

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ο ρόλος των πολυαμινών στη διαχείριση των φωτονίων και των πρωτονίων από τη φωτοσυλλεκτική κεραία του φωτοσυστήματος II

Θεόδωρος Τσιάβος

Βιολόγος, MS

Ηράκλειο, 2014

**Ο ρόλος των πολυαμινών στη διαχείριση των φωτονίων και των πρωτονίων
από τη φωτοσυλλεκτική κεραία του φωτοσυστήματος II**

Από

Θεόδωρο Τσιάβο

Βιολόγο, MS Πανεπιστημίου Κρήτης

Υποβλήθηκε ως μέρος των απαιτήσεων για τον τίτλο του Διδάκτορα
του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης

Επιβλέπων Καθηγητής : Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κυριάκος Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Καλλιόπη Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Δημήτριος Γανωτάκης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κυριάκος Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Τμ. Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων)

Καλλιόπη Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Καθηγήτρια Τμ. Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Δημήτριος Γανωτάκης, Καθηγητής Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ηλέκτρα Γκιζελή, Αναπλ. Καθηγήτρια Τμ. Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Νικόλαος Χανιωτάκης, Καθηγητής Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Τσιώτης, Αναπλ. Καθηγητής Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Στέργιος Πυρίντσος, Αναπλ. Καθηγητής Τμ. Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Στη γιαγιά μου, Όλγα και στον παππού μου, Γιώργο.

Για τα παραμύθια, τις ιστορίες, τις μυρωδιές, για τα καλοκαίρια...

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κυριάκου Κοτζαμπάση, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την αδιάκοπη επιστημονική καθοδήγηση και συνεργασία καθόλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγήτρια Καλλιόπη Ρουμπελάκη-Αγγελάκη και Καθηγητή Δημήτριο Γανωτάκη για το χρόνο που διέθεσαν και τις εύστοχες υποδείξεις τους, καθώς και όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής που αποδέχτηκαν την πρόταση να συμμετάσχουν σε αυτή.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας Νικόλαο Χανιωτάκη για το χρόνο που μου διέθεσε στο μικροσκόπιο Raman του εργαστηρίου του (Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης) προκειμένου να συλλεχτούν τα φάσματα της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ηλέκτρα Γκιζελή για την άριστη συνεργασία στο πεδίο των λιποσωμάτων και τη χρήση εργαστηριακού εξοπλισμού.

Επίσης ευχαριστώ:

Τον Δρ Νικόλαο Ιωαννίδη για την οπτικοποίηση των δομικών μοντέλων του LHCII που παρουσιάζονται στις Εικόνες 57 και 70 της Διατριβής.

Την Δρ Raluca Buiculescu για τη βοήθεια στη συλλογή και ανάλυση των φασμάτων Raman.

Τον Δρ Αχιλλέα Τσορτό για τη βοήθεια στην παρασκευή των λιποσωμάτων.

Την Δρ Ναυσικά Παπαγεωργίου για τις επιστημονικές συμβουλές και τις συζητήσεις.

Τον Γιάννη Ναούμ για τη βοήθεια στην ηλεκτροφόρηση και τις συζητήσεις πάνω στη φωτοσύνθεση.

Την Αντιγόνη Νικολάκη και τον Δημήτρη Στεφανάκη για τη βοήθεια στις υπερφυγοκεντρήσεις.

Την Δρ Αικατερίνη Παπαζή και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας για τη βοήθεια σε επιστημονικά και τεχνικά ζητήματα.

Όλους τους φίλους και συναδέλφους στο Πανεπιστήμιο Κρήτης που έκαναν τα διαλείμματα ανάμεσα από τα πειράματα ευχάριστα και τις αποτυχίες υποφερτές.

Τέλος, ευχαριστώ:

Τους γονείς μου, Κώστα και Αιμιλία, για την ηθική και υλική υποστήριξη.

Τους Γιώργο Τσιάβο, Ιωάννα Φίλιπα, Κωστή Πευκιανάκη, Κυριακή Καπράνου, Γιώργο Βρεττάκη, Άννα Νιργιανάκη και Γιωργία Μπαρμπαρέσου που μοιράστηκαν τα άγχη και τις αγωνίες μου όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	I
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	IV
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	V
ABSTRACT	VII
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Φωτοσύνθεση	1
1.1. Γενικά	1
1.2. Η φωτοσυνθετική διαδικασία	2
1.3. Το φωτοσύστημα II (PSII) και το σύμπλοκο συλλογής φωτός του (LHCII)	4
1.4. Η ανάγκη για φωτοπροστασία του PSII	9
1.5. Ο μηχανισμός NPQ	12
2. Πολυαμίνες	20
2.1 Γενικά	20
2.2 Ο μεταβολισμός των πολυαμινών	21
2.3 Η πρόσδεση των πολυαμινών σε πρωτεΐνες	23
2.4 Οι πολυαμίνες ως διαμορφωτές της λειτουργίας καναλιών ιόντων	24
2.5 Οι πολυαμίνες στη φωτοσύνθεση	26
3. Φασματοσκοπικές τεχνικές	28
3.1 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)	28
3.2 Φασματοσκοπία φθορισμού	31
3.3 Φασματοσκοπία Raman	32
3.3.1 Φασματοσκοπία Raman μεταλλοπορφυρινών	34
3.3.2 Φασματοσκοπία Raman LHCb συμπλόκων	37
ΣΚΟΠΟΣ	39
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
1. Φυτικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας	40
2. Αντιδραστήρια και υλικά	40
3. Απομόνωση και διαχωρισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών	40
4. Ποιοτικός προσδιορισμών χρωστικών	41
5. Ποσοτικός προσδιορισμός χρωστικών	42
6. Μετατροπή χλωροφυλλών σε φαιοφυτίνες	43
7. Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών	43
8. Απομόνωση και διαχωρισμός συμπλόκων της φωτοσυλλεκτικής κεραίας	43
9. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης και ποιοτικός έλεγχος του LHCII	44
10. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	45
11. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	45

12. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φωτοσυνθετικών χρωστικών των συμπλόκων της κεραίας με HPLC ανάλυση	47
13. Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού	48
13.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις απορρόφησης φωτοσυνθετικών χρωστικών	48
13.2 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις απορρόφησης χλωροφυλλίνης	49
13.3 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις απορρόφησης LHCb συμπλόκων	49
14. Φασματοσκοπία φθορισμού	49
14.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις φθορισμού χλωροφυλλών	49
14.2 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις φθορισμού χλωροφυλλίνης	50
14.3 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις φθορισμού LHCb συμπλόκων	50
15. Φασματοσκοπία Raman	51
15.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις Raman χλωροφυλλών	51
15.2 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις Raman χλωροφυλλίνης	51
15.3 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις Raman LHCb συμπλόκων	52
16. Παρασκευή λιποσωμάτων και πρωτεολιποσωμάτων για μετρήσεις αγωγιμότητας	52
16.1 Παρασκευή προσχηματισμένων λιποσωμάτων μιας λιπιδικής διπλοστιβάδας	53
16.2 Ενσωμάτωση των LHCb συμπλόκων στα λιποσώματα	54
16.3 Απομάκρυνση της ελεύθερης χρωστικής από το διάλυμα των λιποσωμάτων (και πρωτεολιποσωμάτων) με χρωματογραφία μοριακής διήθησης	57
17. Μετρήσεις αγωγιμότητας	59
18. <i>In silico</i> ανάλυση της δομής των συμπλόκων της κεραίας	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	60
Χημικοί δεσμοί οξοφορβινών και μεταλλοπορφυρινών με πολυαμίνες - Η αξονική πρόσδεση των πολυαμινών στις χλωροφύλλες τροποποιεί την ικανότητα συλλογής φωτός και απόσβεσης του φθορισμού τους	
Εισαγωγή	61
Αποτελέσματα	64
1. Επίδραση ΠΑς στην Q περιοχή των φασμάτων των Chl a και b	64
2. Επίδραση ΠΑς στην Q περιοχή των φασμάτων των Pheo a και b	68
3. Φάσματα διαφοράς απορρόφησης	70
4. Φασματοσκοπικές ιδιότητες της αξονικής πρόσδεσης	73
4.1 Από τον 5 ^ο δεσμό συναρμογής στον 6 ^ο	73
4.2 Από τον 6 ^ο δεσμό συναρμογής στον 5 ^ο	75
5. Αλλαγή της κατάστασης συναρμογής με τη χρήση φασματοσκοπίας Raman	76
6. Επίδραση ΠΑς στις φασματοσκοπικές ιδιότητες της χλωροφυλλίνης	79
6.1 Επίδραση ΠΑς στην απορρόφηση της SCC	79
6.2 Επίδραση ΠΑς στο φθορισμό της SCC	83
6.3 Επίδραση ΠΑς στα φάσματα Raman της SCC	84
Συζήτηση	87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	96
Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και πιθανά κέντρα απόσβεσης της ενέργειας στο LHCII από τις πολυαμίνες - Οι πολυαμίνες επάγουν τη συσσωμάτωση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII και την απόσβεση του φθορισμού της.	
Εισαγωγή	97
Αποτελέσματα	99
1. Χαρακτηρισμός απομονωμένων συμπλόκων της φωτοσυλλεκτικής κεραίας	99
2. Επίδραση ΠΑΣ στις φασματοσκοπικές ιδιότητες του LHCII	101
3. Επίδραση πρωτονίων (H ⁺) στις φασματοσκοπικές ιδιότητες του LHCII	104
4. Φθορισμός στα 77K κατά τη συσσωμάτωση του LHCII	105
5. Επίδραση ΠΑΣ στο φθορισμό των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας σε διαφορετικά pH	106
6. <i>In silico</i> μελέτη της κατανομής φορτίου στην επιφάνεια των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας	109
7. Επίδραση Spm στα φάσματα Raman του LHCII	110
8. Επίδραση ξανθοφυλλών στο φθορισμό των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας σε διαφορετικά pH	114
9. Συνδυαστική δράση ξανθοφυλλών και Spm στο φθορισμό των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας	117
Συζήτηση	120
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	127
Ενσωμάτωση των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων σε λιποσώματα και μετρήσεις αγωγιμότητας σε πρωτόνια - Η Spm ρυθμίζει τη δίοδο των πρωτονίων διαμέσου του LHCII άμεσα και έμμεσα, μέσω της συσσωμάτωσής του	
Εισαγωγή	128
Αποτελέσματα	131
1. Παρακολούθηση πρωτονιοκινητικής δύναμης στα λιποσώματα	131
2. Μετρήσεις διαπερατότητας των πρωτεολιποσωμάτων σε πρωτόνια	133
3. Επίδραση κατάστασης συσσωμάτωσης του LHCII στην διαπερατότητα των πρωτεολιποσωμάτων	136
4. Επίδραση Spm στην διαπερατότητα των πρωτεολιποσωμάτων	137
5. Μετρήσεις διαπερατότητας πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προεπωασμένα με Spm	140
Συζήτηση	145
Εν κατακλείδι	151
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	154

Συντομογραφίες

Ac	Acetone
Chl	Chlorophyll
EtOH	Ethanol
H ⁺	Proton
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
LHC	Light harvesting complex
LHCII	Major (trimeric) antenna complex of PSII
LHCbs	Antenna polypeptides of PSII
Lut	Lutein
MeOH	Methanol
NPQ	Non-Photochemical Quenching
Nx	Neoxanthin
Pheo	Pheophytin
PSII	Photosystem II
PTS	8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt
Put	Putrescine
Py	Pyridine
qE	Energy quenching
SCC	Sodium Copper Chlorophyllin
Spd	Spermidine
Spm	Spermine
Tricine	N-(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycine
Val	Valinomycin
Vx	Violaxanthin
Zx	Zeaxanthin
β-DM	dodecyl-β-D-maltoside
ΔpH	Transthylakoid proton gradient
ΠΑ	Πολυαμίνη

Περίληψη

Η φωτοσυλλεκτική κεραία του φωτοσυστήματος II (LHCII) των φυτών λειτουργεί όχι μόνο απορροφώντας και μεταφέροντας την ηλιακή ενέργεια στα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυστήματος II (PSII), αλλά και προστατεύοντάς τα από την περίσσεια πίεση διέγερσης. Υπό συνθήκες υψηλού φωτισμού, το LHCII διαχέει την περίσσεια φωτονιακή ενέργεια ακίνδυνα στο περιβάλλον ως θερμότητα, μέσω του μηχανισμού της μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας (NPQ) (Horton et al. 1994). Ο ακριβής μοριακός μηχανισμός του συντελεστή q_E του NPQ, που επάγεται αστραπιαία όταν αυξάνεται το ΔpH κατά μήκος της μεμβράνης των θυλακοειδών παραμένει άγνωστος. Η επικρατούσα θεωρία υποστηρίζει τη δημιουργία κάποιου κέντρου διάχυσης της ενέργειας από την αλληλεπίδραση κάποιας χλωροφύλλης (Chl) με κάποια ξανθοφύλλη που προκύπτει από την επαγόμενη από το ΔpH αλλαγή της οργάνωσης των χρωστικών σε κάποιο τριμερές ή μονομερές σύμπλοκο του LHCII (Ahn et al. 2008, Horton et al. 2000, Pascal et al. 2005, Ruban et al. 2007). Η παρούσα εργασία εστιάζεται στη μελέτη του ρόλου των πολυαμινών (ΠΑΣ) στο μηχανισμό του q_E . Οι τρεις κύριες ΠΑΣ (πουτρεσίνη, Put, σπερμιδίνη, Spd και σπερμίνη, Spm) εντοπίζονται *in vivo* στο χλωροπλάστη προσδεμένες στο LHCII (Navakoudis et al., 2007) ενώ σε συνθήκες υψηλού φωτισμού συσσωρεύονται στο μικροχώρο (Ioannidis et al., 2012). Για τη σταδιακή εστίαση στο μηχανισμό υιοθετήθηκε μια *in vitro* βιοενεργητική πειραματική προσέγγιση από-το-ειδικό-στο-γενικό. Αρχικά, μελετήθηκαν διεξοδικά οι αλληλεπιδράσεις των ΠΑΣ με απομονωμένες Chls και με το υδατοδιαλυτό ανάλογό τους, τη χλωροφυλλίνη (SCC). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι τρεις ΠΑΣ προσδένονται αξονικά μέσω των αμινομάδων τους στο Mg των Chls, αλλάζοντας την κατάσταση συναρμογής του. Παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της αξονικής πρόσδεσης της Chl b, η οποία αλληλεπιδρά με τη Spm με ξεχωριστό τρόπο. Η Spm επάγει αντιστρεπτές αυξομειώσεις στα επίπεδα του φθορισμού της Chl b στα 661nm. Αμινικοί υποκαταστάτες όπως η Spm μπορούν να μετακινήσουν την ισορροπία της Chl b από μια διαμόρφωση διάχυσης της ενέργειας σε μια Pheo-like διαμόρφωση (μεγάλης εκπομπής φθορισμού) ή και το αντίθετο. Η πρόσδεση της Spm στο Mg της Chl b φαίνεται να περιλαμβάνει τις ιμινομάδες του μορίου της, καθώς πειράματα με την SCC ανέδειξαν τον εξαρτώμενο από το βαθμό πρωτονίωσής τους χαρακτήρα της αλληλεπίδρασης. Επιπλέον, νέα φασματοσκοπικά δεδομένα προέκυψαν για την προέλευση του ΔA535 που σχετίζεται βιβλιογραφικά με την επαγωγή του q_E . Έπειτα, μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των ΠΑΣ με απομονωμένα και

λειτουργικά φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα της κεραίας του PSII. Οι ΠΑς βρέθηκε ότι επάγουν την απόσβεση του φθορισμού τόσο των τριμερών LHCP όσο και των μονομερών LHCB συμπλόκων σε φυσιολογικές τιμές pH, μιμούμενες τη δράση των πρωτονίων. Η απόσβεση του φθορισμού του LHCP από τη Spm συμβαίνει ταχύτατα μέσω της σάρωσης των αρνητικών φορτίων στην επιφάνειά του και στη συνέχεια σχηματίζονται μεγάλα συσσωματώματα. Η συσσωμάτωση που επάγεται από τη Spm οδηγεί στη διαμόρφωση διάχυσης της ενέργειας του LHCP που απαντάται κατά την ενεργοποίηση του qE, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας Raman. Όλα τα παραπάνω δείχνουν πως οι αμίνες, άμεσα (ως υποκαταστάτες του Mg) ή/και έμμεσα (μέσω της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνικών συμπλόκων) οδηγούν στην μετατόπιση του Mg μιας Chl εντός του τετραπυρρολικού δακτυλίου της, αποσβένοντας την ενέργεια. Μάλιστα, μετά από *in silico* μελέτη των δομών της κεραίας υποδεικνύεται ως πιθανότερη υποψήφια για αυτόν τον ρόλο η Chl 8. Στο τρίτο μέρος της διατριβής, τα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα ενσωματώθηκαν σε λιποσώματα σε μια προσπάθεια μελέτης τους σε ένα περιβάλλον που προσομοιώνει τις *in vivo* συνθήκες. Μελέτες αγωγιμότητας των πρωτεολιποσωμάτων σε πρωτόνια έδειξαν ότι τόσο τα τριμερή, όσο και τα μονομερή σύμπλοκα της κεραίας αυξάνουν τη διαπερατότητα τους όταν βρίσκονται στις μεμβράνες υπό μερική συσσωμάτωση. Η Spm επάγει τη μερική συσσωμάτωση των LHCP συμπλόκων που όταν ενσωματωθούν σε λιποσώματα αυξάνουν τη μη-ειδική μεταφορά των πρωτονίων, ενώ αντίθετα η προσθήκη Spm σε ήδη ενσωματωμένα σύμπλοκα βρέθηκε να μειώνει την αγωγιμότητά τους, υποδεικνύοντας την ύπαρξη και ειδικής μεταφοράς. Όλα τα παραπάνω επιτρέπουν να προταθεί ένα μοντέλο φωτοπροστασίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από τη Spm.

Abstract

The plant light-harvesting complex of photosystem II (LHCII) functions not only to absorb and deliver solar energy to the photosystem II (PSII) reaction centers, but also to protect them from overexcitation. LHCII dissipates excess solar energy as thermal energy under high light conditions, in a process that is referred to as non-photochemical quenching (NPQ) (Horton et al., 1994). The molecular mechanism of high energy quenching (qE), the rapidly inducible and reversible component of NPQ which is triggered when ΔpH across the thylakoid membrane is increased, remains unresolved. The predominant hypothesis claims that an energy quenching center is formed from the interaction between specific xanthophyll and chlorophyll (Chl) molecules due to the ΔpH -induced changes in internal pigment organization of trimeric or monomeric proteins of LHCII (Horton et al., 2000; Pascal et al., 2005; Ruban et al., 2007; Ahn et al., 2008). This work is focused on the role of polyamines (PAs) in qE. The main PAs (putrescine, Put, spermidine, Spd and spermine, Spm) are found *in vivo* in chloroplast and bound to LHCII (Navakoudis et al., 2007), while upon illumination they accumulate in lumen (Ioannidis et al., 2012). In order to gradually focus on the mechanism *in vitro* a bottom-up bioenergetic approach was adopted. Initially, it was tested in detail the mode of interaction of all three PAs with isolated Chls as well as with their water-soluble analogue chlorophyllin (SCC). The results showed that all three PAs bind to the Mg ion of Chls and shift their coordination-state equilibrium. For the first time, spectroscopic data are presented for the axial ligation of Chl b. The coordination of Spm with Chl b has the most interesting features from all pigments tested. Spm induces reversible increases and decreases of the fluorescence yield of Chl b at about 661nm. Interestingly, equilibrium between a high-fluorescence yield conformation and a low yield is feasible by the interaction of Chl b and aminic ligands. Most probably Spm binds axially to the Mg of Chl b *via* its imino groups, as revealed by experiments with SCC showing that the mode of interaction is dependent upon their protonation state. Furthermore, new absorption data for the diagnostic region of 535nm, related to qE, are provided and discussed. Then, the interaction of PAs with isolated and purified complexes of the PSII antenna was studied. At physiological pH, PAs stimulate fluorescence quenching of both trimeric LHCII and monomeric LHCb complexes, mimicking the action of protons. Spm was the most potent quencher and induced aggregation of LHCII trimers, due to its highly cationic character. It seems that the mechanism of Spm-induced aggregation comprises a surface charge screening of LHCII until larger aggregates

are formed. Spm-induced and qE-induced LHCII aggregation results in the same conformation as revealed by Raman spectroscopy. A possible interpretation of these results is that amines or/and amine-induced aggregation lead to deeper insertion of the Mg in the macrocycle and this quenches fluorescence of one Chl creating a sink that quenches the fluorescence of the LHCII. A putative site of this mechanism could be the domain that ligates Chl8 of LHCII, as it was shown by *in silico* analysis that it has similar structure to the domain of heme in myoglobin that modulates the positioning of the metal in heme. In the third part of this work, the antenna complexes were reconstituted into proteoliposomes in an attempt to mimic *in vitro* their *in vivo* conditions. Conductivity measurements showed that both monomeric and trimeric complexes increased the membrane permeability to protons when in a partly aggregated state. The Spm-induced aggregation of LHCII within the lipid phase was found to increase the non-specific proton permeation across the membrane. On the other hand, addition of Spm to already incorporated complexes reduced their permeability, indicating that LHCII may also serve as a specific channel to protons. All in all, a new model for the photoprotection of the photosynthetic apparatus by Spm is discussed.

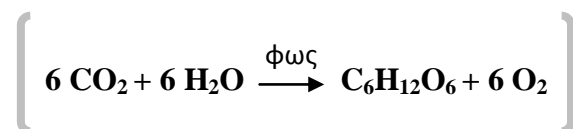
Εισαγωγή

1. Φωτοσύνθεση

1.1 Γενικά

Περίπου πριν από 4 δισ χρόνια, στο ξεκίνημα της ζωής στη γη, ο πλανήτης βρισκόταν σε μια χαμηλή οξειδο-αναγωγική κατάσταση και επικρατούσαν αναερόβιες συνθήκες. Η ατμόσφαιρα ήταν πλούσια σε άζωτο, ελεύθερο (N₂) ή με τη μορφή αμμωνίας (NH₃), άνθρακα με τη μορφή μονοξειδίου (CO) ή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και οξυγόνο ως νερό (H₂O) (Bendall et al. 2008). Η επιφάνεια ήταν καλυμμένη με νερό και τα ορυκτά και τα μεταλλικά ιόντα βρίσκονταν και αυτά σε ανηγμένες μορφές χαμηλού χημικού σθένους. Αυτές οι συνθήκες δεν ευνοούσαν την ανάπτυξη και τη διατήρηση της ζωής στη γη. Όλα αυτά άλλαξαν δραστικά με την έναρξη της οξυγονικής φωτοσύνθεσης, που έχει χαρακτηριστεί ως η μεγάλη έκρηξη της εξέλιξης (big bang of evolution) (Barber 2004). Η οξυγονική φωτοσύνθεση παρέχει ελεύθερο οξυγόνο, έναν οξειδωτικό παράγοντα, στην ατμόσφαιρα, ως παραπροϊόν της αντίδρασης που καταλύεται από το φως και χρησιμοποιεί CO₂ και H₂O για να παράξει οργανική ύλη, όπως σάκχαρα (Εικόνα 1). Έτσι, η οξειδο-αναγωγική κατάσταση του συστήματος γη/ατμόσφαιρα συνέχισε να αυξάνει και σήμερα βρίσκεται σε μια στατική κατάσταση μεταξύ οξείδωσης και αναγωγής και φυσικά αερόβιες συνθήκες.

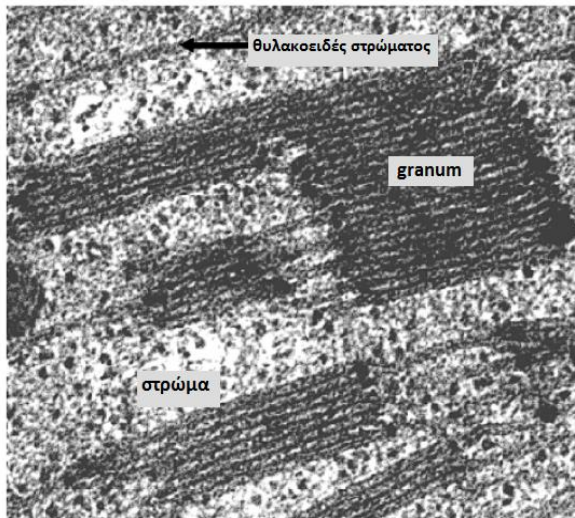
Η φωτοσύνθεση αναμφισβήτητα αποτελεί την πιο εντυπωσιακή και σημαντική διαδικασία της φύσης, καθώς είναι υπεύθυνη για τη συνεχή ροή ενέργειας από τον ήλιο στη βιόσφαιρα για πάνω από 2.2 δισ χρόνια (Line 2002). Σχεδόν όλη η ελεύθερη ενέργεια που καταναλώνεται από τα βιολογικά συστήματα πηγάζει από την ηλιακή ενέργεια που δεσμεύεται και αποθηκεύεται ως χημική ενέργεια από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς μέσω της φωτοσύνθεσης. Δηλαδή, οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί αποτελούν τη βάση της τροφικής πυραμίδας τόσο στα υδατικά, όσο και στα χερσαία οικοσυστήματα. Το ποσό της ελεύθερης ενέργειας που αποθηκεύεται μέσω της φωτοσύνθεσης είναι αστρονομικό και φτάνει τα



Εικόνα 1. Η εξίσωση της φωτοσύνθεσης. Το νερό και το διοξείδιο του άνθρακα ενώνονται για την παραγωγή υδατανθράκων και μοριακού οξυγόνου.

10^{17} Kcal κάθε χρόνο, ποσότητα που αντιστοιχεί στη μετατροπή περισσότερων από 10^{10} τόνων άνθρακα σε υδατάνθρακα και άλλες μορφές οργανικής ύλης (Berg et al. 2002).

1.2 Η φωτοσυνθετική διαδικασία

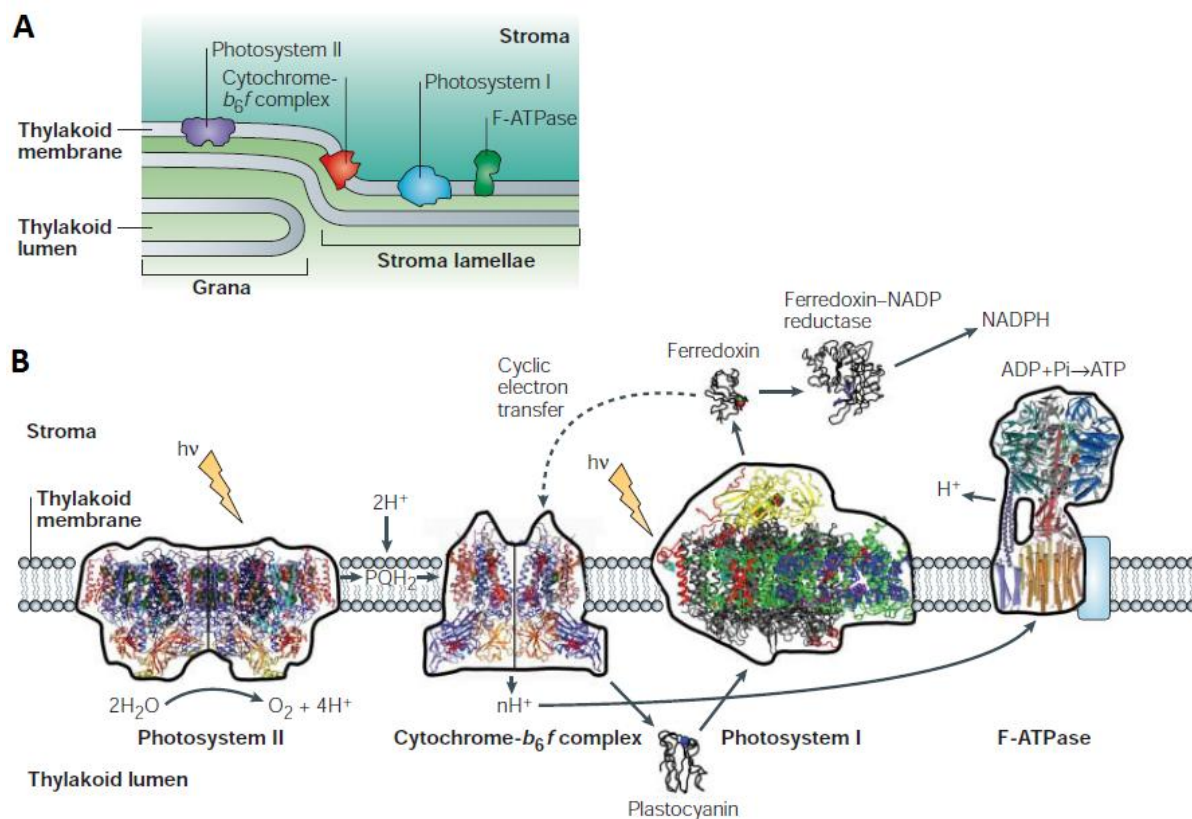


Εικόνα 2. Grana σε χλωροπλάστη.

