρώσεις μεταξύ 10^{-4} – 10^{-6} M που αρκούν για να δώσουν καλά φάσματα. Τέλος, πληροφορίες σχετικά με τις ηλεκτρονικές διεγερμένες καταστάσεις μπορούν να παρατηρηθούν από το προφίλ διέγερσης ενώ γενικά μόνο οι ταλαντώσεις που σχετίζονται με τον πορφυρινικό σκελετό είναι λόγω συντονισμού ενισχυμένες και για αυτό το φάσμα δεν παρεμποδίζεται από τις ταινίες περιφερειακών υποκαταστατών.

3.1.3.1 Φασματοσκοπία συντονισμού Raman Χλωροφυλλών

Οι περισσότερες γραμμές που παρατηρούνται σε ένα φάσμα συντονισμού Raman χλωροφύλλης προέρχονται από τις εντός επιπέδου δονήσεις του μορίου (Lutz, 1979). Εκτός βέβαια από τις δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου στην υψηλή περιοχή συχνοτήτων (1200-1700cm^{-1}) των φασμάτων συντονισμού Raman χλωροφυλλών μπορούν να παρατηρηθούν δονήσεις περιφερειακών υποκαταστατών του πορφυρινικού δακτυλίου όταν αυτοί είναι συζυγιακά συστήματα όπως οι βινυλομάδες και οι φορμυλομάδες. Γενικά δεν αναμένεται να ενισχύονται δονήσεις των περιφερειακών υποκαταστατών της πορφυρίνης με διέγερση στις ππ* μεταβάσεις της χλωροφύλλης, εφόσον δε συνεισφέρουν στις μεταβάσεις αυτές. Κερδίζουν όμως σημαντική ένταση είτε μέσω της ηλεκτρονιακής σύζευξής τους με το συζυγιακό συστημα της πορφυρίνης είτε μέσω κινητικής σύζευξης με τις δονήσεις του δακτυλίου. Ωστόσο, αν και από παλιά έχουν υπάρξει αρκετές έρευνες πάνω σε φάσματα Raman χλωροφυλλών (Lutz, 1984; Lutz and Robert, 1988; Lutz and Mantele, 1991), λίγες μόνο δονήσεις έχουν εξακριβωθεί καθώς οι χλωροφύλλες είναι ιδιαίτερα πολύπλοκα μόρια με χαμηλό βαθμό συμμετρίας (Boldt et al., 1987; Donohoe et al., 1988).

I. Δονήσεις του πορφυρινικού σκελετού

Οι δονήσεις έκτασης των γεφυρών μεθυλενίου συνεισφέρουν σημαντικά στις ζώνες της περιοχής των 1520-1620cm^{-1} (Lutz, 1984). Αυτές οι ζώνες δηλώνουν μια ξεκάθαρη, αν και έμμεση, ευαισθησία της κατάστασης συναρμογής του κεντρικού ατόμου Mg. Αποτελούν κατάλληλους δείκτες κυρίως λόγω της πολύ υψηλής τους απόδοσης κατά το συντονισμό με Soret ηλεκτρονιακή μετάβαση. Η ζώνη που προκύπτει από τη δόνηση έκτασης των γεφυρών μεθυλενίου εντοπίζεται γύρω στους 1600cm^{-1} όταν το κεντρικό άτομο Mg δεσμεύει δύο εξωτερικούς προσδέτες (δηλαδή στον 6^{o} βαθμό συναρμογής) και σε συχνότητες μεγαλύτερες από τους 1608cm^{-1} (1610-1615cm^{-1}) όταν αλληλεπιδρά μόνο με έναν αξονικό προσδέτη (Cotton and van Duyne, 1981). Η συχνότητα αυτής της ζώνης εξαρτάται επίσης ελαφρώς από τη θερμοκρασία και τις συνθήκες διέγερσης (Mattioli et al., 1992). Για τα μόρια της Chl a ένα ζεύγος ζωνών έχει παρατηρηθεί στους 1529-1554cm^{-1} όταν το κεντρικό άτομο Mg έχει αριθμό συναρμογής 5 και στους 1521-1545cm^{-1} όταν αυτό έχει αριθμό συναρμογής 6 (Fujiwara and Tasumi, 1986; Tasumi and Fujiwara, 1987). Μετά από εκτεταμένες μελέτες έχει προσδιοριστεί σαν ζώνη «κλειδί» για την κατάσταση συναρμογής του κεντρικού ατόμου Mg η ζώνη γύρω στους 1550cm^{-1} για την Chl a και γύρω στους 1565cm^{-1} για την Chl b. Πιο συγκεκριμένα, όταν το κεντρικό άτομο Mg της Chl a έχει αριθμό συναρμογής 5 εμφανίζει τη ζώνη γύρω στους 1554cm^{-1} ενώ όταν έχει αριθμό συναρμογής 6 γύρω στους 1545-1549cm^{-1}. Για την Chl b, οι ζώνες αυτές αναμένονται γύρω στους 1566-1570cm^{-1} και 1559-1563cm^{-1} αντίστοιχα (Schulz and Baranska, 2007).

II. Δονήσεις περιφερειακών υποκαταστατών

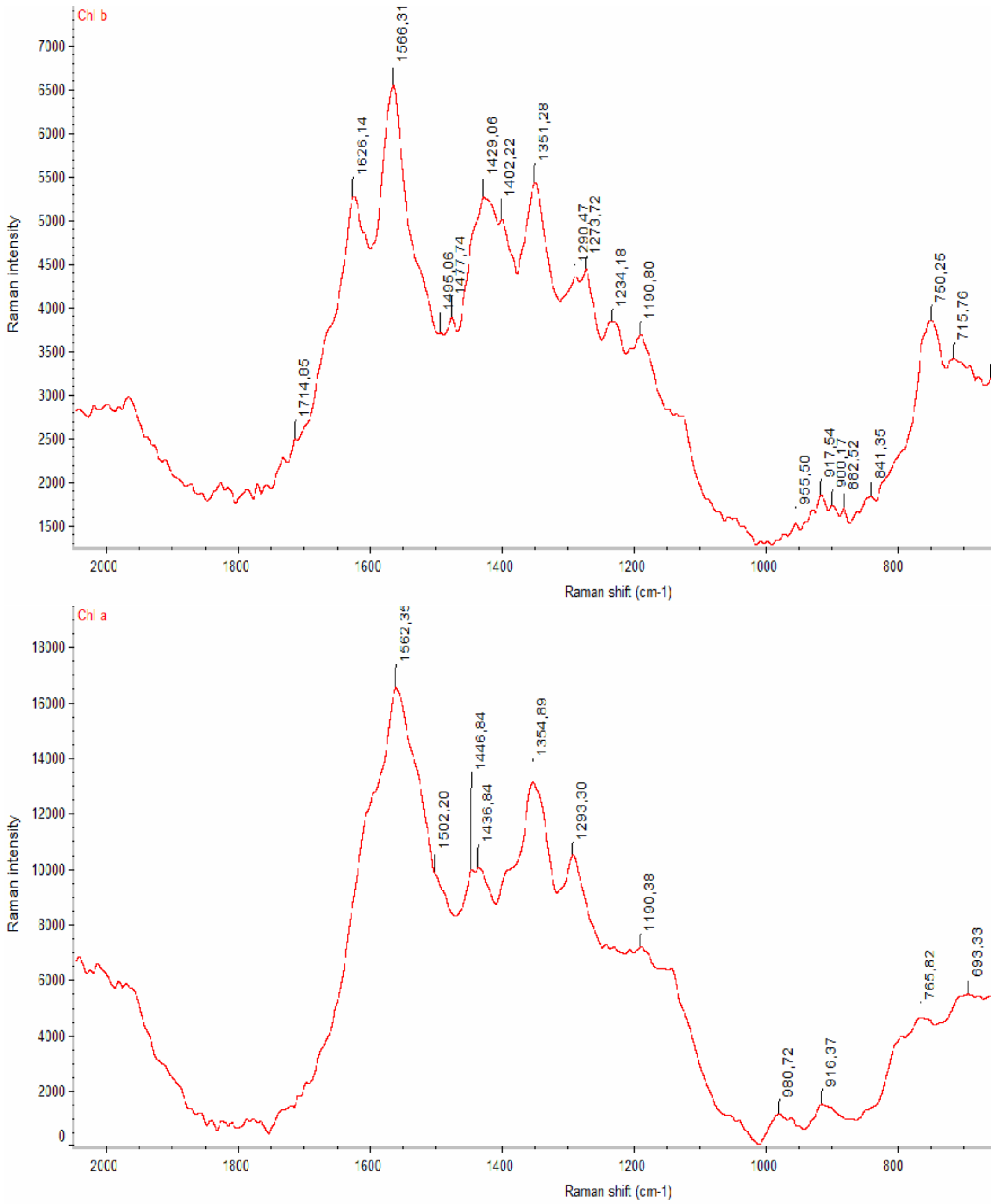
Στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων του φάσματος των χλωροφυλλών, μεταξύ των 1620 και 1750 cm^{-1}, οι ζώνες προκύπτουν από τις δονήσεις των καρβονυλομάδων τους (εικόνα 3.1) (9-κετο για την Chl a και 9-κετο και 3-φορμυλο για την Chlb) (Lutz, 1972, 1974). Οι συχνότητες για τις 9-κετο καρβονυλικές δονήσεις έκτασης παρατηρούνται στους 1695cm^{-1} για την Chl a και στους 1701cm^{-1} για την Chl b απουσία ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, σε μη πολικό περιβάλλον. Η αντίστοιχη συχνότητα για τις φαιοφυτίνες είναι λίγο μεγαλύτερη (στους 1707cm^{-1} για την Pheo a). Οι δονήσεις έκτασης των 3-φορμυλο καρβονυλικών ομάδων παρατηρούνται στους 1663cm^{-1} απουσία ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων (Lutz, 1984; Mattioli et al., 1993). Οι συχνότητες των δονήσεων όλων των παραπάνω ομάδων φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από τυχόν ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν και σε μικρότερο βαθμό από τη διηλεκτρική σταθερά του περιβάλλοντός τους. Παρουσία ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, όπως δεσμών υδρογόνου, παρατηρούνται ισχυρές μετατοπίσεις της τάξης των 40cm^{-1}, ενώ το εύρος της απόκλισης, για την ίδια συχνότητα, που αφορά την επίδραση του διαλύτη είναι γύρω στους 12cm^{-1} (Lutz, 1984 ; Koyama et al., 1986). Λαμβάνοντας υπόψη τη θέση αυτών των περιφερειακών υποκαταστατών στους δακτυλίους του μορίου, οι δονήσεις έκτασης των καρβονυλίων στη θέση 9 αναμένονται πιο ενεργές σε συντονισμό με Y-polarized μεταβάσεις. Αντίθετα, οι δονήσεις έκτασης των φορμυλίων στη θέση 3 αναμένονται πιο έντονες με X-polarized μεταβάσεις (Lutz, 1984; Feiler et al.,1991).

Εκτός από τις δονήσεις έκτασης των καρβονυλομάδων, στην ίδια περιοχή υψηλών συχνοτήτων έχουμε και τη συνεισφορά της δόνησης έκτασης του δεσμού βινυλίου στη θέση 2 του μορίου των χλωροφυλλών. Η δόνηση αυτή εμφανίζεται γύρω στους 1625cm^{-1}, αν και κυρίως όταν προκαλείται Soret συντονισμός, η συνεισφορά της είναι πολύ αδύναμη και συνήθως επικαλύπτεται από τις δονήσεις έκτασης των γεφυρών μεθυλενίου (Feiler et al., 1994). Γενικά, η διέγερση με ακτινοβολία που ανήκει στην Q περιοχή ενδείκνυται για την παρατήρηση των ζωνών που προκύπτουν από τις δονήσεις έκτασης των περιφερειακών υποκαταστατών των χλωροφυλλών, ενώ από την άλλη μεριά, η εξαγωγή συμπερασμάτων για τον αριθμό συναρμογής του κεντρικού ατόμου Mg τους είναι ευκολότερη με ακτινοβολία διέγερσης της B-περιοχής.

3.1.3.2 Αλληλεπίδραση των χλωροφυλλών a και b με τις πολυαμίνες μέσω φασματοσκοπίας Raman

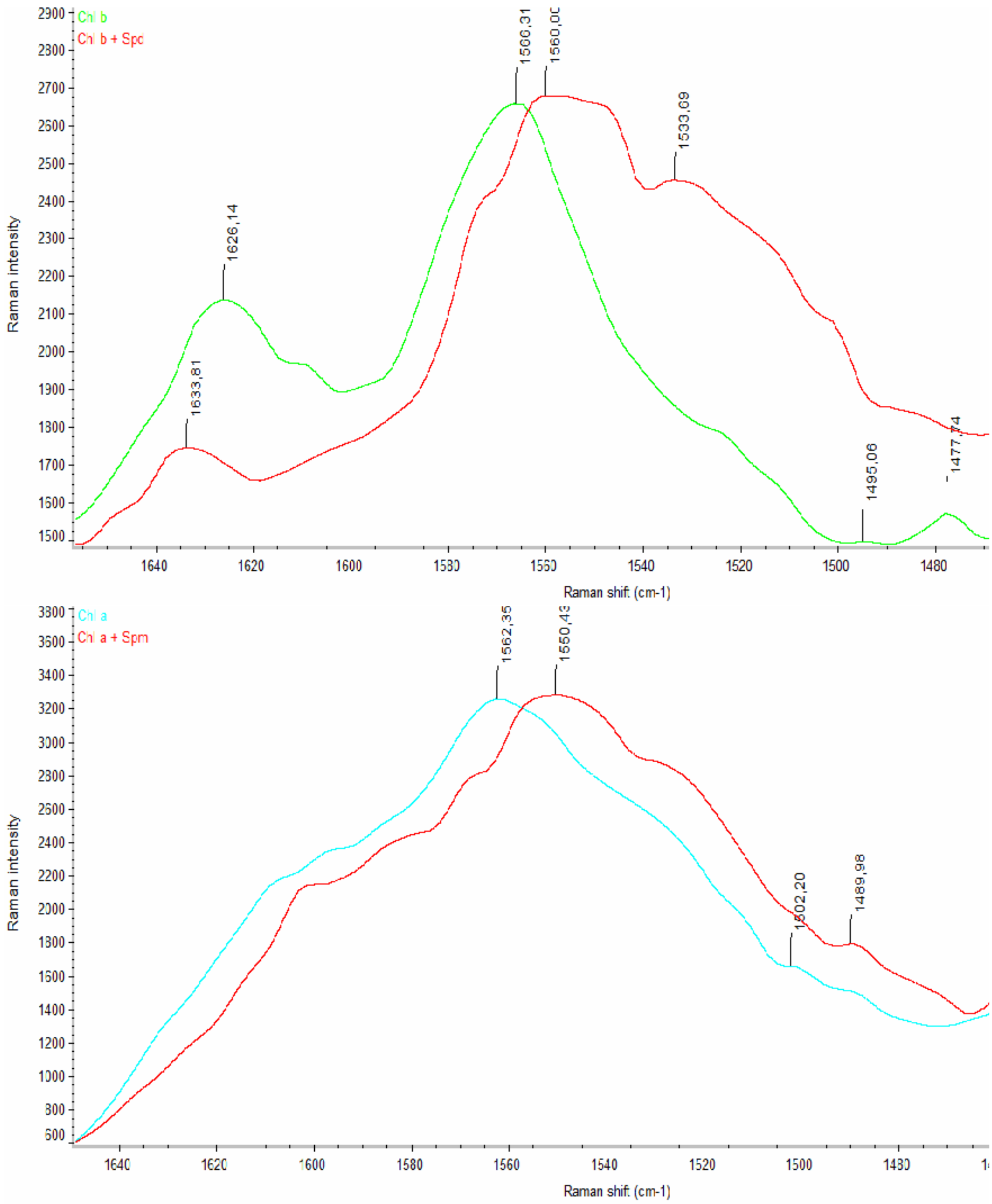
Στην εικόνα 3.19 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman των περιοχών υψηλών συχνοτήτων των χλωροφυλλών b και a σε αιθανόλη. Εύκολα διακρίνουμε την πιο έντονη ζώνη στους 1566cm^{-1} για τη Chl b και στους 1562cm^{-1} για τη Chl a, που σύμφωνα με τα παραπάνω αντιστοιχεί στις δονήσεις έκτασης των γεφυρών μεθυλενίου και αναδεικνύει τον πέμπτο δεσμό συναρμογής των κεντρικών ατόμων

Mg των χλωροφυλλών με την αιθανόλη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η κορυφή στους 1626cm^{-1} στο φάσμα της Chl b, που σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως θα μπορούσε να αντιστοιχεί στη δόνηση έκτασης του δεσμού βινυλίου στη θέση 2 ή στη δόνηση έκτασης της 3-φορμυλο καρβονυλικής ομάδας όπως θα προέκυπτε από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις με τον πολικό διαλύτη. Η δεύτερη υπόθεση ωστόσο δεν φαίνεται να είναι η επικρατέστερη καθώς παρατηρείται ένας «ώμος» γύρω στους 1660cm^{-1} στο φάσμα.



Εικόνα 3.19. Φάσματα Raman στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων της χλωροφύλλης b (επάνω) και της χλωροφύλλης a (κάτω) σε αιθανόλη. Η συγκέντρωση της χλωροφυλλης ήταν 25x10^{-3}M, το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 473nm, η ένταση του λέιζερ 100%, ο χρόνος έκθεσης του δείγματος 1sec, ο αριθμός των εκθέσεων 2 ενώ το φάσμα πάρθηκε με 10x φακό.

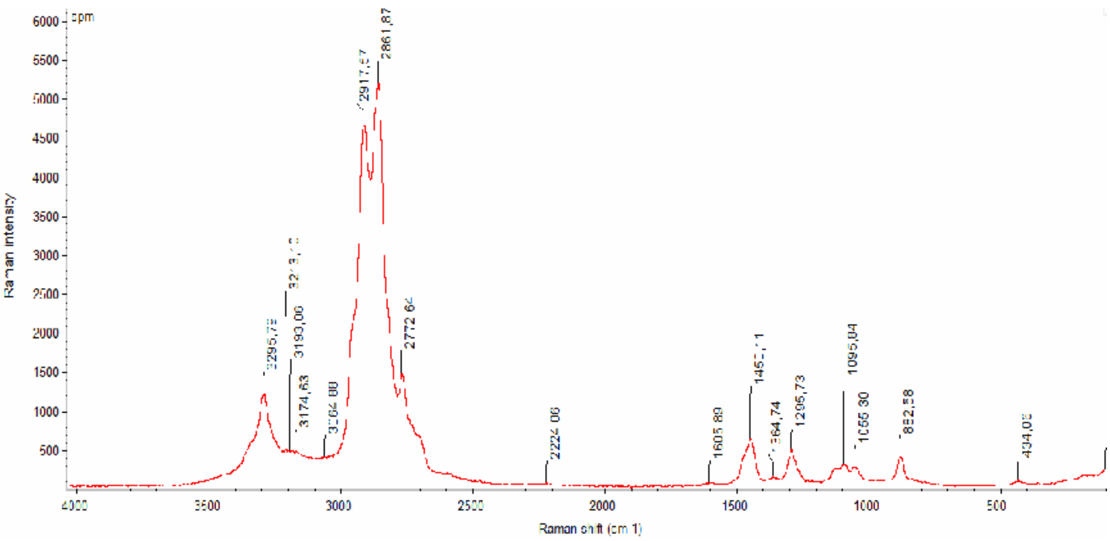
Η μεταχείριση με τις δύο μεγαλύτερες πολυαμίνες αφενός προκαλεί μια μεγάλη μείωση στην ένταση των ζωνών, αφετέρου μετατοπίζει τη ζώνη που αντιστοιχεί στις δονήσεις έκτασης των γεφυρών μεθυλενίου τόσο ώστε να τεκμηριωθεί ο σχηματισμός του έκτου δεσμού συναρμογής. Στην εικόνα 3.20 παρατίθενται δύο τέτοιες μεταχειρίσεις, όπου η σπερμιδίνη μετατοπίζει τη ζώνη από τους 1566cm^{-1} στους 1560cm^{-1}, ενώ η σπερμίνη μετατοπίζει τη ζώνη από τους 1562cm^{-1} στους 1550cm^{-1}.