Χωροταξικά, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός των φυτών, που μετατρέπει την ηλιακή σε χημική ενέργεια, εντοπίζεται μέσα σε ειδικά οργανίδια των φυτικών κυττάρων, τους χλωροπλάστες. Αυτοί έχουν συνήθως μήκος $5\mu\text{m}$ 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 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 (Εικόνα 2). Οι μεμβράνες των θυλακοειδών περιέχουν τον μηχανισμό μεταγωγής της ενέργειας. Εκεί βρίσκονται οι φωτοσυνθετικές μονάδες που αποτελούνται από σύμπλοκα πρωτεϊνών και φωτοσυνθετικών χρωστικών.

Μια φωτοσυνθετική μονάδα αποτελείται από τρία σύμπλοκα χρωστικών/ πρωτεϊνών: το φωτοσύστημα II (PSII), με το σύμπλοκο συλλογής φωτός (Light Harvesting Complex, LHCI), το φωτοσύστημα I (PSI), με το αντίστοιχο σύμπλοκο συλλογής φωτός, LHCI, το κυτόχρωμα b_6/f (cyt b_6/f) και την συνθάση του ATP (ATPase) (Εικόνα 3). Τα παραπάνω είναι άνισα κατανομημένα 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 PSII εντοπίζεται κυρίως στις στοιβαγμένες περιοχές. Το cyt b

b_6/f είναι ισότιμα κατανομημένο και στις δύο περιοχές. Παρόλα αυτά, τα φωτοσυνθετικά αυτά σύμπλοκα λειτουργούν συντονισμένα, σαν μια μονάδα.



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής των τεσσάρων πρωτεϊνικών συμπλόκων στις θυλακοειδείς μεμβράνες του χλωροπλάστη (A) και η δομή τους (B). Παρουσιάζεται επίσης η δομή κάποιων πομπών και δεκτών ηλεκτρονίων (όπως η πλαστοκυανίνη και η φερρεδοξίνη) καθώς και τα κύρια μονοπάτια μεταφοράς των ηλεκτρονίων και των πρωτονίων (Nelson and Ben-Shem 2004).

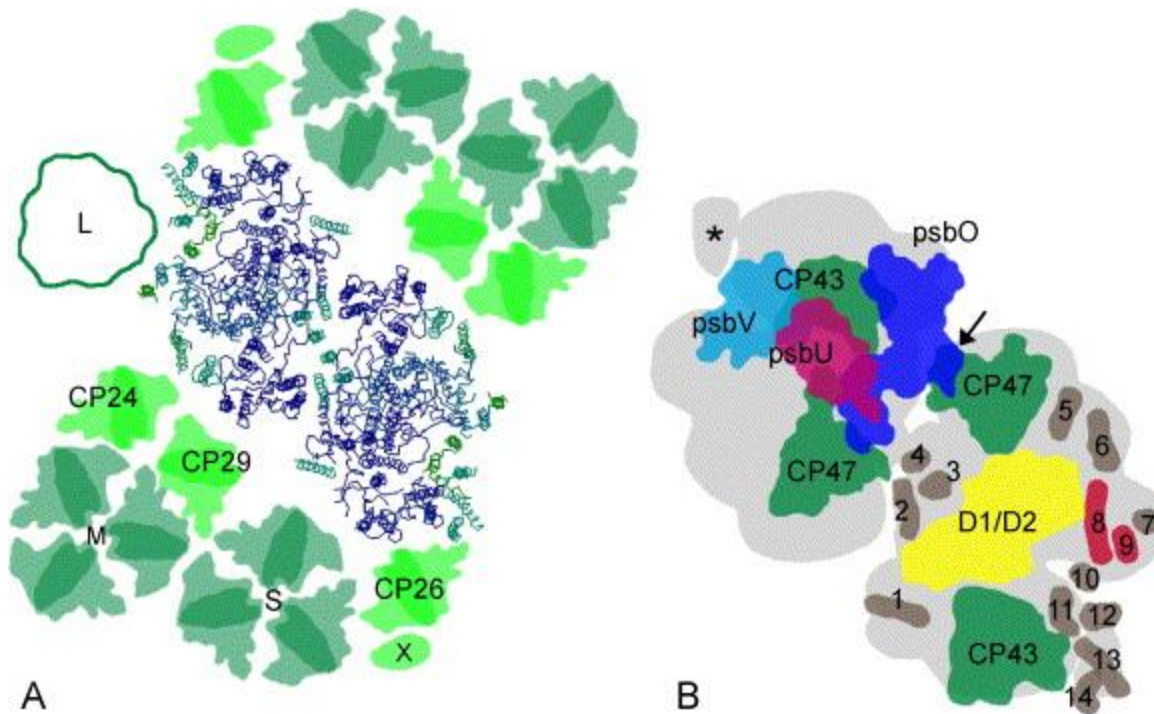
Σε γενικές γραμμές, η φωτοσύνθεση ξεκινά με την απορρόφηση φωτός από τις φωτοσυλλεκτικές κεραίες των φωτοσυστημάτων που οδηγούν την ενέργεια στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων. Στο PSII, η διέγερση της P680, ενός ειδικού ζεύγους μορίων χλωροφύλλης, οδηγεί στη μεταφορά ηλεκτρονίου στην πλαστοκινίνη. Το κέντρο αντίδρασης επανακτά τα ηλεκτρόνια του από το νερό μέσω ενός μηχανισμού που θα αναφερθεί πιο αναλυτικά στη συνέχεια. Η πλαστοκινίνη που ανάγεται από το PSII επανοξειδώνεται από το Cyt b_6/f , το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια προς την πλαστοκυανίνη, μια διαλυτή πρωτεΐνη χαλκού. Από την πλαστοκυανίνη τα ηλεκτρόνια εισέρχονται στο PSI, όπου η διέγερση ενός ειδικού ζεύγους χλωροφυλλών P700 απελευθερώνει ηλεκτρόνια τα οποία ρέουν προς τη φερρεδοξίνη (ferredoxin, Fd), ένα ισχυρό αναγωγικό μέσον. Η αναγωγή του ζεύγους $Fd-NADP^+$, μια φλαβινοπρωτεΐνη που βρίσκεται στη στρωματική πλευρά της μεμβράνης, καταλύει τότε την αναγωγή του $NADP^+$ σε NADPH (Εικόνα 3). Αυτή η ροή ηλεκτρονίων, που μόλις περιγράφηκε, είναι συζευγμένη

με τη μετάθεση H^+ από το στρώμα στο μικροχώρο και την εγκαθίδρυση ηλεκτροχημικού δυναμικού H^+ , που ονομάζεται proton motive force (pmf) και οδηγεί, βάσει της χημειωσμοτικής θεωρίας, στην ενδόεργη σύνθεση ATP μέσω της ATP συνθάσης. Τα NADPH και ATP, που παράγονται κατά τις φωτεινές αυτές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης, αξιοποιούνται στο στάδιο των σκοτεινών αντιδράσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν την αναγωγή του CO_2 και τη σύνθεση των υδατανθράκων.

1.3 Το φωτοσύστημα II και το σύμπλοκο συλλογής φωτός του (LHCII)

Το φωτοσύστημα II (PSII) είναι ένα μεγάλο διαμεμβρανικό υπερ-σύμπλοκο χρωστικών/πρωτεϊνών που εντοπίζεται στις θυλακοειδείς μεμβράνες φυτών, φυκιών και κυανοβακτηρίων και λειτουργεί ως οξειδοαναγωγάση νερού-πλαστοκινόνης. Το PSII παράγει το θετικότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό στη φύση και έτσι μπορεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από το νερό (Nelson 2011). Χρησιμοποιεί την ηλιακή ενέργεια για να διασπάσει το νερό σε μοριακό οξυγόνο, πρωτόνια και ηλεκτρόνια. Στα ανώτερα φυτά, αποτελείται από τον πυρήνα του PSII (PSII core) και το σύμπλοκο συλλογής φωτός του PSII (Light Harvesting Complex II, LHCII) (Εικόνα 4).

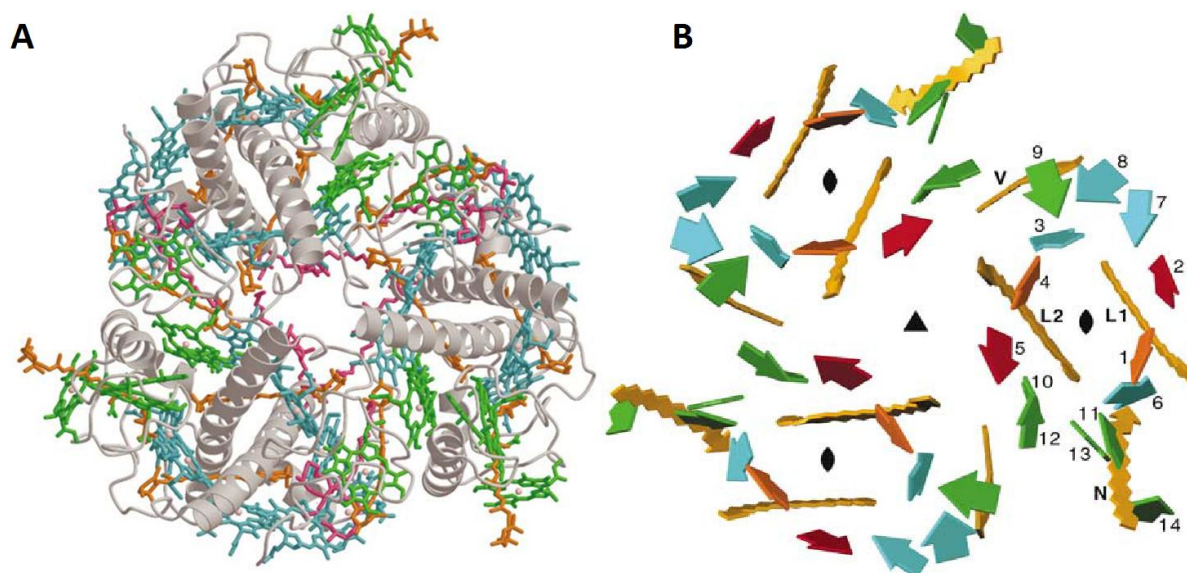
Ο πυρήνας του PSII (PSII core) είναι ένα διμερές μοριακού βάρους 700 kD (Barber 2008), που παρουσιάζει ψευδοσυμμετρία δεύτερης τάξης και έχει ύψος 105 Å (45 Å μέσα στη μεμβράνη), μήκος 205 Å και πλάτος 110 Å (Ferreira et al. 2004). Αποτελείται από το κέντρο αντίδρασης (Reaction Centre, RC) και από δύο εσωτερικά φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα, τις πρωτεΐνες CP43 (PsbC) και CP47 (PsbB), που προσδένουν ως συμπαράγοντες 14 και 16 χλωροφύλλες a, αντίστοιχα. Αυτές μεταφέρουν την ενέργεια που απορροφάται από τις εξωτερικές φωτοσυλλεκτικές κεραίες στα κέντρα αντίδρασης. Το κέντρο αντίδρασης του PSII αποτελείται από δύο παρόμοιες πρωτεΐνες, τις D1(PsbA) και D2 (PsbD), με 5 διαμεμβρανικές έλικες η καθεμία. Επάνω τους βρίσκεται το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (Oxygen Evolving Complex, OEC) καθώς και όλοι οι συμπαράγοντες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Hankamer et al. 2001; Biesiadka et al. 2004; Ferreira et al. 2004; Loll et al. 2005). Για την οξείδωση δύο μορίων νερού προς παραγωγή ενός μορίου οξυγόνου από το μηχανισμό έκλυσης οξυγόνου στο PSII, απαιτείται η ενέργεια 4 φωτονίων. Αυτά απορροφούνται από τις εξωτερικές, περιφερειακές φωτοσυλλεκτικές κεραίες του PSII, τα LHC σύμπλοκα.



Εικόνα 4. Α. Άποψη του υπερσυμπλόκου $C_2S_2M_2$ βασισμένη σε Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των PSII-LHCII υπερσυμπλόκων του σπανακιού. Ως S, M και L χαρακτηρίζονται τα ισχυρά, μέτρια και χαλαρά προσδεμένα τριμερή σύμπλοκα, αντίστοιχα. Στο κέντρο αναπαριστάται ο πρωτεϊνικός σκελετός στο εσωτερικό της μεμβράνης, ενώ ανάμεσα από τον διμερή πυρήνα και τα τριμερή LHCII εντοπίζονται τα μονομερή σύμπλοκα CP29, CP26 και CP24. Β. Τα μέρη του PSII στο εσωτερικό της μεμβράνης (δεξιά) και τα εκτεθειμένα στο μικροχώρο (αριστερά). Με γκρι οριοθετείται η έκταση του πυρήνα ενώ κάθε αριθμός αντιστοιχεί σε κάποια εκ των 14 διαμεμβρανικών α -ελίκων του (Dekker and Boekema 2005).

Τα LHCs ανήκουν σε μια μεγάλη ομάδα μεμβρανικών πρωτεϊνών που απαντώνται στο χλωροπλάστη 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* υπερικογένειας γονιδίων που περιλαμβάνει τουλάχιστον 30 ομόλογα γονίδια στην *Arabidopsis* (Jansson 1999). Τα LHCs χωρίζονται σε δύο ομάδες: τα τρία πολυπεπίδια του κύριου (τριμερούς) LHCII (LHCII), *Lhcb1*, *Lhcb2* και *Lhcb3*, αλλά και τα μονομερή σύμπλοκα του ονομαζόμενου δευτερεύοντος LHCII, γνωστά ως CP24, CP26 και CP29, τα οποία προέρχονται από τα γονιδιακά προϊόντα *Lhcb6*, *Lhcb5* και *Lhcb4* αντίστοιχα (Peter and Thornber 1991; 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 PSII *PsbS* (Kim et al. 1992, Wedell et al. 1992), το οποίο στην ώριμη μορφή του παρουσιάζει μόνο 15% ομοιότητα με το *Lhcb1*. Το LHCII, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας κωδικοποιείται στον πυρήνα (Kung et al. 1972).

Στη μεμβράνη των θυλακοειδών το LHCIΙ 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 (Hobe et al. 1995) ότι το μοτίβο WYGPDR που ενυπάρχει στο LHCIΙ και στο CP26, 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 LHCIΙ στη θυλακοειδή μεμβράνη να είναι μηδαμινή, ενώ η κατάσταση των μερών του δευτερεύοντος LHCIΙ 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 LHCIΙ/PSII διατηρείται (Ruban et al. 2003). Γενικά, κάθε διμερές πυρήνας του PSII, προσδένει δύο αντίγραφα των CP29 και CP26 καθώς και ένα τριμερές LHCIΙ ισχυρά προσδεδεμένο (S-trimer) με αποτέλεσμα τη δημιουργία του επονομαζόμενου C₂S₂ υπερσυμπλόκου (Boekema et al. 1995). Στο υπερσύμπλοκο αυτό μπορεί να προσδεθούν επιπλέον δύο CP24 και δύο τριμερή LHCIΙ με μέτρια ισχύ πρόσδεσης (M-trimers) προς σχηματισμό του μεγαλύτερου υπερσυμπλόκου C₂S₂M₂ που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4A (Boekema et al. 1998). Σε αυτήν την κύρια δομή, τέλος, έχει βρεθεί ότι μπορεί να



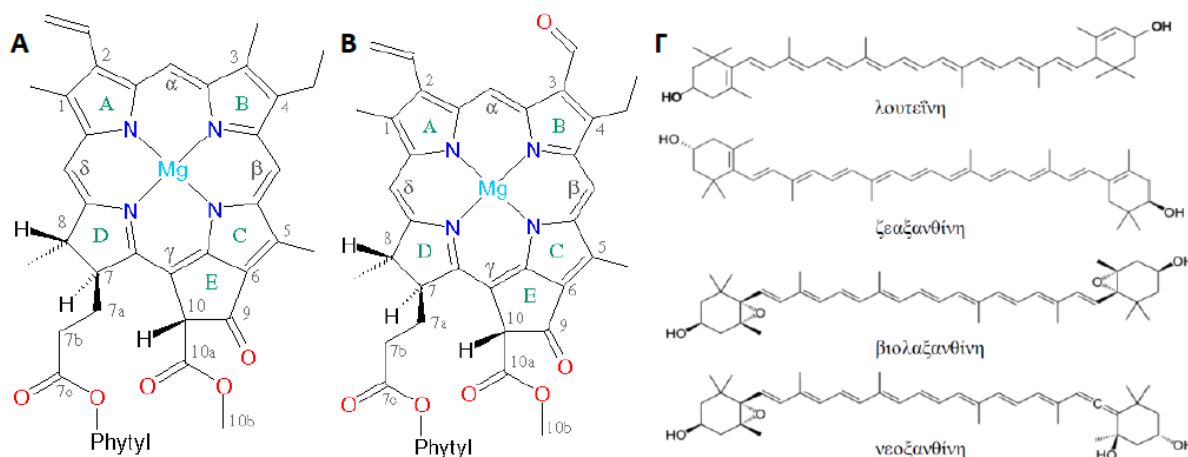
Εικόνα 5. Δομή του LHCIΙ: Το τριμερές σύμπλοκο όπως φαίνεται από την πλευρά του στρώματος. Γκρι: πολυπεπτίδιο, κυανό: χλωροφύλλη a, πράσινο: χλωροφύλλη b, σκούρο πορτοκαλί: λουτεΐνη, ανοιχτό πορτοκαλί: νεοξανθίνη, κίτρινο: βιολαξανθίνη, ροζ: λιπίδιο B. Ο προσανατολισμός των χλωροφυλλών (1-14) και των ξανθοφυλλών του τριμερούς LHCIΙ όπως φαίνονται από την πλευρά του στρώματος. L: λουτεΐνη, N: νεοξανθίνη, V: βιολαξανθίνη (Standfuss et al. 2005).

προσδεθούν ασθενώς τρία ή τέσσερα ακόμα τριμερή (L-trimers) (Boekema et al. 1999; Dekker et al. 1999). Η μεταφορά ενέργειας από τα τριμερή LHCII στα CP43/CP47 και στις D1/D2 γίνεται μέσω των μονομερών LHC συμπλόκων (CP29, CP26 και CP24) που βρίσκονται μεταξύ των τριμερών συμπλόκων και του διμερούς πυρήνα του PSII (Εικόνα 4).

Πίνακας 1. Σύσταση σε χρωστικές των μονομερών φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων του PSII.

LHC	Chl a	Chl b	Chl a/b	Lut	Nx	Vx	Chl/Car	Αναφορά
LHC II	8	6	1.33	2	1	1	3.5	Liu et al. (2004); Standfuss et al. (2005)
CP29	6	2	3	1	0.35	0.65	4	Crimi et al. (2001)
	6.8	2.0	3.4	0.9	0.6	1.2	3.3	Ruban et al. (1999)
CP26	6.2	2.8	2.2	1.02	0.61	0.38	4.5	Croce et al. (2002)
	7.5	3.0	2.5	1.2	1.0	0.9	3.4	Ruban et al. (1999)
CP24	2.7	2.3	1.17	0.54	-	0.47	5	Pagano et al. (1998)

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 LHCII 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 (Εικόνα 5). Κάθε μία εκ των Lhcb1, Lhcb2 και Lhcb3 προσδένει ως συμπαράγοντες 14 μόρια χλωροφύλλης (8 μόρια χλωροφύλλης (Chl) a και 6 μόρια Chl b), 4 μόρια τριών διαφορετικών καροτενοειδών (2 λουτεΐνες, Lut, 1 νεοξανθίνη, Nx και 1 βιολαξανθίνη, Vx) και δύο διαφορετικά λιπίδια (Liu et al. 2004; Standfuss et al. 2005). Η ακριβής σύσταση σε χρωστικές όλων των LHCb συμπλόκων φαίνεται στον Πίνακα 1, ενώ η χημική δομή των χρωστικών στην Εικόνα 6. Στο τριμερές, οι Chls εντοπίζονται σε δύο στρώματα κοντά στις δύο επιφάνειες της μεμβράνης. Πέντε μόρια Chl a και τρία Chl b συναντώνται κοντά στην περιοχή του στρώματος ενώ οι υπόλοιπες τρεις Chl a και τρεις Chl b στην πλευρά του μικροχώρου. Οι αποστάσεις μεταξύ των κέντρων δύο γειτονικών Chls κυμαίνονται μεταξύ 10Å και 13Å. Η επίσημη ονοματολογία των Chls που εντοπίζονται στις πρωτεΐνες αυτές δίνονται στον Πίνακα 2.



Εικόνα 6. Η χημική δομή (Α) της χλωροφύλλης α, (Β) της χλωροφύλλης β και (Γ) των ξανθοφυλλών που εντοπίζονται στα σύμπλοκα της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII.

Όπως υποδηλώνει το όνομά του, η πρωταρχική λειτουργία του LHCII 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 PSII και PSI στη μεμβράνη των θυλακοειδών κάτω από διαφορετικές συνθήκες φωτός (Allen 2003). Επιπλέον, το LHCII 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 LHCII είναι αυτός της φωτοπροστασίας του PSII, διαχέοντας θερμικά την περίσσεια ενέργεια υπό συνθήκες πίεσης διέγερσης μέσω του μηχανισμού της μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας (Non-Photochemical Quenching, NPQ) (Horton et al. 2005).

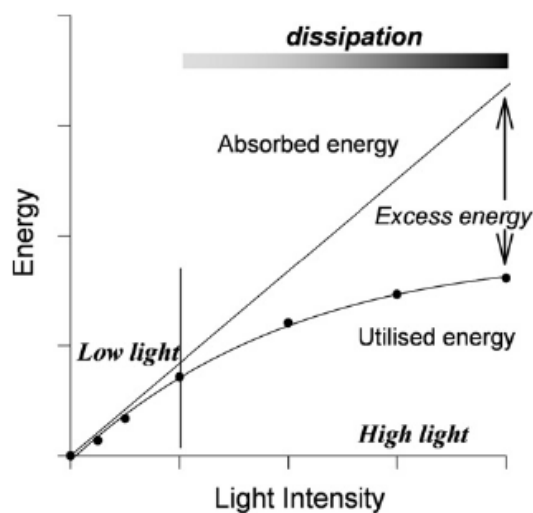
Πίνακας 2. Ονοματολογία των χλωροφυλλών του LHCII.

	Chl a								Chl b					
Standfuss et al. (2005)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Liu et al. (2004)	610	612	613	602	603	604	611	614	601	607	608	609	606	605
Kuhlbrandt et al. (1994)	a1	a2	a3	a4	a5	a6	b2	b3	-	a7	b1	b5	b6	-

1.4 Η ανάγκη για φωτοπροστασία του PSII

Η ένταση του φωτός αλλάζει διαρκώς στη διάρκεια της ημέρας, τόσο χρονικά (ως αποτέλεσμα του ημερήσιου κύκλου του φωτός ή φωτοπεριόδου) όσο και τοπικά (ως αποτέλεσμα της σκίασης από την παρουσία σύννεφων ή άλλων οργανισμών και αντικειμένων). Η συχνά προκαλούμενη έκθεση σε χαμηλής έντασης φωτισμό άσκησε ισχυρή «πίεση επιλογής» κατά την εξέλιξη των φωτοσυνθετικών οργανισμών για ένα μοριακό μηχανισμό που θα μπορούσε να αυξάνει την απόδοση της φωτοσύνθεσης κάτω από τέτοιες συνθήκες. Έτσι, απέκτησαν τα σύμπλοκα συλλογής φωτός (LHCs), όπως αυτά είναι σήμερα και περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα, με πολλές χρωστικές ενσωματωμένες, ικανές να απορροφούν και να μεταφέρουν αποτελεσματικά την ηλιακή ενέργεια στις χρωστικές των κέντρων αντίδρασης των φωτοσυστημάτων. Ωστόσο, ενώ η φωτοσυνθετικές κεραίες ωφελούν τον οργανισμό υπό συνθήκες χαμηλής έντασης φωτός, μπορούν επίσης να προκαλέσουν ζημιά σε συνθήκες υψηλού φωτισμού.

Το πρόβλημα στις υψηλές εντάσεις φωτισμού πηγάζει από τη διαφορά στο ρυθμό απορρόφησης της ενέργειας και της μεταφοράς της στα κέντρα αντίδρασης με αυτόν της πιο αργής ακολουθούμενης μεταφοράς ηλεκτρονίων. Κάτω από αυξανόμενες συνθήκες φωτισμού, τα φωτοσυνθετικά κέντρα αντίδρασης γίνονται σταδιακά κορεσμένα (κλειστά), με αποτέλεσμα τη μείωση του ποσού της ενέργειας που χρησιμοποιείται στη φωτοσύνθεση και ακολούθως τη συσσώρευση περίσσειας, εν δυνάμει καταστροφικής ενέργειας στη φωτοσυνθετική μεμβράνη (Εικόνα 7). Η περίσσεια αυτή ενέργεια οδηγεί σε φωτοαναστολή, μια διαρκή μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, συνδεδεμένη με βλάβη στο P680 (Powles 1984). Όταν η προσφορά ηλεκτρονίων στο P680 είναι λιγότερο αποτελεσματική από την οξείδωση, αυξάνεται ο χρόνος ζωής του ισχυρού οξειδωτικού P680⁺ (που έχει προέλθει από το P680 με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου). Το P680⁺ μπορεί να οξειδώσει τις κοντινότερες χρωστικές και αμινοξέα, καταλήγοντας τελικά στην



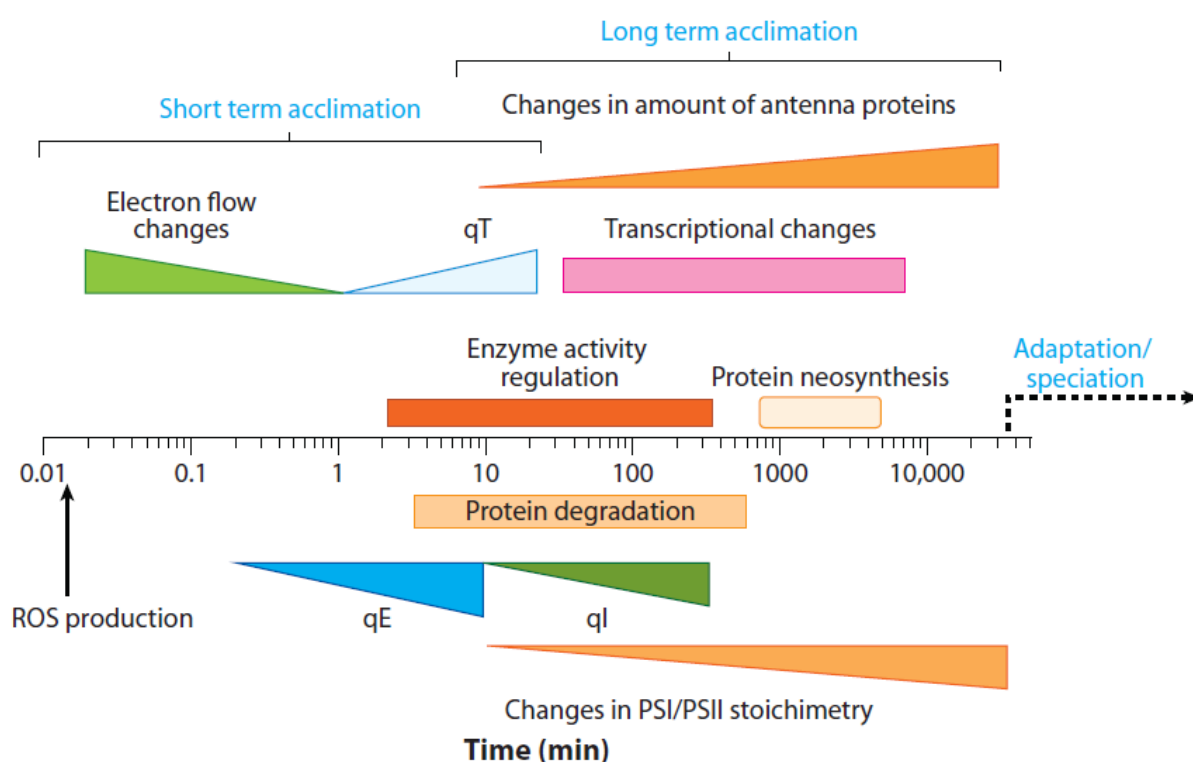
Εικόνα 7. Η ανάγκη για φωτοπροστασία του PSII. Σε κανονικές (χαμηλές) συνθήκες φωτός το ποσό της ηλιακής ενέργειας που απορροφάται ισοδυναμεί με το ποσό που χρησιμοποιείται στην φωτοχημεία. Υπό συνθήκες όμως έντονου φωτισμού, ενώ η απορρόφηση της ενέργειας συνεχίζεται αμείωτη, επέρχεται κορεσμός στη φωτοσύνθεση. Έτσι, δημιουργείται περίσσεια πίεσης διέγερσης που μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική καταστροφή της φωτοσυνθετικής μεμβράνης (Ruban et al. 2012).

αποικοδόμηση της D1 πρωτεΐνης του κέντρου αντίδρασης του PSII. Αντίστροφα, όταν αναστέλλεται η μεταφορά ηλεκτρονίων από το P680 στην οξειδωμένη πλαστοκινόνη λόγω συσσώρευσης ανηγμένης πλαστοκινόνης, μπορεί να συμβεί ανακατανομή φορτίου και σχηματισμός P680 τριπλής κατάστασης (triplet) (Telfer et al. 1990; Barber 1995). Στην κατάσταση αυτή, το P680 μπορεί να αλληλεπιδράσει με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο τριπλής κατάστασης, παράγοντας οξυγόνο απλής κατάστασης $^1\text{O}_2$ (singlet oxygen), το οποίο είναι ικανό να προξενήσει βλάβη στο P680 και να οδηγήσει και σε αυτήν την περίπτωση σε φωτοαναστολή, μειώνοντας τον αριθμό των ενεργών PSII μονάδων. Η αργή επιδιόρθωση της D1 πρωτεΐνης, η επιβράδυνση της μεταφοράς ηλεκτρονίων εξακολουθεί για αρκετές ώρες ακόμα και στο σκοτάδι ή σε χαμηλής έντασης ακτινοβολία (Ohad et al. 1984). Είναι λοιπόν έκδηλη η ανάγκη για αποφυγή της φωτοαναστολής μέσω μηχανισμών μείωσης της συσσώρευσης περίσσειας ενέργειας.

Στην πορεία της εξέλιξής τους, τα φυτά ανέπτυξαν προσαρμοστικούς μηχανισμούς για να ανταπεξέλθουν στις υψηλές εντάσεις φωτισμού. Μέσω των μηχανισμών αυτών μπορούν να ρυθμίζουν τόσο την ικανότητα απορρόφησης ηλιακής ενέργειας όσο και την μεταχείρισή της αφότου έχει ήδη παγιδευτεί. Τα φυτά αντιδρούν στις συνθήκες αυτές σε διαφορετικά επίπεδα οργάνωσης, από το επίπεδο ολόκληρου του οργανισμού μέσω μετακινήσεων των φύλλων, το κυτταρικό επίπεδο μέσω μετακινήσεων των χλωροπλαστών και τη ρύθμιση του αριθμού τους, έως και το μοριακό επίπεδο, μέσω ρύθμισης του αριθμού των χλωροφυλλών στην κεραία, κ.α. (Chow et al. 1988; Koller 1990). Οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί που συμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο είναι οι πιο σημαντικοί και αποτελούν αντικείμενο έρευνας για τα τελευταία 40 χρόνια. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, σε αυτούς που σχετίζονται με μακροπρόθεσμη προσαρμογή (εγκλιματισμός, acclimation) και στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε βραχυπρόθεσμη προσαρμογή (Εικόνα 8). Η πρώτη κατηγορία αφορά την φωτοεξαρτώμενη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης που συμβαίνει σε μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο (Anderson et al. 1988; Anderson et al. 1995; Andersson and Aro 1997; Kloppstech 1997). Ωστόσο, λόγω της αργής απόκρισης του εγκλιματισμού, η αποδοτικότητα της φωτοπροστασίας είναι μικρή, ενώ συγχρόνως ο οργανισμός σπαταλά ενέργεια και πόρους.

Αντίθετα, οι βραχυπρόθεσμοι προσαρμοστικοί μηχανισμοί ενεργοποιούν βρόγχους προστασίας μέσω αλυσίδων μοριακών γεγονότων και αποτελούν την καθεαυτό αυτορρύθμιση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Κατά τις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης, η υπερπαραγωγή ATP (και NADPH) οδηγεί στη συσσώρευση πρωτονίων

στο μικροχώρο των θυλακοειδών, που στη συνέχεια προκαλεί την αναστολή της λειτουργίας ενζύμων-κλειδιών στη μεταφορά ηλεκτρονίων (Cyt b/f και OEC του PSII) και κατ' επέκταση τη μείωση του ρυθμού μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Η φωτοσυνθετική μεμβράνη ρυθμίζει τη φωτοσυνθετική διαδικασία μέσω ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης (feed-back mechanism) που διατηρεί μια ισορροπία ανάμεσα στην παροχή ενέργειας και την μεταφορά των ηλεκτρονίων. Ωστόσο, αυτό δεν είναι αρκετό, καθώς απαιτείται μια δικλείδα ασφαλείας κατά τη μετατροπή της ενέργειας των φωτονίων σε αυτή των ηλεκτρονίων. Υπάρχει λοιπόν ένας δεύτερος ανατροφοδοτικός μηχανισμός, που σχετίζεται με τη συσσώρευση πρωτονίων στο μικροχώρο, και ρυθμίζει την πίεση διέγερσης που δέχεται το PSII από την περίσσεια φωτονίων (Wraight and Crofts 1970; Briantais et al. 1979; Weis and Berry 1987). Η διαδικασία αυτή παρακολουθείται από τη μείωση του φθορισμού της χλωροφύλλης στην φωτοσυλλεκτική κεραία του PSII κάτω από αυτές τις συνθήκες (Wraight and Crofts 1970; Briantais et al. 1979; Schreiber 1986; Genty et al. 1989) και ονομάζεται μη-φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού της χλωροφύλλης (Non-Photochemical Quenching, NPQ).



Εικόνα 8. Χρονική κλίμακα των βραχυπρόθεσμων και μακροπρόθεσμων προσαρμοστικών μηχανισμών στα ανώτερα φυτά. Στους βραχυπρόθεσμες διεργασίες συμπεριλαμβάνονται οι τρεις συντελεστές του NPQ (qE, qT και qI), η ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας και η αποικοδόμηση πρωτεϊνών. Σε μεγαλύτερους χρόνους επάγεται η γονιδιακή έκφραση και η πρωτεϊνσύνθεση συνεισφέροντας στον εγκλιματισμό σε βιοτικά και αβιοτικά ερεθίσματα (Eberhard et al. 2008).

1.5 Ο μηχανισμός NPQ

Ο μηχανισμός NPQ είναι μια ετερογενής διαδικασία, τόσο κινητικά, όσο και μηχανιστικά. Μπορεί να διαιρεθεί σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικούς συντελεστές σύμφωνα με τις κινητικές «χαλάρωσης» τους στο σκοτάδι μετά από μια περίοδο φωτισμού, καθώς και με την απόκρισή τους στους διαφορετικούς ανασταλτικούς παράγοντες. Ο πιο αργός συντελεστής του NPQ είναι ο qI που ενεργοποιείται λόγω φωτοαναστολής και εμφανίζει πολύ αργές κινητικές χαλάρωσης διάρκειας ωρών (Aro et al. 1993). Ένας δεύτερος μηχανισμός που σχηματίζεται και «χαλαρώνει» σε διάστημα δεκάδων λεπτών είναι ο λεγόμενος μηχανισμός μετακίνησης της κεραίας “state transitions” ή qT (Allen 1992). Αυτός σχετίζεται με την ανακατανομή της ενέργειας διέγερσης μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων που επάγεται σε μεταβαλλόμενες συνθήκες φωτισμού. Όταν το PSII διεγείρεται υπερβολικά, ένα μέρος του LHCI μεταφέρεται στο PSI μειώνοντας με τον τρόπο αυτό την ενέργεια που δέχεται το PSII και κατ’ επέκταση και τον κίνδυνο καταστροφής του. Ωστόσο, η ενεργοποίηση του NPQ στα ανώτερα φυτά σε υψηλές εντάσεις φωτισμού, οφείλεται κατά 80% στην ενεργοποίηση/φόρτιση της μεμβράνης των θυλακοειδών (energization quenching) ή το συντελεστή qE, που εμφανίζει κινητικές δευτερολέπτων ή λίγων λεπτών (Wraight and Crofts 1970; Krause and Weis 1991; Horton and Ruban 1992; Horton et al. 1996; 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 πρωτονιοκινητική δύναμη, pmf ($\Delta pH + \Delta \psi$), της οποίας το ωσμωτικό μέρος (ΔpH) είναι γνωστό ότι πυροδοτεί εντός δευτερολέπτων το qE και τη διαδικασία διάχυσης της ενέργειας (Horton and Ruban 1992; Horton et al. 1996; Niyogi 1999). Σε σχέση με τη διαβάθμιση των πρωτονίων, το qE εμφανίζει πιο αργές κινητικές σχηματισμού και «χαλάρωσης» (Krause 1974; Demmig et al. 1987; Horton and Ruban 1992). Η διαπίστωση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι η μεμβράνη των θυλακοειδών (πιο συγκεκριμένα ένα μέρος του PSII) υφίσταται κάποια αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωσή του με στόχο να έρθει σε μια κατάσταση φωτοπροστασίας δημιουργώντας κάποιο κέντρο απόσβεσης της ενέργειας (Krause and Weis 1991). Πειράματα επαγωγής του qE σε φύλλα και θυλακοειδή ανέδειξαν την ίδια αύξηση της απορρόφησης κοντά στα 535nm, που αποτελεί ένα σημαντικό φασματοσκοπικό δείκτη της παρακολούθησης αυτών των αλλαγών της στερεοδιαμόρφωσης, γνωστό ως ΔA535 (Krause 1974; Bilger et al. 1989; Horton et al. 1991; Noctor et al. 1993).

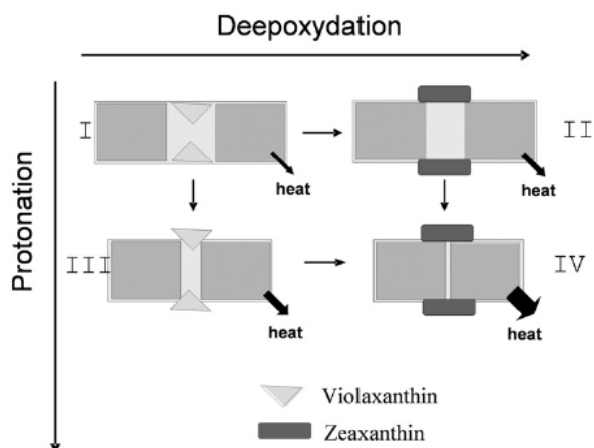
Τη δεκαετία του '80 και στις αρχές της δεκαετίας του '90 επικράτησε μια έντονη συζήτηση που αφορούσε το χώρο που λαμβάνει μέρος το qE. Η επιστημονική κοινότητα αναζητούσε ισχυρές ενδείξεις για το εάν η απόσβεση της ενέργειας λαμβάνει χώρα στο κέντρο αντίδρασης του PSII ή στο LHCI. Η απάντηση ήρθε στα τέλη της δεκαετίας του '90 οπότε και πολλά ερευνητικά στοιχεία έδειξαν ξεκάθαρα το δεύτερο (Horton et al. 1996). Το qE βρέθηκε να σχετίζεται με μια σημαντική μείωση στο φθορισμό του LHCI όταν όλα τα κέντρα αντίδρασης του PSII ήταν ανοικτά (Horton and Ruban 1993). Το qE φάνηκε επίσης να μην επηρεάζεται από το πάγωμα στους 77K και να σχετίζεται με την απόσβεση του φθορισμού κορυφών που προέρχονταν από το LHCI (Ruban et al. 1991; Ruban and Horton 1994). Δεδομένα από φύλλα που καταγράφηκαν με πειράματα φθορισμού στο χρόνο συμφωνούσαν με τα παραπάνω (Genty et al. 1992). Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι χημικά που παρεμπόδιζαν το qE, δεν επέτρεπαν σε απομονωμένα τριμερή σύμπλοκα να μεταβούν σε κατάσταση απόσβεσης της ενέργειας (Ilioaia et al. 2008). Η απόκριση του τριμερούς LHCI και του qE ήταν ίδια σε διάφορους παράγοντες, όπως η αντιμυκίνη A, τεταρτοταγείς αμίνες και το μαγνήσιο (Noctor et al. 1993; Ruban et al. 1994). Σημαντική ήταν και η ανακάλυψη πως το qE εξαρτάται από την παρουσία ξανθοφυλλών, όπως η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη, που εντοπίζονται προσδεδεδεμένες αποκλειστικά στα LHCI σύμπλοκα (Ruban et al. 1994; Niyogi et al. 2001). Έτσι, σήμερα, είναι ευρέως αποδεκτό ότι το qE λαμβάνει χώρα στην κεραία του PSII και η συζήτηση έχει μετατοπιστεί στο ακριβές μέρος της κεραίας (στο κύριο τριμερές LHCI ή σε κάποιο δευτερεύον σύμπλοκο ή και στα δύο).

Πριν από 20 περίπου χρόνια, η ομάδα του Demmig-Adams συνέδεσε για πρώτη φορά τον κύκλο των ξανθοφυλλών με το NPQ (Demmig-Adams 1990, Demmig-Adams and Adams 1992). Ο κύκλος των ξανθοφυλλών ανακαλύφθηκε από την ομάδα του Sapochnikov το 1957 (Sapochnikov et al. 1957) και οι ιδιότητές του χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά από τις ομάδες των Yamamoto και Hager (Yamamoto et al. 1962; Hager 1966). Ο κύκλος περιλαμβάνει δύο ένζυμα, την απεποξειδάση της βιολαξανθίνης και την εποξειδάση της ζεαξανθίνης που μετατρέπουν την βιολαξανθίνη σε ζεαξανθίνη και αντιστρόφως αντίστοιχα. Η μετατροπή της βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη που επάγεται σε υψηλές εντάσεις φωτός από το ΔpH ενισχύει σημαντικά το NPQ (Demmig et al. 1987; Demmig-Adams et al. 1989a, b) και επομένως έχει προταθεί πως η ζεαξανθίνη είναι η υπεύθυνη χρωστική για την απόσβεση της ενέργειας (Demmig-Adams 1990). Η απουσία της Zx βρέθηκε να αποδυναμώνει σημαντικά το qE και να μικραίνει το πλάτος ΔA535nm που μετατοπίζεται στα 525nm ενισχύοντας την παραπάνω υπόθεση (Noctor et al. 1993). Το ποσό της Zx βρέθηκε να

σχετίζεται τόσο με το qE όσο και με ένα μέρος του qI, μιας και το τελευταίο προκαλείται, όπως γνωρίζουμε σήμερα, από την διαρκή κατάσταση απόσβεσης του LHC II που ρυθμίζει αρνητικά τη λειτουργία του PS II (Baker and Horton 1987; Ruban et al. 1993).

Η εμπλοκή αυτή της Zx στο qE οδήγησε σε λεπτομερή μελέτη της σχέσης qE και ΔpH σε διαφορετικά επίπεδα Zx στη μεμβράνη των θυλακοειδών. Η ομάδα του Horton βρήκε ότι είναι δυνατή η επαγωγή του qE χωρίς Zx υπό την προϋπόθεση ότι το pH του μικροχώρου είναι κάτω από 5,0 (Rees et al. 1989; Noctor et al. 1991). Παρουσία Zx από την άλλη, το qE επάγεται σε pH 5,7-6,2, που αντιστοιχεί σε μικρότερο ΔpH της τάξης του 1,3-1,7. Έτσι, τελικά, προτάθηκε ένας ρόλος αλλοστερικού ρυθμιστή του qE για τη Zx, η οποία μάλλον επηρεάζει έμμεσα το qE ρυθμίζοντας τη συγγένεια του LHCI για πρωτόνια, παρά άμεσα, λειτουργώντας ως ο αποσβέστης της ενέργειας (Rees et al. 1992; Horton et al. 2000). Σειρά μελετών φανέρωσε πολλές φασματοσκοπικές ομοιότητες ανάμεσα στα qE με και χωρίς Zx και την απόσβεση του φθορισμού απομονωμένου LHCI σε χαμηλή συγκέντρωση απορρυπαντικού που είχε ως αποτέλεσμα τη συσσωμάτωσή του (Ruban and Horton 1992; Ruban et al. 1992b; Ruban et al. 1994; Ruban et al. 1996; Phillip et al. 1996; Ruban et al. 1997b). Έχει βρεθεί άλλωστε ότι οι πιο υδρόφοβες ξανθοφύλλες, όπως είναι η Zx ευνοούν πιο συμπυκνωμένες καταστάσεις των συμπλόκων της κεραίας σε σχέση με πιο πολικές ξανθοφύλλες, όπως η Vx (Horton et al. 1991; Ruban et al. 1994; Ruban et al. 1997a; Ruban and Horton 1999; Johnson et al. 2010). Όλα τα παραπάνω οδήγησαν την ομάδα του Horton στην υπόθεση για το μηχανισμό του qE που απαιτεί τη συσσωμάτωση του τριμερούς LHC II σε ολιγομερή (LHC II aggregation model) (Horton et al. 1991).

Το μοντέλο αυτό κάνει λόγο για τέσσερις διακριτές δομικές/λειτουργικές καταστάσεις της φωτοσυλλεκτικής κεραίας, I, II, III και IV (Εικόνα 9). Στην κατάσταση I η κεραία είναι προσαρμοσμένη στο σκοτάδι, περιέχοντας μόρια βιολαξανθίνης στην πρωτεϊνική της δομή. Η ακτινοβολία προκαλεί την απεποξείδωση της Vx σε Zx και την πρωτονίωση της κεραίας με αποτέλεσμα το σύστημα να μεταβεί στην κατάσταση απόσβεσης IV μέσω συσσωμάτωσης των συμπλόκων. Η Vx παρεμποδίζει τη συσσωμάτωση τους. Αν δεν σχηματιστεί Zx, τα σύμπλοκα θα συσσωματωθούν μερικώς και θα οδηγήσουν σε μερική απόσβεση της ενέργειας (κατάσταση III). Μετά τη χαλάρωση του qE, η κεραία συνεχίζει να περιέχει Zx και παραμένει σε κατάσταση μερικής συσσωμάτωσης και απόσβεσης (II), καθώς απαιτείται αρκετά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την εποξείδωση της Zx σε Vx από ότι για τη χαλάρωση του ΔpH. Η ρύθμιση της ευαισθησίας του qE στο ΔpH από τον κύκλο των ξανθοφυλλών είναι εξαιρετικά μεγάλης σημασίας διαδικασία. Σε υψηλές εντάσεις φωτισμού



Εικόνα 9. Το μοντέλο συσσωμάτωσης του LHCII για το NPQ (Horton et al. 1991). Σύμφωνα με αυτό υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές λειτουργικές/δομικές καταστάσεις στην κεραία, οι I, II, III και IV. Η I αντιστοιχεί στην κατάσταση της κεραίας που προκύπτει από προσαρμογή στο σκοτάδι και περιέχει μόνο Vx. Ο φωτισμός προκαλεί την απεποξείδωση της Vx και την πρωτονίωση του LHCII, διεργασίες που οδηγούν το σύστημα σε κατάσταση έντονης απόσβεσης (IV) μέσω της συσσωμάτωσής του. Αν δεν σχηματιστεί Zx τότε το LHCII συσσωματώνεται μερικώς φέροντας περιορισμένη ικανότητα απόσβεσης (III). Μετά την χαλάρωση του qE η κεραία περιέχει ακόμα Zx, επειδή η εποξειδωσή της σε Vx χρειάζεται περισσότερο χρόνο από την χαλάρωση του ΔpH και έτσι παραμένει μερικώς συσσωματωμένη και ικανή για μερική απόσβεση (II).

επιτρέπει το σχηματισμό του qE σε μη κορεσμένα επίπεδα του ΔpH, επιτρέποντας έτσι υψηλή ροή ηλεκτρονίων, ενώ σε χαμηλές εντάσεις φωτισμού ο μηχανισμός του qE είναι ανενεργός σε επίπεδα ΔpH που αρκούν για τη σύνθεση ATP. Μια άλλη σημαντική πτυχή του μοντέλου αυτού είναι ότι παραμένει το μοναδικό μοντέλο που εξηγεί τις μεγάλες διαφοροποιήσεις στα επίπεδα του NPQ που παρατηρούνται ανάμεσα στους διάφορους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, όπου έχει βρεθεί ότι ο φθορισμός της κεραίας κατά τη συσσωμάτωσή της μπορεί να μειωθεί ως και 20 φορές (Ruban and Horton 1992; Phillip et al. 1996; Ruban et al. 1996; Ruban et al. 1997b).

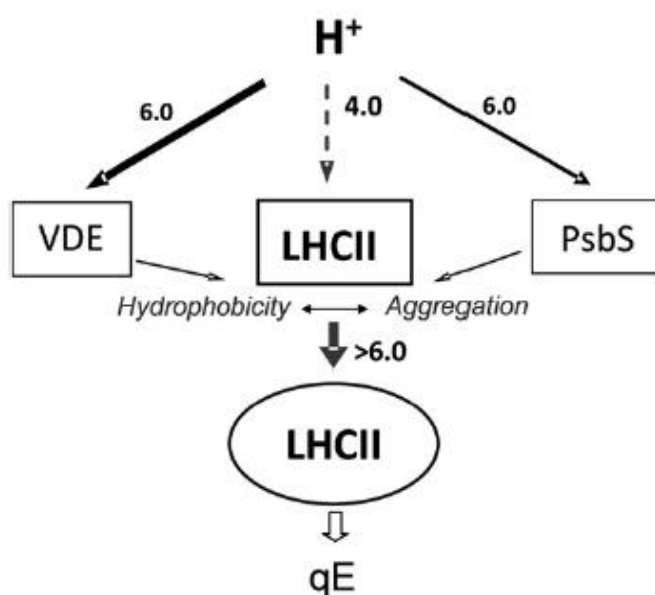
Ωστόσο, παρά το ότι περιγράφει πολλά φυσιολογικά φαινόμενα της φωτοπροστασίας, το εν λόγω μοντέλο εμφανίζει έλλειψη βασικών δομικών στοιχείων. Ένα πολύ σημαντικό ερώτημα ήταν το πώς και πού δρουν τα πρωτόνια και πυροδοτούν το qE. Για τη διαλεύκανση του ερωτήματος χρησιμοποιήθηκε ευρέως το αντιδραστήριο *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD). Αυτό προσδένεται ομοιοπολικά σε κατάλοιπα γλουταμινικού και ασπαρτικού που εντοπίζονται σε υδρόφοβες περιοχές. Η μεταχείριση θυλακοειδών με DCCD βρέθηκε να καταστέλλει το qE και επιπρόσθετα τη μετατόπιση πρωτονίων από την περιοχή της διάσπασης του νερού στο μικροχώρο (Jahns et al. 1988b; Ruban et al. 1992a). Η σήμανση του DCCD με ¹⁴C αποκάλυψε ότι αυτό προσδένεται κυρίως στα CP26 και CP29 (Walters et al. 1994). Επειδή όμως τα κατάλοιπα των συμπλόκων αυτών δε μπορούν να περικλείσουν ολόκληρη την περιοχή των πρωτονίων, προτάθηκε ότι ενδεχομένως αποτελούν τμήματα ενός καναλιού πρωτονίων που συνδέεται με την περιοχή του qE, η οποία βρίσκεται κάπου αλλού στο PSII. Αν και το τριμερές LHCII φάνηκε να προσδένεται λιγότερο αποτελεσματικά στο [¹⁴C]DCCD, η σήμανση με τρίτιο έδειξε πως μπορεί να δεσμεύσει μέχρι και 17 περισσότερα πρωτόνια όντας σε κατάσταση απόσβεσης και κατά τη συσσωμάτωσή του *in vitro* (Zolotareva et al. 1999).

Η μελέτη συνεχίστηκε με την κατασκευή μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis* όπου συγκεκριμένα μέρη της κεραίας είχαν επιλεκτικά απομακρυνθεί (με antisense και knock-out τεχνικές) ώστε να ελεγχθεί η επίδρασή τους στο qE. Σε αντίθεση με τη μεγάλη συγγένεια που εμφάνισε με το DCCD, η απουσία του CP26 δεν είχε καμία επίπτωση στο qE (Andersson et al. 2001). Η απουσία του CP29 από την άλλη μείωσε το qE κατά 30% (Andersson et al. 2001) ενώ η απουσία του CP24 (που δεν προσδέεται στο DCCD) οδήγησε σε 50% μείωση του qE (Kovacs et al. 2006). Απρόσμενα όμως, η ταυτόχρονη έλλειψη των CP24 και CP26 και η συνεπακόλουθη μείωση κατά 50% των επιπέδων του CP29, δεν έδειξε καμία μείωση στο qE (de Bianchi et al. 2008). Απουσία των Lhcb1 και 2 προκάλεσε μια μείωση του qF της τάξης του 35% (Andersson et al. 2003). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι θεωρητικοί υπολογισμοί έχουν υποδείξει το κύριο τριμερές LHC II ως τον πιο αποδοτικό τόπο του qE (Valkunas et al. 2009). Από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι για το qE δεν ευθύνεται αποκλειστικά κάποιο συγκεκριμένο σύμπλοκο της κεραίας καθώς η απόσβεση της ενέργειας θα μπορούσε να λαμβάνει χώρα σε οποιαδήποτε από τα τέσσερα σύμπλοκα του LHCI.

Η ανακάλυψη μιας νέας πρωτεΐνης, της PsbS, που σχετίζεται με το PSII, έφερε νέα στοιχεία για το μηχανισμό του qE (Funk et al. 1995a; Funk et al. 1995b). Δουλεύοντας με μεταλλάγματα *Arabidopsis*, από τα οποία έλλειπε η PsbS, η ομάδα του Niyogi βρήκε ότι σε αυτά το qE είχε σχεδόν εξαλειφθεί (Li et al. 2000; Li et al. 2002). Αρχικά υπήρξαν ενδείξεις *in vitro* ότι η PsbS μπορούσε να προσδέει Zx προκαλώντας αλλαγές στις φασματοσκοπικές ιδιότητες της τελευταίας (Aspinall-O'Dea et al. 2002) καθώς και ότι μπορούσε να προσδέει DCCD μέσω δύο γλουταμινικών καταλοίπων εκτεθειμένων κοντά στην πλευρά του μικροχώρου (Dominici et al. 2002). Όταν τα δύο αυτά κατάλοιπα έφεραν μεταλλαγές, η ικανότητά τους να προσδέουν DCCD και να δημιουργούν qE, εξαφανιζόταν με αποτέλεσμα να προταθεί πως η πρόσδεση των πρωτονίων από την PsbS ενεργοποιούσε την πρόσδεση της Zx η οποία λειτουργούσε ως ο αποσβέστης της ενέργειας διεγερμένων χλωροφυλλών στην κεραία (Li et al. 2004). Άλλα πειραματικά δεδομένα ωστόσο ήρθαν να καταρρίψουν και αυτό το μοντέλο. Τα επίπεδα της PsbS και της Zx δε σχετίζονται και δεν απαιτούνται και τα δύο για την ενεργοποίηση του qE (Zia et al. 2011), ενώ νέα στοιχεία έδειξαν ότι η PsbS δεν είναι σε θέση να προσδέει ειδικά και επιλεκτικά τη Zx (Bonente et al. 2008). Ακόμα πιο πρόσφατες έρευνες έδειξαν πως είναι δυνατόν φυτά που δεν εκφράζουν την PsbS να φτάσουν τα ίδια επίπεδα NPQ με τα αγρίου τύπου φυτά (Johnson and Ruban 2010). Έτσι λοιπόν, η επικρατούσα σήμερα θεωρία είναι ότι η PsbS πρωτεΐνη δεν είναι ο τόπος όπου λαμβάνει χώρα η απόσβεση της ενέργειας αλλά συμβάλλει στο μηχανισμό qE δρώντας ως καταλύτης

της αλλαγής της στερεοδιαμόρφωσης της κεραίας (Horton et al. 2000; Dominici et al. 2002; Horton et al. 2005; Bonente et al. 2008; Johnson and Ruban 2010).

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως για τον κύκλο των ξανθοφυλλών, η ρύθμιση της ευαισθησίας του qE στο ΔpH από την PsbS πρωτεΐνη είναι εξίσου σημαντική καθώς αυξάνει και αυτή την αποδοτικότητα της φωτοσυνθετικής διαδικασίας. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι το pKa της πλευράς της θυλακοειδούς μεμβράνης που είναι εκτεθειμένη στο μικροχώρο είναι πολύ χαμηλό, κοντά στο 4,1 (Åkerlund et al. 1979). Παράγοντες, όπως η

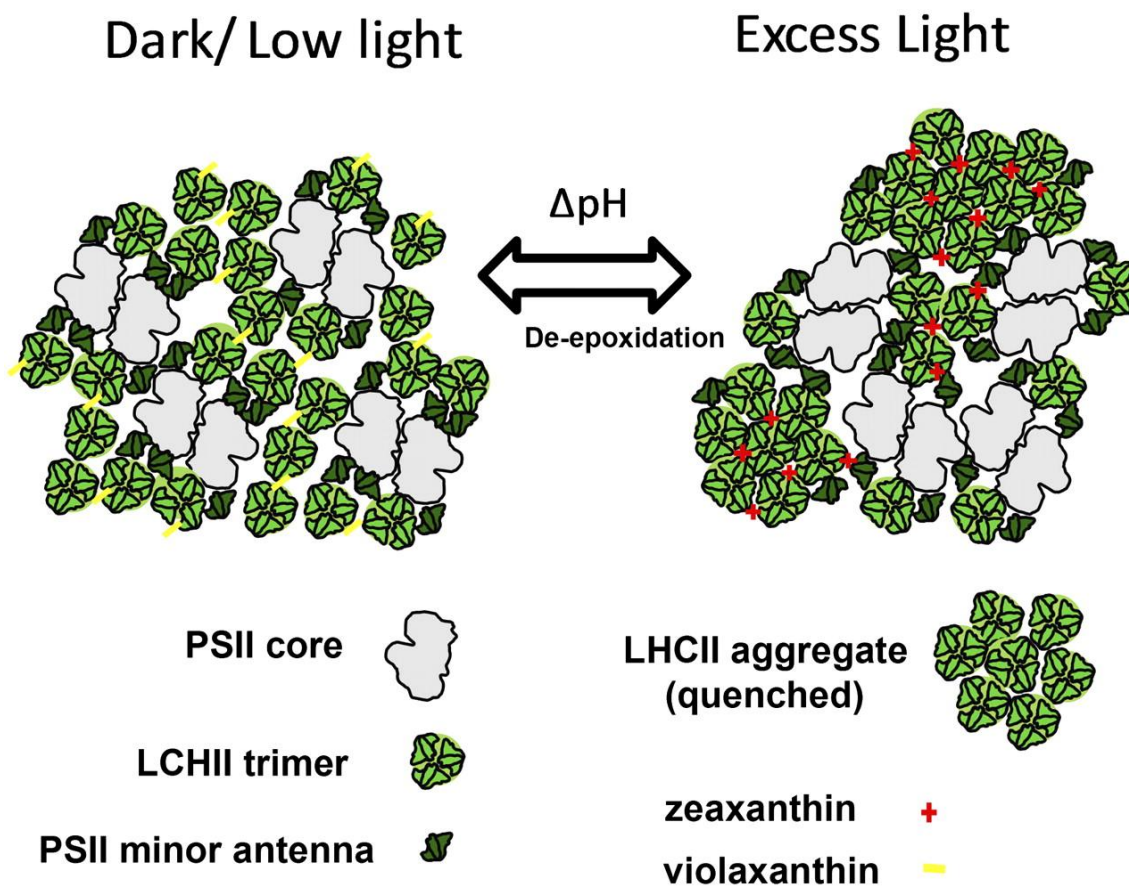


Εικόνα 10. Μοντέλο που εξηγεί την επίδραση της PsbS και του κύκλου των ξανθοφυλλών στο pKa qE-ενεργών καταλοίπων του LHCII στο χλωροπλάστη. Οι PsbS και VDE έχουν pKa κοντά στο 6,0 με αποτέλεσμα να προσδένουν πρωτόνια και να αυξάνουν την υδροφοβικότητα του LHCII και τη συσσωμάτωσή του σε χαμηλότερες τιμές ΔpH από αυτές που θα απαιτούνταν χωρίς αυτές.