Εικόνα 3.20. Φάσματα Raman στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων των μεταχειρίσεων Chl b : spd σε αναλογία 1:30 (επάνω) και Chl a : spm σε αναλογία 1:2 (κάτω) σε αιθανόλη. Η συγκέντρωση των χλωροφυλλών ήταν 25x10^{-3}M, το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 473nm, η ένταση του λέιζερ 100%, ο χρόνος έκθεσης του δείγματος 1sec, ο αριθμός των εκθέσεων 2 ενώ το φάσμα πάρθηκε με 10x φακό.

Στην πρώτη μεταχείριση που αφορά τη χλωροφύλλη b παρατηρείται και μια νέα ζώνη στους 1533cm^{-1} που εντάσσεται στην περιοχή των δονήσεων έκτασης των γεφυρών μεθυλενίου. Κατά την ίδια μεταχείριση, η ζώνη στους 1626cm^{-1} μετατοπίζεται στους 1634cm^{-1}, κάτι που θα μπορούσε να υποδηλώνει την πρόσδεση της σπερμιδίνης στη θέση 2 του μορίου της χλωροφύλλης. Η διέγερση με μήκος κύματος ακτινοβολίας τα 473nm είναι σε θέση να μας δώσει την απαιτούμενη πληροφορία για την κατάσταση συντονισμού του κεντρικού μετάλλου αλλά δε φαίνεται ιδιαίτερα χρήσιμη για να προβούμε σε ασφαλή συμπεράσματα για τον τρόπο πρόσδεσης των πολυαμινών στο δακτύλιο της χλωροφύλλης, αφού η πληροφορία που αφορά τους περιφερειακούς υποκαταστάτες, όπως αυτή προκύπτει από τα φάσματα Raman, δεν επιτρέπει κατηγορηματικές απαντήσεις.

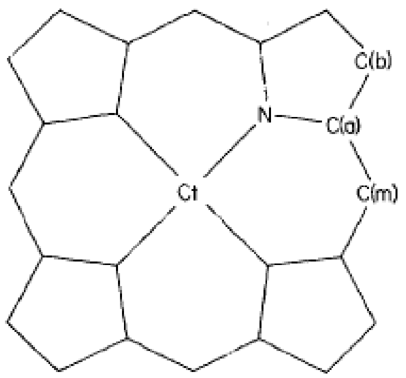
Τα φάσματα Raman των τριών κύριων πολυαμινών που εξετάστηκαν δε φάνηκε να επηρεάζουν την ευκρίνεια των φασμάτων Raman των χλωροφυλλών μιας και δεν εμφανίζουν κορυφές στη σημαντική περιοχή (1500-1600cm^{-1}) για την εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς την κατάσταση συναρμογής των χλωροφυλλών. Η δυσκολία να συλλέξουμε φάσματα για αυτές έγκειται στο ότι αυτά μοιάζουν πολύ με το φάσμα της αιθανόλης (Εικ. 2.2). Στην εικόνα 3.21 παρουσιάζεται το φάσμα της ελεύθερης βάσης σπερμίνης σε αιθανόλη όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές στους 3295cm^{-1} που αντιστοιχεί στις εκτός φάσης δονήσεις έκτασης του δεσμού N-H και τις δύο εντονότερες ζώνες του φάσματός της στους 2917cm^{-1} και 2861cm^{-1} που αντιστοιχούν σε δονήσεις του δεσμού CH_2 (Amorim de Costa et al., 2003).



Εικόνα 3.21 Φάσμα Raman της ελεύθερης βάσης σπερμίνης. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 473nm, η ένταση του λέιζερ 100%, ο χρόνος έκθεσης του δείγματος 1sec, ο αριθμός των εκθέσεων 2 ενώ το φάσμα πάρθηκε με 10x φακό.

3.1.3.3 Αλληλεπίδραση της χλωροφυλλίνης με τις πολυαμίνες μέσω φασματοσκοπίας Raman

Η περιοχή 1300-1700cm^{-1} του φάσματος συντονισμού Raman των μεταλλοπορφυρινών περιέχει τις εντός επιπέδου δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου όπως ήδη προαναφέρθηκε και μας δίνει πληροφορία για την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του δακτυλίου, τη διαμόρφωση spin, το μέγεθος του πυρήνα του μορίου και τον αριθμό συναρμογής του κεντρικού ατόμου μετάλλου. Στην ενότητα αυτή, θα προσεγγίσουμε τα δεδομένα που καταγράψαμε με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης που έγινε για παράγωγα Fe-octaethylporphyrin ή Fe(OEP) (Ozaki et al., 1986). Η ισχυρότερη γραμμή που παρουσιάζεται στο φάσμα στους 1360-1375cm^{-1} όταν η διέγερση πραγματοποιείται στη Soret περιοχή, αποδίδεται στην πλήρως συμμετρική C_aN διαμόρφωση έκτασης (ν_4, p) της μεταλλοπορφυρίνης. Αυτή η ζώνη έχει αναφερθεί ως δείκτης της κατάστασης οξείδωσης για αιμοπρωτεΐνες (Yamamoto et al., 1973) ή ερμηνεύεται ως η αντανάκλαση του απεντοπισμού των π ηλεκτρονίων (Spiro and Strekas, 1974, Kitigawa et al., 1975). Μεταβολές της οξειδωτικής κατάστασης του κεντρικού ατόμου μετάλλου του δακτυλίου προκαλούν σημαντική μετατόπιση της συχνότητας που εμφανίζεται η ν_4 εξαιτίας της ισχυρής αλληλεπίδρασης των τροχιακών της πορφυρίνης και του μετάλλου.



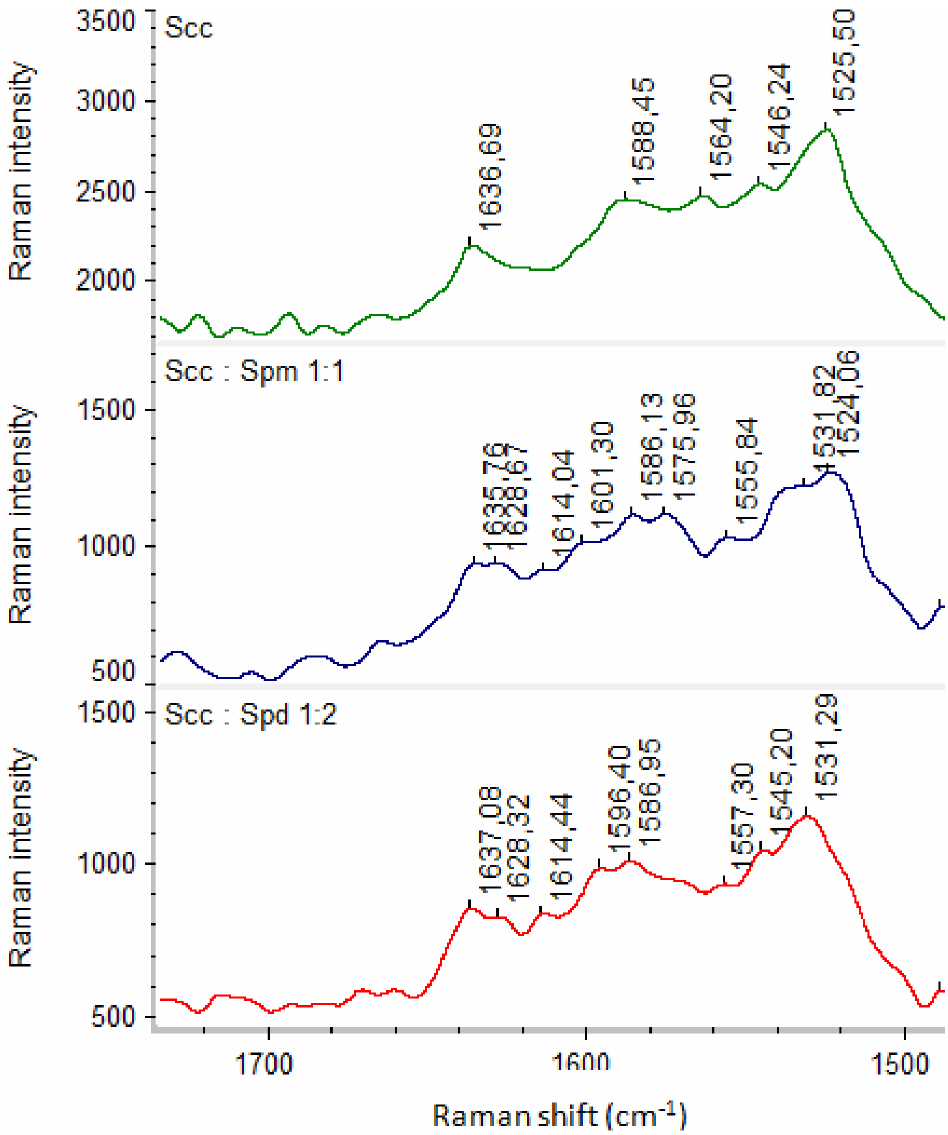
Η υψηλότερης συχνότητας γενικά γραμμή προκύπτει από την εκτός επιπέδου C_aC_m διαμόρφωση έκτασης (ν_{10}, dp) και η εντός επιπέδου συμμετοχή της όσον αφορά τον C_4 άξονα δίνει μια κάθετη κορυφή στους 1550-1600cm^{-1} (ν_{19}, ap). Η συγκεκριμένη κορυφή λόγω της ευθύγραμμης σχέσης που παρουσιάζουν οι ν_{19} συχνότητες με τις Ct-N αποστάσεις θεωρείται πως αντιπροσωπεύει το μέγεθος του πυρήνα του μορίου (Felton et al., 1974, Spaulding et al., 1975, Spiro et al., 1979, Choi et al., 1982, Ozaki et al., 1986). Η απόλυτα συμμετρική C_aC_m διαμόρφωση έκτασης εμφανίζεται γύρω στους 1475-1510cm^{-1} (ν_3, p). Η δεύτερη υψηλότερη σε συχνότητα πολωμένη κορυφή γύρω στους 1575-1595cm^{-1} σχετίζεται κυρίως με τις εντός επιπέδου C_bC_b διαμορφώσεις έκτασης (ν_2, p) και η εκτός επιπέδου συμμετοχή σχετικά με τον C_4 άξονα δίνει τη δεύτερη υψηλότερης συχνότητας dp κορυφή γύρω στα 1545-1570cm^{-1} (ν_{11}, dp). Η συχνότητα ν_{10} μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση του αριθμού συναρμογής του κεντρικού ατόμου μετάλλου και συγκεκριμένα δίνονται οι περιοχές των 1615-1625cm^{-1} και 1627-1630cm^{-1} για τα six- και five-coordinate σύμπλοκα σιδηροπορφυρινών αντίστοιχα (Spiro et al., 1979, Teraoka and Kitagawa, 1980).

Οι συχνότητες των δονήσεων που περιγράφηκαν παραπάνω εξαρτώνται από το είδος του κεντρικού μετάλλου που συντονίζεται. Αυτό παρατηρήθηκε όταν σε κάποια μελέτη αναλύθηκαν τα φάσματα Raman των Co, Ni, Cu, και Zn(OEP) και οι συχνότητες ν_2,ν_3,ν_{10},ν_{11} και ν_{19} αποδόθηκαν σε συνάρτηση με την ενέργεια μετάβασης (transition) της ζώνης Q_y (Kitagawa et al., 1979). Αυτό που διαφάνηκε είναι ότι η απορρόφηση ηλεκτρονίων αντανακλά την αύξηση του πυρήνα στην ηλεκτρονιακή θεμελιώδη κατάσταση και όχι κάποια αλλαγή στη διεγερμένη κατάσταση. Η εξάρτηση από το μέταλλο των φασμάτων Raman υποκατεστημένων με μέταλλο χλωροφυλλών εξετάστηκε από τους Fujiwara and Tasumi (1986) οι οποίοι παρατήρησαν ευθύγραμμους συσχετισμούς μεταξύ των συχνοτήτων Raman και των Ct-N αποστάσεων. Έτσι, συμπεραίνουμε ότι όσο πιο ισχυρός ο δεσμός $M\text{-}N_{pyrr}$, τόσο μικρότερη η Ct-N απόσταση και υψηλότερες οι συχνότητες έκτασης του δακτυλίου. Έτσι, οι αντίστοιχες με τις παραπάνω συχνότητες των δονήσεων για το μόριο της χλωροφυλλίνης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Δόνηση	Δεσμός	Αναμενόμενη ζώνη (cm^{-1})	Παρατηρούμενη ζώνη (cm^{-1})
ν_{10}	C_aC_m	1638	1636,69
ν_{37}	C_aC_m	1632	1622
ν_{19}	C_aC_m	1596	
ν_2	C_bC_b	1590	1588,45
ν_{11}	C_bC_b	1560	1564,2
ν_{38}	C_bC_b	1553	1546,24
ν_3	C_aC_m C_aN	1502	1525,5
ν_4	C_aN C_bC_b	1373	1372,34
ν_{12}	C_aN C_bC_b	1359	1363,52

Πίνακας 3.1. Οι συχνότητες των δονήσεων των δεσμών του μορίου της χλωροφυλλίνης σύμφωνα με τους Hildebrandt and Spiro (1988) και οι αντίστοιχες που προέκυψαν από τις δικές μας μετρήσεις.

Η μεταχείριση της χλωροφυλλίνης με σπερμίνη σε αναλογία 1:1 και με σπερμιδίνη 1:2 προκάλεσε τη μείωση της έντασης των κορυφών και το σχάσιμο των ν_2, ν_3 και ν_{10} ζωνών (εικόνα 3.22). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μείωση της έντασης της κορυφής στους 1636cm^{-1} και η εμφάνιση δύο νέων ίδιας έντασης κορυφών στους 1628cm^{-1} και 1614cm^{-1} που σύμφωνα με τα όσα προαναφέρθηκαν πιθανότατα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι προέκυψε κάποια αλλαγή της κατάστασης συναρμογής του κεντρικού ατόμου Cu του μορίου. Μια δεύτερη αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι η εμφάνιση της ν_{19} συχνότητας (που απουσιάζει από τα φάσμα της χλωροφυλλίνης) στους 1601cm^{-1} για τη σπερμίνη και στους 1596cm^{-1} για τη σπερμιδίνη. Η παρατήρηση αυτή που αφορά σε δόνηση του ίδιου δεσμού, συνηγορεί υπέρ της υπόθεσης που διατυπώσαμε προηγουμένως περί αλλαγής της κατάστασης συναρμογής. Κατά παρόμοιο τρόπο φαίνεται να επηρεάζονται και οι δεσμοί C_bC_b του μορίου. Η πουτρεσίνη δεν ήταν ικανή να προκαλέσει παρόμοιες αλλαγές στο φάσμα της χλωροφυλλίνης υποδηλώνοντας ότι οι πρωτοταγείς αμινομάδες δεν είναι αρκετές για την αλληλεπίδραση (δεν παρατίθενται δεδομένα). Αυτό συνηγορεί υπέρ της δημιουργίας δεσμού με τις ίμινο ομάδες των σπερμιδίνη ή/και σπερμίνη.



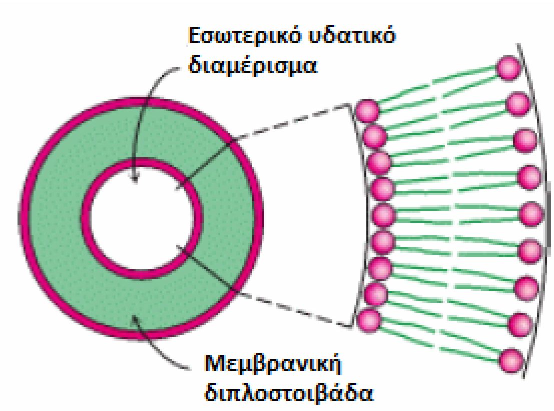
Εικόνα 3.22. Φάσματα Raman 5,5x10^{-4}M χλωροφυλλίνης σε απιονισμένο νερό πριν (επάνω) και μετά τη μεταχείριση με 5,5x10^{-4}M σπερμίνης (μέση) και 11x10^{-4}M σπερμιδίνης (κάτω). Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 473nm, η ένταση του λέιζερ 100%, ο χρόνος έκθεσης του δείγματος 3,5sec, ο αριθμός των εκθέσεων 2 ενώ το φάσμα πάρθηκε με 50x φακό.

3.2 Προσομοίωση θυλακοειδών με τη χρήση/κατασκευή λιποσωμάτων με ενσωματωμένο LHC II

Ο λόγος που επιλέξαμε να ασχοληθούμε με λιποσώματα είναι για να μελετήσουμε τη λειτουργία του LHC II σε ένα μοντέλο μεμβρανικού συστήματος, σε αντιστοιχία αυτού της μεμβράνης των θυλακοειδών στην οποία συναντάται *in vivo*. Όπως αναπτύχθηκε στην εισαγωγή, το LHC II είναι απαραίτητο σε πολλές διαδικασίες, κρίσιμες τόσο για τη φωτοχημεία, όσο και για τη μη-φωτοχημεία. Γνωρίζουμε επίσης ότι το LHC II είναι ο τόπος όπου λαμβάνει χώρα ο μηχανισμός NPQ καθώς και ότι η διαδικασία διάχυσης της ενέργειας πυροδοτείται από την ύπαρξη ΔpH/Δψ μεταξύ στρώματος και μικροχώρου. Εύλογα λοιπόν τίθεται το εξής ερώτημα: Μπορεί το LHC II να λειτουργήσει σαν κανάλι μεταφοράς ιόντων; Αν κάτι τέτοιο όντως συμβαίνει, όπως εξάλλου έχει αποδειχτεί (Iwaszko et al., 2004), τότε το μοντέλο λειτουργίας του μηχανισμού NPQ θα μπορούσε να εμπλουτιστεί και να στηθεί σε νέες βάσεις. Ένα δεύτερο ερώτημα που τίθεται σαν συνέχεια του πρώτου αφορά το ρόλο των πολυαμινών και αν αυτές μπορούν να αλλάξουν τις ιδιότητες του καναλιού-LHC II.

3.2.1 Επιλογή κατάλληλων λιποσωμάτων

Τα λιπίδια εμφανίζουν αμφίφιλο χαρακτήρα καθώς αποτελούνται από ένα τμήμα που διαλύεται σε πολικούς διαλύτες και ένα δεύτερο που διαλύεται σε μη πολικούς διαλύτες. Η ιδιότητά τους αυτή προάγει την αυθόρμητη συνάθροισή τους σε ποικίλες μικροδομές όταν αυτά βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον. Το σχήμα και το μέγεθος των διαφορετικών μικροδομών που σχηματίζονται εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη γεωμετρία των λιπιδίων. Μια τέτοια μικροδομή αποτελούν τα λιποσώματα. Πρόκειται για σφαιρικά κυστίδια που αποτελούνται από λιπιδικές διπλοστοιβάδες που περιβάλλουν-εγκλωβίζουν υδατικό διάλυμα στο εσωτερικό τους. Στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, οι υδρόφοβες ουρές των λιπιδίων προσανατολίζονται προς το εσωτερικό της μεμβράνης, ενώ οι υδρόφιλες κεφαλές προς το υδατικό περιβάλλον στο εσωτερικό και εξωτερικό της μεμβράνης (Εικ. 3.23).