φωτός, το ΔpH πυροδοτεί την αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων που οδηγεί σε μερική αποδιοργάνωση της δομής τους και στην συσσωμάτωση του LHCII (Εικόνα 11). Η απεποξείδωση της Vx σε Zx καθώς και η πρωτονίωση της PsbS πρωτεΐνης θεωρείται ότι συμβάλλουν καθοριστικά στη συσσωμάτωση του LHCII και κατ' επέκταση στο NPQ. Με άλλα λόγια, έχει ανακαλυφθεί τι πυροδοτεί τον μηχανισμό, ότι αυτός λαμβάνει χώρα στην φωτοσυλλεκτική κεραία, ότι σχετίζεται άμεσα με τη συσσωμάτωση των συμπλόκων και την τροποποίηση των χρωστικών τους, αλλά μένει ακόμα αναπάντητο ερώτημα, μετά από όλη αυτή την ανασκόπηση, η ακριβής θέση και σύσταση του κέντρου διάχυσης της ενέργειας.

PsbS και η VDE έχουν pKa κοντά στο 6.0 (Dominici et al. 2002; Jahns et al. 2009) και άρα προσδένουν πρωτόνια και ενεργοποιούν τη συσσωμάτωση του LHCII, αυξάνοντας την υδροφοβικότητά του. Με τον τρόπο αυτό, αυξάνουν το συγκεκριμένο pKa και επομένως επιτρέπουν τη δημιουργία του qE σε φυσιολογικές τιμές pH (γύρω στο 5,8 για το μικροχώρο), δηλαδή σε χαμηλότερες τιμές ΔpH από ότι θα χρειαζόνταν διαφορετικά (Εικόνα 10).

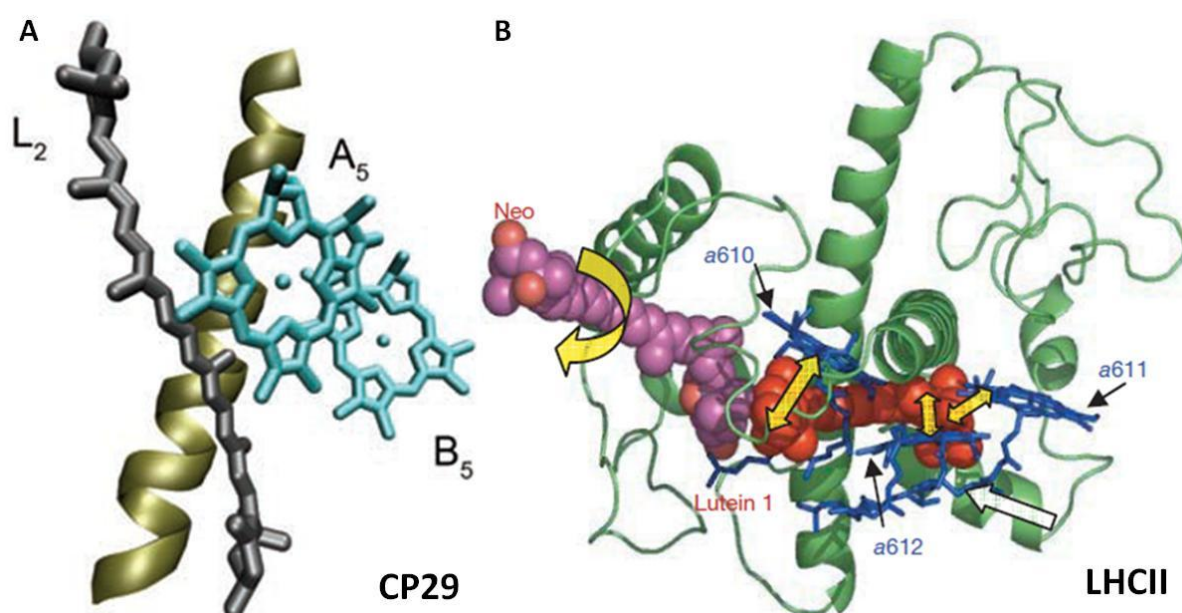
Συμπερασματικά, είναι σήμερα γνωστό ότι σε συνθήκες υψηλού



Εικόνα 11. Δομικό μοντέλο της αναδιοργάνωσης των συμπλόκων στη μεμβράνη των θυλακοειδίων κατά την ενεργοποίηση του μηχανισμού qE. Σε χαμηλές εντάσεις φωτισμού, το LHCII κατανέμεται ομοιόμορφα στα grana σχηματίζοντας μεγάλα C2S2M2 υπερούμπλοκα με τα PSII και τα μονομερή σύμπλοκα της κεραίας. Παρουσία έντονου φωτισμού, το ΔpH επάγει αλλαγές στην εσωτερική διαμόρφωση των LHCII συμπλόκων με αποτέλεσμα αυτά να ολιγομερίζονται αφήνοντας τις δομές των υπερσυμπλόκων. Η αποεποξείδωση της Vx σε Zx ενισχύει τη συσσωμάτωση του LHCII και επομένως του NPQ (Johnson et al. 2011).

Δύο είναι σήμερα τα επικρατέστερα μοντέλα για τα πιθανά κέντρα απόσβεσης της ενέργειας. Το πρώτο, όπως προτάθηκε από την επιστημονική ομάδα του Bassi, υποστηρίζει ότι η πρωτονίωση των μονομερών συμπλόκων της κεραίας οδηγεί σε μια αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης που φέρνει κοντά τη ζεαξανθίνη (στη θέση L_2) με το ζεύγος των χλωροφυλλών 5 (A_5 ή 603) και 12 (B_5 ή 609) (Εικόνα 12A). Η ζεαξανθίνη πιστεύεται ότι αποσβένει την ενέργεια μεταφέροντας ένα ηλεκτρόνιο σε κάποια χλωροφύλλη με την οποία έχει έρθει σε επαφή (Electron transfer model). Ο μηχανισμός μπορεί να περιγραφεί και ως μια μετάπτωση σε μια ενεργειακά χαμηλή κατάσταση μεταφοράς φορτίου (Holt et al. 2005; Ahn et al. 2008; Avenson et al. 2008). Αντίθετα, το δεύτερο μοντέλο από τους van Grondelle και συνεργάτες, τοποθετείται στο τριμερές LHCII, η πρωτονίωση του οποίου οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής του που προκαλεί τη στρέβλωση του μορίου της νεοξανθίνης (Εικόνα 12B). Η αλλαγή αυτή «σπρώχνει» τη λουτεΐνη (που είναι προσδεσμένη στην L_1 θέση του συμπλόκου) προς το διμερές των χλωροφυλλών $\alpha 611(\text{Chl } 7)$ - $\alpha 612(\text{Chl } 2)$.

Η διάχυση της ενέργειας εδώ προτείνεται ότι συμβαίνει με τη μεταφορά της ενέργειας από μια Chl a στην S1 κατάσταση της Lut (Gear shift model), μια θερμοδυναμικά εφικτή διεργασία καθώς το χαμηλότερο διεγερμένο επίπεδο της Lut είναι χαμηλότερα από αυτό της Chl. Η Zx στο δεύτερο μοντέλο λειτουργεί ως αλλοστερικός ρυθμιστής και όχι ως άμεσος αποσβέστης της ενέργειας (Ruban et al. 2007). Έχει μάλιστα προταθεί πως τα δύο αυτά μοντέλα μπορεί να αντιστοιχούν σε δύο συντελεστές του ίδιου φαινομένου, με το δεύτερο μοντέλο να αποτελεί την άμεση και γρήγορη απόκριση του μηχανισμού και το πρώτο να αντιστοιχεί σε μια δεύτερη, πιο αργή απόκριση (Johnson et al. 2009).

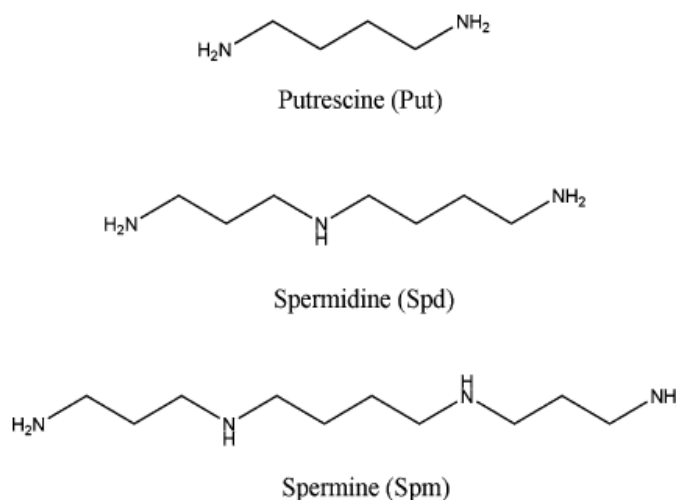


Εικόνα 12. Μοντέλα πιθανών κέντρων απόσβεσης στα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα σε επίπεδο ατομικής δομής. Α. Το μοντέλο που προτάθηκε από την ομάδα του Bassi και εμφανίζει τη Zx στη θέση L_2 του CP29 να αποσβένει την ενέργεια του ζεύγους των Chl A_5 και B_5 μέσω ανασυνδυασμού του φορτίου τους. Οι αποστάσεις των κέντρων των μορίων ανάμεσα στη Zx και τη Chl A_5 , τις Chls A_5 και B_5 και τη Chl B_5 και τη Zx, υπολογίζεται περίπου στα 6, 10 και 13Å αντίστοιχα (Ahn et al. 2008). Β. Το μοντέλο που προτάθηκε από την ομάδα του van Grondelle και εμφανίζει τη Lut στη θέση L_1 του LHCII να αλληλεπιδρά με τις Chls a610, a611 και a612, αποσβένοντας την ενέργεια μέσω μεταφοράς της ενέργειας διέγερσης στην S1 διεγερμένη κατάστασή του (Ruban et al., 2007).

2. Πολυαμίνες

2.1 Γενικά

Οι Πολυαμίνες (ΠΑς) είναι οργανικά μόρια με περισσότερες της μιας αμινομάδες. Η αρχική ανακάλυψή τους έγινε το 1678 όταν περιγράφηκε 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-



Εικόνα 13. Η χημική δομή των τριών κύριων βιογενών πολυαμινών.

diamine; Spermine ή Spm] (Ladenburg and Abel 1888). Συμφώνως, το όνομα σπερμιδίνη [N-(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine; Spermidine ή Spd] δόθηκε 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 μόνο πουτρεσίνη και σπερμιδίνη ενώ τα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών περιέχουν και σπερμίνη (Pal Bais and Ravishankar 2002).

Οι τρεις κύριες ΠΑς είναι μικρού μοριακού βάρους, κατιονικά, εύκαμπτα αλειφατικά μόρια (Εικόνα 13) που βρίσκονται παντού και εμπλέκονται στη λειτουργία των κυττάρων. Ρυθμιζόμενες από ένα πολύπλοκο σύστημα βιοσύνθεσης, ενδομετατροπής, καταβολισμού, πρόσδεσης και μεταφοράς, εμφανίζουν ραγδαίες αλλαγές στα επίπεδά τους, που είναι ιδιαίτερα υψηλά σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα φτάνοντας συγκεντρώσεις της τάξης των mM (Heby et al. 1973; Pera et al. 1986; Pegg 1988; Corella et al. 1998; Cochón et al. 2002; Wallace et al. 2003; Weiss et al. 2004). Καθώς οι ΠΑς φέρουν σχεδόν πλήρως πρωτονιωμένες αμινομάδες σε φυσιολογικές τιμές pH (Bencini et al. 1999) είναι ικανές να προσδένονται, πολλές φορές αντιστρεπτά, σε αρνητικά φορτισμένες περιοχές μακρομορίων, όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες, αλλά και σε μικρότερα μόρια, όπως είναι τα φωσφολιπίδια και τα νουκλεοτίδια, επηρεάζοντας τη δομή και τη λειτουργία τους (Bachrach 2005; Pegg 2009). Συνεπώς, έχει βρεθεί να ρυθμίζουν πολυάριθμες διεργασίες σε διάφορα

συστήματα που έχουν μελετηθεί και κυμαίνονται από τη σηματοδότηση των κυττάρων έως τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Εμπλέκονται στην κυτταρική αύξηση και ανάπτυξη, διαφοροποίηση, τον κυτταρικό θάνατο και τις αποκρίσεις σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Tabor and Tabor 1984; Cohen 1988; Pegg 1988; Thomas and Thomas 2001; Kusano et al. 2008).

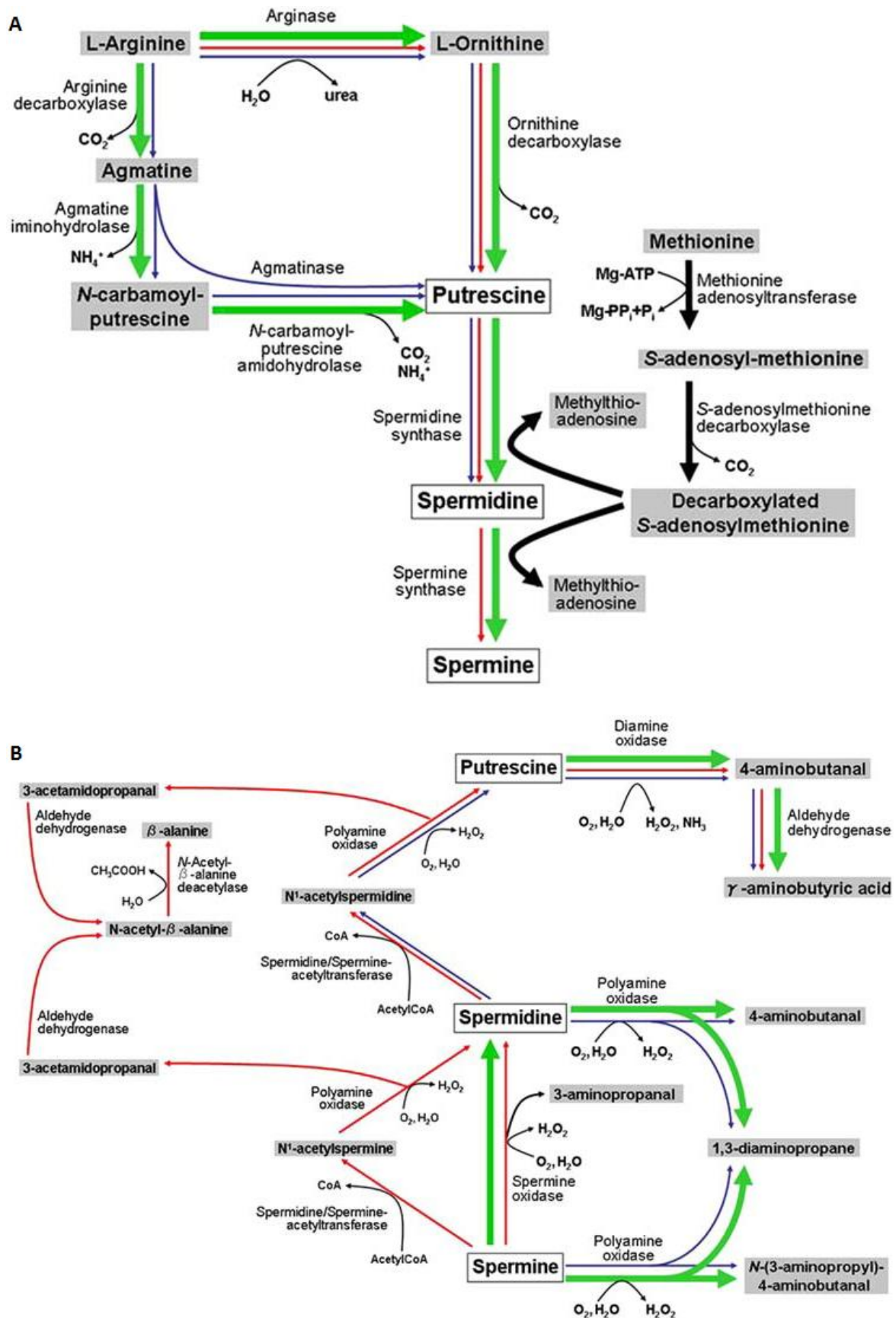
Σε μια πρώτη, σημαίνουσα εργασία για τις ΠΑΣ το 1984, οι Tabor και Tabor (1984) έκαναν την ακόλουθη διατύπωση. « Η ακριβής τους λειτουργία είναι ακόμα ασαφής, αλλά η ευρεία κατανομή τους, η υψηλή συγκέντρωσή τους στα κύτταρα και η αύξηση των συγκεντρώσεών τους σε ταχύτατα αυξανόμενους ιστούς, έχουν τονώσει την έρευνά τους». Σήμερα, περίπου 30 χρόνια μετά και έπειτα από αναρίθμητες μελέτες σε όλο το εύρος των δράσεων τους και όλων των βασιλείων, οι λεπτομέρειες για τους μηχανισμούς με τους οποίους διεξάγονται αυτές οι δράσεις παραμένουν ακόμα, ως επί το πλείστον, άγνωστες (Schuster and Bernhardt 2011).

2.2 Ο μεταβολισμός των πολυαμινών

Με κάποιες διαφοροποιήσεις, τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των πολυαμινών σε βακτήρια, ζώα και φυτά είναι συντηρημένα (Tabor and Tabor 1984). Η σύνθεσή τους ξεκινά από δύο πρόδρομα αμινοξέα, την L-αργινίνη και την L-μεθειονίνη (Εικόνα 14A). Στα φυτά, ξεκινώντας από την αργινίνη, η διαμίνη Put συντίθεται μέσω της ορνιθίνης από την αργινάση (EC 3.5.3.1) και την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC, EC 4.1.1.17). Η Put όμως μπορεί να συντεθεί και μέσω της αγματίνης από την αποκαρβοξυλάση της αργινίνης (ADC, EC 4.1.1.19) και την ιμινοϋδρολάση της αγματίνης (AIH, EC 3.5.3.12). Η διαμίνη Put μετατρέπεται στην τριαμίνη Spd και στην τετραμίνη Spm με την προσθήκη μιας ομάδας αμινοπροπυλίου από την αποκαρβοξυλιωμένη S-αδενοσυλ-μεθειονίνη (SAM), με τη δράση της συνθάσης της σπερμιδίνης (SPDS, EC 2.5.1.16) και της συνθάσης της σπερμίνης (SPMS, EC 2.5.1.22), αντίστοιχα. Η αποκαρβοξυλιωμένη SAM προέρχεται από τη SAM μέσω της δράσης της ομώνυμης αποκαρβοξυλάσης (SAMDC, EC 4.1.1.50) και θεωρείται το βήμα που καθορίζει το ρυθμό σύνθεσης των πολυαμινών.

Ένας από τους τρόπους ρύθμισης των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ΠΑΣ είναι ο καταβολισμός τους. Οι ΠΑΣ καταβολίζονται στα φυτά μέσω της δράσης των αμινικών οξειδασών (AOs), οι οποίες περιλαμβάνουν τις διαμινικές οξειδάσες (DAO, EC 1.4.3.6), που περιέχουν χαλκό και τις πολυαμινικές οξειδάσες (PAOs, EC 1.5.3.11) οι οποίες περιέχουν την φλαβίνη FAD (flavin adenine dinucleotide). Οι πρώτες, προτιμούν ως υποστρώματα

διαμίνες και καταλύουν την οξείδωση της Put σε 4-αμινοβουτανάλη

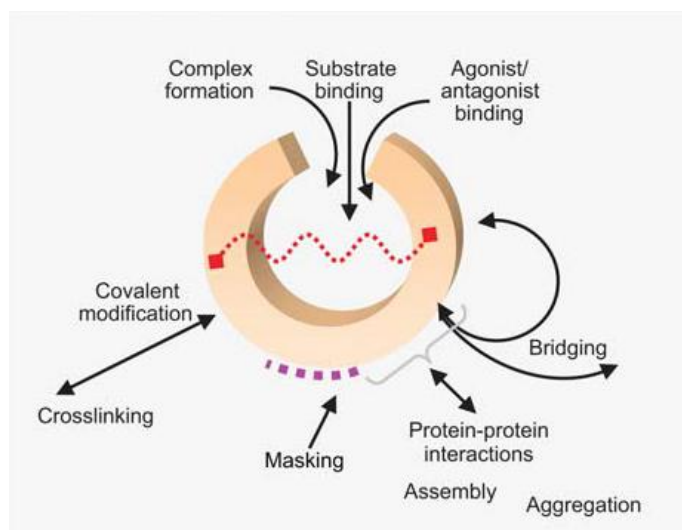


Εικόνα 14. Τα μονοπάτια (A) βιοσύνθεσης και (B) καταβολισμού των πολυαμινών. Τα έντονα πράσινα βέλη αντιστοιχούν στα φυτικά μονοπάτια. Τα μπλε και κόκκινα βέλη δείχνουν τα βακτηριακά και ζωικά μονοπάτια αντίστοιχα (Kusano et al. 2008).

παράγοντας παράλληλα αμμωνία και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Οι PAOs καταλύουν τη μετατροπή της Spd και της Spm σε 4-αμινοβουτανάλη και N-(3-αμινοπροπυλο)-4-αμινοβουτανάλη αντίστοιχα, παράλληλα με την παραγωγή 1,3-διαμινοπροπανίου και H_2O_2 (Εικόνα 14B).

2.3 Η πρόσδεση των πολυαμινών σε πρωτεΐνες

Οι ΠΑς μπορούν να προσδένονται σε πρωτεϊνικές επιφάνειες με αντιστρεπτό και μη-αντιστρεπτό τρόπο (Williams-Ashman and Canellakis 1980; Hamada et al. 2009) (Εικόνα 15). Ο αριθμός, το μέγεθος και η κατανομή των αρνητικά φορτισμένων περιοχών στις



Εικόνα 15. Οι διάφοροι τρόποι αλληλεπίδρασης των πολυαμινών με τις πρωτεΐνες. Οι ΠΑς μπορεί να αναγνωρίζονται ως υποστρώματα ή ρυθμιστές σε διάφορες εσοχές όπου προσδένονται. Επιπλέον, μπορούν να ουδετεροποιούν αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες (Masking). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα σε διάφορα σημεία της ίδιας πρωτεΐνης ή ακόμα και σε διαφορετικές πρωτεΐνες (Bridging). Με τον τρόπο αυτό οι ΠΑς επάγουν (αντιστρεπτά) συσσωμάτωση (Aggregation) των πρωτεϊνών και επηρεάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών. Από την άλλη, μέσω της δράσης των τρανσγλουταμινάσων, οι ΠΑς μπορούν να συνδέονται ομοιοπολικά σε διάφορες επιφάνειες (Crosslinking) (Schuster and Bernhardt 2011).

και διαφορετικών πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτό οι ΠΑς μπορούν να οδηγήσουν στη συσσωμάτωση πρωτεϊνών ή/και στην ενεργοποίηση αλλαγών στη στερεοδιάταξή τους (Schuster and Bernhardt 2011).

Εκτός από τις αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις, οι ΠΑς προσδένονται ομοιοπολικά σε πρωτεΐνες μέσω της δράσης των τρανσγλουταμινάσων (TGases, EC 2.3.2.13). Τρανσγλουταμινάσες έχουν ανιχνευτεί σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς, μεταξύ αυτών

επιφάνειες πρωτεϊνών αντανακλούν την ικανότητά τους να προσδένουν αντιστρεπτά ΠΑς. Εκτός από πληθώρα ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες επαφές μπορεί να συνεισφέρουν στην ειδικότητα της πρόσδεσης, διαφοροποιώντας κατ' επέκταση τις ΠΑς από τα μονοσθενή και δισθενή κατιόντα εντός και εκτός κυττάρου. Λόγω του εκτεταμένου μεγέθους και της ελαστικότητάς της, ιδιαίτερα η Spm επιτρέπει το μέγιστο των επαφών που μπορεί να είναι η αποτελεσματική σάρωση των αρνητικά φορτισμένων επιφανειών καθώς και η γεφύρωση της απόστασης δύο περιοχών της ίδιας πρωτεΐνης ή

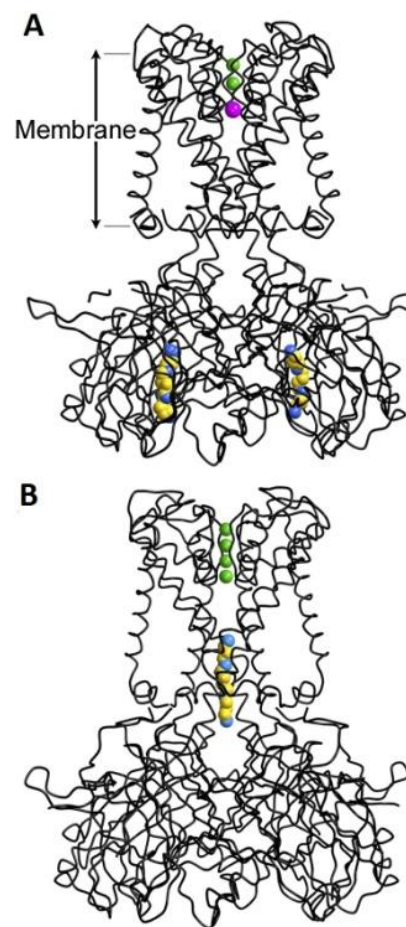
και σε ανώτερα φυτά. Τα ένζυμα αυτά εντοπίζονται τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά (π.χ. στο κυτταρικό τοίχωμα) (Tiburcio et al. 1997; Votyakova et al. 1999; Martin-Tangui 2001). Η ενεργότητά τους εξαρτάται από το Ca^{2+} , ενώ έχουν αναφερθεί και τρανσγλουταμινάσες ανεξάρτητες του Ca^{2+} (Serafini-Fracassini et al. 1995). Η πρόσδεση του μορίου της πολυαμίνης με την πρωτεΐνη γίνεται με τη συμμετοχή είτε μιας εκ των τελικών αμινομάδων σε ένα κατάλοιπο γλουταμικού οξέος στο μόριο της πρωτεΐνης, σχηματίζοντας μονο-(γ -γλουταμυλο)-πολυαμίνες (mono-PAs), είτε και με τις δύο πρωτοταγείς αμινομάδες σε γλουταμικά κατάλοιπα που ανήκουν στην ίδια ή σε διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, σχηματίζοντας δι-(γ -γλουταμυλο)-πολυαμίνες (bis-PAs) (Serafini-Fracassini et al. 1995; Tiburcio et al. 1997). Το επιπλέον θετικό φορτίο των πρωτεϊνών μετά την ομοιοπολική πρόσδεση των ΠAs μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη δομή τους.

2.4 Οι πολυαμίνες ως διαμορφωτές της λειτουργίας καναλιών ιόντων

Ενδογενείς ενώσεις που μπλοκάρουν ή αυξάνουν την αγωγιμότητα καναλιών ιόντων, ενεργοποιούν ζωτικής σημασίας φυσιολογικές διεργασίες. Οι ΠAs μπορούν να θεωρηθούν ενδογενείς ρυθμιστές καθώς επηρεάζουν διάφορους τύπους ηλεκτροδυναμικών και εξαρτώμενων από υποκαταστάτες διαύλων ιόντων σε φυσιολογικές συνθήκες, εισερχόμενες από τη εξωτερική ή/και εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Στα φυτά, οι ενδοκυτταρικές ΠAs έχει βρεθεί ότι μπλοκάρουν ένα γρήγορα-ενεργοποιούμενο κανάλι κατιόντων του χυμοτοπίου του κριθαριού (Bruggemann et al. 1998) καθώς και τα αντίστοιχα κανάλια αλλά και κάποια αργά-ενεργοποιούμενα κανάλια του χυμοτοπίου του παντζαριού (Dobrovinskaya et al. 1999). Γνωρίζουμε ότι κυτταροπλασματικές ΠAs 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 and Cuin 2008). Επιπλέον, εκτός από την άμεση επίδραση των πολυαμινών στα κανάλια μεταφοράς ιόντων, έχουν αναφερθεί και έμμεσες επιδράσεις. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση ενεργοποιούμενων από την υπερπόλωση ιοντικού ρεύματος καναλιών Ca^{2+} στην πλασματική μεμβράνη των γυρεοσωλήνων. Η εισροή Ca^{2+} και κατ' επέκταση η ρύθμιση της ανάπτυξης των γυρεοσωλήνων σηματοδοτείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) που παράγεται από την οξείδωση της Spd (Wu et al. 2010). Τέλος, έχει βρεθεί ότι οι ΠAs και ειδικά η Spm, ενισχύουν την ενεργότητα της H^+ ATPase μέσω της ένωσης της πρωτεΐνης 14-3-3 και του ενζύμου (Garufi et al. 2007).