Εικόνα 3.23. Διάγραμμα ενός λιπιδικού κυστιδίου.

Τα λιποσώματα μπορεί να αποτελούνται από μία μόνο λιπιδική διπλοστοιβάδα που περιβάλλει τον υδατικό πυρήνα (unilamellar) ή από μερικές διπλοστοιβάδες που περιβάλλουν ομοκεντρικά τον υδατικό πυρήνα (multilamellar). Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα με το μέγεθος και το σχήμα τους, τα λιποσώματα μπορούν να διαχωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες (New, 1990):

i. Κυστίδια που αποτελούνται από περισσότερες από μία λιπιδική διπλοστοιβάδα (multilamellar vesicles ή **MLVs**). Το μέγεθός τους μπορεί να κυμαίνεται από 100 έως 1000nm.
ii. Μικρά κυστίδια μίας λιπιδικής διπλοστοιβάδας (small unilamellar vesicles ή **SUVs**). Το μέγεθός τους είναι το μικρότερο δυνατό και κυμαίνεται από 15 έως 25nm.
iii. Μεγάλα κυστίδια μίας λιπιδικής διπλοστοιβάδας (large unilamellar vesicles ή **LUVs**). Το μέγεθός τους είναι της τάξης των 1000nm.
iv. Ενδιάμεσου μεγέθους κυστίδια μίας λιπιδικής διπλοστοιβάδας (intermediate unilamellar vesicles ή **IUVs**). Το μέγεθός τους είναι της τάξης των 100nm.

Το πρωτόκολλο παρασκευής των λιποσωμάτων καθορίζει αν θα προκύψουν ομογενή ή ετερογενή εναιωρήματα λιποσωμάτων και ανάλογα με την ενδεχόμενη εφαρμογή τους επιλέγεται η καταλληλότερη μέθοδος παρασκευής τους. Για την ενσωμάτωση λιποδιαλυτών συστατικών στη μεμβράνη των λιποσωμάτων οποιοσδήποτε από τους παραπάνω τύπους λιποσωμάτων είναι κατάλληλος, αφού το μέγιστο ποσό του συστατικού που ενσωματώνεται στη μεμβράνη εξαρτάται από την ποιότητα των συστατικών της μεμβράνης και όχι από το μέγεθος των λιποσωμάτων. Για υδατοδιαλυτά συστατικά, όπου ο αρχικός στόχος είναι να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή αναλογία παγιδευμένου όγκου : λιπιδίων, ενδείκνυνται μεγάλου ή ενδιαμέσου μεγέθους κυστίδια μιας λιπιδικής διπλοστοιβάδας (LUVs και IUVs). Ωστόσο, ένα μειονέκτημα των LUVs αποτελεί η μηχανική αδυναμία της μοναδικής τους μεμβράνης η οποία, λόγω του μεγάλου μεγέθους της, μπορεί εύκολα να σπάσει χάνοντας μέρος των παγιδευμένων συστατικών της, λειτουργώντας έτσι ως ασθενής φραγμός για τη ροή των υδατοδιαλυτών συστατικών (New, 1990).

3.2.2 Σχεδιάζοντας την πρόσδεση απομονωμένου λειτουργικού LHC II στα λιποσώματα

Σε αρκετές περιπτώσεις, η ενσωμάτωση του LHC II σε βιομοριακές λιπιδικές μεμβράνες αποδεικνύεται ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη των λειτουργιών αυτού του συμπλόκου χρωστικών/πρωτεϊνών. Τόσο μικρά λιποσώματα με μία λιπιδική διπλοστοιβάδα, όσο και μεγάλα λιποσώματα με περισσότερες της μιας διπλοστιβάδες μπορούν να εφαρμοστούν ως μοντέλα λιπιδικών διπλοστοιβάδων καθώς είναι εύχρηστα και μπορούν εύκολα να παρασκευαστούν. Η επιλογή ανάμεσα στα παραπάνω εξαρτάται από τη φύση του επιστημονικού προβλήματος που τίθεται προς εξέταση. Για παράδειγμα, οι επιδράσεις των λιπιδίων στις φασματοσκοπικές ιδιότητες των προσδεμένων στο LHC II φωτοσυνθετικών χρωστικών μπορεί να μελετηθεί καλύτερα με χρήση λιποσωμάτων με περισσότερες της μιας λιπιδικές διπλοστοιβάδες (Gruszecki et al., 1994). Αν όμως το ζητούμενο είναι η μελέτη της επίδρασης του LHC II στη μεταφορά ιόντων διαμέσου λιπιδικών μεμβρανών, τότε επιβάλλεται η χρήση κυστιδίων με μια λιπιδική διπλοστοιβάδα (Wardak et al., 2000). Στην περίπτωση αυτή, μπορούν να χρησιμοποιηθούν χρωστικές ευαίσθητες στα ιόντα ή φθορισμομετρικοί δείκτες που παγιδεύονται στο εσωτερικό των λιποσωμάτων και επιτρέπουν την παρακολούθηση της μεταφοράς των ιόντων διαμέσου της μεμβράνης.

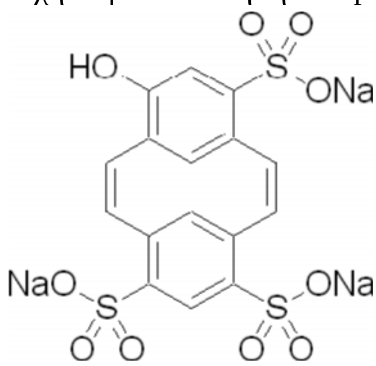
Το μεμβρανικό σύστημα που εμείς επιθυμούμε να έχουμε πρέπει λοιπόν να αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα, να είναι ενδιάμεσου μεγέθους, να περικλείει έναν αξιόπιστο δείκτη των αλλαγών του pH στο εσωτερικό του και να διατηρεί καλά ενσωματωμένο το απομονωμένο LHC II στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Για να επιτευχθούν όλα τα παραπάνω απαιτείται ένας συνδυασμός τεχνικών οι οποίες πρέπει να επιλεχθούν με βάση τη διαθεσιμότητα τους και να εφαρμοστούν με τη σωστή σειρά, βασιζόμενοι σε ήδη υπάρχουσες μεθόδους και πρωτόκολλα παρασκευής τέτοιων λιπιδικών συστημάτων. Ένα τέτοιο πρωτόκολλο, που αποτέλεσε τη βάση και την αφετηρία της προσπάθειάς μας (Gruszecki, 2004) είναι το παρακάτω:

1. Λιποσώματα που περιέχουν ενσωματωμένο LHC II προετοιμάζονται σε συγκέντρωση λιπιδίων σε διάλυμα που κυμαίνεται από 1 mg/mL έως 10 mg/mL.
2. Μια λεπτή ταινία λιπιδίων σχηματίζεται στη βάση της γυάλινης φιάλης μετά την εξάτμιση του διαλύτη (χλωροφόρμιο ή αιθανόλη) στον οποίο βρίσκονται αρχικά τα λιπίδια με αέριο άζωτο.
3. Η λιπιδική ταινία κρατείται υπό τη μειωμένη πίεση (λιγότερο από 1/105 bar) του αερίου αζώτου τουλάχιστον για 30 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν όλα τα πιθανά υπολείμματα του οργανικού διαλύτη.
4. Η φιάλη συμπληρώνεται με τον απαιτούμενο όγκο διαλύματος και μετά από ανάδευση τα λιποσώματα σχηματίζονται είτε με έκθεση του διαλύματος σε υπερήχους για 5 λεπτά είτε με εξώθησή του από φίλτρο πολυανθρακικού εστέρα γνωστής διαμέτρου πόρων.
5. Το εναιώρημα των λιποσωμάτων αναμιγνύεται στη συνέχεια με αυτό του LHC II στο ίδιο διάλυμα.
6. Το μείγμα αναδεύεται έντονα (vortex) για 5 λεπτά και έπειτα υπόκειται σε μικρούς παλμούς υπερήχων (5 φορές για 3 δευτερόλεπτα).
7. Το διάλυμα των λιποσωμάτων φυγοκεντρείται για 3 λεπτά στα 15000 x g ώστε να απομακρυνθούν τα συσσωματώματα του LHC II στην υδατική φάση που δεν έχουν ενσωματωθεί στα λιποσώματα.
8. Μια ένδειξη της αναλογίας ενσωμάτωσης μπορεί να παρθεί μέσω ανάλυσης της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών a και b στο διάλυμα των λιποσωμάτων γνωστής συγκέντρωσης λιπιδίων.

3.2.3 Παρακολούθηση πρωτονιοκινητικής δύναμης στα λιποσώματα

Στην παρούσα εργασία επιλέχτηκε η φθορισμομετρική παρακολούθηση του pH στο εσωτερικό των λιποσωμάτων, τα οποία περικλείουν μικρό όγκο υδατικού διαλύματος, μέσω κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Η επιλογή αυτή έγκειται στο ότι η φασματοσκοπία φθορισμού παρέχει μεγάλη ευαισθησία και επιλεκτικότητα, χαμηλά όρια ανίχνευσης, μικρή σχετικά επίδραση από παρεμποδίζουσες ουσίες και μεγαλύτερο γραμμικό εύρος της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου. Παράλληλα, η εισαγωγή ενός φθορισμομετρικού δείκτη, που είναι ευαίσθητος σε αλλαγές του pH, στο εσωτερικό των λιποσωμάτων επιτρέπει την άμεση παρακολούθηση της μεταφοράς των πρωτονίων σε ένα μόλις βήμα.

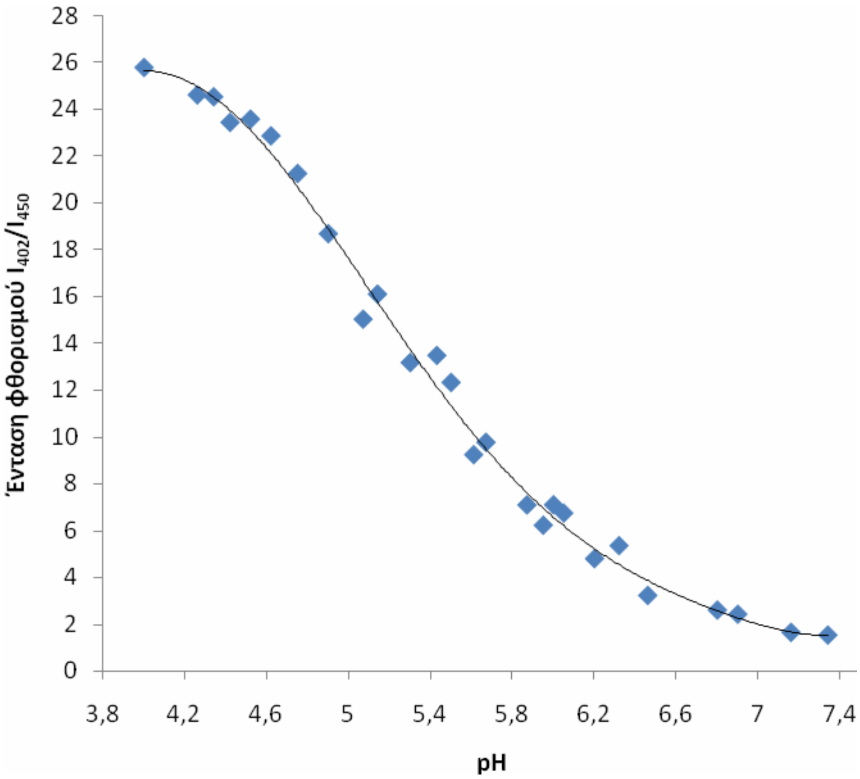
Μετά από εκτενή πειραματική και βιβλιογραφική έρευνα φάνηκε ότι η πυρανίνη (8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt ή PTS) (Εικ. 3.24) πληροί όλες τις προϋποθέσεις ώστε να επιλεγεί για τα συγκεκριμένα πειράματα (Kano and Fendler, 1978; Clement and Gould, 1981; Biegel and Gould, 1981; Oliver and Deamer, 1994; Iwaszko et al., 2004). Είναι ένας φθορισμομετρικός δείκτης ευαίσθητος σε αλλαγές του pH και χρήσιμος για τη συνεχή παρακολούθηση του pH στο εσωτερικό των λιποσωμάτων. Έχει pk_a=7,3 και μήκος κύματος εκπομπής φθορισμού τα 511nm, μακριά από την περιοχή εκπομπής φθορισμού του LHC II. Το φάσμα απορρόφησής της περιλαμβάνει δύο κορυφές μία στα 402nm που αντιστοιχεί στην πρωτονιομένη μορφή της και μία στα 450nm που αντιστοιχεί στη μη-πρωτονιομένη μορφή της. Έτσι, παρατηρώντας το λόγο της έντασης του φθορισμού I_{402}/I_{450} μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την κατάσταση της χρωστικής όπως αυτή διαμορφώνεται κάθε φορά από την αλλαγή του pH. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της πυρανίνης είναι ότι δεν αλληλεπιδρά με τις μεμβράνες λόγω του πολυανιονικού της χαρακτήρα και είναι αρκετά ευδιάλυτη στο νερό (Zignani et al., 2000, New, 1990). Τα λιποσώματα δημιουργούνται παρουσία της πυρανίνης ενώ η απομάκρυνση της ελεύθερης πυρανίνης, που δεν έχει εγκλωβιστεί στα λιποσώματα, απομακρύνεται σε μεγάλο βαθμό με χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή. Επιπλέον, η διαρροή είναι ελάχιστη ενώ τα χαρακτηριστικά της χρωστικής μέσα στα λιποσώματα δεν αλλοιώνονται πολύ σε σχέση με αυτά της ελεύθερης χρωστικής.



Εικόνα 3.24. Η μοριακή δομή της πυρανίνης

Για την παρακολούθηση της μεταφοράς πρωτονίων διαμέσου των λιποσωμάτων με φασματοσκοπία φθορισμού, η εκπομπή της πυρανίνης ανιχνεύτηκε στα 511nm και η διέγερσή της καταγράφηκε στα 402nm και 450nm (στα κύρια μέγιστα του φάσματος διέγερσής της που αντιστοιχούν στη πρωτονιωμένη και μη-πρωτονιωμένη μορφή της). Για την καταγραφή της κινητικής των αλλαγών του επιπέδου του pH στο εσωτερικό των λιποσωμάτων μετά την οξίνιση του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε ο λόγος Ex402nm(Em511nm)/Ex450nm(Em511nm). Για να αποφευχθεί η πιθανή δημιουργία ηλεκτροστατικού φραγμού κατά τη διακίνηση των πρωτονίων στο εσωτερικό των λιποσωμάτων 2μl αιθανολικού διαλύματος Βαλινομυκίνης (ενός μεταφορέα ιόντων K^+) προστέθηκε μετά την εκκίνηση της καταγραφής ώστε η τελική συγκέντρωση της Βαλινομυκίνης στο διάλυμα να είναι 75μΜ. Η διαβάθμιση πρωτονίων προκλήθηκε με την ένθεση στο διάλυμα 10μl 0,1M HCl 1min μετά την προσθήκη της Βαλινομυκίνης.

Μετρώντας τη μείωση του σήματος της μη πρωτονιωμένης κορυφής και την αντίστοιχη ενίσχυση του σήματος της πρωτονιωμένης κορυφής της πυρανίνης και σε συνδυασμό με μια σταθερή καμπύλη τιτλοδότησης του φθορισμού ως προς το pH, μπορούμε εύκολα να συμπεράνουμε την τιμή του pH στο εσωτερικό των λιποσωμάτων ανά πάσα στιγμή. Η pH-μετρική τιτλοδότηση του δείκτη κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να προσδιοριστεί και το εύρος του pH στο οποίο λειτουργεί βέλτιστα ο βιοαισθητήρας μας. Όπως φαίνεται από την εικόνα 3.25 ο λόγος της έντασης του φθορισμού I_{402}/I_{450} αυξάνεται γραμμικά με τη μείωση του pH στο εύρος 4,5-6,0. Έτσι επιλέγεται η τιμή pH 6,7 ως η καταλληλότερη για το διάλυμα των λιποσωμάτων μας ώστε να εξασφαλιστεί η υψηλότερη δυνατή ευαισθησία και το μεγαλύτερο εύρος απόκρισης για την ανίχνευση των μεταβολών του pH. Για την κατασκευή της συγκεκριμένης καμπύλης επιλέχτηκε συγκέντρωση πυρανίνης 0,25μM η οποία πλησιάζει κατά πολύ τις τιμές φθορισμού της χρωστικής στο εσωτερικό των λιποσωμάτων.



Εικόνα 3.25. Πεχαμετρική καμπύλη τιτλοδότησης του δείκτη πυρανίνη. Ο λόγος I_{402}/I_{450} αυξάνεται με τη μείωση του pH.

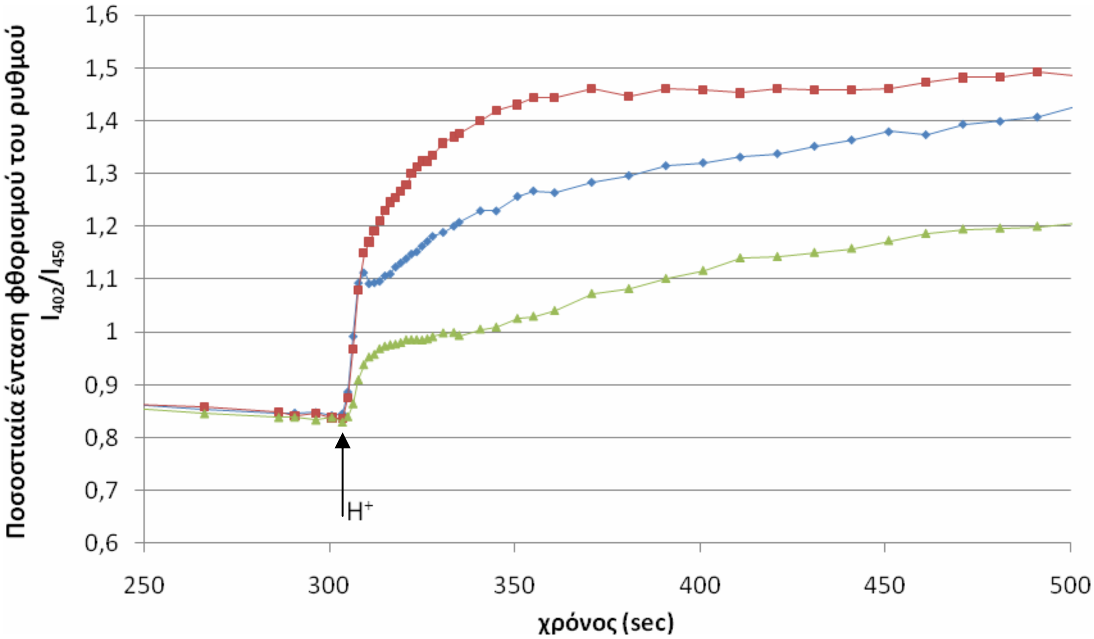
3.2.4 Επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου απομόνωσης του LHC II με κριτήριο τη λειτουργικότητά του σε λιποσώματα

Στην προσπάθειά μας να έχουμε ένα εύχρηστο και λειτουργικό LHC II για την καλύτερη ενσωμάτωσή του στη λιπιδική διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων, δοκιμάσαμε δύο διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PS-II. Αρχικά η απομόνωση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Akoyonoglou και Thomou (1981) όπως τροποποιήθηκε από τη Navakoudi (2003). Η συγκεκριμένη μέθοδος περιλαμβάνει υπερφυγοκέντριση θυλακοειδών μεμβρανών σε συνεχή κλίση σακχαρόζης (5-22%). Το κλάσματα που συλλέγονται μετά τη διαδικασία και περιέχουν τα μονομερή και τα ολιγομερή μέρη του LHC II δεν αποτελούν το καταλληλότερο υλικό για την ενσωμάτωση του LHC II στα λιποσώματα καθώς βρίσκονται σε τέτοιες συνθήκες που ευνοούν το σχηματισμό μικκυλίων. Αντίθετα η χρήση της μεθόδου Krupa (1987), με την οποία η απομόνωση του LHC II γίνεται με κατακρήμνιση με άλατα K^+ και Mg^{2+} (αναλυτικά η μέθοδος περιγράφεται στην ενότητα 2.4). Το απομονωμένο LHC II αποτελείται κυρίως από τριμερή LHC II και μπορεί εύκολα να ξεπλυθεί με νερό για την απομάκρυνση του απορρυπαντικού και να επαναδιαλυθεί στο επιθυμητό διάλυμα.

Με βάση υπάρχουσες ερευνητικές προσεγγίσεις καταλήξαμε σε συγκέντρωση λιπιδίων 2,5mg/ml και συγκέντρωση LHC II 0,25mg/ml, έτσι ώστε η μοριακή αναλογία χλωροφύλλης : λιπιδίων (που αφορούν το LHC II και τα λιποσώματα) να είναι 1 : 10 (Zhou et al., 2009). Η αρχική συγκέντρωση της πυρανίνης επιλέχτηκε στα $5{,}5x10^{-4}$M ενώ δοκιμάστηκαν τόσο το ρυθμιστικό διάλυμα Tricine-NaOH pH 7,3, 0,1M KCl όσο και διάλυμα 0,1M KCl χωρίς ρυθμιστικό pH (Wardak et al., 2000; Iwaszko et al., 2004). Το δεύτερο επιλέχτηκε ως το πιο εύχρηστο κατά τις αλλαγές του pH, αλλά και επειδή διαφαίνεται αλληλεπίδραση των Tris και Tricine με τις χλωροφύλλες που ανταγωνίζονται ελαφρώς τη δράση των πολυαμινών (Tsiavos, diploma thesis, 2007).

Ένα από τα βασικά ζητούμενα είναι η παρασκευή λιποσωμάτων με μία λιπιδική διπλοστοιβάδα ώστε να είναι κατάλληλα για την παρακολούθηση της μεταφοράς ιόντων. Ο καλύτερος τρόπος για την παρασκευή τέτοιων λιποσωμάτων και μάλιστα ενδιαμέσου μεγέθους όπως αυτά που επιθυμούμε, είναι με τη χρήση κάποιας μεμβράνης πολυανθρακικού εστέρα με πόρους διαμέτρου 100nm. Σύμφωνα με τους Iwaszko et al (2004) αυτό το στάδιο πρέπει να γίνει αφού έχει ενσωματωθεί το LHC II στα λιποσώματα. Ωστόσο, στην πράξη, τα συσσωματώματα του ελεύθερου LHC II που δεν έχουν ενσωματωθεί στα λιποσώματα καθιστούν αδύνατον κάτι τέτοιο. Τη λύση στο πρόβλημα αυτό θα έδινε σύμφωνα με το προαναφερθέν πρωτόκολλο μια φυγοκέντριση στα 15000 x g. Τα συσσωματώματα όμως δημιουργούν μια κοινή πελέτα με τα λιποσώματα αντί να μένουν στην υδατική φάση όπως αναφέρεται. Η έκθεση του δείγματος σε υπερήχους χρησιμεύει εναλλακτικά της χρήσης πολυανθρακικού εστέρα. Η εφαρμογή της στη συγκεκριμένη περίπτωση οδήγησε σε παρασκευή multilamellar λιποσωμάτων που είχε ως αποτέλεσμα τη μεγάλη διακύμανση ανάμεσα στις μετρήσεις (Εικ. 3.26). Επομένως, κατά τη διαδικασία που ακολουθήσαμε, προηγείται η δημιουργία λιποσωμάτων μιας λιπιδικής διπλοστοιβάδας διαμέτρου 100nm και ακολουθεί η ενσωμάτωση του LHC II με έντονη ανάδευση του μίγματος.

Στη συνέχεια κρίθηκε σκόπιμο να ακολουθηθεί διαδοχική ψύξη και τήξη του διαλύματος τοποθετώντας το για 5s σε υγρό άζωτο (-195^{o}C) και στη συνέχεια αφήνοντάς το να ξεπαγώσει αργά στους 4^{o}C. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές. Κατά την ψύξη του διαλύματος η μεμβράνη των σχηματιζόμενων λιποσωμάτων σπάει σε ορισμένα σημεία λόγω της διόγκωσης του νερού στο εσωτερικό τους ενώ κατά τη διαδικασία της τήξης η μεμβράνη των λιποσωμάτων επανασχηματίζεται. Με τη διαδοχική ψύξη και τήξη του μείγματος επιτυγχάνεται η βέλτιστη ενσωμάτωση του LHC II στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Το μείγμα στη συνέχεια εκτίθεται σε υπερήχους για 5min στους 4°C ώστε να διατηρηθεί ένας ομοιογενής σε μέγεθος και μορφή πληθυσμός λιποσωμάτων (Moya et al., 2001; Zhou et al., 2009).



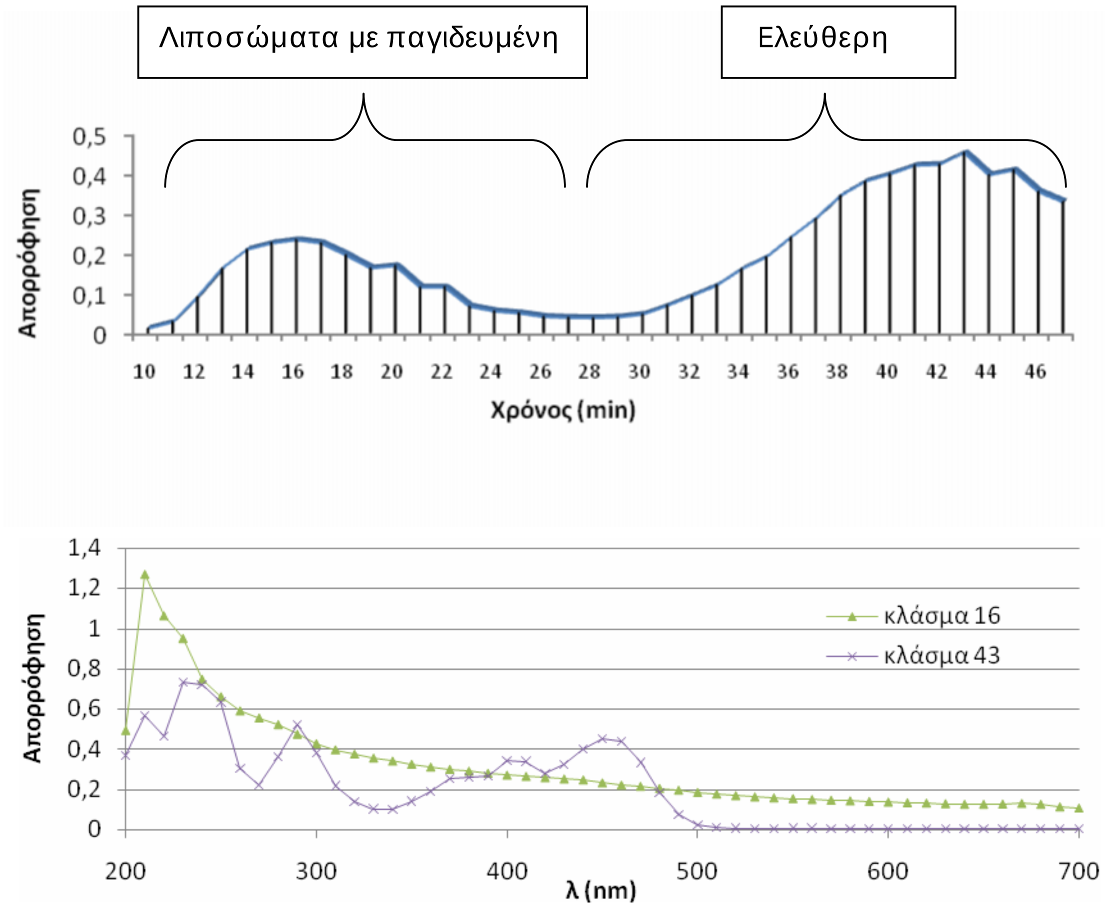
Εικόνα 3.26. Μετρήσεις κινητικής πρωτονίων διαμέσου λιποσωμάτων. Το διάγραμμα απεικονίζει τρεις διαφορετικές επαναλήψεις για λιποσώματα που παρασκευάστηκαν με τον ίδιο τρόπο σε 0,1M KCl. Η βαλινομυκίνη προστέθηκε στα 150s και το HCl στα 300s, όπως υποδεικνύεται στο διάγραμμα με το βέλος. Το μήκος κύματος εκπομπής του φθορισμού ήταν 511nm, το παράθυρο διέγερσης ήταν 2,5nm, το παράθυρο εκπομπής ήταν 5nm και η σάρωση του φάσματος είχε ταχύτητα 500nm min^{-1}. Η μεγάλη διακύμανσηείναι ενδεικτική της ύπαρξης μεγάλης ετερογένειας στο δείγμα. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανόν στην ύπαρξη λιποσωμάτων με περισσότερες της μιας διπλοστοιβάδες.

3.2.5 Απομάκρυνση της ελεύθερης χρωστικής από το διάλυμα των λιποσωμάτων

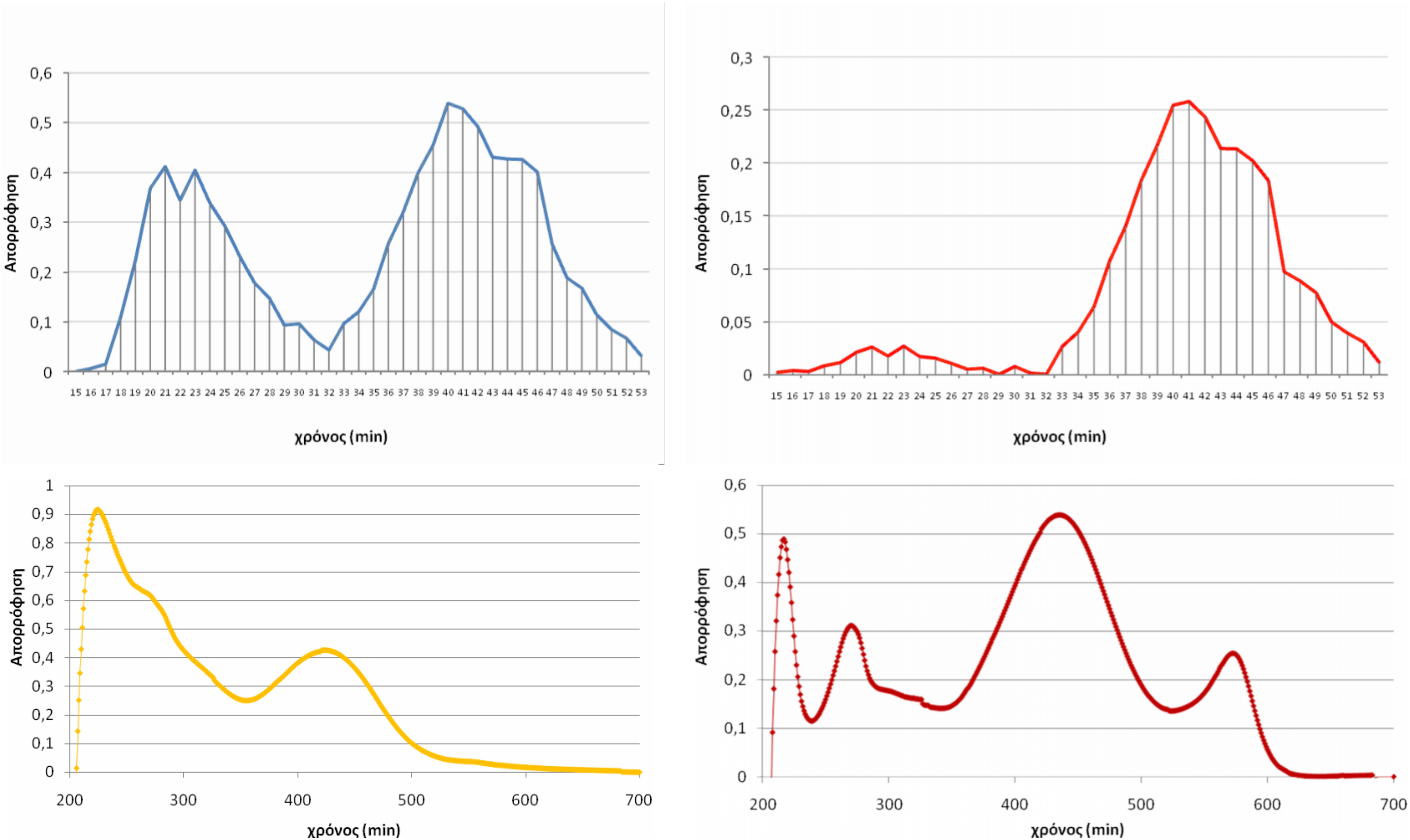
Ο διαχωρισμός του μη παγιδευμένου υλικού στο εσωτερικό των λιποσωμάτων από τα λιποσώματα με αυτό στο εσωτερικό τους επιτυγχάνεται είτε με διάλυση (dialysis), είτε με χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή (gel filtration column chromatography). είτε με φυγοκέντρηση. Για τα πειράματα της παρούσας μελέτης επιλέχτηκε το υλικό Sephadex G-100 που είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υλικό σε τέτοιου είδους διαχωρισμούς και το καταλληλότερο για το διαχωρισμό των IUVs (New, 1990; Iwaszko et al., 2004). Πράγματι, τόσο η χρωστική πυρανίνη, όσο και τα σύμπλοκα LHC II που δεν εισήχθησαν/ενσωματώθηκαν στα λιποσώματα και παρέμειναν ελεύθερα στο διάλυμα, διαχωρίστηκαν και απομακρύνθηκαν με χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή (Sephadex G-100). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ίδιας σύστασης και pH με αυτό στο εσωτερικό των λιποσωμάτων.

Από τα UV-Vis φάσματα των κλασμάτων ανιχνεύτηκε η σύστασή τους και παρατηρήθηκε ότι τα κλάσματα που περιείχαν την ελεύθερη χρωστική συλλέγονταν περίπου 15-20min αργότερα από αυτά που περιείχαν τα λιποσώματα. Στην εικόνα

3.27 παρουσιάζεται η απορρόφηση των κλασμάτων (ένα κλάσμα ανά λεπτό) στην περιοχή των 450nm όπου απορροφά έντονα η πυρανίνη. Παρατηρούνται δύο κορυφές στην κινητική αυτή, η μία γύρω στα 16min και η άλλη γύρω στα 43min. Η ερμηνεία που δίνεται είναι ότι τα λιποσώματα με την ενσωματωμένη χρωστική στο εσωτερικό τους απελευθερώνονται από τη στήλη στο διάστημα μεταξύ 10-25min ενώ η ελεύθερη χρωστική στο διάστημα μεταξύ 30-55min. Σε συμφωνία με τα παραπάνω παρατίθενται δύο χαρακτηριστικά φάσματα για τις δύο αυτές περιπτώσεις, το ένα αντιστοιχεί στο 16^{o} κλάσμα όπου η κορυφή στα 210nm είναι χαρακτηριστική της απορρόφησης των λιποσωμάτων και το δεύτερο στο 43^{o} κλάσμα όπου και διαγράφεται το χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης της χρωστικής (Εικ. 3.27). Προς επιβεβαίωση της παραπάνω ερμηνείας, εξετάστηκε και μια δεύτερη χρωστική, η Cresol Red (CR), η οποία είναι ιδανική για μετρήσεις απορρόφησης και εμφανίζει μέγιστα στα 436nm και 573nm που αντιστοιχούν στη πρωτονιωμένη και μη-πρωτονιωμένη μορφή της αντίστοιχα. Η απορρόφηση των κλασμάτων στις περιοχές αυτές καθώς και τα χαρακτηριστικά φάσματα των δύο διακριτών πληθυσμών λιποσωμάτων (που στην περίπτωση της CR είναι ορατοί με γυμνό μάτι) παρουσιάζονται στην εικόνα 3.28.



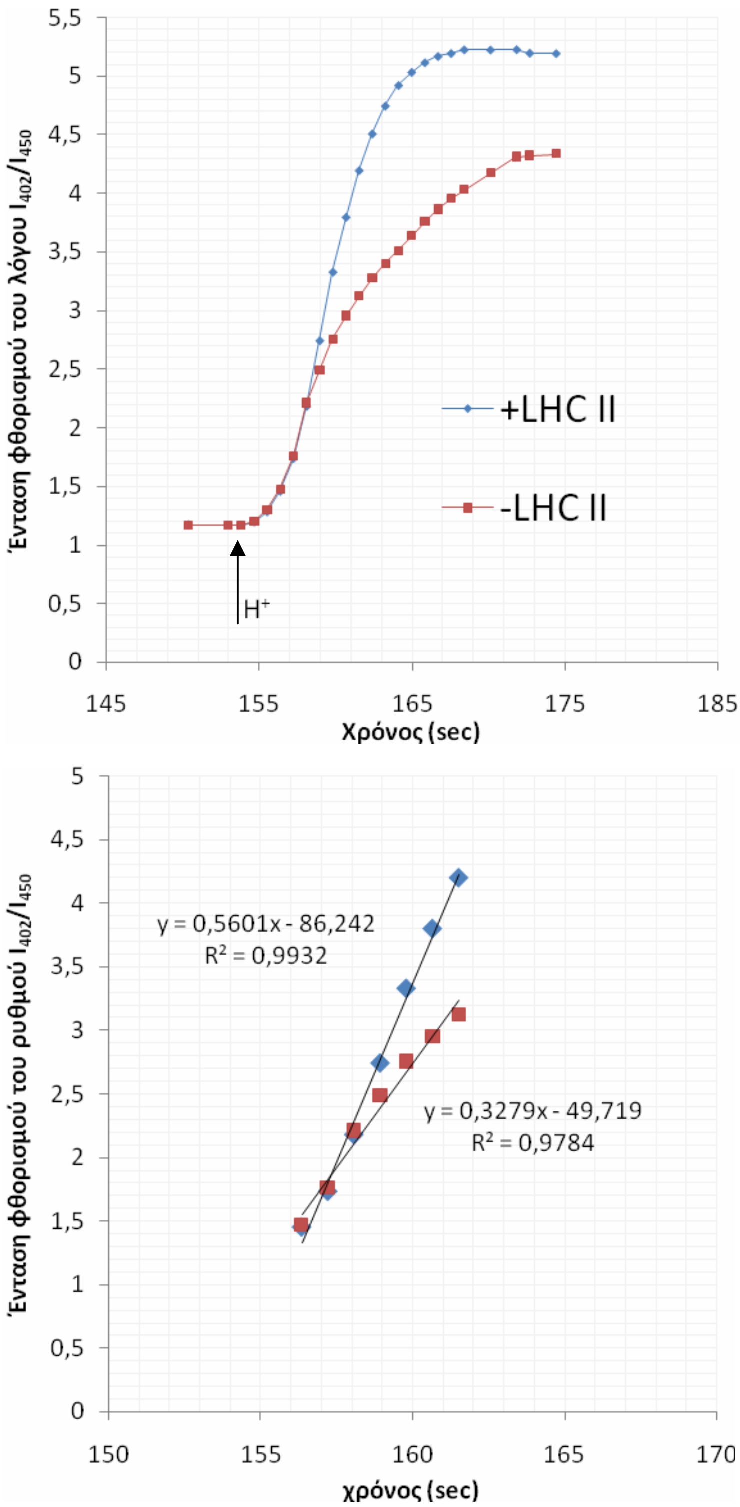
Εικόνα 3.27. Το σήμα απορρόφησης των κλασμάτων στα 450nm (επάνω) παρουσιάζει δύο ξεκάθαρες περιόδους έκλουσης των πληθυσμών των λιποσωμάτων και της ελεύθερης χρωστικής. Παρατίθενται επίσης δύο εκ των παραπάνω φασμάτων, ένα για κάθε πληθυσμό (κάτω).