Στα θηλαστικά, οι ΠΑΣ έχουν άμεση επίδραση σε αρκετά κανάλια ιόντων και υποδοχείς τους, ρυθμίζοντας την ομοιόσταση των κυττάρων σε Ca^{2+} , Na^+ και K^+ (Johnson 1996; Williams 1997a; Williams 1997b; Li et al. 2007). Οι ενδοκυτταρικές ΠΑΣ εμπλέκονται στη ρύθμιση της εισόδου και ανόρθωσης (rectification) καναλιών K^+ (Kir channels) (Ficker et al. 1994; Lopatin et al. 1995; Oliver et al. 2000; Lu 2004). 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 γλουταμινικού, μπλοκάροντας τον πόρο του καναλιού και εμποδίζοντας έτσι την εισροή Ca^{2+} ή Na^+ . Οι εξωκυτταρικές ΠΑΣ, ειδικά η σπερμίνη, έχουν διεγερτική επίδραση στον υποδοχέα NMDA (N-methyl-D-aspartate) (Williams 1997a, Williams 1997b). Μάλιστα, η αποδοτικότητα της δράσης των πολυαμινών σε κανάλια κατιόντων βασίζεται σε ένα δίκτυο θετικών φορτίων και ακολουθεί τη σειρά $\text{Sprm} > \text{Spd} \gg \text{Put}$.

Για μερικά από αυτά τα κανάλια υπάρχουν κρυσταλλογραφικά δεδομένα που έχουν επιτρέψει μία αναλυτικότερη παρακολούθηση της πρόσδεσης των πολυαμινών (που μπορεί να είναι αντιπροσωπευτικά για την πρόσδεση των πολυαμινών και σε άλλα κανάλια). Τα σημαντικότερα από αυτά αφορούν τα κανάλια Kir, τα οποία δομούνται από ομοτετραμερείς μεμβρανικές πρωτεΐνες και άγουν επιλεκτικά κατιόντα καλίου. Τα εν λόγω κανάλια παίζουν σημαντικό ρόλο ειδικά σε ότι αφορά τη ρύθμιση του μεμβρανικού δυναμικού ηρεμίας και την ισορροπία των ηλεκτρολυτών και φαίνεται να ρυθμίζουν την νευρωνική και καρδιακή ηλεκτρική δραστηριότητα και τη λειτουργία του παγκρέατος (Lu 2004). Σε ένα αρνητικό μεμβρανικό δυναμικό ως προς το δυναμικό ισορροπίας (ή Nernst) του καλίου, τα κανάλια Kir περνούν K^+ προς τα μέσα, ενώ ταυτόχρονα σημειώνεται μια μικρή ή και καθόλου εκροή προς την αντίθετη κατεύθυνση (Lopatin et al. 1995, Nichols and Lopatin 1997). Η κατεύθυνση της ροής ρυθμίζεται εκτός



Εικόνα 16. Η ρύθμιση της αγωγιμότητας σε ιόντα K^+ του KirBac3.1 καναλιού από τη Sprm. Με μαύρο χρώμα αναπαριστάται ο πρωτεϊνικός σκελετός του καναλιού που μπορεί να ενσωματώνει στις κυτταροπλασματικές του υπομονάδες δύο μόρια Sprm (A) έως ότου αλλάξει η στερεοδιαμόρφωσή τους και κάποιο μόριο Sprm εισχωρήσει στον πόρο του καναλιού μπλοκάροντας το (B). Τα N και C του μορίου της Sprm με μπλε και κίτρινο χρώμα αντίστοιχα. Με πράσινο χρώμα τα ιόντα K^+ .

από ενδοκυτταρικούς παράγοντες όπως Mg^{2+} , Ca^{2+} , από ενδοκυτταρικές ΠΑΣ και ειδικά από τη Spm και τη Spd, οι οποίες εισέρχονται στον πόρο και μπλοκάρουν την πρόσβαση των ιόντων σε (υπό)μικρομοριακές συγκεντρώσεις (Nichols and Lopatin 1997).

Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του καναλιού Kir2.2 από το κοτόπουλο (φέρει 90% ομολογία με το ανθρώπινο Kir2) και του μικροβιακού καναλιού KirBac3.1 έχει αποκαλύψει λεπτομέρειες για τη μοριακή δομή των διαμεμβρανικών και των ενδοκυτταρικών περιοχών του καναλιού, την (iris like) δομική αναδιοργάνωση κατά τη διάρκεια της ροής K^+ καθώς και για τη φύση και το μηχανισμό της πρόσδεσης των πολυαμινών (Tao et al. 2009; Clarke et al. 2010). Οι υπομονάδες στην κυτταροπλασματική περιοχή ρυθμίζουν τη διάμετρο του ανοίγματος του καναλιού και την αγωγιμότητα σε ιόντα μέσω της αλλαγής της διαμόρφωσής τους. Βρέθηκαν δύο διαφορετικού τύπου θέσεις πρόσδεσης των ΠΑΣ: μία κλειστή περιοχή στις δύο ενδοκυτταρικές υπομονάδες (Εικόνα 16Α) που αρχικά φιλοξενεί τις ΠΑΣ και μετά την αλλαγή της στερεοδιάταξής τους, τις απελευθερώνουν και αυτές εισέρχονται βαθιά στον διάυλο για να προσδεθούν στη δεύτερη θέση (Εικόνα 16Β). Στις περιοχές αυτές, οι ΠΑΣ προσδέονται σε εκτεταμένη μορφή και αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με αρνητικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα αλλά και με δεσμούς van der Waals (Clarke et al. 2010).

2.5 Οι πολυαμίνες στη φωτοσύνθεση

Οι τρεις κύριες ΠΑΣ παράγονται και οξειδώνονται στους χλωροπλάστες των ανώτερων φυτών και υπάρχουν σήμερα αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν το σημαντικό τους ρόλο στη φωτοσύνθεση (Hamdani et al. 2011). Κατά τη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, η έκφραση τους ρυθμίζεται αρνητικά (Dörnemann et al. 1996). Η βιοσύνθεση των πολυαμινών φαίνεται να ελέγχεται από το φως (Kramer et al. 1992), και κατά τη φωτοπροσαρμογή, η αναλογία Spm/Put επιδρά στην οργάνωση και λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Kotzabasis et al. 1999). Η αλλαγή των επιπέδων των ενδοκυτταρικών ΠΑΣ μπορεί να αυξήσει την ανοχή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατ' επέκταση του φυτού 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).

Οι ΠΑΣ υπάρχουν σε τρεις μορφές: ελεύθερες, προσδεμένες και συζευγμένες με μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους βιομόρια. Οι προσδεμένες ΠΑΣ εντοπίζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στα PSII και LHCIΙ των ανώτερων φυτών (Kotzabasis et al. 1993). Οι Spm και Spd, σε μεγάλες συγκεντρώσεις, προκαλούν σημαντικές αλλαγές στη δευτεροταγή δομή του

PSII (Bograh et al. 1997) και αποσυναρμολογούν το σύμπλοκο έκλουσης οξυγόνου ως αποτέλεσμα της αύξησης του θετικού φορτίου (Beauchemin et al. 2007a, Beauchemin et al. 2007b). *In vitro*, έχει βρεθεί πως η δεξαμενή της ελεύθερης Put αυξάνει την αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας διεγείροντας τη φωτοφωσφορυλίωση (Ioannidis et al. 2006). Πρόσφατα *in vivo* δεδομένα δείχνουν ότι αυτό γίνεται με την ενίσχυση του Δψ συστατικού της πρωτονιοκινητικής δύναμης που εγκαθίσταται στη μεμβράνη των θυλακοειδών (Ioannidis et al. 2012). Οι ανώτερες ΠΑΣ, από τη άλλη πλευρά, φαίνεται να έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης καθώς σε μεγάλες συγκεντρώσεις, είναι αποτελεσματικοί αποσυζευκτές της φωτοφωσφορυλίωσης *in vitro*. Η Spd και η Spm αποσβένουν το μέγιστο φθορισμό φυλλικών δίσκων καπνού που έχουν προσαρμοστεί στο σκοτάδι και διεγείρουν το NPQ σε χαμηλές συνθήκες φωτός ενώ το μειώνουν σε υψηλές συνθήκες φωτός (Ioannidis and Kotzabasis 2007b). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι φυτά καπνού που υπερεκφράζουν μια γλωροπλαστική τρανσγλουταμινάση του καλαμποκιού εκδηλώνουν έξι φορές υψηλότερο qE σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά, ως αποτέλεσμα της ενίσχυσης της πολυαμινοϋλίωσης των πρωτεϊνών των θυλακοειδών (Ioannidis et al. 2009). Οι απόπρωτεΐνες της κεραίας LHCI, CP24, CP26, CP29 (Duca et al. 1994), οι πρωτεΐνες D1, D2, Cyt f και η μεγάλη υπομονάδα της Rubisco (Besford et al. 1993), είναι μερικά από τα υποστρώματα της τρανσγλουταμινάσης στα πλαστίδια. Τέλος, σε απομονωμένα LHCI σύμπλοκα από φύκη, η Spd και η Spm προκάλεσαν απόσβεση του φθορισμού στα 680nm (Ioannidis et al. 2011). Επομένως, υπάρχει ένας σύνδεσμος ανάμεσα στις λειτουργικές ιδιότητες της κεραίας και τις ΠΑΣ. Ο τρόπος δράσης τους όμως μένει να εξακριβωθεί.

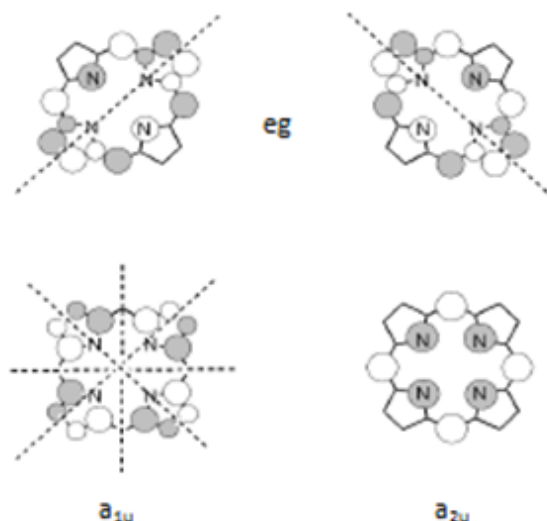
3. Φασματοσκοπικές τεχνικές

3.1 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

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 $\sim 665\text{nm}$ και ένα δεύτερο μέσω της κυανής $\sim 440\text{nm}$. 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. Επειδή η απορρόφηση ακτινοβολίας προκαλεί διέγερση του μορίου, το φάσμα απορρόφησης υποδηλώνει την ποιότητα των φωτονίων που μπορούν να διεγείρουν το εν λόγω μόριο.

Σύμφωνα με το θεωρητικό μοντέλο των τεσσάρων μοριακών τροχιακών τους (Gouterman 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 Molecular Orbital) έχουν συμμετρία a_{2u} , a_{1u} και e_g αντίστοιχα (Εικόνα 17). Όταν ένα ηλεκτρόνιο προωθείται από ένα δεσμικό μοριακό τροχιακό π σε ένα αντιδεσμικό π^* , αποκαλούμε το φαινόμενο αυτό διέγερση $\pi\pi^*$. Το ακριβές μήκος κύματος που απαιτείται για μια τέτοια

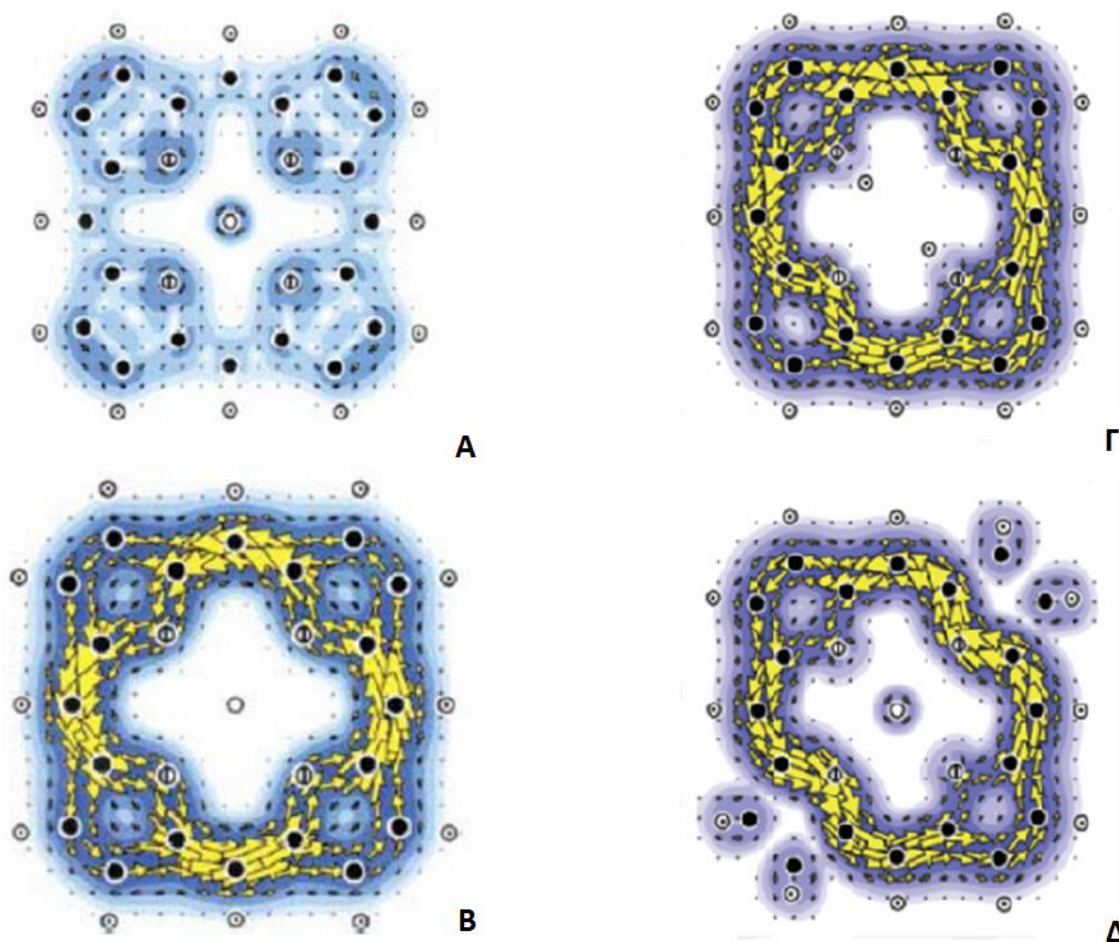


Εικόνα 17. Οι συμμετρίες των μοριακών τροχιακών HOMO και LUMO. Οι γραμμοσκιασμένες επιφάνειες αντιστοιχούν σε (+), ενώ οι μη γραμμοσκιασμένες σε (-) πρόσημο κυματοσυνάρτησης.

σε $eg(y)$ (Hanson 1991; Kee et al. 2007).

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 $\pi\pi^*$. 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 διεγερση 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 διεγερσης και συμβολίζεται ως $Q(1,0)$.

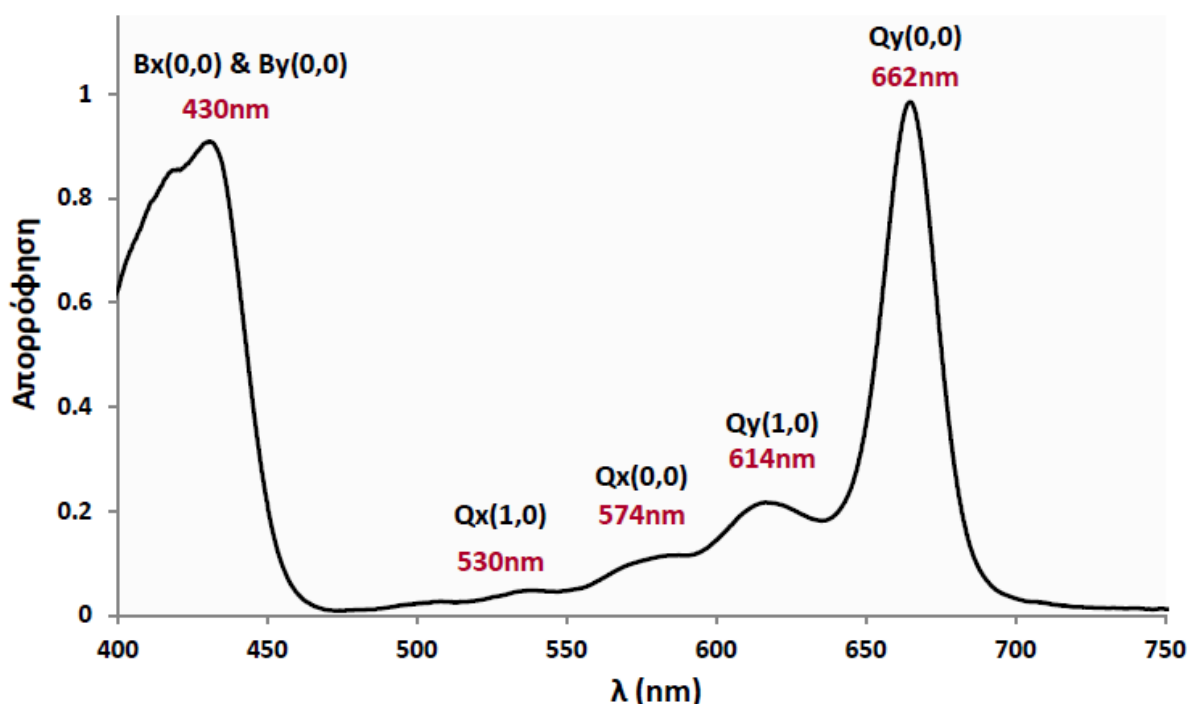
διέγερση σε ένα συζυγιακό μόριο εξαρτάται από το ενεργειακό χάσμα μεταξύ των τροχιακών HOMO και LUMO. Έτσι, όλα τα βασικά χαρακτηριστικά των ηλεκτρονικών φασμάτων των πορφυρινών, οφείλονται σε ηλεκτρονικές μεταβάσεις που λαμβάνουν χώρα στα τροχιακά αυτά ($\pi\pi^*$ καταστάσεις $a_{2u}e_g$ και $a_{1u}e_g$) (Kitagawa and Ozaki 1987). Μελέτες που κάνουν χρήση του μοντέλου αυτού για τη Chl a και την βακτηριοχλωροφύλλη (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



Εικόνα 18. Σφαιρικά ρεύματα τετραπυρρολικών 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-ηλεκτρονικές κατανομές μιας ελεύθερης βάσης πορφυρίνης και Δ. μιας Mg-βακτηριοχλωρίνης. Η π ηλεκτρονιακή πυκνότητα οφείλεται κυρίως στα HOMO μοριακά τροχικά από τα οποία προέρχονται και τα φάσματα Υπεριώδους-Ορατού (Steiner and Fowler, 2002).

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 (Εικόνα 19). 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 B_x , B_y , Q_x και Q_y . Επιπλέον, η Q μετάβαση κερδίζει ένταση σε σχέση με τις ελεύθερες χλωρίνες και τη φαιοφυτίνη (Houssier and Sauer 1970; Weiss 1975; Fragata 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 1999).



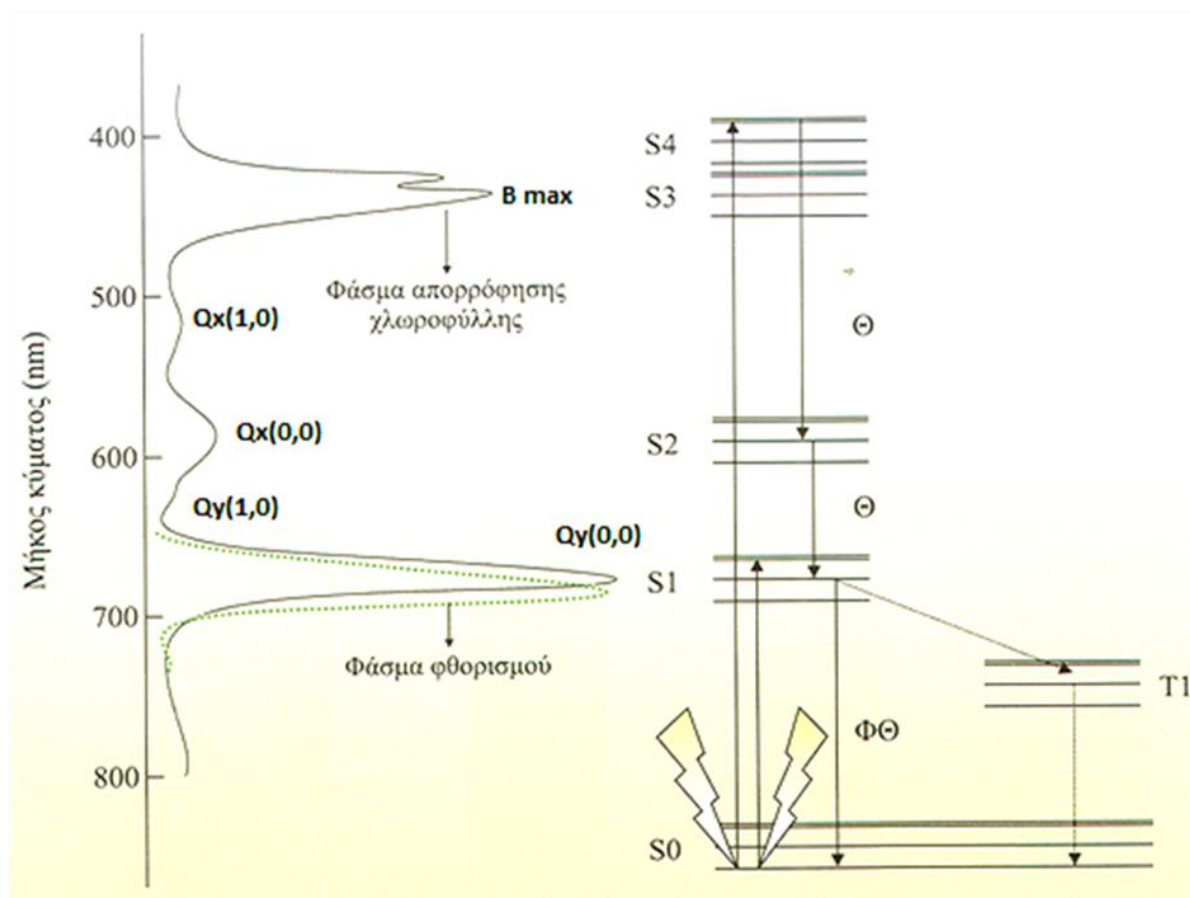
Εικόνα 19. Οι ταινίες απορρόφησης του φάσματος της Chl a σε αιθανόλη που προκύπτουν από τις ππ* μεταβάσεις και τα μέγιστα των κορυφών τους. Η αντιστοίχιση έγινε σύμφωνα με τον Παπαγεωργίου (2004).

3.2 Φασματοσκοπία Φθορισμού

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 (Εικόνα 20). 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 S0 στο S1 (Ghanotakis and Kotzabasis 2003). Επομένως, η διέγερση της χλωροφύλλης είτε με κυανή ακτινοβολία (S3, S4) είτε με ερυθρή (S1) 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.

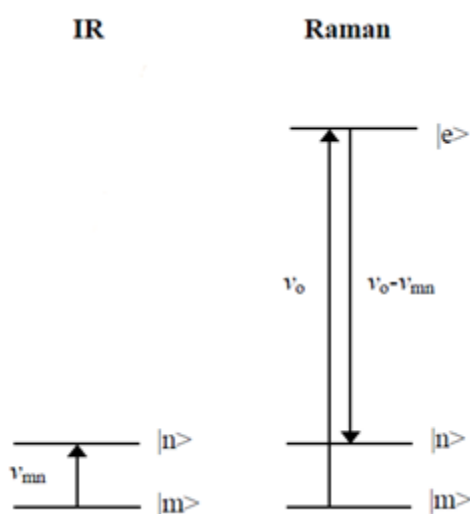


Εικόνα 20. Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων των χλωροφυλλών και σχέση του φάσματος απορρόφησης των χρωστικών με τα ενεργειακά επίπεδα (S0, S1, S2, S3 & S4). Στο φάσμα απορρόφησης φαίνονται η B και οι τέσσερις Q ταινίες. Θ: Απελευθέρωση ενέργειας με τη μορφή θερμότητας. ΦΘ: Απελευθέρωση ενέργειας με τη μορφή φθορισμού.

3.3 Φασματοσκοπία Raman

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 υπερέυθρου (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 21. Απορρόφηση υπερύθρου και σκέδαση Raman, όπου $|m\rangle$ και $|n\rangle$ είναι δύο κβαντισμένες καταστάσεις μιας κανονικής δόνησης στη βασική ηλεκτρονική κατάσταση και $|e\rangle$ μια διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση.

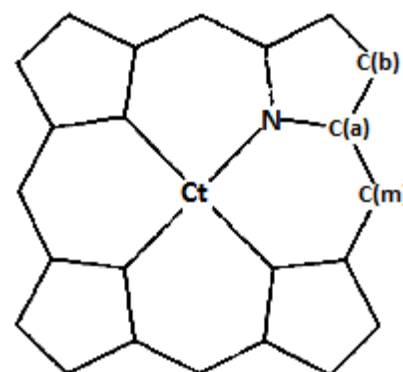
τεχνικές αποκαλύπτουν την ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στα κβαντισμένα δονητικά επίπεδα $|m\rangle$ και $|n\rangle$, ισχύουν διαφορετικοί κανόνες επιλογής. Αν η μετάβαση ανάμεσα στα $|m\rangle$ και $|n\rangle$ συνοδεύεται από μεταβολή της διπολικής ροπής η δόνηση είναι IR ενεργή, ενώ αν συνοδεύεται από 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 ύδωρ 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 σε πολλές περιπτώσεις 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. Έτσι, όταν εκτελείται φασματοσκοπία συντονισμού Raman, μόνο οι ταλαντώσεις που σχετίζονται με τον πορφυρινικό σκελετό είναι ενισχυμένες και το φάσμα δεν παρεμποδίζεται συνήθως από τις ταινίες περιφερειακών υποκαταστατών.

3.3.1 Φασματοσκοπία Raman μεταλλοπορφυρινών

Η περιοχή $1300-1700\text{cm}^{-1}$ του φάσματος Raman των μεταλλοπορφυρινών περιέχει τις εντός επιπέδου δονήσεις του τετραπυρρολικού δακτυλίου δίνει πληροφορία για την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του δακτυλίου, τη διαμόρφωση σπιν, το μέγεθος του πυρήνα του μορίου και τον αριθμό συναρμογής του κεντρικού ατόμου μετάλλου. Μελέτες που έγιναν για παράγωγα Fe-octaethylporphyrin ή Fe(OEP) (Ozaki et al. 1986) έδειξαν ότι η ισχυρότερη γραμμή που παρουσιάζεται στο φάσμα στους $1360-1375\text{cm}^{-1}$ όταν η διέγερση πραγματοποιείται στη Soret περιοχή, αποδίδεται στην πλήρως συμμετρική C_{4v} διαμόρφωση έκτασης (ν_4) της μεταλλοπορφυρίνης. Αυτή η ζώνη έχει αναφερθεί ως δείκτης της κατάστασης οξειδωσης 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.

Γενικά, η υψηλότερης συχνότητας γραμμή προκύπτει από την εκτός επιπέδου C_{4v} διαμόρφωση έκτασης (ν_{10}) και η εντός επιπέδου συμμετοχή της δίνει μια κάθετη κορυφή στους $1550-1600\text{cm}^{-1}$ (ν_{19}). Η συγκεκριμένη κορυφή λόγω της ευθύγραμμης σχέσης που παρουσιάζουν οι ν_{19} συχνότητες με τις Ct-N αποστάσεις (Εικόνα 22) 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_{4v} διαμόρφωση έκτασης εμφανίζεται γύρω στους $1475-1510\text{cm}^{-1}$ (ν_3). Η δεύτερη υψηλότερη σε συχνότητα πολωμένη κορυφή γύρω στους $1575-1595\text{cm}^{-1}$ σχετίζεται κυρίως με τις εντός επιπέδου C_{4v} διαμορφώσεις έκτασης (ν_2) και η εκτός επιπέδου συμμετοχή της δίνει τη δεύτερη υψηλότερης συχνότητας αποπολωμένη κορυφή γύρω στα $1545-1570\text{cm}^{-1}$ (ν_{11}). Η συχνότητα ν_{10} μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση του αριθμού συναρμογής του κεντρικού ατόμου μετάλλου και συγκεκριμένα δίνονται οι περιοχές των $1615-1625\text{cm}^{-1}$ και $1627-1630\text{cm}^{-1}$ για τα σύμπλοκα σιδηροπορφυρινών με έξι και πέντε δεσμούς συναρμογής αντίστοιχα (Spiro et al. 1979; Teraoka and Kitagawa 1980).