Εικόνα 3.28. Το σήμα απορρόφησης των κλασμάτων στα 436nm (επάνω αριστερά) και στα 573nm (επάνω δεξιά) παρουσιάζει δύο ξεκάθαρες περιόδους έκλουσης των πληθυσμών των λιποσωμάτων και της ελεύθερης CR. Παρατίθενται επίσης δύο εκ των παραπάνω φασμάτων απορρόφησης στα 436nm, που αφορούν σε πληθυσμό λιποσωμάτων με ενσωματωμένη CR (κάτω αριστερά) και σε πληθυσμό ελεύθερης CR (κάτω δεξιά).

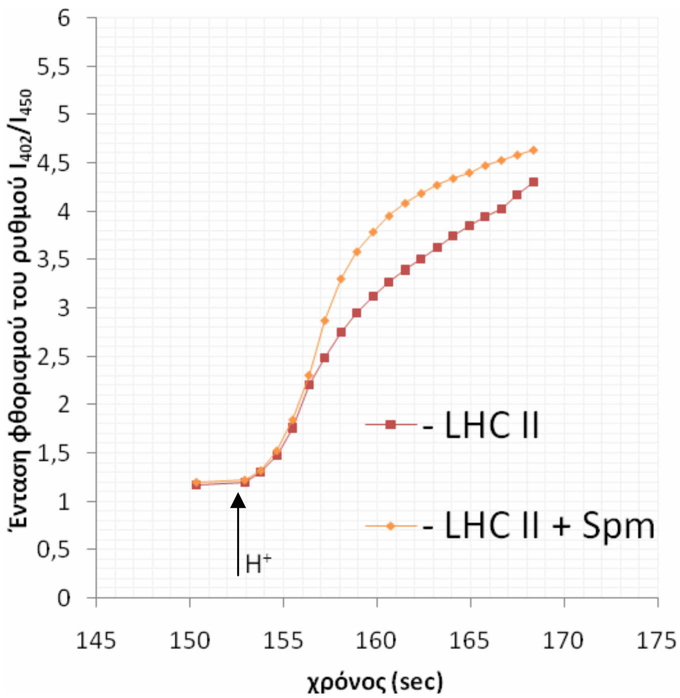
3.2.6 Μετρήσεις αγωγιμότητας των λιποσωμάτων σε πρωτόνια

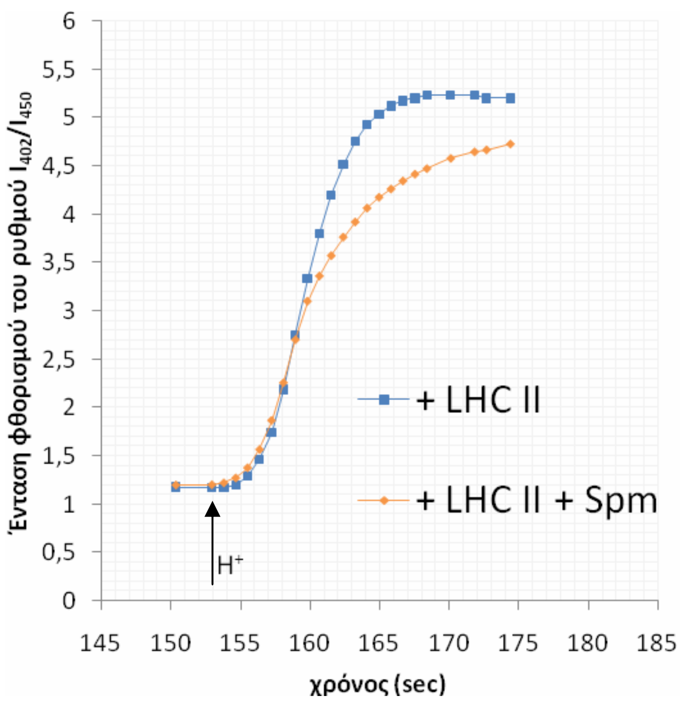
Από τις μετρήσεις κινητικής που παρουσιάζονται στην εικόνα 3.29 παρατηρείται μια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των μεμβρανών που φέρουν ενσωματωμένο LHC II και αυτών που δεν το περιέχουν. Φαίνεται πως το LHC II αυξάνει τη διαπερατότητα των λιποσωμάτων, όπως προκύπτει από τη γρηγορότερη και μεγαλύτερη μείωση του pH στο εσωτερικό τους. Αυτό αναδεικνύεται καλύτερα συγκρίνοντας τις κλίσεις των ευθειών που προκύπτουν από τα σημεία του χρονικού διαστήματος 156s-161s οπότε και λαμβάνει χώρα η γρήγορη φάση του φαινομένου προτού επέλθει ο κορεσμός. Η κλίση της ευθείας των λιποσωμάτων χωρίς ενσωματωμένο LHC II είναι 0,3279 ενώ αυτή των λιποσωμάτων με ενσωματωμένο LHC II είναι 0,5601 (Εικ. 3.29).



Εικόνα 3.29 Μετρήσεις κινητικής πρωτονίων διαμέσου λιποσωμάτων μιας λιπιδικής διπλοστοιβάδας και λιποσωμάτων μιας λιπιδικής διπλοστοιβάδας με ενσωματωμένο LHC II. Απεικονίζεται η κινητική των πρωτονίων από την είσοδό τους στο διάλυμα (153s) έως το πέρας της διαδικασίας (175s) (επάνω) και οι κλίσεις των ευθειών που προκύπτουν από τα σημεία που αντιστοιχούν στη γρήγορη φάση του φαινομένου (κάτω). Το μήκος κύματος εκπομπής του φθορισμού ήταν 511nm, το παράθυρο διέγερσης ήταν 2,5nm, το παράθυρο εκπομπής ήταν 5nm και η σάρωση του φάσματος είχε ταχύτητα 500nm min^{-1}.

Τα αντίστοιχα πειράματα έγιναν και με την παρουσία 0,1mM σπερμίνης κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες (βλ. υπόμνημα εικ. 3.29). Η Spm φαίνεται να έχει μικρή επίδραση στην μετακίνηση των πρωτονίων σε λιποσώματα που δεν είχαν ενσωματωμένο LHC II (Εικ. 3.30). Αντίθετα, η Spm φαίνεται να προκαλεί μικρή καθυστέρηση στη διακίνηση των πρωτονίων διαμέσου του LHC II (Εικ. 3.30). Τα παραπάνω πειράματα επαναλήφθηκαν πολλές φορές. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, οι μετρήσεις εμφάνιζαν μεγάλη διακύμανση, από παρασκεύασμα σε παρασκεύασμα ακόμα και για το μάρτυρα. Η μεγάλη διακύμανση μεταξύ των δεδομένων αγωγιμότητας δε μπορεί να οδηγήσει σε κατηγορηματικά συμπεράσματα για το ρόλο των πολυαμινών στη διαδικασία αυτή, για αυτό και παρατίθενται ελάχιστα δεδομένα. Ένας σημαντικός παράγοντας μείωσης της επαναληψιμότητας πιθανότατα είναι η ύπαρξη multilamellar λιποσωμάτων στο παρασκεύασμα, καθώς και η ευαισθησία του απομονωμένου LHC II. Η αντιμετώπιση των φαινομένων αυτών απαίτησε πολλαπλές προσπάθειες δοκιμής και λάθους και τα δεδομένα από τα υψηλότερης ποιότητας παρασκευάσματα παρατίθενται στις εικόνες 3.29 και 3.30.





Εικόνα 3.30. Μετρήσεις κινητικής πρωτονίων διαμέσου IUVs (επάνω) και IUVs με ενσωματωμένο LHC II (κάτω) με και χωρίς μεταχείριση με 0,1mM Spm Το μήκος κύματος εκπομπής του φθορισμού ήταν 511nm, το παράθυρο διέγερσης ήταν 2,5nm, το παράθυρο εκπομπής ήταν 5nm και η σάρωση του φάσματος είχε ταχύτητα 500nm min^{-1}.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Αλληλεπίδραση χλωροφυλλών – πολυαμινών. Ένα πιθανό πρότυπο NPQ κέντρο στο LHC II

Η διεξοδική μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης της φωτοσυνθετικής διαδικασίας από πολυαμίνες έδειξε διακριτούς ρόλους για την πουτρεσίνη σε σχέση με τις άλλες δύο πολυαμίνες, οι οποίοι επιβεβαιώθηκαν από *in vitro* μελέτες. Πιο αναλυτικά, η αύξηση της πουτρεσίνης προκαλεί αναστολή της ενεργοποίησης του NPQ και ταυτόχρονα παράταση του χρόνου αποφόρτισης της μεμβράνης του θυλακοειδούς. Αντίθετα, οι Spd και Spm προκαλούν επαγωγή του NPQ ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς φωτοπροστασίας ακόμα και σε χαμηλής έντασης φωτισμό (Ioannidis and Kotzabasis, 2007). Αξιοσημείωτο είναι πως σε γενετικά τροποποιημένα φυτά που ο τίτλος των προσδεμένων στα θυλακοειδή πολυαμινών είναι αυξημένος, το qE υπερλειτουργεί (Ioannidis et al., 2009). Γνωρίζουμε ότι ενώ η παρουσία καμίας Lhcb πρωτεϊνης από μόνη της δεν αποτελεί προϋπόθεση για το qE, κάθε μια από αυτές παίζει ένα ρόλο στη διαμόρφωση της μακροδομής του PS-II για τον ευνοϊκότερο συνδυασμό του LHC-II και της φωτοπροστασίας (Horton et al., 2008). Μελέτες με μεταλλάγματα χωρίς Chl b στα οποία το μέγεθος της κεραίας του PS-II ήταν δραματικά μειωμένο, έδειξαν ισχυρή μείωση της ικανότητάς τους να επάγουν το μηχανισμό NPQ (Hartel et al., 1996; Gilmore et al., 2000). Η κατάλληλη διάταξη του PS-II και η στοίβαξη των θυλακοειδών μεμβρανών αποτελούν μεγίστης σημασίας παράγοντες για τη μέγιστη λειτουργικότητα του NPQ (Johnson et al., 2008).

Ο μοριακός/βιοχημικός μηχανισμός δράσης των πολυαμινών φαίνεται να είναι πολύπλοκος και πολυεπίπεδος. Στο επίπεδο της αρχιτεκτονικής των μεμβρανών φαίνεται ότι μπορεί να οφείλεται έως και το 50% του συνολικού NPQ. Με δεδομένο ότι οι πολυαμίνες μπορούν να αυξήσουν το βαθμό στοίβαξης των θυλακοειδών (grana stacking) ένα σημαντικό μέρος του ολικού NPQ που επάγουν οι πολυαμίνες πιθανότατα έχει προέλευση τη στοίβαξη. Σε ένα δεύτερο επίπεδο οι πολυαμίνες είναι δυνατόν να αλλάζουν τη στερεοδιαμόρφωση και αρχιτεκτονική της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PS-II. Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες σε απομονωμένη κεραία η Spm μπορεί να αποσβέσει έως 30% του φθορισμού της χλωροφύλλης a λόγω του ολιγομερισμού των πρωτεϊνών (Ioannidis PhD thesis, 2006). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αναδεικνύουν ξεκάθαρα πως οι πολυαμίνες (κυρίως η Spm και η Spd σε μικρότερο βαθμό) αλληλεπιδρούν με τις χλωροφύλλες μέσω κάποιας εκ των αμινομάδων τους που προσδένεται στο κεντρικό άτομο Mg του μορίου των χλωροφυλλών δημιουργώντας τον 5^{o} και 6^{o} δεσμό συναρμογής του. Τα *in vitro* δεδομένα για πρώτη φορά διεθνώς αναδεικνύουν την δυνατότητα η ενεργειακή διαχείριση των φωτονίων που προσπίπτουν στην χλωροφύλλη να μπορεί σε μεγάλο βαθμό να καθορίζεται (τόσο η απορρόφηση όσο και η εκπομπή φωτονίων) από το βαθμό συναρμογής του κεντρικού Mg. Κάτι παρόμοιο θα μπορούσε να ισχύει *in vivo* εντός της φωτοσυλλεκτικής κεραίας LHC-II. Επίσης η χαρακτηριστική ΔA_{535} κατά την επαγωγή του NPQ θα μπορούσε να σχετίζεται με τις ιδιότητες της χλωροφύλλης και να μην αντανακλά απαραιτήτως τη δημιουργία ζεαξανθίνης όπως παλαιότερα είχε προταθεί.

4.1.1 Η αλλαγή της κατάστασης συναρμογής του κεντρικού ατόμου Mg ως αποτέλεσμα του δεσμού του με κάποια αμινομάδα

Στις χλωροφύλλες που είναι συνδεδεμένες στις πρωτεΐνες του LHC-II, το κεντρικό άτομο Mg παρουσιάζει σχεδόν αποκλειστικά συναρμογή αριθμού πέντε (Oba and Tamiaki, 2002; Balaban et al., 2002). Ο πέμπτος αξονικός προσδέτης μπορεί να είναι κάποιο πρωτεϊνικό κατάλοιπο (His, Asp/Glu, Asn/Gln, για παράδειγμα) ή ένα μόριο νερού. Το νερό θα μπορούσε να αποτελεί ένα σημαντικό σταθεροποιητικό παράγοντα στα ζεύγη χλωροφυλλών P700 και P680 σύμφωνα με τα κλασικά μοντέλα (Katz and Norris, 1973; Shipman et al., 1976). Η δημιουργία του έκτου δεσμού συναρμογής *in vivo* φαίνεται να εμποδίζεται καθώς δεν υπάρχουν ξεκάθαρα στοιχεία που να αποδεικνύουν κάτι τέτοιο, αν και υπάρχουν ορισμένες ενδείξεις (Hughes et al., 2006). Αυτό είναι ένα ενδιαφέρον ερώτημα μιας και το ιόν Mg^{2+} τείνει να προσδένει και δεύτερο αξονικό προσδέτη για παράδειγμα σε υδατικά διαλύματα (Skipper et al., 1989; Bock et al., 1994; Kiriukhin and Collins, 2002).

Η δημιουργία του πέμπτου και του έκτου δεσμού συναρμογής στα μόρια των χλωροφυλλών σε διάλυμα είναι καλά τεκμηριωμένη και έχει διερευνηθεί με ποικίλες πειραματικές τεχνικές (Houssier and Sauer, 1970; Evans and Katz, 1975; Cotton and Duyne, 1981; Fujiwara and Tasumi, 1986; Lutz and Braket, 1988; Sato et al., 1995; Umetsu et al., 1999; Pascal et al., 2000; Kania and Fiedor, 2006; Fiedor at al., 2008). Έτσι, γνωρίζουμε ότι σε διαλύτες όπως ο διαιθυλαιθέρας και η ακετόνη οι χλωροφύλλες εμφανίζουν αριθμό συναρμογής πέντε ενώ σε άλλους διαλύτες, όπως η πυριδίνη και το τετραϋδροφουράνιο (THF) εμφανίζουν αριθμό συναρμογής έξι. Ακολούθως, εκτενής έρευνα έχει γίνει πάνω στην αλληλεπίδραση μονομερών χλωροφυλλών σε υδατικά διαλύματα (Agostiano et al., 2002). Στην περίπτωση αυτή ο αριθμός συναρμογής του κεντρικού ατόμου μετάλλου των μορίων παίζει σημαντικό ρόλο, αφού η δημιουργία συσσωματωμάτων προκύπτει από αλληλεπιδράσεις μονομερών που συνδέονται μεταξύ τους με μόρια νερού.

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι η μορφή του φάσματος απορρόφησης μορίων πορφυρινικού τύπου τείνει να εξαρτάται από τον αριθμό συναρμογής και τον τύπο του δεσμού που δημιουργεί το κεντρικό άτομο Mg του χλωρινικού δακτυλίου (Evans and Katz, 1975; Krawczyk, 1989). Μια από τις συχνότερες φασματικές αλλαγές που παρατηρείται κατά τη μετάβαση από την κατάσταση του μορίου με αριθμό συναρμογής «πέντε» σε αυτή με αριθμό συναρμογής «έξι» είναι η βαθυχρωμική μετατόπιση της Qx μετάβασης πιο κοντά στην Qy θέση (Evans and Katz, 1975). Γενικά, ισχυροί πυρηνόφιλοι διαλύτες (Renge and Avarmaa, 1985), χαμηλές θερμοκρασίες (Ellervee et al., 2004) και υψηλές πιέσεις (Ellervee and Freiberg, 2008) ευνοούν το σχηματισμό του έκτου δεσμού συναρμογής στο μόριο της χλωροφύλλης.

Πρώτοι, οι Evans and Katz, το 1975, συνέδεσαν την εμφάνιση του μέγιστου απορρόφησης στα 633nm με την ένδειξη για έκτο δεσμό συναρμογής στο μόριο της χλωροφύλλης a. Παρατήρησαν ότι η μετατροπή της χλωροφύλλης a που προσδένει ένα μόριο πυριδίνης και έχει ως εκ τούτου αριθμό συναρμογής «5» σε αυτήν την κατάσταση που προσδένει δύο μόρια πυριδίνης και έχει αριθμό συναρμογής «6» αντανακλάται στο φάσμα απορρόφησης με τη μείωση της απορρόφησης στα 619nm και την αύξηση στα 633nm. Σύμφωνα με τους Fragata et al. (1988) οι καλά σχηματισμένες κορυφές στα 640nm της χλωροφύλλης a με αριθμό συναρμογής «6» σε διάλυμα πυριδίνης αντιπροσωπεύει τις Qx ηλεκτρονιακές μεταβάσεις, ενώ οι πιο αδύναμες κορυφές στα 618nm σχετίζονται με την Qy(1,0). Στα συστήματα με αριθμό συναρμογής «5» πιστεύεται ότι οι δύο αυτές καταστάσεις επικαλύπτονται δίνοντας μια μοναδική ευρεία κορυφή γύρω στα 615nm.