Εικόνα 22. Δεσμοί του τετραουρρολικού δακτυλίου ενός πορφυρινικού σκελετού.

Οι συχνότητες των δονήσεων που περιγράφηκαν παραπάνω εξαρτώνται από το είδος του κεντρικού μετάλλου που φέρει το πορφυρινικό μόριο. Όταν αναλύθηκαν τα φάσματα Raman των Co, Ni, Cu, και Zn(OEP) και οι συχνότητες $\nu_2, \nu_3, \nu_{10}, \nu_{11}$ και ν_{19} αποδόθηκαν σε συνάρτηση με την ενέργεια μετάβασης της ζώνης Qy, η απορρόφηση ηλεκτρονίων φάνηκε να αντανάκλα την αύξηση του πυρήνα στην ηλεκτρονιακή θεμελιώδη κατάσταση και όχι κάποια αλλαγή στη διεγερμένη κατάσταση (Kitagawa et al. 1979). Μελέτες φασμάτων Raman υποκατεστημένων χλωροφυλλών ανέδειξε ευθύγραμμους συσχετισμούς μεταξύ των συχνοτήτων Raman και των Ct-N αποστάσεων (Fujiwara and Tasumi 1986). Έτσι, προτάθηκε ότι όσο πιο ισχυρός ο δεσμός M-N_{pyrr}, τόσο μικρότερη η Ct-N απόσταση και υψηλότερες οι συχνότητες έκτασης του δακτυλίου. Έτσι, οι συχνότητες των ζωνών στις μεταλλοπορφυρίνες αυξάνονται με την εξής σειρά: Mg < Zn < Cu < Co < Ni < Pd.

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 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 σύστημα 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), η ταυτοποίηση των δονήσεών τους καθίσταται πολλές φορές δύσκολη λόγω της πολυπλοκότητας του μορίου τους και του χαμηλού βαθμού συμμετρίας (Boldt et al. 1987; Donohoe et al. 1988).

I. Δονήσεις πορφυρινικού σκελετού των χλωροφυλλών

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. Για τα μόρια της Chl a ένα ζεύγος ζωνών έχει παρατηρηθεί

στους $1529-1554\text{cm}^{-1}$ όταν το κεντρικό άτομο Mg έχει αριθμό συναρμογής «πέντε» οπότε και αλληλεπιδρά μόνο με έναν αξονικό προσδέτη και στους $1521-1545\text{cm}^{-1}$ όταν αυτό έχει αριθμό συναρμογής «έξι», όταν δηλαδή το κεντρικό άτομο Mg δεσμεύει δύο εξωτερικούς προσδέτες (Fujiwara and Tasumi 1986; Tasumi and Fujiwara 1987). Από άλλες 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 $1545-1549\text{cm}^{-1}$. Για την Chl b, οι ζώνες αυτές αναμένονται γύρω στους $1566-1570\text{cm}^{-1}$ και $1559-1563\text{cm}^{-1}$ αντίστοιχα (Schulz and Baranska 2007).

II. Δονήσεις περιφερειακών υποκαταστατών των χλωροφυλλών

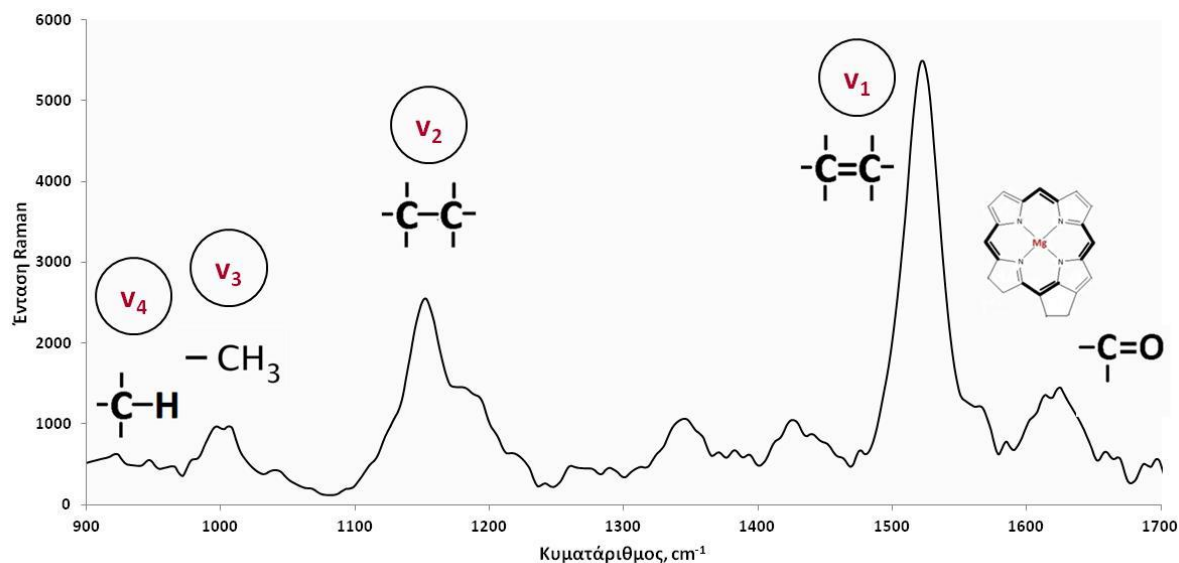
Στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων του φάσματος των χλωροφυλλών, μεταξύ των 1620 και 1750cm^{-1} , οι ζώνες προκύπτουν από τις δονήσεις των καρβονυλομάδων τους (9-κετο για την Chl a και 9-κετο και 3-φορμυλο για την Chlb) (Lutz 1974). Οι συχνότητες για τις 9-κετο καρβονυλικές δονήσεις έκτασης παρατηρούνται 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.

3.3.2 Φασματοσκοπία Raman LHCB συμπλόκων

Τα φάσματα Raman των συμπλόκων της φωτοσυνθετικής κεραίας αποτελούνται ως επί το πλείστον από ζώνες που σχετίζονται με τις δονήσεις των δεσμών των καροτενοειδών που φέρουν ως συμπαράγοντες. Τα καροτενοειδή αποτελούν εξαιρετικά αποτελεσματικούς σκεδαστές Raman και υπάρχουν ως αντικείμενο σχετικών ερευνών από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Τα φάσματά τους αποτελούνται από τέσσερις ομάδες ζωνών, κοντά στους 1530 (ν_1), 1120-1200 (ν_2), 1000 (ν_3) και 960cm⁻¹ (ν_4). Η ν_1 ζώνη προκαλείται από τις δονήσεις έκτασης των διπλών δεσμών άνθρακα (C = C) του καροτενοειδούς. Η θέση της είναι ευαίσθητη στο μήκος του συζυγιακού συστήματος του μορίου και στη στερεοδιαμόρφωσή του (cis/trans) (Rimai et al. 1973; Koyama et al. 1982; Koyama et al. 1988). Η ν_2 ζώνη προκύπτει κυρίως από δονήσεις έκτασης των απλών δεσμών άνθρακα (C – C) συζευγμένων είτε με δονήσεις κάμψης δεσμών C – H ή με δονήσεις έκτασης δεσμών C – CH₃. Η θέση της επίσης σχετίζεται με τη μοριακή διαμόρφωση του καροτενοειδούς. Ακριβής ανάλυση των ν_1 και ν_2 κορυφών οδηγούν σε σχετικά ασφαλή συμπεράσματα για τη διαμόρφωση του καροτενοειδούς (Koyama et al. 1988). Η ν_3 ζώνη προέρχεται από τις λικνιζόμενες (rocking) δονήσεις κάμψης των μεθυλομάδων (CH₃) ενώ η ν_4 από τις παλλόμενες (wagging) δονήσεις κάμψης των ομάδων C – H των καροτενοειδών. Για λόγους συμμετρίας, η τελευταία ζώνη δεν είναι συζευγμένη με την ηλεκτρονιακή μετάβαση των εντελώς επίπεδων μορίων και δεν αναμένεται ενεργή σε φάσματα συντονισμού Raman. Ωστόσο, η έντασή της σχετίζεται άμεσα με τη διαμόρφωση του καροτενοειδούς και αυξάνεται με τη στρέβλωση του μορίου εκτός επιπέδου (Lutz et al. 1987; Pascal et al. 1998). Στην Εικόνα 23 οι ζώνες αυτές που προκύπτουν από τα καροτενοειδή υποδεικνύονται στο φάσμα του τριμερούς LHCP συμπλόκου.



Εικόνα 23. Φάσμα Raman στην περιοχή των $900\text{-}1700\text{cm}^{-1}$ του τριμερούς LHCII. Με v_1 , v_2 , v_3 και v_4 υποδεικνύονται οι τέσσερις ζώνες που αντιστοιχούν στις δονήσεις των αναγραφόμενων δεσμών των μορίων των καροτενοειδών. Στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων οι ζώνες προκύπτουν από δονήσεις των δεσμών των μορίων των χλωροφυλλών.

Εκτός όμως από τις δονήσεις των καροτενοειδών, ένα φάσμα Raman της κεραίας εμφανίζει στη λεγόμενη περιοχή υψηλών συχνοτήτων ($1600\text{-}1700\text{cm}^{-1}$) κορυφές που σχετίζονται με τις δομήσεις των χλωροφυλλών (Pascal et al. 2000; Robert 2004; Robert 2009). Σε αντίθεση με το μεγάλο αριθμό ζωνών που εμφανίζουν τα φάσματα Raman των απομονωμένων χλωροφυλλών σε όλο το εύρος του φάσματος, στη περίπτωση που αυτές βρίσκονται προσδεμένες στις πρωτεΐνες της κεραίας η συνεισφορά τους στο φάσμα είναι μικρότερη καθώς υποσκιάζονται αφενός από την παρουσία των καροτενοειδών και αφετέρου η συγκέντρωσή τους είναι πολύ μικρότερη. Παρόλα αυτά, η περιοχή κοντά στους 1600cm^{-1} είναι ευαίσθητη στην κατάσταση συναρμογής τους ενώ οι ζώνες στην περιοχή των $1620\text{-}1700\text{cm}^{-1}$, όπως και στα φάσματα των απομονωμένων Chls, σχετίζονται με τις δονήσεις των περιφερειακών υπακαταστατών τους (Εικόνα 23).

Σκοπός

Η περίσσεια φωτονίων που προκαλεί την πίεση διέγερσης στο PSII μπορεί να οδηγήσει στην οξειδωτική καταστροφή της φωτοσυνθετικής μεμβράνης. Στην πρώτη γραμμή άμυνας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού βρίσκεται ο μηχανισμός NPQ. Έρευνα αιχμής τα τελευταία 30 χρόνια στον τομέα της φωτοσύνθεσης αποτελεί ο μοριακός μηχανισμός του συντελεστή qE του NPQ, που επάγεται αστραπιαία από την αύξηση του ΔpH κατά μήκος της μεμβράνης των θυλακοειδών. *In vivo* μελέτες, έχουν συσχετίσει τα επίπεδα των μεγαλύτερων πολυαμινών με την αύξηση του qE. Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η εύρεση του μοριακού μηχανισμού δράσης των ΠAs που να εξηγεί το ρόλο τους στο qE. Πρωταρχικός στόχος ήταν η καταγραφή όλων των *in vitro* βιοενεργητικών αλληλεπιδράσεων των ΠAs με τα μονομερή και τριμερή σύμπλοκα της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII και ο εντοπισμός πιθανών κέντρων απόσβεσης της ενέργειας στο εσωτερικό τους. Η δημιουργία κέντρων απόσβεσης της ενέργειας από τις πολυαμίνες σχετίζεται άμεσα με την ικανότητά τους να προσδένονται στις χλωροφύλλες της φωτοσυλλεκτικής κεραίας και να τροποποιούν τις ιδιότητές τους. Για αυτόν το λόγο μελετήθηκαν διεξοδικά οι αλληλεπιδράσεις και των τριών κύριων πολυαμινών με απομονωμένες φωτοσυνθετικές χρωστικές και ανάλογά τους. Ο δεύτερος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο έλεγχος της ικανότητας του LHClI να άγει πρωτόνια και ο ρόλος των πολυαμινών στην τροποποίηση των ιδιοτήτων ενός τέτοιου καναλιού με εξαιρετική σημασία για τη ρύθμιση του qE. Η προσέγγιση αυτή επιχειρήθηκε με την ενσωμάτωση των απομονωμένων μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας σε λιποσώματα, προσομοιάζοντας *in vitro* τις *in vivo* συνθήκες στις μεμβράνες των θυλακοειδών.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Φυτικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας

Στα πειράματα του πρώτου κεφαλαίου, με τις απομονωμένες χρωστικές, χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*) ηλικίας 6-8 εβδομάδων που αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού. Η απομόνωση των φωτοσυνθετικών συμπλόκων της κεραίας του PSII έγινε από φύλλα σπανακιού (*Spinacia oleracea*) βιολογικής καλλιέργειας, ηλικίας 5-7 εβδομάδων (Εικόνα 24).



Nicotiana tabacum L. cv. *Xanthi*



Spinacia oleracea

Εικόνα 24. Φυτά καπνού (αριστερά) και σπανακιού (δεξιά) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

2. Αντιδραστήρια και υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής προήλθαν κυρίως από τις εταιρείες Sigma-Aldrich, Merck, Bio-Rad και Avanti.

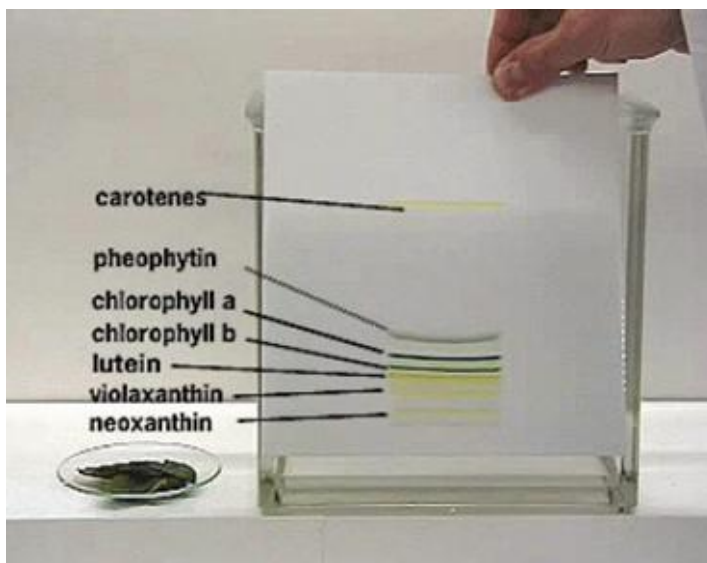
3. Απομόνωση και διαχωρισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Η απομόνωση των χλωροφυλλών (Chl a&b), της φαιοφυτίνης (Pheo) και των καροτενοειδών έγινε με τη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) σύμφωνα με τη μέθοδο των Hager και Meyer-Bertenrath (1966) με κάποιες τροποποιήσεις. Η εκχύλιση των χρωστικών από φύλλα καπνού έγινε με μεθανόλη στους 70 °C, με προσθήκη ελάχιστης ποσότητας $Mg(CO_2)_3$ ώστε να παρεμποδιστεί η

απώλεια του μαγνησίου των χλωροφυλλών. Το εκχύλισμα φυγοκεντρίθηκε για 5min σε 3.000xg για την απαλλαγή του δείγματος από συσσωματώματα, πρωτεΐνες και λιπίδια και συλλέχτηκε το υπερκείμενο. Στο δοχείο χρωματογραφίας είχε τοποθετεί το μείγμα ανάπτυξης και διηθητικό χαρτί Wattman σε σχήμα U περίπου μια ώρα νωρίτερα, ώστε η ατμόσφαιρα του δοχείου να είναι κορεσμένη. Η σύσταση του μείγματος είχε ως εξής: πετρελαϊκός αιθέρας:2-προπανόλη:dH₂O 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 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 μάντες αποκολλήθηκαν μηχανικά με μια σπάτουλα και οι αντίστοιχες χρωστικές εκχυλίστηκαν σε 100% (v/v) αιθανόλη. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 5min στα 1.500xg και το απαλλαγμένο από το υλικό προσρόφησης υπερκείμενο συλλέχτηκε, χαρακτηρίστηκε φασματοσκοπικά και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Όλη η διαδικασία απομόνωσης των χρωστικών πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες χαμηλής έντασης πράσινου φωτός, για να αποφευχθεί η φωτοοξειδωση των χλωροφυλλών.

4. Ποιοτικός προσδιορισμός χρωστικών

Ο προσδιορισμός των χρωστικών έγινε υπολογίζοντας τις τιμές R_f. Το R_f ορίζεται ως το πηλίκο του διαστήματος που έτρεξε η χρωστική προς το διάστημα που έτρεξε το υγρό ανάπτυξης. Η τιμή R_f κάθε ουσίας είναι χαρακτηριστική και συγκεκριμένη για την ουσία στο διάλυμα ανάπτυξης. Στην Εικόνα 25 παρουσιάζεται μια χαρακτηριστική ολοκληρωμένη



ανάπτυξη πλάκας TLC. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές από πάνω προς τα κάτω εμφανίζουν μειούμενες τιμές R_f (αντίστροφη σειρά προσρόφησης στη χρωματογραφική πλάκα).

Εικόνα 25. Απεικόνιση της χρωματογραφικής πλάκας μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας. Πάνω στην πλάκα διακρίνονται οι χρωστικές με σειρά μειούμενης τιμής R_f. Χαρακτηριστικό είναι το διαφορετικό χρώμα κάθε χρωστικής.

5. Ποσοτικός προσδιορισμός χρωστικών

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

$$C = \frac{E}{\epsilon \times d}$$

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 μήκη κύματος που δίνονται στον Πίνακα 3 και η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε με τους αντίστοιχους συντελεστές ϵ , σύμφωνα με τους Afzal et al. (2004).

Πίνακας 3. Molar extinction coefficients ϵ ($L mol^{-1} cm^{-1}$) για τις χλωροφύλλες a και b και τη φαιοφυτίνη a σε 100% (v/v) ακετόνη.

Χρωστική	λ_{max} nm	ϵ ($L mol^{-1} cm^{-1}$)
Χλωροφύλλη a	661.6	2.86×10^4
	616.0	6.35×10^3
Χλωροφύλλη b	661.6	7.20×10^4
	644.8	3.00×10^4
Φαιοφυτίνη a	652.6	1.20×10^4
	601.0	2.70×10^3



Εικόνα 26. Το φωτόμετρο τύπου Ocean Optics USB4000 εξοπλισμένο με τη φωτεινή πηγή τύπου DH-2000-BAL.

Τα διαλύματα σε 100% (v/v) αιθανόλη των καροτενοειδών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο της TLC φωτομετρήθηκαν στα μήκη κύματος που δίνονται στον Πίνακα 4 και η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε με τους

αντίστοιχους συντελεστές ϵ , σύμφωνα με τους Jeffrey et al. (1997). Όλες οι μετρήσεις απορρόφησης έγιναν σε φωτόμετρο τύπου Ocean Optics USB4000 εξοπλισμένο με φωτεινή πηγή τύπου DH-2000-BAL (Εικόνα 26).

Πίνακας 4. Molar extinction coefficients ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) για τα καροτενοειδή σε 100% (v/v) αιθανόλη.

Χρωστική	λ_{max} nm	ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
β -καροτένιο	453	141×10^3
Νεοξανθίνη	438	136×10^3
Βιολαξανθίνη	443	153×10^3
Λουτεΐνη	445	145×10^3
Ζεαξανθίνη	450	145×10^3

6. Μετατροπή των χλωροφυλλών σε φαιοφυτίνες

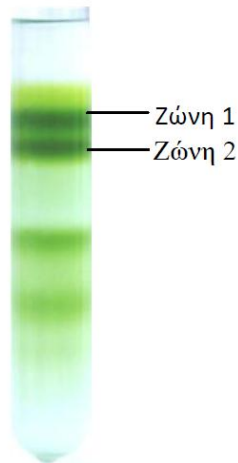
Οι Pheo a και b προέκυψαν από τις Chl a και b μετά από σύντομη μεταχείρισή τους με μικρό όγκο 36% HCl σε θερμοκρασία δωματίου. Το ισχυρό οξύ εξατμίστηκε στη συνέχεια με αέριο άζωτο και το στερεό κατάλοιπο επαναδιαλύθηκε σε 100% αιθανόλη. Τα φάσματα της απομονωμένης με TLC Pheo a και αυτής που προέκυψε από τη συγκεκριμένη μεταχείριση ήταν τα ίδια.

7. Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών

Αρχικά, απομονώθηκαν θυλακοειδή από σπανάκι σύμφωνα με τη μέθοδο των Bassi et al. (1985) με κάποιες τροποποιήσεις. Περίπου 100g φρέσκων φύλλων, αφού πλύθηκαν με απιονισμένο νερό, ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M tricine (pH 7,8 NaOH), 0,4M sorbitol, 5mM MgCl_2 , 0,2% BSA και 1mM PMSF. Το μείγμα διηθήθηκε από οκταπλό φύλλο γάζας και το διήθημα φυγοκεντρήθηκε (5.000g, 5min, 4°C). Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα επαναϊώρησης 10mM sodium pyrophosphate (pH 7,4) και φυγοκεντρήθηκε (5.000g, 5min, 4°C) και το ίδιο επαναλήφθηκε μία ακόμη φορά. Το ίζημα (μεμβράνες θυλακοειδών) τέλος επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 30mM tricine (pH 7,3 NaOH) και αποθηκεύτηκε στους -25°C.

8. Απομόνωση και διαχωρισμός των συμπλόκων της φωτοσυλλεκτικής κεραίας

Σε συνέχεια των παραπάνω, τα σύμπλοκα της κεραίας του PSII απομονώθηκαν και διαχωρίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Caffarri et al. (2001) με μικρές διαφοροποιήσεις.



Εικόνα 27. Οι δύο έντονα πράσινες ζώνες που προκύπτουν μετά την υπερφυγοκέντρωση σε διαβάθμιση σάκχαρης και αντιστοιχούν στα μονομερή (Ζώνη 1) και τριμερή (Ζώνη 2) σύμπλοκα της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII.

Αφού μετρήθηκε η περιεκτικότητα του διαλύματος των θυλακοειδών σε χλωροφύλλη ακολούθησε η φυγοκέντρωσή του (5.000g, 5min, 4°C). Ίζημα θυλακοειδών μεμβρανών που αντιστοιχούσε σε συγκέντρωση 500μg Chl διαλυτοποιήθηκε σε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος 14mM HEPES (pH 7,5 NaOH) που περιείχε 0,6% dodecyl-β-D-maltoside (β-DM) και αναδεύτηκε προσεκτικά. Το διαλυτοποιημένο υλικό φυγοκεντρήθηκε (12.000g, 10min, 4°C) ώστε να απομακρυνθούν τα μη διαλυτοποιημένα μέρη του και φορτώθηκε σε διαβάθμιση σάκχαρης όπου και

κλασματώθηκε με υπερφυγοκέντρωση σε φυγόκεντρο Beckman και ρότορα τύπου TH-641 (210.000g, 19h, 4°C). Οι φυγοκεντρικοί σωλήνες που περιείχαν 14mM HEPES (pH 7,5 NaOH), 0,65M σάκχαρη και 0,01% β-DM είχαν νωρίτερα παγώσει στους -80°C και στη συνέχεια ξεπαγώσει σταδιακά στους 4°C σχηματίζοντας τις διαβαθμίσεις. Με το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης, οι δύο

ανώτερες πράσινες ζώνες που αντιστοιχούν στα μονομερή και τριμερή σύμπλοκα της κεραίας του PSII (Εικόνα 27) συλλέχτηκαν προσεκτικά με μια σύριγγα και αποθηκεύτηκαν ξεχωριστά στους -25°C. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες χαμηλής έντασης πράσινου φωτός.

9. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης και ποιοτικός έλεγχος του LHCII

Η ποσοτικοποίηση των χλωροφυλλών που περιείχαν τα κλάσματα των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας, έγινε φασματοφωτομετρικά σε 80% (v/v) διαλύματα ακετόνης σύμφωνα με τις εξισώσεις των Porra et al. (1989):

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

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

Όπου $A_{663.6}$, $A_{646.6}$, και A_{750} οι μονάδες απορρόφησης στα 663.6 nm, 646.6 nm και 750 nm αντίστοιχα. Η ολική χλωροφύλλη υπολογίστηκε ως το άθροισμα των συγκεντρώσεων της Chl a και Chl b.

Ο λόγος Chl a/Chl b του τριμερούς LHC II αποτελεί έναν πολύ καλό δείκτη για την εκτίμηση της καθαρότητας του απομονωμένου συμπλόκου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο

ιδανικός λόγος Chl a/Chl b ισούται με 1.34, που υποδηλώνει ότι υπάρχουν προσδεμένες στην κεραία 14 Chls (8 Chl a και 6 Chl b), όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή. Ο λόγος αυτός στα δείγματα που απομονώθηκαν κυμαινόταν από 1.36 έως 1.56 που σημαίνει ότι τα πρωτεϊνικά μας σύμπλοκα έφεραν ως συμπαράγοντες 8 Chl a και 6 ή 5 Chl b.

Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις απορρόφησης ήταν τύπου Ocean Optics USB4000.

10. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών

Οι ολικές πρωτεΐνες στα δείγματα των συμπλόκων της κεραίας και των θυλακοειδών υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Bradford (1976), όπως προτείνεται και από τους Jones et al. (1989). Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη βοείου ορού (BSA). Η απορρόφηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε φωτόμετρο τύπου Ocean Optics USB4000.

11. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η πρωτεϊνική σύσταση των ζωνών που απομονώθηκαν από την κλασμάτωση των θυλακοειδών στη διαβάθμιση σάκχαρης ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Η χημική διάσπαση του υπερθειικού αμμωνίου ($S_2O_8^{2-}$) δίνει τις ελεύθερες ρίζες ($2SO_4^{\cdot-}$) που προκαλούν την έναρξη του πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου. Η σταθεροποίηση των ριζών πραγματοποιείται με τη προσθήκη τετραμέθυλο-αίθυλο- διαμίνης (TEMED).

Αρχικά, τα δείγματα συμπυκνώθηκαν μετά την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με προσθήκη ίσου όγκου 20% (v/v) TCA και επώαση για 30 min στους 4°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (13.000g, 10min, 4°C) και πλύσιμο του ιζήματος επί 3 φορές με αιθανόλη:οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 1:1 (v/v) και αντίστοιχο αριθμό φυγοκεντρήσεων (13.000g, 10min, 4°C). Τα όποια υπολείμματα οργανικού διαλύτη εξατμίστηκαν σε συσκευή speedvac και το τελικό πρωτεϊνικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης [sample buffer: 325mM Tris (pH 6,8 HCl), 12,5% (v/v) SDS, 0,6% (w/v) bromophenol blue και 30% γλυκερόλη] στο οποίο είχε προστεθεί β-μερκαπτοαιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 0,5mM λίγο πριν τη χρήση του (Mattoo et al. 1981). Τέλος, τα δείγματα επώαστηκαν στους 100°C για 5min.



Εικόνα 28. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τύπου P9DS της Owl Separation Systems.

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (1970) με ελάχιστες αλλαγές. Αρχικά, οι πρωτεΐνες διήρθαν από πηκτική στοίβαξης (stacking gel) περιεκτικότητας 4% w/v διαλύματος ακρυλαμιδίου, σε πεδίο 80V όπου και συσσωρεύτηκαν. Έπειτα, πέρασαν στη πηκτική διαχωρισμού (resolving gel) περιεκτικότητας 16% w/v διαλύματος ακρυλαμιδίου και δυναμικό 120V. Με τη βοήθεια του ηλεκτρικού ρεύματος και της πηκτικής οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση τη μάζα τους. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η P9DS της Owl Separation Systems και το τροφοδοτικό το OSP-300 της ίδιας εταιρίας (Εικόνα 28). Η πηκτική, μετά τη λήξη της ηλεκτροφόρησης, τοποθετήθηκε σε διάλυμα χρώσης (stain) και οι πρωτεΐνες χρωματίστηκαν με Coomassie Brilliant Blue R-250 με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20min. Στη συνέχεια το πήκτωμα αποχρωματίστηκε με διάλυμα αποχρωματισμού (destain) και αφού ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό φωτογραφήθηκε.

Πίνακας 5. Η σύσταση των διαλυμάτων στοίβαξης και διαχωρισμού των πρωτεϊνών.

	Stacking	Resolving
Acrylamide:Bis	2ml	16ml
Upper/Lower Tris	3,7ml	7,5ml
Glycerol 50%		0,6ml
Final volume	15ml	30ml
APS 10%	52μl	120μl
TEMED	22μl	10μl

Πίνακας 6. Η σύσταση των διαλυμάτων χρώσης και αποχρωματισμού του πηκτώματος.

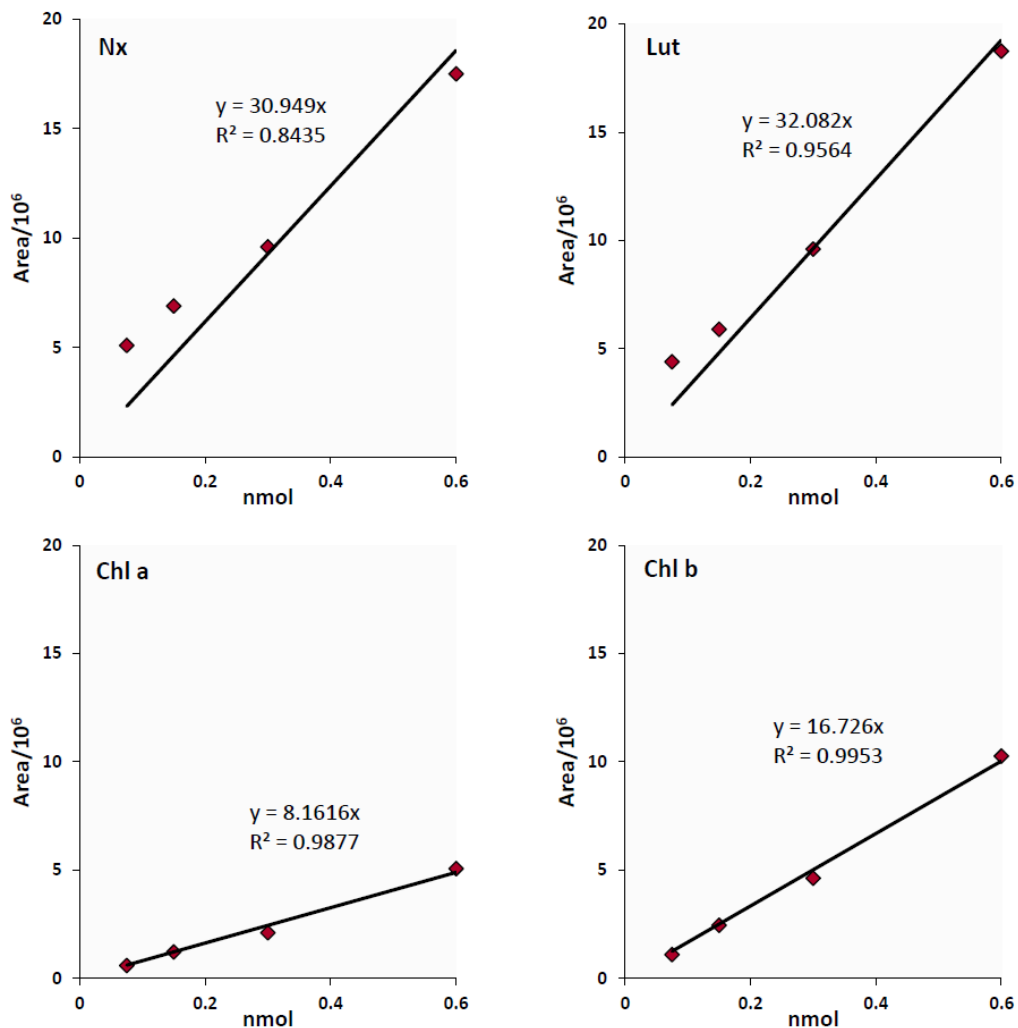
	Stain	Destain
Methanol	50%	50%
Acetic acid	10%	10%
dH ₂ O	39,5%	40%
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,5%	

12. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φωτοσυνθετικών χρωστικών των συμπλόκων της κεραίας με HPLC ανάλυση



Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των χρωστικών των απομονωμένων ζωνών από τη διαβάθμιση σάκχαρης έγινε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High performance liquid chromatography, HPLC). Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε την

Εικόνα 29. Η συσκευή HPLC τύπου Shimadzu LC-10AD. εκχύλιση των χρωστικών με την προσθήκη σε 250μl δείγματος 500μl οξεϊκού αιθυλεστέρα, 500μl απιονισμένου νερού και μια μικρή ποσότητα NaCl. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντριση (13.000g, 5min, 25°C) των



Εικόνα 30. Πρότυπες καμπύλες εμβαδού κορυφής- συγκέντρωσης για τις χρωστικές νεοξανθίνη (Nx), λουτεΐνη (Lut), χλωροφύλλη a (Chl a) και χλωροφύλλη b (Chl b), όπως προέκυψαν από τα χρωματογραφήματα της HPLC.

δειγμάτων για τη συλλογή της οργανικής φάσης. Προστέθηκαν ξανά 500ml οξεικού αιθυλεστέρα και η διαδικασία επαναλήφθηκε ώσπου τελικά ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε με αέριο N₂ και τα αποξηραμένα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε 80% ακετόνη. Οι χρωστικές διαχωρίστηκαν με τη χρήση στήλης narrow bore C-18 (2,1mm x 200mm, 5μm Hypersyl, Hewlett Packard) εφαρμόζοντας μια διαβάθμιση από ακετονιτρίλιο : μεθανόλη (75:25 v/v) και νερό σύμφωνα με την μέθοδο των Humbeck et al. (1988). Ο διαχωρισμός έγινε σε HPLC (Shimadzu, LC-10AD, VP) σύστημα δύο αντλιών με diode array (Shimadzu SPD-M10A) (Εικόνα 29).

Για τη ποσοτικοποίηση των κορυφών των χρωματογραφημάτων ήταν αναγκαία η απομόνωση ελεύθερων χρωστικών με TLC και η σύγκριση με πρότυπες καμπύλες που δημιουργήθηκαν από τα χρωματογραφήματα διαφορετικών συγκεντρώσεων αυτών των χρωστικών (Εικόνα 30).

13. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού

Όλες οι λήψεις των φασμάτων απορρόφησης έγιναν σε φωτόμετρο τύπου Ocean Optics USB4000 εξοπλισμένο με φωτεινή πηγή τύπου DH-2000-BAL (Εικόνα 26). Η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε ήταν quartz χαλαζία. Όλη η διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων των χρωστικών και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνθήκες χαμηλής έντασης πράσινου φωτός, για να αποφευχθεί η φωτοοξειδωση των χρωστικών.

13.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις απορρόφησης φωτοσυνθετικών χρωστικών

Αρχικά η συγκέντρωση των διαλυμάτων των χρωστικών που βρίσκονταν διαλυμένες σε αιθανόλη προσαρμόστηκε στα 30μM, αφού μετά από φασματοσκοπική μελέτη η συγκεκριμένη συγκέντρωση επιλέχτηκε ως η καταλληλότερη. Τα διαλύματα των χρωστικών αναμείχθηκαν με διαλύματα πολυαμίνης (σε μορφή ελεύθερης βάσης) ώστε τελικά να προκύψουν διαλύματα με ίδια συγκέντρωση χλωροφύλλης και διαφορετική συγκέντρωση πολυαμίνης. Η μοριακή αναλογία ήταν 1:16.600 για την υψηλότερη συγκέντρωση πολυαμίνης που εξετάστηκε.

13.2 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις απορρόφησης χλωροφυλλίνης

Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε για τα πειράματα με τη χλωροφυλλίνη (Sodium Copper Chlorophyllin, SCC) ήταν 30 μ M (10 φορές χαμηλότερα από το όριο διαλυτότητάς της κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες) όμως στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν ΠAs σε μορφή άλατος και όλες οι μετρήσεις έγιναν εξολοκλήρου σε απιονισμένο νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος. Η τιτλοδότηση των συμπλόκων SCC:ΠΑ έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1mM HEPES το pH του οποίου ρυθμίστηκε με την προσθήκη κατάλληλων συγκεντρώσεων HCl ή NaOH.

13.3 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις απορρόφησης LHCb συμπλόκων

Τα δείγματα ήταν διαλυτοποιημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα 14mM HEPES (pH 7,5) που περιείχε 20 μ M β -DM ενώ η συγκέντρωση της χλωροφύλλης των συμπλόκων είχε ρυθμιστεί στα 3,5 μ M.

14. Φασματοσκοπία φθορισμού

Όλες οι λήψεις των φασμάτων φθορισμού έγιναν σε υπερευαίσθητο φθοροφωτόμετρο τύπου LS-50B (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.

Εικόνα 31. Το φθοροφωτόμετρο τύπου LS-50B Perkin της Elmer.

14.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις φθορισμού φωτοσυνθετικών χρωστικών

Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού για τις Chl a, Chl b, Pheo a και Pheo b προήλθαν μετά από διέγερση στα 425, 440, 410 και 415 nm αντίστοιχα. Το παράθυρο διέγερσης ήταν 15nm και το παράθυρο εκπομπής 5nm. Οι συγκεντρώσεις είχαν οριστεί στα 3 $\times 10^{-8}$ M, ενώ οι μοριακές αναλογίες χρωστικής:πολυαμίνης (με τη μορφή ελεύθερης βάσης) που εξετάστηκαν ήταν ίδιες με αυτές της απορρόφησης (έως και 1:16.600).

14.2 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις φθορισμού χλωροφυλλίνης

Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού για τη SCC προήλθαν μετά από διέγερση στα 405nm. Το παράθυρο διέγερσης ήταν 15nm και το παράθυρο εκπομπής 15nm. Η συγκέντρωση της SCC ορίστηκε στα 10μM. Η τιτλοδότηση του συμπλόκου SCC:Spm έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1mM HEPES, το pH του οποίου ρυθμίστηκε με την προσθήκη κατάλληλων συγκεντρώσεων HCl ή NaOH.

14.3 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις φθορισμού LHCb συμπλόκων

Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού σε θερμοκρασία δωματίου και η παρακολούθηση της εκπομπής φθορισμού στα 681nm στη διάρκεια του χρόνου (Time drive μετρήσεις φθορισμού) των τριμερών και μονομερών συμπλόκων της κεραίας πάθησαν με διέγερση στα 440nm υπό συνεχή ανάδευση. Το παράθυρο διέγερσης ήταν 15nm και το παράθυρο εκπομπής 5nm. Τα σύμπλοκα της κεραίας ήταν διαλυτοποιημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα 14mM HEPES (pH 7,5) που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις β-DM. Η τελική συγκέντρωση της Chl στο διάλυμα της κυψελίδας ορίστηκε σε όλες τις περιπτώσεις γύρω στα 0,1μM. Για την τιτλοδότηση των ΠΑΣ, τα αλάτια τους προστέθηκαν στο διάλυμα πριν την προσθήκη των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων. Η οξίνιση του διαλύματος επετεύχθη έπειτα από την προσθήκη μικρής ποσότητας αραιωμένου διαλύματος HCl ώστε η τιμή του pH να μεταβεί στο 5,7 ή και χαμηλότερα σε κάποια πειράματα. Η ποσότητα HCl ήταν συγκεκριμένη και είχε επιλεγεί έπειτα από δοκιμές τιτλοδότησης σε μεγαλύτερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος με τη χρήση ενός CRISON GLP22 pHμέτρου. Τα δείγματα ήταν αρκετά σταθερά στον πάγο για τουλάχιστον 8 ώρες, ενώ η αυθόρμητη απόσβεση του φθορισμού τους λόγω της μείωσης της συγκέντρωσης του απορρυπαντικού από τα 200μM στα 20μM ή στα 6μM υπολογίστηκε ότι ήταν μικρότερη από 10% κατά τη διάρκεια της συλλογής των φασμάτων.

Για τις μετρήσεις φθορισμού στα 77K, προστέθηκαν σε διάλυμα 14mM HEPES (pH 7,5) που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις β-DM, τα αλάτια των ΠΑΣ και τα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα σε τελική συγκέντρωση 0,1μM και αφού αναδεύτηκε, περίπου 250μl μεταφέρθηκαν σε γυάλινο τριχοειδή σωλήνα ο οποίος πάγωσε αμέσως με την τοποθέτησή του στην ειδική βάση του φωτόμετρου που περιείχε υγρό άζωτο.

15. Φασματοσκοπία Raman

Οι μετρήσεις Raman διεξάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με τη χρήση ενός Nicolet Almega XR Raman φωτόμετρου εξοπλισμένο με ένα 473nm μπλε λέιζερ (15mW) ως πηγή διέγερσης και 672 lines/mm grating (σχάρα διάθλασης) από μια θερμοηλεκτρικά ψυχόμενη (-49°C) CCD κάμερα. Η δέσμη



Εικόνα 32. Το Nicolet Almega XR Raman φωτόμετρο εξοπλισμένο με ένα 473nm μπλε λέιζερ.

εστιάστηκε στα δείγματα μέσω ενός ομοεστιακού (confocal) μικροσκοπίου εξοπλισμένο με 10x, 50x, και 100x φακούς. Η ένταση του λέιζερ διέγερσης ήταν 100%. Όλα τα φάσματα πάρθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Nicolet OMNIC στην περιοχή ανάμεσα στους 400 και 4000 cm^{-1} . Η προετοιμασία των δειγμάτων και η λήψη των φασμάτων έγινε σε απόλυτο σκοτάδι. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο μάρτυρας και οι μεταχειρίσεις με ΠΑς αντιστοιχούν σε ξεχωριστά δείγματα και όχι σε ένα αρχικό στο οποίο προστέθηκε στη συνέχεια η ΠΑ και ξαναμετρήθηκε.

15.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις Raman χλωροφυλλών

Για τα πειράματα της δονητικής φασματοσκοπίας Raman προμηθεύτηκαν όσο το δυνατόν καθαρότερα παρασκευάσματα Chl a και b από την εταιρεία Fluka. Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε αιθανόλη σε μια αρχική συγκέντρωση 40mM. Στη συνέχεια αραιώθηκαν με ίσο όγκο αιθανολικού διαλύματος 1M (ελεύθερης βάσης) πολυαμίνης (ή απουσία ΠΑ για το μάρτυρα) σε τελική συγκέντρωση 20mM. Τα φάσματα των Chl a και b καταγράφηκαν με τη συγκέντρωση 2 φασμάτων, ενώ ο χρόνος έκθεσης του κάθε δείγματος ήταν 10sec.

15.2 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις Raman χλωροφυλλίνης

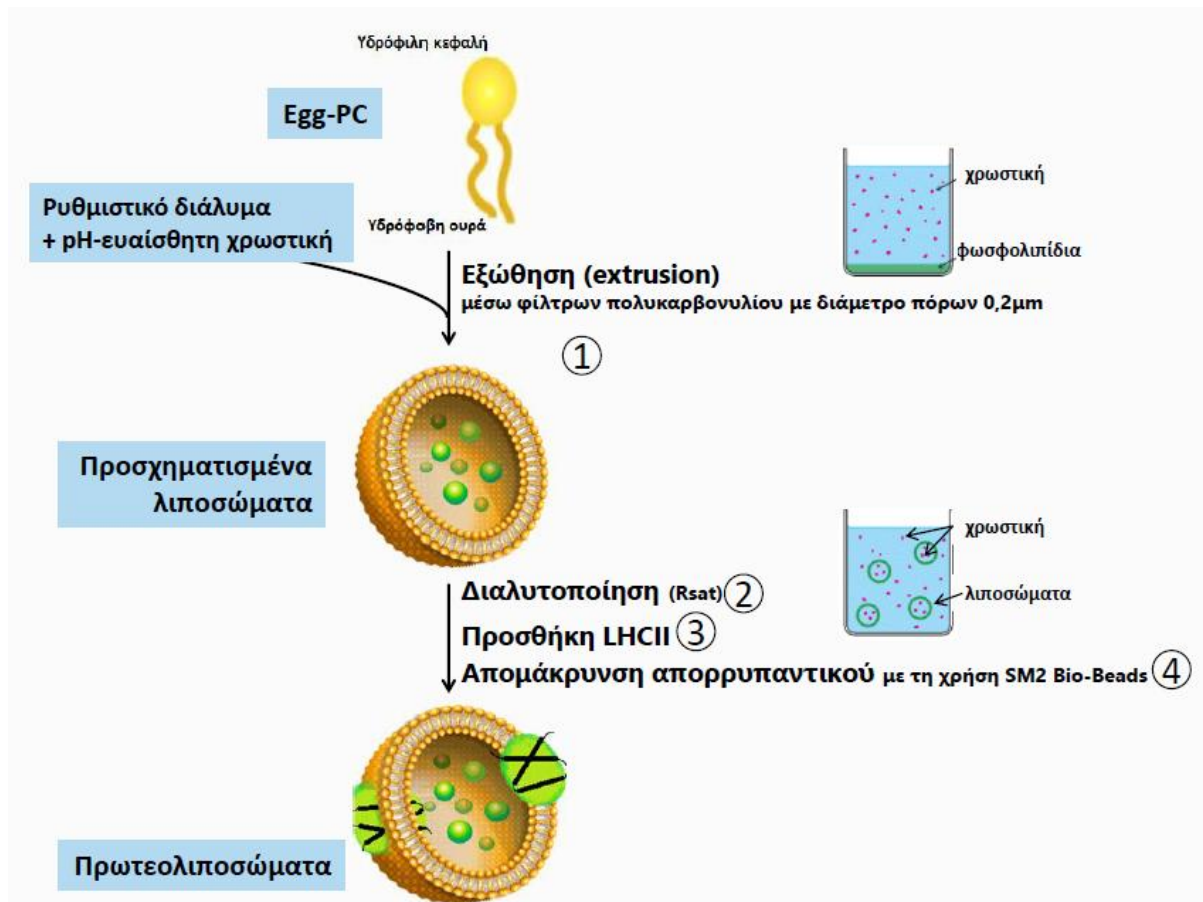
Τα φάσματα 25mM χλωροφυλλίνης σε απιονισμένο νερό καταγράφηκαν με τη συγκέντρωση 2 φασμάτων, ενώ ο χρόνος έκθεσης του κάθε δείγματος ήταν 30sec. Η μοριακή αναλογία χλωροφυλλίνης: πολυαμίνης (σε μορφή αλατιού) ήταν 1:1.

15.3 Προετοιμασία δειγμάτων και μετρήσεις Raman LHCb συμπλόκων

Τα φάσματα Raman των συμπλόκων της κεραίας καταγράφηκαν με τη συγκέντρωση 2 φασμάτων, ενώ ο χρόνος έκθεσης του κάθε δείγματος ήταν 5sec. Τα δείγματα ήταν διαλυτοποιημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα 14mM HEPES (pH 7,5) που περιείχε 40μM β-DM σε τελική συγκέντρωση Chl 3,5μM.

16. Παρασκευή λιποσωμάτων και πρωτεολιποσωμάτων για μετρήσεις αγωγιμότητας

Η πιο επιτυχημένη και συχνά χρησιμοποιούμενη στρατηγική για την παρασκευή πρωτεολιποσωμάτων είναι αυτή που εμπεριέχει τη χρήση απορρυπαντικών, καθώς οι περισσότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες απομονώνονται και καθαρίζονται επίσης με τη χρήση απορρυπαντικών που διατηρούν μη μετουσιωμένη τη μορφή τους (Helenius and Simons

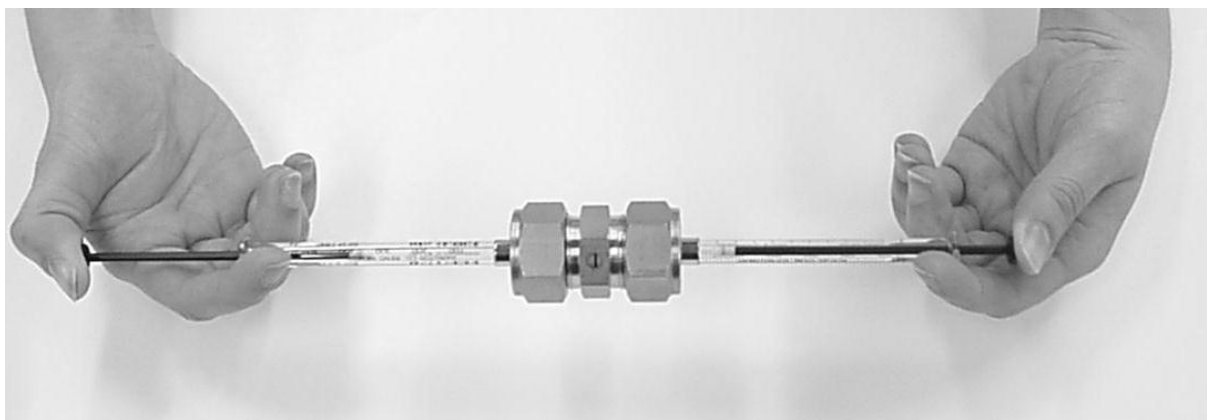


Εικόνα 33. Η ενσωμάτωση μεμβρανικών πρωτεϊνών σε λιποσώματα διεξάγεται σε 4 στάδια. Αρχικά, από λιπίδια φωσφατιδυλοχολίνης σχηματίζονται με την προσθήκη υδατικού μέσου ανομοιογενείς σε μέγεθος και μορφή πληθυσμοί λιποσωμάτων που στη συνέχεια ομογενοποιούνται μέσω εξώθησης του εναιωρήματος από μια πολυκαρβονυλική μεμβράνη με συγκεκριμένη διάμετρο πόρων (1). Στη συνέχεια, τα προσηματισμένα λιποσώματα μιας λιπιδικής διπλοστιβάδας διαλυτοποιούνται ελαφρώς με συγκεκριμένη ποσότητα κατάλληλου απορρυπαντικού (2) ώστε να είναι ευκολότερη η ενσωμάτωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων που προστίθενται στο αμέσως επόμενο βήμα (3). Τέλος, το απορρυπαντικό απομακρύνεται από το διάλυμα με τη χρήση ειδικών σφαιριδίων πολυστυρενίου για το σχηματισμό των πρωτεολιποσωμάτων (4).

1975; Rigaud et al. 1995). Πιο συγκεκριμένα, στη διατριβή αυτή ακολουθήθηκε με μικρές διαφοροποιήσεις η στρατηγική των Rigaud και Lévy (2003) που περιλαμβάνει τέσσερα βασικά στάδια (Εικόνα 33): (1) παρασκευή σχετικά μεγάλων, ομοιογενών λιποσωμάτων μιας λιπιδικής διπλοστιβάδας, (2) προσθήκη απορρυπαντικού στα προσχηματισμένα λιποσώματα σε τέτοια συγκέντρωση που να βρίσκεται σε κορεσμό στα λιποσώματα χωρίς να τα διαλυτοποιεί σε μικκύλια, (3) προσθήκη της διαλυτοποιημένης μεμβρανικής πρωτεΐνης και (4) απομάκρυνση του απορρυπαντικού και σχηματισμός των πρωτεολιποσωμάτων.

16.1 Παρασκευή προσχηματισμένων λιποσωμάτων μιας λιπιδικής διπλοστιβάδας

Για την παρασκευή των λιποσωμάτων χρησιμοποιήθηκε φωσφατιδυλοχολίνη από αυγό (Egg - Phosphatidyl Choline, Egg-PC ή lecithin) που χρησιμοποιείται ευρέως λόγω του ουδέτερου φορτίου της και του μικρού της κόστους. Επειδή από την ακόρεστη φωσφατιδυλοχολίνη προκύπτουν διαπερατές και σχετικά ασταθείς διπλοστοιβάδες, προστέθηκε στο αρχικό διάλυμα φωσφατιδυλοχολίνης μικρή ποσότητα χοληστερόλης (Cholesterol) σε μοριακή αναλογία (Egg-PC:Cholesterol) 9:1. Η παρουσία της χοληστερόλης στα λιποσώματα προσέφερε μεγαλύτερη σταθερότητα και μεγαλύτερη αδιαπερατότητα σε πρωτόνια. Η ανάμειξή τους έγινε σε χλωροφόρμιο μέσα σε μια γυάλινη φιάλη και η συγκέντρωση του egg-PC ορίστηκε στα 1,25mg/ml. Μια λεπτή ταινία λιπιδίων σχηματίζεται στη βάση της γυάλινης φιάλης μετά την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη με αέριο άζωτο (Εικόνα 33). Η λιπιδική ταινία κρατείται υπό τη μειωμένη πίεση (λιγότερο από 1/105 bar) του αερίου αζώτου για περίπου 90min ώστε να απομακρυνθούν όλα τα πιθανά υπολείμματα του οργανικού διαλύτη. Στη συνέχεια, η φιάλη συμπληρώνεται με μικρό όγκο (0,5ml)

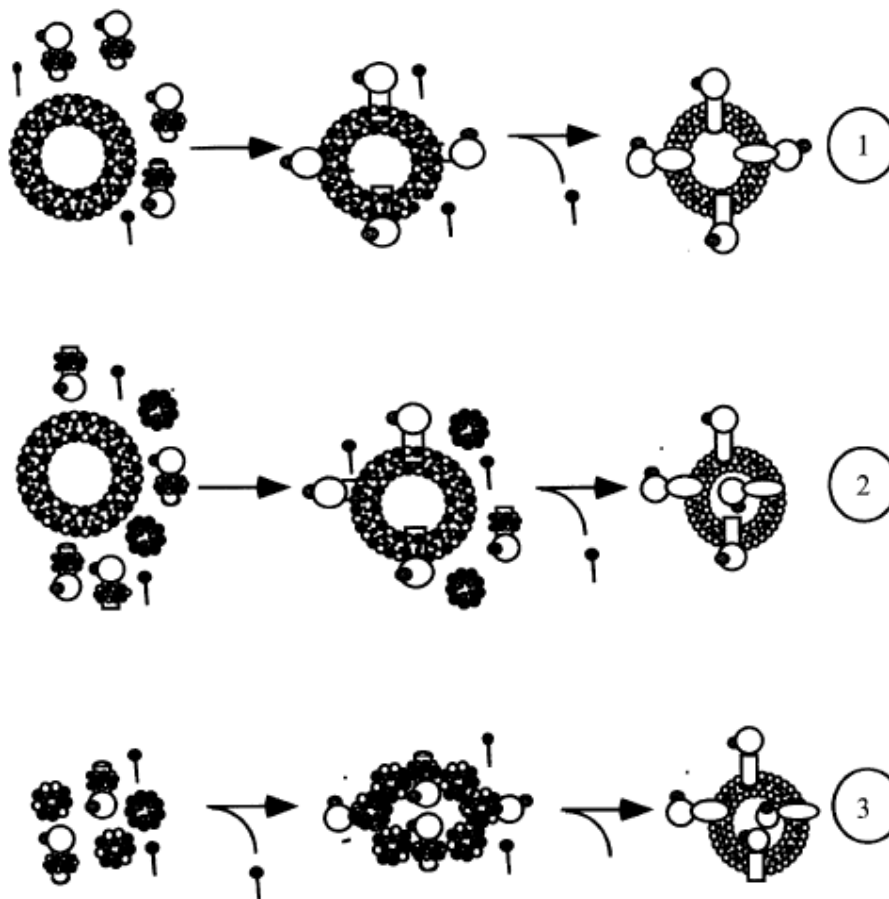
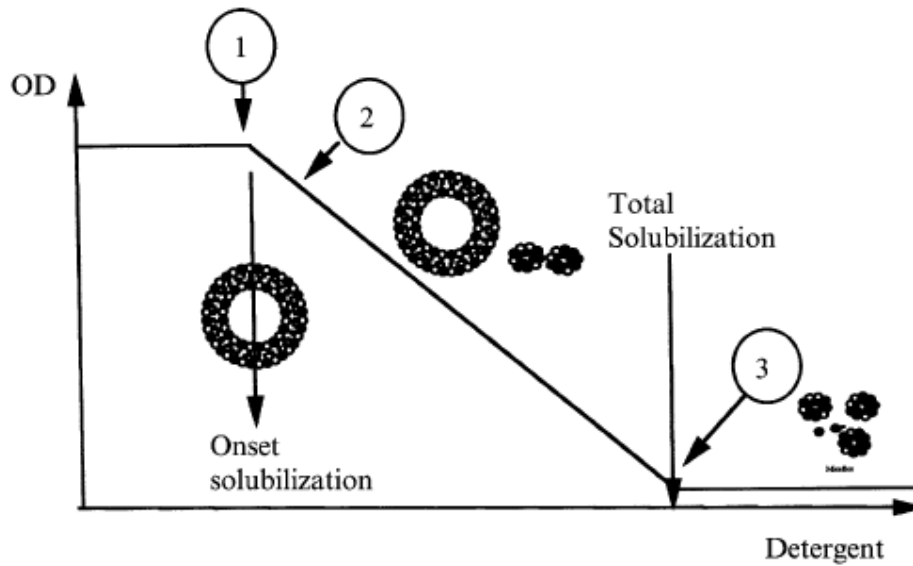


Εικόνα 34. Η παρασκευή ομοιογενούς σε μέγεθος πληθυσμού λιποσωμάτων μιας λιπιδικής διπλοστιβάδας επιτυγχάνεται με την εξώθηση του διαλύματος από φίλτρο πολυανθρακικού εστέρα με πόρους γνωστής διαμέτρου. Το διάλυμα πέρασε από τη μια σύριγγα στην άλλη δια μέσω του φίλτρου 21 φορές.