Το κεντρικό άτομο Mg της χλωροφύλλης σε διάλυμα αιθανόλης έχει αριθμό συναρμογής «5» (Cotton et al., 1974; Fujiwara and Tasumi, 1986; Krawczyk, 1989), δηλαδή το Mg προσδένει ένα μόριο διαλύτη ως αξονικό προσδέτη. Από τις παρατηρούμενες αλλαγές στις Qx και Qy περιοχές του φάσματος απορρόφησης, συμπεραίνουμε ότι η σπερμίνη (και λιγότερο οι άλλες πολυαμίνες) αποτελεί έναν πολύ δραστικό χηλικό παράγοντα του κεντρικού ιόντος Mg, ικανό να υποκαταστήσει τα μόρια αιθανόλης στην αξονική θέση. Με βάση τις παραπάνω μελέτες τα δεδομένα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι η σπερμίνη δημιουργεί τον έκτο δεσμό συναρμογής στο μόριο της χλωροφύλλης, όπως αποκαλύπτει η παρουσία του νέου μέγιστου γύρω στα 640nm και η μείωση του σήματος στα 615nm για τη χλωροφύλλη a (εικόνα 3.5). Για πρώτη φορά αναδεικνύεται η αντίστοιχη συσχέτιση της απορρόφησης της χλωροφύλλης b στην περιοχή αυτή με το σχηματισμό του έκτου δεσμού συναρμογής του κεντρικού ατόμου Mg της (εικόνα 3.6). Μάλιστα στην περίπτωση της Chl b παρατηρούνται οι μεγαλύτερες αλλαγές στη στερεοδιάταξη του μορίου της από τις μεταχειρίσεις με σπερμίνη όπως προκύπτει από τις δραματικές αλλαγές του φάσματος απορρόφησής της. Από τα φάσματα απορρόφησης για τη Pheo a γίνεται σαφές ότι η απουσία κάποιου μέγιστου στην περιοχή των 640nm οφείλεται στην απουσία του κεντρικού ατόμου Mg (Εικ. 3.8). Πιθανώς ο τρόπος αλληλεπίδρασης των πολυαμινών με τη φαιοφυτίνη να γίνεται με τη συμμετοχή κάποιου περιφερειακού υποκαταστάτη της που λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων.

Αυτή είναι ίσως και η πρώτη αναφορά για ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ πολυαμινών και χλωροφυλλίνης. Ωστόσο, παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει από μελέτες αλληλεπίδρασης των πολυαμινών με τη χρωστική Cibacron blue F3GA (Subramanian, 1982). Η αλληλεπίδραση αυτή είναι εδώ ιοντική αφού η εξουδετέρωση των θετικών φορτίων των αμινομάδων ελαχιστοποιεί τη διαφοροποίηση και η ικανότητα πρόσδεσής των πολυαμινών στη χρωστική μειώνεται με τη σειρά spm>spd>put. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη αυτή έδειξε ότι για τη σπερμίνη, το σήμα του φάσματος του συμπλόκου spm / Cibacron blue F3GA εξαρτάται από την κατάσταση του φορτίου μιας ιμινομάδας της με $pK_a = 8.2$.

Αν παρατηρήσουμε ξανά την εικόνα 3.11 θα προσέξουμε ότι η επίδραση της σπερμίνης στη μείωση του σήματος της B κορυφής της χλωροφυλλίνης είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της σπερμιδίνης με τη διαφορά ότι σε αναλογία συγκέντρωσης Spm:Scc μεγαλύτερη του 3:1 επέρχεται κορεσμός. Για το σύμπλοκο Spd:Scc δεν φαίνεται να επέρχεται κορεσμός ακόμα και σε αναλογία συγκέντρωσης Spd:Scc 5:1. Ένα πιθανό μοντέλο της αλληλεπίδρασης θα μπορούσε να περιλαμβάνει την πρόσδεση στη χρωστική των δύο ιμινομάδων και της μίας εκ των δύο τελικών αμινομάδων της σπερμίνης. Αυτό θα προκαλούσε αποτελεσματική κατανομή φορτίου και θα μπορούσε να οδηγήσει στον κορεσμό του συμπλόκου. Έτσι, η ασθενέστερη αλληλεπίδραση της σπερμιδίνης καθώς και η απουσία κορεσμού του συμπλόκου Spd:Scc εξηγείται από την έλλειψη μιας τελικής ομάδας $–(CH_2)_3$-NH_3.

Είναι πιθανό τα αποτελέσματα από τη φασματοσκοπία απορρόφησης να επηρεάζονται ως ένα βαθμό από φαινόμενα σκέδασης. Ωστόσο, αν και δε μπορούμε να εξαλείψουμε το φαινόμενο, προσπαθήσαμε να το ελαχιστοποιήσαμε χρησιμοποιώντας κατάλληλους διαλύτες και συγκεντρώσεις χρωστικών κάτω από το όριο της διαλυτότητας ώστε να μην ευνοείται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων. Πέρα από αυτό, φαινόμενα σκέδασης που τυχόν προκύπτουν από την ύπαρξη συσσωματωμάτων θα οδηγούσαν σε αλλαγές της έντασης της απορρόφησης και όχι σε μετατοπίσεις των μέγιστων απορρόφησης (Cotton et al., 1974).

Τα παραπάνω αποτελέσματα από τη φασματοσκοπία απορρόφησης των χλωροφυλλών έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των μετρήσεων φθορισμού (εικόνα 3.15). Η επίδραση των πολυαμινών στην εκπομπή φθορισμού της Chl a ακολουθεί την ισχύ Spm > Spd > Put κατά την απόσβεση του σήματος στα 672nm. Το ενδιαφέρον μας όμως εστιάζεται ιδιαίτερα στην περίπτωση της Chl b όπου πέρα από τη μετατόπιση του μέγιστου, παρατηρείται αύξηση του φθορισμού, που στην περίπτωση της Spm είναι δραματική.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης αποτελεί έναν πολύ ευαίσθητο δείκτη της επιπεδότητας της πορφυρίνης (Senge, 1992; Gentemann et al., 1997), οι επιδράσεις των διαλυτών στο χρόνο ζωής της διεγερμένης κατάστασης S_1 μπορεί να αιτιολογηθεί λογικά υποθέτοντας ότι δύο κύριοι παράγοντες επιδρούν στη χαλάρωση του χαμηλότερου ενεργειακού επιπέδου της χρωστικής: (i) δεσμοί υδρογόνου και (ii) αλλαγές στη διαμόρφωση των μορίων που προκύπτουν από την εκάστοτε κατάσταση συναρμογής. Οι χρόνοι ζωής των διεγερμένων καταστάσεων των χλωροφυλλών είναι μεγαλύτεροι σε διαλύτες ισχυρούς ως προς την ικανότητά τους να δημιουργούν τον έκτο δεσμό συναρμογής με το κεντρικό άτομο Mg. Αυτό, φαίνεται να συμβαίνει λόγω της επαναφοράς του κεντρικού ατόμου Mg μέσα στο επίπεδο του δακτυλίου και την επιστροφή του μορίου σε επίπεδη διαμόρφωση (Callahan and Cotton, 1987). Πράγματι, απουσία του κεντρικού ατόμου Mg, παρατηρείται μια ασθενής επίδραση του διαλύτη στο χρόνο ζωής της διεγερμένης κατάστασης του μορίου (η περίπτωση της φαιοφυτίνης).

Καθώς μεταβαίνουμε από την κατάσταση με αριθμό συναρμογής πέντε σε αυτή με αριθμό συναρμογής έξι, το άτομο Mg εισέρχεται στο επίπεδο του δακτυλίου, Οι Mg-X αποστάσεις αυξάνονται και οι αντίστοιχες τάξεις των δεσμών μειώνονται. Από αντίστοιχα πειράματα με πυριδίνη (υποκαταστάτης με μία αμινομάδα) έχει προταθεί ότι η πρόσδεση του δεύτερου αξονικού προσδέτη είναι εξώεργη αντίδραση και ο παράγοντας-κλειδί είναι η υψηλή τιμή της ενέργειας διασποράς (Ben Fredj et al., 2009). Καθώς τα αποτελέσματα των πειραμάτων μεταχείρισης με σπερμίνη μοιάζουν πολύ με τα αντίστοιχα πειράματα μεταχείρισης με πυριδίνη σε ότι αφορά τη δημιουργία του έκτου δεσμού συναρμογής, μπορούν να αποδοθούν με τη μορφή των παρακάτω αντιδράσεων:

MgChl + Spm $\longleftrightarrow$ Mg-Spm (1-Spm)

MgChl-Spm + Spm $\longleftrightarrow$ Mg-$(Spm)_2$ (2-Spm)

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις μπορούν να ερμηνευτούν με το απλό μοντέλο τεσσάρων τροχιακών, υποθέτοντας ότι το Qy επίπεδο καθορίζεται από το ενεργειακό κενό ανάμεσα στα a_{1u} (HOMO) και e_{gx} (LUMO) μοριακά τροχιακά. Η ενέργεια του τελευταίου σχετίζεται άμεσα από την κατάσταση συντονισμού του κεντρικού ατόμου επειδή ένα μέρος της ηλεκτρονιακής του πυκνότητας κατανέμεται σε δύο άτομα αζώτου του πυρρολικού δακτυλίου. Στην κατάσταση αριθμού συναρμογής «έξι», μια ισχυρή αλληλεπίδραση με το εντός επιπέδου κεντρικό άτομο μετάλλου αυξάνει την ενέργειά του (υψιχρωμική μετατόπιση) ενώ μια βαθυχρωμική μετατόπιση της Qy μετάβασης συμβαίνει όταν επικρατεί κατάσταση αριθμού συναρμογής «πέντε», καθώς η εκτός επιπέδου θέση του κεντρικού ατόμου Mg φέρνει το e_{gx} επίπεδο πιο κοντά στο a_{1u}. Γενικά, όσο πιο αδύναμος ο προσδέτης, τόσο πιο βαθυχρωμικά μετατοπισμένη είναι η Qy μετάβαση.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα από τη φασματοσκοπία απορρόφησης αποκαλύπτουν τη δημιουργία του 6^{ου} δεσμού συναρμογής του κεντρικού ατόμου Mg. Σε αυτό συνηγορούν και τα αποτελέσματα από τη φασματοσκοπία φθορισμού, όπου είναι εμφανές ότι η πρόσδεση κάποιας αμινομάδας στο κεντρικό άτομο Mg, «τραβάει» το Mg έξω από το επίπεδο του χλωρινικού δακτυλίου της Chl b και ο φθορισμός αυξάνεται. Τα παραπάνω τεκμηριώνονται περεταίρω με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας Raman που δείχνουν ξεκάθαρα την αλλαγή της κατάστασης συναρμογής. Η πληροφορία που δεν κατέστη δυνατό να καταγραφεί αφορά στη συμμετοχή ή όχι κάποιων εκ των περιφερειακών υποκαταστατών του μορίου της χλωροφύλλης κατά την πρόσδεση.

Ωστόσο, ένδειξη ότι ο τρόπος πρόσδεσης της Spm διαφέρει από αυτόν των υπόλοιπων πολυαμινών και της μονοαμίνης που εξετάστηκε, αποτελεί τη σχάση της αρνητικής κορυφής στα 660nm που προκύπτει από τα φάσματα διαφοράς της απορρόφησης της Chl a πριν και μετά τη μεταχείριση με Spm (Εικ. 3.7). Κάτι αντίστοιχο απουσιάζει από τα φάσματα διαφοράς οποιασδήποτε άλλης μεταχείρισης. Έτσι, υποθέτουμε ότι οι 3-αμινο-1-προπανόλη, Put και Spd προσδένονται στο κεντρικό άτομο Mg με μια αμινομάδα τους, με τον ίδιο τρόπο που προσδένεται στο Mg κάποιο μόριο πολικού διαλύτη ή το H_2O. Μάλιστα, είναι πιθανό κάποια μόρια από αυτά να προσφέρουν ηλεκτρόνια σε δύο άτομα Mg ταυτόχρονα συνδέοντας μονομερή μόρια χλωροφυλλών σε διμερή ή και σε μεγαλύτερες δομές συσσωματωμάτων. Αντίθετα, η πρόσδεση της Spm στο Mg ενδεχομένως να περιλαμβάνει τις δύο ιμινομάδες της, ενώ οι δύο εξωτερικές αμινομάδες του μορίου της μπορεί να προσδένονται σε κάποιους από τους περιφερειακούς υποκαταστάτες της χλωροφύλλης.

4.1.2 Η πρόσδεση της πολυαμίνης στο χλωρινικό δακτύλιο θα μπορούσε να συνδέεται με τη ΔA_{535} του qE

Κατά την επαγωγή της φωτοπροστασίας *in vivo* ο σχηματισμός του qE σχετίζεται γραμμικά με μια αύξηση του σήματος απορρόφησης στα 535nm (ΔA_{535}). Το NPQ (qE) φαίνεται να αντιστοιχεί σε κάποια αλλαγή της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PS II που οδηγεί στην απόσβεση της ενέργειας (Heber et al., 1969; Bilger and Bjorkman 1990; Ruban et al., 1993a; Bilger and Bjorkman, 1994; Ruban et al., 2002b). Η αλλαγή αυτής της διαμόρφωσης του LHC II θα αναμενόταν να επηρεάζεται από αλλαγές της σύστασης των πρωτεϊνών Lhcb. Για την εξακρίβωση της παραπάνω υπόθεσης έχουν εξεταστεί διάφορα μεταλλάγματα που αφορούν τα μονομερή μέρη της κεραίας, το τριμερές LHC II, τη λουτεΐνη και τη ζεαξανθίνη. Αν και στα περισσότερα μεταλλάγματα (ζεαξανθίνης και Lhcb), οι μετρήσεις ανέδειξαν μια γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στα μεγέθη των ΔA_{535} και qE, σε κάποια μεταλλάγματα της λουτεΐνης και του μείζονος LHC II, τα αποτελέσματα δεν ανταποκρίνονται στη συσχέτιση αυτή (Johnson et al., 2009). Έτσι, προτάθηκε ότι η διαφορά στην απορρόφηση δεν αντανακλά κατά ανάγκη άμεσα το σχηματισμό κέντρων απόσβεσης, όπως έχει διατυπωθεί και από άλλες μελέτες (Kalituho et al., 2006b).

Η θεωρία που επικρατεί μέχρι στιγμής είναι ότι η ΔA_{535} αποτελεί δείκτη παρακολούθησης των δομικών αλλαγών του LHC II που συνοδεύεται από την ενίσχυση του qE από τη ζεαξανθίνη. Η εξήγηση που δίνεται είναι ότι η παρατηρούμενη βαθυχρωμική μετατόπιση της απορρόφησης της ζεαξανθίνης που αναδεικνύει τη ΔA_{535} προκαλείται από τη δημιουργία ενός διμερούς ανάμεσα σε κάποιο μόριο που συνδέεται στη θέση LHC II V1 και κάποιο άλλο που προσδένεται σε γειτονικό σύμπλοκο (Ruban et al., 1993b; Bonete et al., 2008). Απουσία ζεαξανθίνης, το μέγιστο απορρόφησης μετατοπίζεται στα 525nm περίπου όπως έχει φανεί και από μελέτες σε απομονωμένους χλωροπλάστες (Noctor et al., 1993). Γενικά διατυπώνεται η άποψη ότι η ΔA_{535} πιθανότατα αποτελείται από διάφορες ζώνες στην περιοχή των 525-540nm, οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικές καταλήψεις της θέσης V1 από ζεαξανθίνη που εξαρτάται από την κατάσταση απεποξείδωσης. Η εμφάνιση της θετικής κορυφής στα 535nm στα φάσματα διαφοράς, που προκύπτει από το σχηματισμό του qE, συνοδεύεται από την εμφάνιση τριών ακόμα αρνητικών κορυφών στα 495nm, 468nm και 438nm. Οι αλλαγές στις περιοχές αυτές αποδίδονται στην πολυπλοκότητα των αλλαγών της διαμόρφωσης των προσδεμένων στο LHC II χρωστικών, ως αποτέλεσμα των δομικών αλλαγών των συμπλόκων αυτών κατά την ενεργοποίηση του NPQ (Johnson et al., 2009).

Η επίδραση των πολυαμινών στη φασματική περιοχή απορρόφησης 500-540nm έχει λοιπόν εξαιρετική σημασία λόγω των φυσιολογικών προεκτάσεων που μπορεί να αποκαλύπτει. Η επίδραση των πολυαμινών στην περιοχή αυτή ακόμη κι όταν απουσιάζουν οι αποπρωτεΐνες της φωτοσυλλεκτικής κεραίας υποδεικνύει μια άμεση και ειδική αλληλεπίδραση πολυαμινών και χλωροφύλλης με ισχύ που ακολουθεί τη σειρά Spm > Spd > Put. Τα φάσματα διαφοράς της απορρόφησης της Chl b πριν και μετά τη μεταχείριση με τις πολυαμίνες (εικόνα 3.7) παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με αυτά των *in vivo* αποτελεσμάτων που περιγράφηκαν παραπάνω. Ειδικά η Spm (αλλά και οι δύο μικρότερες πολυαμίνες σε μικρότερο βαθμό) οδηγεί σε αύξηση του σήματος της απορρόφησης κοντά στα 530nm και το φάσμα διαφοράς πριν και μετά τη μεταχείριση με Spm καταγράφει μια ξεκάθαρη κορυφή στην περιοχή αυτή. Αντίθετα, οι πολυαμίνες φαίνεται να μειώνουν την απορρόφηση της Chl a στα 535nm, αλλά προκαλούν τη δημιουργία μιας θετικής κορυφής στα φάσματα διαφοράς κοντά στα 520nm. Εκτός όμως από την παρατηρούμενη διαφορά κοντά στα 535nm, ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι δύο αρνητικές κορυφές που προκύπτουν στα φάσματα διαφοράς στα 473nm περίπου για τη Chl b και στα 438nm περίπου για τη Chla μετά τη μεταχείριση με τις πολυαμίνες. Επομένως, θα μπορούσαμε να προτείνουμε πως οι αρνητικές κορυφές των φασμάτων διαφοράς στα 468nm και στα 438nm κατά την παρατήρηση του NPQ προκύπτουν από αλλαγές στη διαμόρφωση της Chl b και της Chl a αντίστοιχα. Η τρίτη αρνητική κορυφή στα 495nm ενδεχομένως να σχετίζεται με τη φαιοφυτίνη, η οποία εμφανίζει μια δραματική αύξηση του σήματος απορρόφησής της στην περιοχή αυτή από τη μεταχείριση με τις πολυαμίνες (εικόνα 3.9). Την ισχύ Spm > Spd > Put επιδεικνύουν οι τρεις κύριες πολυαμίνες και στην περιοχή Qx του φάσματος απορρόφησης της Scc. Χαρακτηριστικές είναι οι θετικές κορυφές των φασμάτων διαφοράς στα 470nm και 517nm πριν και μετά τη μεταχείριση με την Spm και δευτερευόντως με την Spd (εικόνα 3.12).

4.2 Ο ρόλος του LHC II στη μεταφορά ιόντων και η επίδραση των πολυαμινών

Υπάρχουν στοιχεία που μαρτυρούν την ικανότητα του LHC II να αυξάνει τη διαπερατότητα των πρωτονίων στις λιπιδικές μεμβράνες στις οποίες είναι προσδεμένο (Wardak et al., 2000; Iwaszko et al., 2004). Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 3.29. Η ικανότητα του LHC II να άγει πρωτόνια ελεγχόμενα έχει εξαιρετικά υψηλή βιολογική σημασία. Διπλασιάζει τον αριθμό των πρωτεϊνών (ATPase, LHC II) που καθορίζουν την έξοδο και κατ' επέκταση την εκφόρτιση του μικροχώρου ρυθμίζοντας το επίπεδο της πρωτονιοκινητικής δύναμης. Ένας τέτοιος ρυθμιστικός μηχανισμός έχει εξαιρετικά υψηλή σημασία κάτω από συνθήκες έντονου φωτός, οπότε και δημιουργείται μεγαλύτερο ΔpH μεταξύ στρώματος και μικροχώρου που αποτελεί κίνδυνο για τον φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Kramer et al., 2003). Μια αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών αυτών σε πρωτόνια θα εξυπηρετούσε στην αποφυγή των παραπάνω φαινομένων προμηθεύοντας το φωτοσυνθετικό μηχανισμό με μια δικλίδα ασφαλείας (ελεγχόμενη εκτόνωση/ αποφόρτιση μικροχώρου).

Πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος των πολυαμινών κατά τη διακίνηση των ιόντων. Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας μελετήθηκαν οι επιδράσεις και των τριών κύριων πολυαμινών στην αγωγιμότητα του LHC II. Παρουσιάζονται πρωταρχικά αποτελέσματα μόνο για την τετραμίνη σπερμίνη. Υπάρχει μία τάση μείωσης της αγωγιμότητας του LHC II σε πρωτόνια παρουσία μικρών συγκεντρώσεων σπερμίνης. Η σπερμίνη και σε άλλες περιπτώσεις έχει αναδειχτεί ικανός ρυθμιστής της αγωγιμότητας καναλιών ιόντων (Lopatin et al., 1994). Στα θηλαστικά, οι πολυαμίνες έχουν άμεση επίδραση σε αρκετά κανάλια ιόντων και υποδοχείς τους, ρυθμίζοντας την ομοιόσταση των κυττάρων σε Ca^{2+}, Na^{+} και K^{+} (Johnson, 1996; William, 1997a,b; Li et al., 2007). Οι ενδοκυτταρικές πολυαμίνες εμπλέκονται στη ρύθμιση της εισόδου και ανόρθωσης (rectification) καναλιών K^{+} (Ficker et al., 1994; Lopatin et al., 1994; Oliver et al., 2000). Επιπλέον, είναι υπεύθυνες για την ανόρθωση κάποιων τύπων AMPA (α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) διαπερατών σε Ca^{2+} και kainite υποδοχέων μπλοκάροντας τον πόρο του καναλιού και εμποδίζοντας έτσι την εισροή Ca^{2+} ή Na^{+}. Μάλιστα, η αποδοτικότητα της δράσης των πολυαμινών σε κανάλια κατιόντων βασίζεται σε ένα δίκτυο θετικών φορτίων και ακολουθεί τη σειρά Spm > Spd >> Put.

Οι μελέτες περί της επίδρασης των πολυαμινών στα κανάλια ιόντων έχουν επεκταθεί και στα φυτά. Ενδοκυτταρικές πολυαμίνες έχει βρεθεί ότι μπλοκάρουν ένα γρήγορα-ενεργοποιούμενο κανάλι κατιόντων του χυμοτοπίου του κριθαριού (Bruggemann et al., 1998, 1999) καθώς και τα αντίστοιχα κανάλια και κάποια αργά-ενεργοποιούμενα κανάλια του χυμοτοπίου του *Beta vulgaris* (Dobrovinskaya et al., 1999a,b). Γνωρίζουμε ότι κυτταροπλασματικές πολυαμίνες μπλοκάρουν επίσης την κυκλοφορία ιόντων K^{+} δια μέσου της πλασματικής μεμβράνης των καταφρακτικών κυττάρων (Liu et al., 2000). Μη ειδικά κανάλια κατιόντων αποτελούν έναν ακόμη στόχο των πολυαμινών που οδηγεί σε παρεμπόδιση της εκροής ιόντων K^{+} σε κύτταρα μεσοφύλλου του μπιζελιού (Shabala et al., 2007). Επιπλέον, εκτός από την άμεση επίδραση των πολυαμινών στα κανάλια μεταφοράς ιόντων, έχει αναφερθεί ότι αυτές και ειδικά η σπερμίνη, ενισχύουν την ενεργότητα της H^{+}ATPase μέσω της ένωσης της πρωτεΐνης 14-3-3 και του ενζύμου (Garufi et al., 2007). Οι πρώτες ενδείξεις από τα *in vitro* αποτελέσματα για τη σχέση Spm και LHC II πιθανόν να έχουν φυσιολογική σημασία *in vivo*. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το LHC II περιέχει πολυαμίνες, των οποίων ο ρόλος παραμένει ακόμα άγνωστος (Kotzabasis et al., 1993; Del Duca et al., 1994; Della Mea et al., 2004).

4.3 Μελλοντικοί στόχοι – Προοπτικές

Το πιο σημαντικό συμπέρασμα αυτής της εργασίας είναι ο ρόλος του κεντρικού ιόντος Mg στις οπτικές ιδιότητες της χλωροφύλλης a και της χλωροφύλλης b. Για πρώτη φορά δείχνεται με κατηγορηματικό τρόπο ότι ο φθορισμός της χλωροφύλλης μπορεί να ελεγχθεί μέσω της κατάστασης συναρμογής του κεντρικού ιόντος Mg. Επίσης, η ικανότητα των πολυαμινών να συμπλέκονται με το Mg της χλωροφύλλης και να τροποποιούν αντιστρεπτά τις ιδιότητες απορρόφησης και εκπομπής φωτονίων της αναφέρεται πρώτη φορά διεθνώς. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας θα μπορούσαν να αποτελούν τμήματα του μοριακού μηχανισμού που ενεργοποιείται και απενεργοποιείται ελεγχόμενα από το φυτό κατά το NPQ. Ιδιαίτερη έμφαση απαιτεί το γεγονός ότι οι χλωροφύλλες ρυθμίζουν το φθορισμό τους *in vitro* απουσία ξανθοφυλλών. Επίσης, φάνηκε ότι οι χλωροφύλλες σε αντίθεση με τα μέχρι τώρα κοινώς αποδεκτά μοντέλα εμφανίζουν εξαιρετικά ευαίσθητη απόκριση στην περιοχή 510-540nm που έχει υψηλή διαγνωστική αξία στην έρευνα της φωτοσύνθεσης. Όλα αυτά συνηγορούν υπέρ ενός κεντρικότερου ρόλου για τις χλωροφύλλες στο μηχανισμό NPQ αλλά και στην *in vivo* παρακολούθησή του. Αυτό το καινοτόμο μοντέλο δεν έρχεται σε αντιδιαστολή με το ρόλο των ξανθοφυλλών δεδομένου ότι αυτές θα μπορούσαν να λειτουργούν ρυθμιστικά ως ενισχυτές των φαινομένων απόσβεσης και όχι ως μόρια-αποσβέστες. Το αν οι πολυαμίνες *in vivo* αποτελούν τα μόρια-αποσβέστες του LHC II θα αποτελέσει αντικείμενο μελέτης μελλοντικών πειραμάτων. Ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στην πληροφορία από πειράματα με λιποσώματα, δεδομένου του διπλού ρόλου του LHC II στη διαχείριση των πρωτονίων. Μελλοντικά πειράματα πρέπει να ελέγξουν το αν τα πρωτόνια που επάγουν το NPQ στο LHC II σχετίζονται λειτουργικά με τα πρωτόνια που άγει ελεγχόμενα το LHC II.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adamska I. (1997) ELIPs - light-induced stress proteins. Physiologia Plantarum 100: 794–805

Afzal M., Obuekwe C., Shuaib N., Barakat H. (2004) Photosynthetic pigment profile of Cordia myxa L. and its potential in folklore medicinal application. Food, Agriculture & Environment Vol.2 (2): 114-120

Agostiano A., Catucci L., Colafemmina G., Scheer H. (2002) Role of functional groups and surfactant charge in regulating chlorophyll aggregation in micellar solutions. J Phys Chem B 106: 1446–1454

Ahn T.K., Avenson T.J., Ballottari M., Cheng Y.-C., Niyogi K.K., Bassi R., Fleming G.R. (2008) Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein. Science 320: 794–797

Alcazar R., Marco F., Cuevas J.C., Patron M., Ferrando A., Carrasco P., Tiburcio A.F., Altabella T. (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. Biotechnol Lett 28: 1867-1876

Allen J.F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. Biochim Biophys Acta 1098: 275-335

Allen J.F. (2003) State transitions—a question of balance. Science 299: 1530-1532

Allen J.F., Forsberg J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. Trends Plant Sci 6: 317–326

Aro E.M., Virgin I., Andersson B. (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. Biochim Biophys Acta 1143: 113-134

Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **50:** 601–639

Bais H.P., Ravishankar G.A. (2002) Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. Plant cell, Tissue and Organ Culture 69: 1-34

Balaban T.S., P. Fromme, A.R. Holzwarth, N. Krauß and V.I. Prokhorenko (2002) Biochim Biophys Acta – Bioenerg 1556: 197

Barros T. and Kühlbrandt W. (2009) Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex II. Biochim Biophys Acta - Bioenergetics 1787: 753-772

Beauchemin R., A. Gauthier, J. Harnois, S. Boisvert, S. Govindachary and R. Carpentier (2007) Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from TyrZ to $P680^+$ and the quinone acceptors Q_A^- to QB. Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenerg 1767: 905–912

Beauchemin R., J. Harnois, R. Rouillon, H.A. Tajmir-Riahi and R. Carpentier (2007) Interaction of polyamines with proteins of photosystem II: cation binding and photosynthetic oxygen evolution J Mol Struct 833: 169–174

Besford R.T., Richardson C.M., Campos J.L., Tiburcio A.F. (1993) Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. Planta 189: 201-206

Biegel C.M., Gould J.M. (1981) Kinetics of hydrogen ion diffusion across phospholipid vesicle membranes. Biochemistry 20: 3474-3479

Bilger W., Bjorkman O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of Hedera canariensis. Photosynth Res 25: 173–185

Bilger W., Bjorkman O. (1994) Relationships among violaxanthin deepoxidation, thylakoid membrane conformation, and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in leaves of cotton (Gossypium hirsutum L.). Planta 193: 238–246

Bock C.W., A. Kaufman and J.P. Glusker (1994) Inorg Chem 33: 419

Bograh A., Y. Gingras, H.A. Tajmir-Riahi and R. Carpentier (1997) The effects of spermine and spermidine on the structure of photosystem II proteins in relation to inhibition of electron transport. FEBS Lett 402: 41–44

Boldt N.J., Donohoe R.J., Birge R.R., Bocian D. (1987) Chlorophyll model compounds: effects of low symmetry on the resonance Raman spectra and normal mode descriptions of Ni(I1) dihydroporphyrins. J Am Chem SOC 109: 2284-2298

Bonente G., Howes B.D., Caffarri S., Smulevich G., Bassi R. (2008) Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied in vivo and in vitro. J Biol Chem 283: 8434–8445

Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. Plant Sci 140: 103-125

Bruggemann L., Pottosin I., Schonknecht G. (1998) Cytoplasmic polyamines block the fast-activating vacuolar cation channel. Plant J 16: 101-105

Bruggemann L., Pottosin I., Schonknecht G. (1999) Selectivity of the fast-activating vacuolar cation channel. J Exp Bot 50: 873-876

Callahan P.M., Cotton T.M. (1987) Assignment of bacteriochlorophyll a ligation state from absorption and resonance Raman spectra. J Am Chem Soc **109**: 7001–7007

Camm E.L., Green B.R. (2004) How the chlorophyll–proteins got their names, Photosynth Res. 80: 189–196

Casero R.A. Jr., Marton L.J. (2007) Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. Nat Rev Drug Discov 6: 373-390

Choi S., Spiro T.G., Langry K.C., Smith K.M. (1982a) Vinyl influences on protoheme resonance Raman spectra: Nickel(ll) protoporphyrin IX with deuterated vinyl groups. J Am Chem Soc 104: 4337-4344

Choi S., Spiro T.G., Langry K.C., Smith K.M., Budd D.L., La Mar G.N. (1982b) Structural correlations and vinyl influences in resonance Raman spectra of protoheme complexes and proteins. J Am Chem Soc 104: 4345-4351

Clement N.R., Gould J.M. (1981) Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. Biochemistry 20: 1534-1538

Cohen S.S. (1998) A guide to the polyamines. Oxford University Press, New York

Cotton T.M., Trifunac A.D., Ballschmiter K. and Katz J.J. (1974) State of chlorophyll *a in vitro* and *in vivo* from electronic transition spectra, and the nature of antenna chlorophyll. Biochim Biophys Acta 368: 181–198

Cotton T.M., van Duyne R.P. (1981) Characterization of bacteriochlorophyll interactions in vitro by resonance Raman spectroscopy. J Am Chem Soc 103: 6020-6026

Crofts, A. R., Yerkes, C. T. (1994) A molecular mechanism for qE-quenching. FEBS Lett 352: 265-270

Demetriou G., Neonaki C., Navakoudis E., Kotzabasis K. (2007) Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus—The protective role of polyamines. Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenerg 1767: 272–280

Dobrovinskaya O.R., Muniz J., Pottosin I. (1999a) Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. J Membr Biol 167: 127-140

Dobrovinskaya O.R., Muniz J., Pottosin I. (1999b) Asymmetric block of the plant vacuolar Ca^{2+}-permeable channel by organic cations. Eur Biophys J 28: 552-563

Doernemann D., Navakoudis E., Kotzabasis K. (1996) Changes in the polyamine content of plastidal membranesin light- and dark-grown wildtype and pigment mutants of the unicellular green alga Scenedesmus obliquus and their possible role in chloroplast photodevelopment. J Photochem Photobiol 36: 293-299

Dolphin D. (1978) The Porphyrins, Academic Press, New York

Donohoe R.I., Frank H.A., Bocian D.F. (1988) Resonance Raman spectra and normal mode descriptions of a bacteriochlorophyll a model complex. Photochem Photobiol 48: 531–537

Dudley H.W., Rosenheim O., Starling W.W. (1927) The constitution and synthesis of spermidine, a newly discovered base isolated from animal tissues. Biochem J 21: 97-103

Ellervee A., Freiberg A. (2008) Formation of bacteriochlorophyll a coordination states under external high-pressure. Chemical Physics Letters 450: 386–390
Ellervee A., Linnanto J., Freiberg A. (2004) Spectroscopic and quantum chemical study of pressure effects on solvated chlorophyll. Chemical Physics Lett 394: 80-84
Evans T.A. and J.J. Katz (1975) Biochim Biophys Acta 396: 414
Feiler U., Albouy D., Lutz M., Robert B. (1994a) Pigment interactions in chlorosome of various green bacteria. Photosynth Res 41: 175–180
Feiler U., Mattioli T.A., Katheder I., Scheer H., Lutz M., Robert B. (1994b) Effects of vinyl substitutions on resonance Raman spectra of (bacterio)chlorophylls. J Raman Spectrosc 25: 365–370
Felton R.H., Yu N.T., O'Shea D.C., Shelnutt J.A. (1974) Letter: Structural implication in metalloporphyrins of the 1590-cm-1 anomalously polarized resonance Raman line. *J Am Chem Soc* **96**(11): 3675–3676
Ficker E., Taglialatela M., Wible B.A., Henly C.M., Brown A.M. (1994) Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K^+ channels. Science 266: 1068-1072
Fiedor L., Kania A., Mys´liwa-Kurdziel B., Orzel L., Stochel G. (2008) Understanding chlorophylls: central magnesium ion and phytyl as structural determinants. Biochim Biophys Acta 1777:1491–1500
Fragata M., Norden B., Kurusev T. (1988) Linear dichroism (250-700nm) of chlorophyll a oriented in a lamellar phase transitions. Photochem Photobiol 47: 133-143
Fujiwara M., Tasumi M. (1986) Metal-sensitive bands in the Raman and infrared spectra of intact and metal-substituted chlorophyll a. J Phys Chem 90: 5646–5650
Garab G., Cseh Z., Kovacs L., Rajagopal S., Varkonyi Z., Wentworth M., Mustardy L., Der A., Ruban A.V., Papp E., Holzenburg A., Horton P. (2002) Light-induced trimer to monomer transition in the main light-harvesting antenna complex of plants: thermo-optic mechanism. Biochemistry 41: 15121–15129
Garufi A., Visconti S., Camoni L., Aducci P. (2007) Polyamines as physiological regulators of 14-3-3 interaction with the plant plasma membrane H^+-ATPase. Plant Cell Physiol 48: 434-440
Gentemann S., Nelson N.Y., Jaquinod L., Nurco D.J., Leung S.H., Medforth C.J., Smith K.M., Fajer J., Holten D. (1997) Variations and temperature dependence of the excited state properties of conformationally and electronically perturbed zinc and free base porphyrins. J Phys Chem B 101: 1247–1254
Gilmore A.M., Itoh S., Govindjee (2000) Global spectral kinetic analysis of room temperature chlorophyll a fluorescence from light harvesting antenna mutants of barley. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 355: 1371–1384
Gouterman M. (1978) Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings. In: D. Dolphin, Editor, *The Porphyrins*. Academic Press, Inc, New York Vol.3 (3): 1–165
Green R.R., Pichersky E. (1994) Hypothesis for the evolution of three-helix Chl a/b and Chl a/c light-harvesting antenna proteins from two-helix and four-helix ancestors. Photosynth Res 39: 149–162
Groppa M.D., Benavides M.P. (2007) Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids 34: 35-45
Grudzinski W., Krupa Z., Garstka M., Maksymiec W., Swartz T.E., Gruszecki W.I. (2002) Conformational rearrangements in lightharvesting complex II accompanying light-induced chlorophyll a fluorescence quenching. Biochim Biophys Acta 1554: 108–117
Gruszecki W.I., Kernen P., Krupa Z., Strasser R.J. (1994) Involvement of xanthophyll pigments in regulation of light-driven excitation quenching in light-harvesting complex of Photosystem II. Biochim Biophys Acta 1188: 235–242
Gruszecki, W. I., Kernen, P., Krupa, Z., and Strasser, R. J. (1994) Involvement of xanthophyll pigments in regulation of light-driven excitation quenching in lightharvesting complex of Photosystem II. Biochim Biophys Acta 1188: 235–242
Gruszecki W.I. (2004) Analysis of LHCII in Model Systems. In: Methods in Molecular Biology Vol 274 Photosynthesis Research Protocols. Edited by R. Carpentier

Gurinovich G.P., Strelkova T.I. (1968) The mechanism of association of chlorophylls and its analogues. Biophysics Vol 13 5: 919-930
Hanson L.K. (1991) In: Scheer H, editor. Molecular orbital theory of monomer pigments. Boca Raton (FL): CRC Press
Heber U. (1969) Conformational changes of chloroplasts induced by illumination of leaves in vivo. Biochim Biophys Acta 180: 302–319
Hildebrandt P., Spiro T.G. (1988) Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of copper chlorophyllin on silver and gold colloids. Journal of Physical Chemistry 92(12): 3355-3360
Holt N.E., Zigmantas D., Valkunas L., Li X.P., Niyogi K.K., Fleming G.R. (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. Science 307: 433–436
Horton P., Johnson M.P., Perez-Bueno M., Kiss A.Z., Ruban A.V. (2008) Does the structure and macro-organisation of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states? FEBS J 275: 1069–1079
Horton P., Ruban A., and Walters R. G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. Annu ReV Plant Phys 47: 655-684
Horton P., Ruban A.V. (1992) Regulation of photosystem II. Photosynth Res 34: 375-385
Horton P., Ruban A.V., Rees D., Pascal A.A., Noctor G., Young A.J. (1991) Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll–protein complex. FEBS Lett 292: 1–4
Horton P., Ruban A.V., Walters R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 665–684
Horton P., Wentworth M., Ruban A. (2005) Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: the LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. FEBS Lett 579: 4201–4206
Horton P., Wentworth M., Ruban A. (2005) Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. FEBS Letters 579: 4201-4206
Houssier C., Sauer K. (1970) Circular dichroism and magnetic circular dichroism of the chlorophyll and protochlorophyll pigments. J Am Chem Soc 92: 779–791
Hughes J.L., R. Razeghifard, M. Logue, A. Oakley, T. Wydrzynski and E. Krausz, J. (2006) Am Chem Soc 128: 3649
Igarashi K., Kashiwagi K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. Biochem Biophys Res Commun 271: 559-564
Ilioaia C., Johnson M.P., Horton P., Ruban A.V. (2008) Induction of efficient energy dissipation in the isolated light-harvesting complex of photosystem II in the absence of protein aggregation. J Biol Chem 283: 29505–29512
Ioannidis N. E., Ph D thesis, (2006) A comparative study of light dependent and light independent biogenesis and functional assemply of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines. pp 128-144
Ioannidis N.E. and K. Kotzabasis (2007) Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane in vivo and in vitro. Biochim Biophys Acta **1767**: 1372–1382
Ioannidis N.E., L. Sfichi and K. Kotzabasis (2006) Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenerg 1757: 821–828
Ioannidis N.E., Ortigosa S.M., Veramendi J., Pintó-Marijuan M., Fleck I., Carvajal P., Kotzabasis K., Santos M., Torné J.M. (2009) Remodeling of tobacco thylakoids by over-expression of maize plastidial transglutaminase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics Vol 1787 10: 1215-1222
Iwaszko E., Wardak A., Krupa Z. and Gruszecki W.I. (2004) Ion transport across model lipid membranes containing lightharvesting complex II: an effect of light. J Photochem Photobiol 74: 13–21

J. Standfuss, W. Kühlbrandt (2004) The three isoforms of the light-harvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation, and functional roles. J Biol Chem 279: 36884–36891
Jansson S. (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. Trends Plant Sci 4: 236–240
Jansson S., Pichersky E., Bassi R., Green B., Ikeuchi M., Melis A., Simpson D., Spangfort M., Staehelin L., Thornber J., (1992) A nomenclature for the genes encoding thechlorophyll a/b-binding proteins of higher plants. Plant Mol Biol Reporter 10: 242–253
Johnson M.P., Perez-Bueno M., Zia A., Horton P., Ruban A.V. (2009) The Zeaxanthin-Independent and Zeaxanthin-Dependent qE Components of Nonphotochemical Quenching Involve Common Conformational Changes within the Photosystem II Antenna in Arabidopsis. Plant Physiology 149: 1061–1075
Kalituho L., Rech J., Jahns P. (2006b) The roles of specific xanthophylls in light utilization. Planta 225: 423–439
Kania A., Fiedor L. (2006) Steric control of bacteriochlorophyll ligation. J Am Chem Soc 128: 454–458
Kano K., Fendler J.H. (1978) Pyranine as a sensitive pH1 probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles. Biochim Biophys Acta 509: 289-299
Katz J.J. and J.R. Norris (1973) Curr Top Bioenerg p. 41
Kee H.L., Kirmaier C., Tang Q., Diers J.R., Muthiah C., Taniguchi M., Laha J.K., Ptaszek M., Lindsey J.S., Bocian D.F., Holten D. (2007) Effects of substituents on synthetic analogs of chlorophylls. Part 2: redox properties, optical spectra and electronic structure. Photochem Photobiol 83: 1125–1143
Kim S., Sandusky P., Bowlby N.R., Aebersold R., Green B.R., Vlahakis S., Yocum C.F., Pichersky E. (1992) Characterization of a spinach psbS cDNA encoding the 22 kDa protein of photosystem II. FEBS Lett 314: 67–71
Kiriukhin M.Y. and K.D. Collins (2002) Biophys Chem 99: 155
Kitagawa T., Kyogoku Y., Iizuka T., Ikeda-Saito M., Yamanaka T. (1975) Resonance Raman scattering from hemoproteins. Effects of ligands upon the Raman spectra of various C-type cytochromes. *J Biochem* 78(4): 719–728
Kitagawa T., Nagai K., Tsubaki M. (1979) Assignment of the Fe-Nepsilon (His F8) stretching band in the resonance Raman spectra of deoxy myoglobin. *FEBS Lett* 104(2): 376–378
Kitagawa T., Ozaki Y. (1987) Infrared and Raman spectra of metalloporphyrins. Struct Bonding 64: 71 - 114
Kotzabasis K., Fotinou C., Roubelakis-Angelakis K.A., Ghanotakis D. (1993) Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine. Photosynth Res 38: 83-88
Kotzabasis K., Strasser B., Navakoudis E., Senger H., Doernemann D. (1999) The regulatory role of polyamines in structure and functioning of the photostnyhetic apparatus during photoadaptation. J Photochem Photobiol 50: 45-52
Koyama Y., Umemoto Y., Akamatsu A. (1986) Raman spectra of chlorophyll forms. J Mol Struct 146: 273-287
Kramer D.M., J.A. Cruz and A. Kanazawa (2003) Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. Trends Plant Sci **8**: 27–32
Kramer G.F., Krizek D.T., Mirecki R.M. (1992) Influence of photosynthetically active radiation and spectral quality on UV-Binduced polyamine accumulation in soybean. Phytochemistry 31: 1119-1125
Krawczyk S. (1989) The effects of hydrogen bonding and coordination interaction in visible absorption and vibrational spectra of chlorophyll a. Biochim Biophys Acta **976**: 140–149

Krupa Z., Huner N.P.A., Williams J.P., Maissan E., James D.R. (1987) Development at cold-hardening temperatures. The structure and composition of purified rye light harvesting complex II. Plant Physiol 84: 19-24
Kumar A., Altabella T., Taylor M., Tiburcio A.F. (1997) Recent advances in polyamine research. Trends Plant Sci 2: 124-130
Kung S.D., Thornber J.P., Wildman S.G. (1972) Nuclear DNA codes for the photosystem II chlorophyll–protein of chloroplast membranes. FEBS Lett 24: 185–188
Kusano T., Yamaguchi K., Berberich T., Takahashi Y. (2007b) The polyamine spermine rescues *Arabidopsis* from salinity and drought stresses. Plant Signal Behav 2: 250-251
Ladenburg A., Abel J. (1888) Uber das Aethylenimin. Ber Dtsch Chem Ges 21:758-766
Legocka J., Zajchert I. (1999) Role of spermidine in the stabilization of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a:b protein complex of photosystem II during leaf senescence process. Acta Physiol Plant 21: 127-132
Li J., Doyle K.M., Tatlisumak T. (2007) Polyamines in the brain: distribution, biological interactions and their potential therapeutic role in brain ischaemia. Curr Med Chem 14: 1804-1813
Li X.P., Bjorkman O., Shih C., Grossman A.R., Rosenquist M., Jansson S., Niyogi K.K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. Nature 403: 391–395
Liu K., Fu H., Bei Q., Luan S. (2000) Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. Plant Physiol 124: 1315-1326
Liu Z., Yan H., Wang K., Kuang T., Zhang J., Gui L., An X., Chang W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. Nature 428: 287–292
Lopatin A.N., Makhina E.N., Nichols C.G. (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. Nature 372: 366-369
Lutz M. (1979) Diffusion Raman de resonance des chlorophylles: applications et l'etude de l'organisation de la membrane photosynthetique. These de doctorat d'etat, Universite Pierre et Marie Curie Paris VI
Lutz M. (1984) Resonance Raman studies in photosynthesis. In: Clark RJH and Hester RE (eds) Advancesin Infrared and Raman Spectroscopy, Vol 11 Ch 5 pp 211-300 John Wiley & Sons Chichester
Lutz M. and van Brakel G. (1988) Ground-state molecular interactions of bacteriochlorophyll c in chlorosomes of green bacteria and in model system: a resonance Raman study. In: Olson J.M., Ormerod J.G., Amesz J., Stackebrandt E., Triiper H.G. (eds) Green Photosynthetic Bacteria, pp 23-34. Plenum Press, New York and London
Lutz M., Mantele W. (1991) Vibrational spectroscopy of chlorophylls. In Chlorophylls (Edited by H. Scheer), p. 855-902 CRC Press, Boca Raton, FL
Lutz M., Robert B. (1988) Chlorophylls and the photosynthetic membrane. In: Spiro T (ed) Biological applications of Raman spectroscopy, vol III. Wiley, New York, pp 347–411
Malmberg R.L., Watson M.B., Galloway G.L., Yu W. (1998) Molecular genetic analysis of plant polyamines. Crit Rev Plant Sci 17: 199-224
Mattioli T., Hoffmann A., Sockalingum D.G., Schrader B., Robert B., Lutz M. (1993) Application of near IR Fourier-Transform resonance Raman spectroscopy to the study of photosynthetic systems. Spectrochim Acta 49A :785–799
Mattioli T., Sockalingum D., Lutz M., Robert B. (1992) Low temperature Fourier-transform Raman studies on bacterial reaction centers. In: Murata N (ed) Research in Photosynthesis, Vol. 1, pp 403–408. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
Matto A.K., Sobolev A.P., Neelam A., Goyal R.K., Handa A.K., Segre A.L. (2006) Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolite profiling of transgenic tomato fruit engineered to accumulate spermidine and spermine reveals enhanced anabolic and nitrogen-carbon interactions. Plant Physiol 142: 1759-1770

Mehta R.A., Cassol T., Li N., Ali N., Handa A.K., Matto A.K. (2002) Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. Nat Biotechnol 20: 613-618

Meyer G., Kloppstech K. (1984) A rapidly light-induced chloroplast protein with a high turnover coded for by pea nuclear DNA. Eur J Biochem 138: 201–207

Moya I., Silvestri M., Vallon O., Cinque G., Bassi R. (2001) Timeresolved fluorescence analysis of the Photosystem II antenna proteins in detergent micelles and liposomes. Biochemistry 40: 12552–12561

Mueller P., Li X-P., Niyogi K.K. (2001) Non-Photochemical Quenching: A response to excess kight energy. Plant Physiol 125: 1558-1566

Mullet J.E. (1983) The amino acid sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. J Biol Chem 258: 9941–9948

Navakoudis E., Luetz C., Langebartels C., Luetz-Meindl U., Kotzabasis K. (2003) Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. Biochim Biophys Acta 1621: 160–166

Navakoudis E., Vrentzou K., Kotzabasis K. (2007) A polyamine- and LHCII protease activity-based mechanism regulates the plasticity and adaptation status of the photosynthetic apparatus. Biochim Biophys Acta 1767: 261–271

Nelson N., Ben-Shem A. (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. Nat Rev Mol Cell Biol 5: 971-982

New R.R.C. (1990) Liposomes: a practical approach. Oxford: Oxford University Press

Niyogi K.K. (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 333–359

Noctor G., Ruban A.V., Horton P. (1993) Modulation of DpH-dependent nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in spinach chloroplasts. Biochim Biophys Acta 1183: 339–344

Oba T. and H. Tamiaki (2002) Photosynth Res 74: 1

Oliver A.E., Deamer D.W. (1994) Alfa-helical hydrophobic polypeptides form proton-selective channels in lipid bilayers. Biophys J 66: 1364–1379

Oliver D., Baukrowitz T., Fakler B. (2000) Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K+ channels. Eur J Biochem 267: 5824-5829

Ozaki Y., Iriyama K., Ogoshi H., Ochiai T., Kitagawa T. (1986) Resonance Raman characterization of iron-chlorin complexes in various spin, oxidation, and ligation states. 1. Comparative study with corresponding iron-porphyrin complexes. J Phys Chem YO 6105 - 6112

Pascal A., E. Peterman, C. Gradinaru, H.V. Amerongen, R.V. Grondelle and B. Robert (2000) J Phys Chem B 104: 9317

Pesaresi P., Sandova D., Giuffra E., Bassi R. (1997) A single point mutation (E166Q) prevents dicyclohexylcarbodiimide binding to the PSII subunit CP29. FEBS Lett 402: 151-156

Peter G.F., Thornber J.P. (1991) Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. J Biol Chem 266: 16745–16754

Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochim Biophys Acta 975: 384–394

Renge I., and R. Avarmaa (1985) Specific solvation of chlorophyll a: solvent nucleophility, hydrogen bonding and steric effects on absorption spectra. Photochem Photobiol 42: 253-260

Ruban A.V., Berera R., Ilioaia C., van Stokkum I.H., Kennis J.T., Pascal A.A., van Amerongen H., Robert B., Horton P., van Grondelle R. (2007) Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. Nature 450: 575–578

Ruban A.V., Horton P, Young A.J. (1993a) Aggregation of high plant xanthophylls: differences in absorption spectra and in the dependency on solvent polarity. J Photochem Photobiol 21: 229–234

Ruban A.V., Pascal A.A., Robert B., Horton P. (2002b) Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. J Biol Chem 277: 7785–7789
Ruban A.V., Wentworth M., Yakushevska A.E., Andersson J., Lee P.J., Keegstra W., Dekker J.P., Boekema E.J., Jansson S., Horton P. (2003) Plants lacking the main lightharvesting complex retain photosystem II macro-organization. Nature 421: 648–652
Ruban A.V., Young A.J., Horton P. (1993b) Induction of non-photochemical quenching and absorbance changes in leaves. Plant Physiol 102: 741–750
S. Hobe, R. Forster, J. Klingler, H. Paulsen (1995) N-proximal sequence motif in lightharvesting chlorophyll a/b-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll a/b complex. Biochemistry 34: 10224–10228
Sato H., K. Uehara, T. Ishii and Y. Ozaki (1995) Biochemistry 34: 7854
Saunder F.R., Wallace H.M. (2007) Polyamine metabolism and cancer prevention. Biochem Soc Trans 35: 364-368
Schulz H., Baranska M. (2007) Identification and Quantification of valuable Plant Substances by IR and Raman Spectroscopy. Vibrational Spectroscopy 43: 13-25
Seiler N., Raul F. (2005) Polyamines and apoptosis. J. Cell Mol Med 9: 623-642
Seiler N., Raul F. (2007) Polyamines and the intestinal tract. Crit Rev Clin Lab Sci 44: 365-411
Senge M.O. (1992) The conformational flexibility of tetrapyrroles – current model studies and photobiological relevance. J Photochem Photobiol *B* 16: 3–36
Sfakianaki M., Sfichi L., Kotzabasis K. (2006) The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature. J Photochem Photobiol B Biol 84: 181–188.
Sfichi L., Ioannidis N., Kotzabasis K. (2004) Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complex II changes. Photochem Photobiol 80: 499–506
Shabala S., Cuin T.A., Pottosin I. (2007) Polyamines prevent NaCl-induced K^+ efflux from pea mesophyll by blocking non-selective cation channels. FEBS Lett 581: 1993-1999
Shipman L.L., Cotton T.M., Norris J.R. and Katz J.J. (1976a) An analysis of the visible absorption spectrum of chlorophyll *a* monomer, dimer and oligomers in solution. J Am Chem Soc 98: 8222–8230
Shipman L.L., Cotton T.M., Norris J.R. and Katz J.J. (1976b) New proposal for structure of special-pair chlorophyll. Proc Natl Acad Sci 73: 1791–1794
Skipper N.T., G.W. Neilson and S.C. Cummings (1989) J Phys: Condens. Matter 1: 3489
Spaulding L.C., Chang C.C., Yu N.-T., Felton R.H. (1975) Resonance Raman spectra of metalloctaethylporphyrins. A Structural probe of metal displacement. J Am Chem Soc 97: 2517-2525
Spiro T.G., Stong J.D., Stein P. (1979) Porphyrin core expansion and doming in heme proteins. New evidence from resonance Raman of six-coordinate high-spin iron(II1) hemes. 1. Am Cheni Soc 101: 2648-2655
Spiro T.G., Strekas T.C. (1974) Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state. *J Am Chem Soc* 96(2): 338–345
Standfuss J., Terwisscha van Scheftinga A.C., Lamborghini M., Kóhlbrandt W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 E resolution. EMBO J 24: 919–928
Subramanian S. (1982) Specific interaction of spermine with Cibacron Blue F3GA. Biochem. Biophys. 217: 388-391
Tabor C.W., Tabor H. (1984) Polyamines. Annu Rev Biochem 53: 749-790
Tasumi M., Fujiwara M. (1987) Vibrational spectra of chlorophylls. In Advances in Spectroscopy, Vol. 14 (Edited by R.J.H. Clark and R.E. Hester), p. 407428. John Wiley & Sons, Chichester

Teraoka J., Kitagawa T. (1980) Resonance Raman study of the heme-linked ionization in reduced horseradish peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **93**(3): 694–700
Thomas L.L., J.-H. Kim and T.M. Cotton (1990) J. Am. Chem. Soc. 112: 9378
Thomas T., Thomas T.J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. Cell Mol Sci 58: 244-258
Umetsu M., Z.-Y. Wang, M. Kobayashi and T. Nozawa (1999) Biochim Biophys Acta 1410: 19
van Amerongen H., J.P. Dekker (2003) Light-harvesting in photosystem II. In Green BR, Parson WW eds, Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 219–251
van Leeuwenhoek A. (1678) Observationes D. Anthonii Leeuwenhoek, de natis e semine genital animalculis. Philos Trans R Soc Lond 12:1040-1043
Walden R., Cordeiro A., Tiburcio A.F. (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. Plant Physiol 113: 1009-1013
Wardak A., Brodowski R., Krupa Z., Gruszecki W.I. (2000) Effect of light-harvesting complex II on ion transport across model lipid membranes. J Photochem Photobiol B: Biol 56: 12–18
Wardak, A., Brodowski, R., Krupa, Z., and Gruszecki, W. I. (2000) Effect of light harvesting complex II on ion transport across model lipid membranes. J Photochem Photobiol B: Biol 56: 12–18
Wedel N., Klein R., Ljungberg U., Andersson B., Herrmann R.G. (1992) The single-copy gene psbS codes for a phylogenetically intriguing 22 kDa polypeptide of photosystem II. FEBS Lett 314: 61–66
Weiss C. Jr (1972) The Pi electron structure and absorption spectra of chlorophylls in solution. Journal of molecular spectroscopy 44: 37-80
William K. (1997a) Interactions of polyamines with ion channels. Biochem J 325: 289-297
William K. (1997b) Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. Cell Signal 9: 1-13
Wraight C.A., Crofts A.R. (1970) Energy-dependent quenching of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. Eur J Biochem 17: 319-327
Yammoto T., Palmer G. (1973) The valence and spin state of iron in oxyhemoglobin as inferred from resonance Raman spectroscopy. *J Biol Chem* **248**(14):5 211–5213
Yang C., Boggasch S., Haase W., Paulsen H. (2006) Thermal stability of trimeric light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCIIb) in liposomes of thylakoid lipids. Biochim Biophys Acta – Bioenergetics 1757: 1642-1648
Zhou F., Liu S., Hu Z., Kuang T., Paulsen H., Yang C. (2009) Effect of monogalactosyldiacylglycerol on the interaction between photosystem II core complex and its antenna complexes in liposomes of thylakoid lipids Photosynth Res 99: 185–193
Zignani M., Drummond D.C., Meyer O., Hong K., Leroux J.C. (2000) In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. Biochim Biophys Acta **1463**: 383–394
Γανωτάκης Δ., Κοτζαμπάσης Κ. (2003) Φωτοσύνθεση Ι: Μετατροπή της ηλιακής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια. Στο βιβλίο: Φυσιολογία φυτών Από το μόριο στο περιβάλλον. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης Κεφ 5 σελ. 147-159 Κεφ 11 σελ.406-409