ρυθμιστικού διαλύματος 10mM Tricine (pH 7,5) που περιέχει 50mM KCl και 4×10^{-4} M PTS (8-Hydroxypryrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt), μια πυρανίνη που χρησιμοποιήθηκε ως φθορισμομετρικός δείκτης της αλλαγής του pH στο εσωτερικό των λιποσωμάτων κατά τις μετρήσεις αγωγιμότητάς τους σε πρωτόνια. Ο αμφίφιλος χαρακτήρας των λιπιδίων, με τις υδρόφιλες κεφαλές και τις υδρόφοβες ουρές (Εικόνα 33) προάγει την αυθόρμητη συνάθροισή τους σε ποικίλες μικροδομές που περικλείουν στο εσωτερικό τους το φθορισμομετρικό δείκτη όσο αυτά βρίσκονται σε υδατικό περιβάλλον και αναδύονται έντονα για άλλα 90min περίπου. Τέλος, δημιουργείται ομοιογενής πληθυσμός λιποσωμάτων μιας λιπιδικής στιβάδας διαμέτρου 200nm με την εξώθησή του διαλύματος από φίλτρο πολυανθρακικού εστέρα με πόρους διαμέτρου 200nm (Εικόνα 34). Το μέγεθος των λιποσωμάτων επιλέχτηκε με σκοπό να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή αναλογία παγιδευμένου όγκου αποφεύγοντας ωστόσο τη μηχανική αδυναμία μιας μεμβράνης που λόγω του μεγάλου μεγέθους της μπορεί εύκολα να σπάσει χάνοντας μέρος των παγιδευμένων συστατικών της (New 1990). Επιπλέον, προς αποφυγή φαινομένων σύντηξης των μεμβρανών στο στάδιο της διαλυτοποίησης των λιποσωμάτων, απαιτούνται λιποσώματα με διάμετρο μεγαλύτερη των 150nm (Rigaud and Lévy 2003).

16.2 Ενσωμάτωση των LHCb συμπλόκων στα λιποσώματα

Το πρώτο στάδιο της ενσωμάτωσης των συμπλόκων στα λιποσώματα είναι αυτό της διαλυτοποίησής τους με προσθήκη μικρής συγκέντρωσης επιλεγμένου απορρυπαντικού, το οποίο στην περίπτωση της παρούσας διατριβής ήταν το dodecyl- β -D-maltoside (β -DM) που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των LHCbs. Το στάδιο αυτό είναι πολύ κρίσιμο για τη μορφή των πρωτεολιποσωμάτων που θα δημιουργηθούν μετά το πέρας και των τριών σταδίων του πρωτοκόλλου. Η σταδιακή προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων απορρυπαντικού στο εναιώρημα των προσχηματισμένων λιποσωμάτων έχει αναδείξει τρεις διακριτές καταστάσεις διαλυτοποίησης (Rigaud et al. 1995; Lambert et al. 1998). Οι καταστάσεις αυτές που παρουσιάζονται στην Εικόνα 35, έχουν διαχωριστεί σύμφωνα με τη θολότητα που εμφανίζει το διάλυμα έπειτα από αρκετές ώρες επώασης με το απορρυπαντικό. Στην πρώτη κατάσταση, μόρια του απορρυπαντικού ενσωματώνονται στο μεμβρανικό σύστημα χωρίς να το διαρρηγνύουν. Στη δεύτερη, μεγαλύτερη συγκέντρωση απορρυπαντικού έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μετατροπή των λιποσωμάτων σε μικρά μικκύλια και η τρίτη οδηγεί σε πλήρη διαλυτοποίησή τους.



Εικόνα 35. Οι τρεις καταστάσεις διαλυτοποίησης των λιποσωμάτων σύμφωνα με τη θολότητα του διαλύματός τους έπειτα από την επώαση με κάποιο απορρυπαντικό (επάνω). Η ενσωμάτωση των πρωτεϊνών στα λιποσώματα μπορεί να γίνει με διαφορετικό τρόπο σε καθεμία από τις τρεις καταστάσεις (κάτω). Είτε απευθείας σε κορεσμένα σε απορρυπαντικό λιποσώματα (μηχανισμός 1), είτε μεταφερόμενες από μικκύλια στα λιποσώματα (μηχανισμός 2), είτε μέσω συνένωσης μικκυλίων (μηχανισμός 3). Ο προσανατολισμός της πρωτεΐνης στο πρωτεολιπόσωμα σχετίζεται άμεσα με τον τύπο της ενσωμάτωσής της (Rigaud and Lévy 2003).

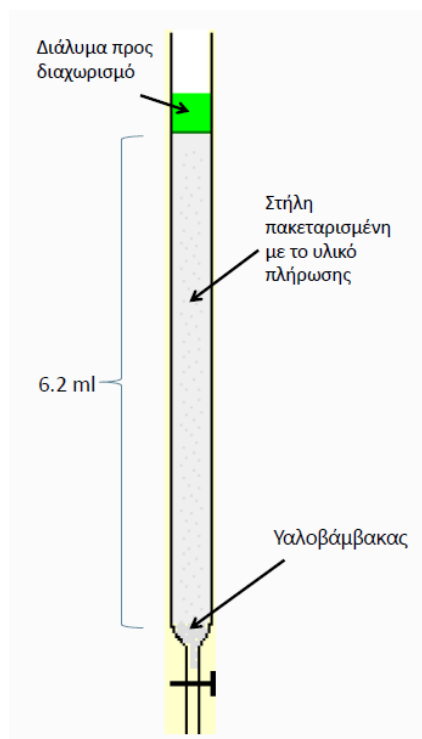
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για να επιτευχθεί η πρώτη κατάσταση διαλυτοποίησης περιγράφεται ποσοτικά από την εξίσωση:

$$D_{\text{total}} = D_{\text{water}} + R_{\text{sat}} [\text{lipid}],$$

όπου D_{total} είναι η τελική επιθυμητή συγκέντρωση του απορρυπαντικού, $[\text{lipid}]$ είναι η συγκέντρωση των λιπιδίων, D_{water} είναι η κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (Critical Micelle Concentration ή CMC) του απορρυπαντικού στο νερό παρουσία των λιπιδίων και R_{sat} η αναλογία απορρυπαντικού ως προς τα λιπίδια που απαιτείται για κορεσμένα σε απορρυπαντικό λιποσώματα. Με δεδομένα ότι η CMC του β -DM στο νερό παρουσία λιπιδίων είναι 0,3mM (ή 0,15mg/ml) και ο λόγος R_{sat} ισούται με 1mol/mol (ή 0,65w/w), προστέθηκε στο διάλυμα των προσχηματισμένων λιποσωμάτων β -DM σε τελική συγκέντρωση του κυμαινόνταν από 0,3 έως 0,65mM, δηλαδή σε κάθε περίπτωση αρκετά χαμηλότερη από την κρίσιμη συγκέντρωση διαλυτοποίησης, και ακολούθησε ανάδευση για 1h πριν την προσθήκη των πρωτεϊνικών συμπλόκων. Για την απομάκρυνση του β -DM από το διάλυμα των πρωτεϊνικών συμπλόκων (που υπήρχε κατά το διαχωρισμό και την απομόνωσή τους), που ήταν απαραίτητη για την αποφυγή φαινομένων διαλυτοποίησης των λιποσωμάτων, έγινε επώαση του διαλύματος με κατάλληλη συγκέντρωση ειδικών προσροφητικών σφαιριδίων πολυστυρενίου (SM-2 Bio-beads) για 1h πριν την ανάμειξή τους με το διάλυμα των λιποσωμάτων. Ακολούθησε η ανάμειξη των πρωτεϊνικών συμπλόκων της κεραίας με τα λιποσώματα σε μοριακή αναλογία λιπιδίων/πρωτεΐνης 80:1(w/w) και το διάλυμα αφέθηκε υπό ήπια ανάδευση για 1h. Για μια τέτοια αναλογία, υπολογίζεται ότι ένα πρωτεολιπόσωμα διαμέτρου 200nm περιέχει έως και 25 πρωτεΐνες των 100KD (Rigaud and Lévy 2003). Τέλος, το απορρυπαντικό που είχε προστεθεί στο στάδιο της διαλυτοποίησης απομακρύνθηκε με τη χρήση σφαιριδίων SM-2 Bio-beads (περίπου 0,05g/0,5ml). Με το πέρας μιας ώρας επώασης υπό ανάδευση, τα σφαιρίδια απομακρύνθηκαν από το διάλυμα, το οποίο περιείχε πρωτεολιποσώματα με ενσωματωμένη PTS και ελεύθερη PTS (Εικόνα 33).

Πρέπει να σημειωθεί ότι για την αποφυγή οποιασδήποτε δομικής διαφοροποίησης ανάμεσα στο μάρτυρα (λιποσώματα) και τα πρωτεολιποσώματα που θα μπορούσε να επηρεάσει τις ιδιότητές τους καθώς και τον όγκο της παγιδευμένης χρωστικής τους, τα τρία αυτά στάδια του πρωτοκόλλου ακολουθήθηκαν διατηρώντας τις ίδιες συνθήκες, αλλά χωρίς προσθήκη πρωτεϊνών (προστέθηκε στο στάδιο αυτό ίσος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος απομόνωσης των συμπλόκων της κεραίας) για την παρασκευή των λιποσωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις μετρήσεις αγωγιμότητας.

16.3 Απομάκρυνση της ελεύθερης χρωστικής από το διάλυμα των λιποσωμάτων (και πρωτεολιποσωμάτων) με χρωματογραφία μοριακής διήθησης

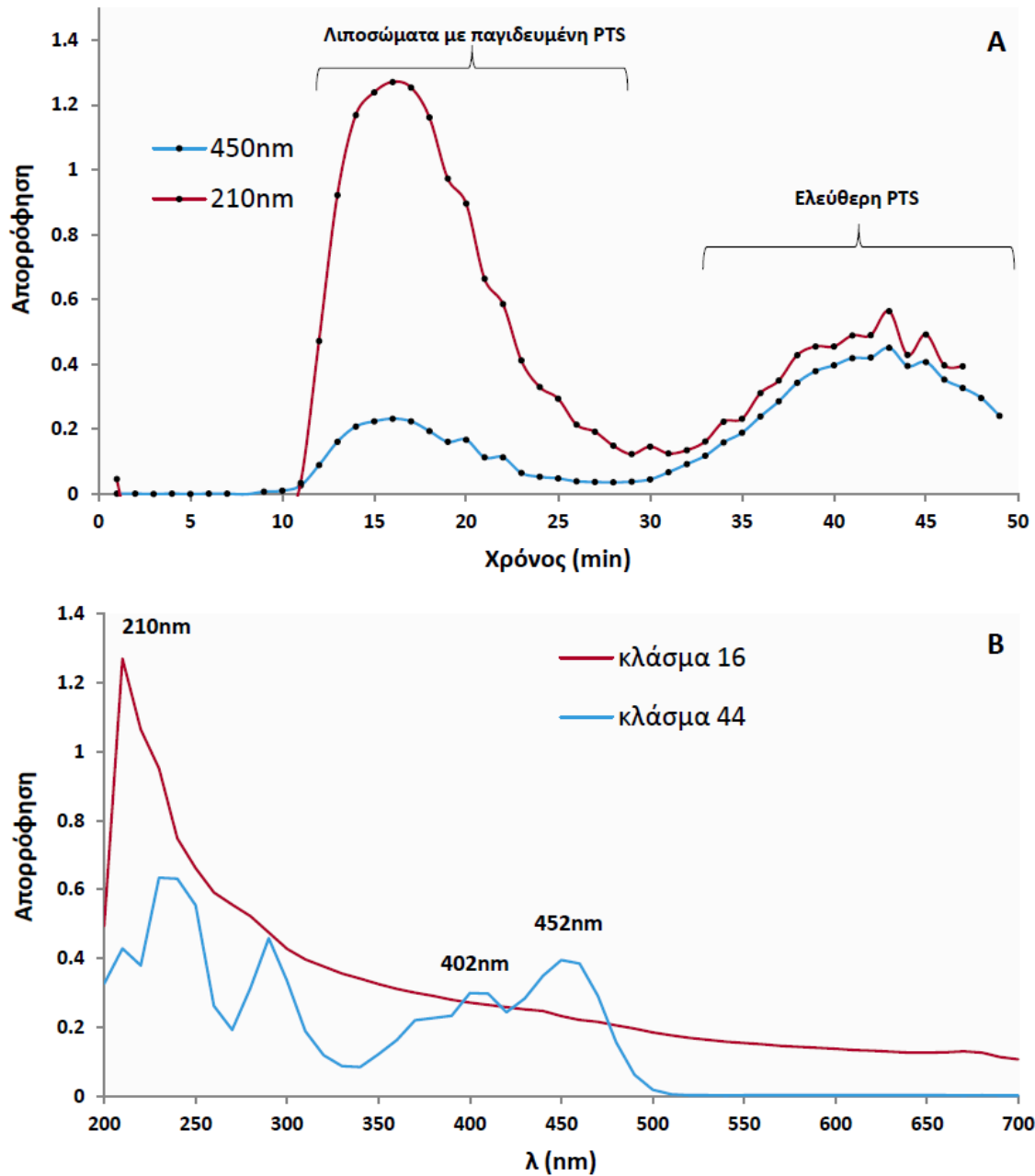


Εικόνα 36. Η στήλη της χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτή Sephadex G-100.

Η ελεύθερη χρωστική στο διάλυμα, που δεν εισήχθη στο εσωτερικό των λιποσωμάτων, απομακρύνθηκε από αυτά με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είχε διάμετρο 0.8cm και μήκος 10,5cm (Εικόνα 36). Το υλικό πλήρωσης, που περιείχε, ήταν το Sephadex G-100, πολυμερές της δεξτράνης στο οποίο έχουν δημιουργηθεί γέφυρες γλυκερόλης υπό την επίδραση της επιχλωριδίνης. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ίδιας σύστασης και pH με αυτό στο εσωτερικό των λιποσωμάτων. Για τον ισομερισμό των κλασμάτων που προέκυψαν από τη χρωματογραφία, χρησιμοποιήθηκε περισταλτική αντλία που η ροή της ρυθμίστηκε στα 0,27ml/min. Ο ρυθμός αυτός επιλέχθηκε γιατί φάνηκε να προσδίδει μεγαλύτερη καθαρότητα μεταξύ των κλασμάτων, δεν χάνεται μεγάλη ποσότητα του επιθυμητού υλικού καθώς δεν υπάρχει μεγάλη επικάλυψη μεταξύ των κρίσιμων κλασμάτων, διαρκεί σχετικά λίγο (περίπου 1h για τον πλήρη διαχωρισμό του δείγματος, 30min για τη συλλογή του πληθυσμού των λιποσωμάτων) και ο τελικός όγκος των κλασμάτων είναι ιδανικός για τη μέτρηση της απορρόφησής τους σε ELISA plate.

Ο διαχωρισμός στη χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή γίνεται με βάση των μέγεθος των μορίων. Τα λιποσώματα δεν παγιδεύονται στους πόρους του υλικού της στήλης και εκλούνται νωρίτερα από τα μικρότερα μόρια, όπως αυτά της πυρανίνης που παγιδεύονται στους πόρους και εκλούνται αργότερα. Από τα φάσματα UV-Vis των κλασμάτων ανιχνεύτηκε η σύστασή τους και επαληθεύτηκαν τα παραπάνω (Εικόνα 37). Τα λιποσώματα (και πρωτεολιποσώματα) με την παγιδευμένη χρωστική στο εσωτερικό τους απελευθερώνονται από τη στήλη στο χρονικό διάστημα μεταξύ 10 και 30min ενώ η ελεύθερη χρωστική στο διάστημα μεταξύ 30 και 55min (Εικόνα 37A). Τα λιπίδια εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης κοντά στα 210nm ενώ η πυρανίνη έχει δύο χαρακτηριστικά μέγιστα στην περιοχή του ορατού, στα 402 και 452nm. Η πυρανίνη απορροφά και στο υπεριώδες κοντά

στα 225-230nm και έτσι δικαιολογείται στο διάγραμμα 37A η αύξηση της απορρόφησης στα 210nm μετά τα 30min. Στην Εικόνα 37B παρατίθενται δύο χαρακτηριστικά φάσματα από κλάσματα που περιέχουν μόνο λιπосώματα (με παγιδευμένη PTS) και μόνο ελεύθερη PTS. Για τις μετρήσεις αγωγιμότητας συλλέχτηκαν σε όλες τις περιπτώσεις τα κλάσματα 1-27.



Εικόνα 37. Α. Το σήμα απορρόφησης των κλασμάτων με τη σειρά που προέκυψαν από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης στα 210nm (κόκκινη γραμμή) και στα 450nm (μπλε γραμμή). Β. Το φάσμα απορρόφησης των κλασμάτων στα 16min και στα 44min, που αντιστοιχούν στους δύο διακριτούς πληθυσμούς, των λιπосωμάτων με παγιδευμένη χρωστική στο εσωτερικό τους και της ελεύθερης χρωστικής αντίστοιχα.

17. Μετρήσεις αγωγιμότητας

Η παρακολούθηση και καταγραφή της διακίνησης των πρωτονίων δια μέσου των λιποσωμάτων και πρωτεολιποσωμάτων έγινε φθορισμομετρικά με τη χρήση του φθοροφωτόμετρου LS50B (Perkin Elmer). Όλες οι μετρήσεις και η προετοιμασία των δειγμάτων έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου και υπό πολύ χαμηλής έντασης φωτισμό. Χρησιμοποιήθηκε γυάλινη κυψελίδα οπτικά καθαρή και από τις τέσσερις πλευρές ενώ τα δείγματα βρίσκονταν υπό συνεχή, ήπια ανάδευση. Η εκπομπή της πυρανίνης ανιχνεύτηκε στα 513nm και η διέγερσή της καταγράφηκε στα 402nm και 452nm, δηλαδή στα κύρια μέγιστα του φάσματος διέγερσής της που αντιστοιχούν στη πρωτονιωμένη και μη-πρωτονιωμένη μορφή της αντίστοιχα. Για την καταγραφή της κινητικής των αλλαγών των επιπέδων του pH στο εσωτερικό των λιποσωμάτων μετά την οξίνιση του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε ο λόγος των μέγιστων διέγερσης 402nm/452nm. Για να αποφευχθεί η πιθανή δημιουργία ηλεκτροστατικού φραγμού κατά τη διακίνηση των πρωτονίων στο εσωτερικό των λιποσωμάτων προστέθηκαν 2μl αιθανολικού διαλύματος Βαλινομυκίνης (Valinomycin ή Val), ενός μεταφορέα ιόντων καλίου. Η Val προστέθηκε 40sec μετά την εκκίνηση της καταγραφής και η τελική συγκέντρωσή της στο διάλυμα ήταν 3μM. Η διαβάθμιση πρωτονίων προκλήθηκε με την ένθεση στο διάλυμα μικρού όγκου 0,67N HCl 2min μετά την προσθήκη της Val, που έριξε τα επίπεδα του pH κάτω από το 6. Η προσθήκη Spm έγινε στα 20sec στις περιπτώσεις όπου προστέθηκε κατά τις μετρήσεις. Τέλος, η επιβεβαίωση της ύπαρξης των LHCB συμπλόκων στα πρωτεολιποσώματα έγινε με την καταγραφή του φθορισμού τους στα 681nm.

18. In silico ανάλυση της δομής των συμπλόκων της κεραίας

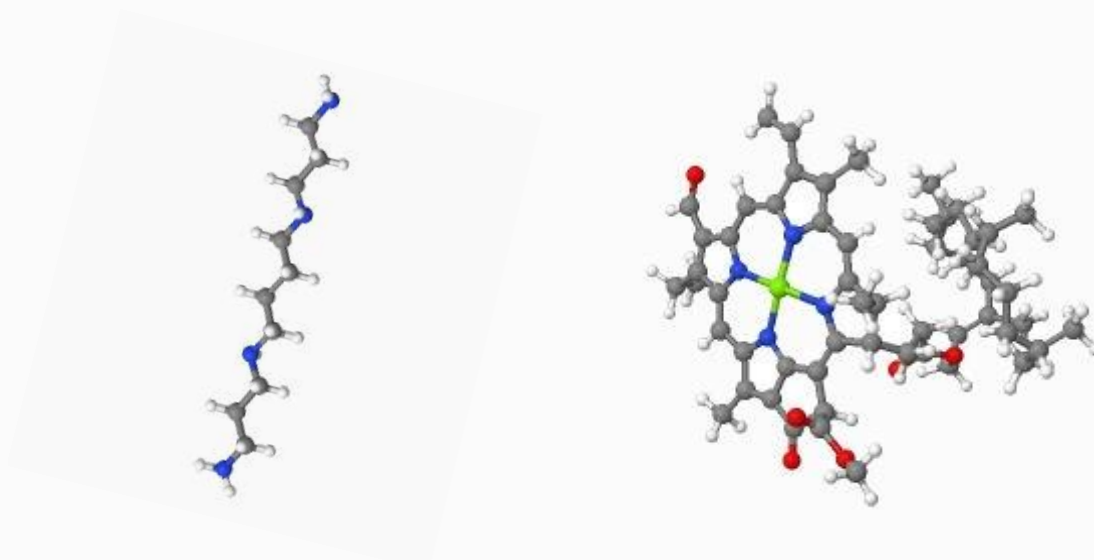
Τα δομικά μοντέλα που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή οπτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.3, Schrödinger, LLC (www.pymol.org). Οι κωδικοί των δομών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Οι PDB κωδικοί των δομών που μελετήθηκαν in silico στην παρούσα διατριβή.

Πρωτεΐνη	Οργανισμός	Κωδικός PDB
LHCII	Μπιζέλι	2BHW
LHCII	Σπανάκι	1RWT
CP29	Σπανάκι	3PL9

Κεφάλαιο 1

Χημικοί δεσμοί οξοφορβινών και μεταλλοπορφυρινών με πολυαμίνες



Η αξονική πρόσδεση των πολυαμινών στις χλωροφύλλες τροποποιεί την ικανότητα συλλογής φωτός και απόσβεσης του φθορισμού τους.

Στην εικόνα: Η τρισδιάστατη δομή της σπερμίνης (αριστερά) και της χλωροφύλλης b (δεξιά). Με γκρι, μπλε, κόκκινο και πράσινο χρώμα τα άτομα άνθρακα, αζώτου, οξυγόνου και μαγνησίου αντίστοιχα. Πηγή: RCSB Protein Data Bank.

Κεφάλαιο 1

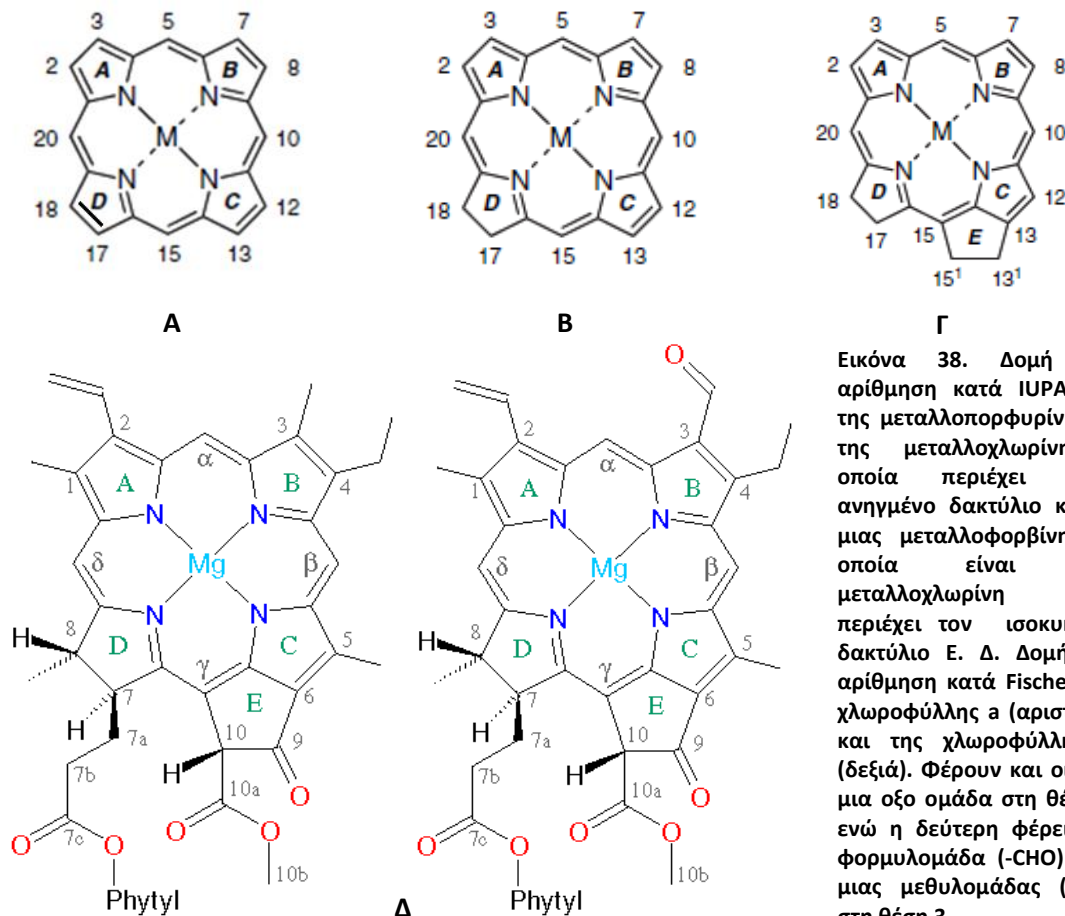
Χημικοί δεσμοί οξοφορβινών και μεταλλοπορφυρινών με πολυαμίνες

Εισαγωγή

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 πυρρολικού 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 38). Τα μόρια των χλωροφυλλών (Chl) 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 Chls 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 (phorbins) μεταξύ των θέσεων 13 και 15 καθώς και μια καρβονυλομάδα στη θέση 13 (Εικόνα 38). Το διακριτό χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία φυτόλης, μιας πολύ υδρόφοβης αλκοόλης με είκοσι άτομα άνθρακα η οποία εστεροποιείται με την πλευρική αλυσίδα ενός οξέος.

Όπως αναφέρθηκε και στην κυρίως εισαγωγή, τα δύο φωτοσυστήματα (PSI, PSII) εξαρτώνται κυρίως από τις Chl a και b που βρίσκονται συνδεδεμένες στις φωτοσυλλεκτικές κεραίες τους για την αποτελεσματική συλλογή της φωτονιακής ενέργειας (Kuhlbrandt et al. 1994; Caffarri et al. 2009). Η Chl a παίζει κεντρικό ρόλο στη φωτοχημική δραστηριότητα των PSII και PSI ενώ δύο μόρια φαιφυτίνης a (Pheo a) ανά ενεργό κέντρο εμπλέκονται στη

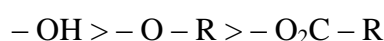
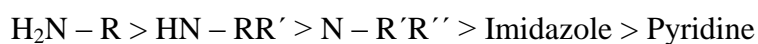
φωτοχημεία του PSII. Έπομένως, οι οπτικές και οξειδοαναγωγικές ιδιότητες των χρωστικών αυτών καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητες των δύο φωτοσυστημάτων.



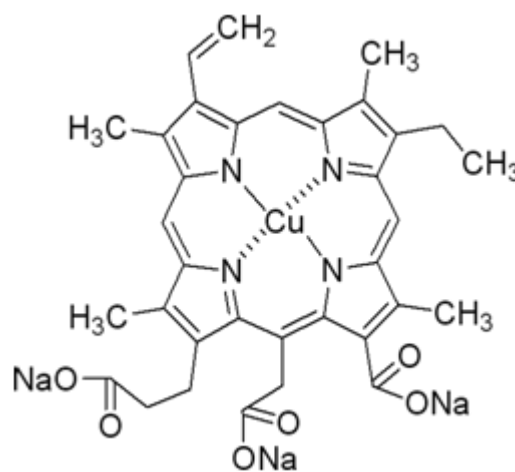
Εικόνα 38. Δομή και αρίθμηση κατά IUPAC Α. της μεταλλοπορφυρίνης Β. της μεταλλοχλωρίνης, η οποία περιέχει έναν ανηγμένο δακτύλιο και Γ. μιας μεταλλοφορβίνης, η οποία είναι μια μεταλλοχλωρίνη που περιέχει τον ισοκυκλικό δακτύλιο Ε. Δ. Δομή και αρίθμηση κατά Fischer της χλωροφύλλης α (αριστερά) και της χλωροφύλλης β (δεξιά). Φέρουν και οι δύο μια οξο ομάδα στη θέση 9 ενώ η δεύτερη φέρει μια φορμυλομάδα (-CHO) αντί μιας μεθυλομάδας (-CH₃) στη θέση 3.

In vivo, ο πρωτεϊνικός σκελετός που καθορίζει τη διάταξη των χλωροφυλλών στα κέντρα αντίδρασης και τις κεραίες, είναι αυτός που ρυθμίζει ως επί το πλείστον τις ιδιότητές τους. Πιο συγκεκριμένα, οι Chls είναι διατεταγμένες σε μια συμπαγή μορφή, πολύ σημαντική για τη μετακίνηση της ενέργειας διέγερσης. Μάλιστα, η συγκέντρωσή τους στην κεραία του PSII φτάνει τα 0.3M (Barros and Kühlbrandt 2009). Επιπλέον, οι Chls προσδένονται με υποκαταστάτες, που είναι συνήθως πλευρικές αλυσίδες κάποιων αμινοξικών καταλοίπων, μέσω δεσμών συναρμογής με το κεντρικό ιόν Mg του τετραπυρρολικού δακτυλίου τους (Standfuss et al. 2005). Οι κρυσταλλικές δομές 34 φωτοσυνθετικών πρωτεϊνών που προσδένουν ως συμπαράγοντες μόρια Chl ή βακτηριοχλωροφύλλης (BChl) έχουν αποκαλύψει πως οι περισσότερες από αυτές τις Chls δημιουργούν δεσμούς συναρμογής κυρίως με πεπτιδικά κατάλοιπα (π.χ. ομάδες histidyl-imidazolyl), πεπτιδικούς σκελετούς ή με κάποιο μόριο νερού (Oba and Tamiaki 2002; Liu et al. 2004). Έτσι, οι Chls εντοπίζονται *in*

νίνο, σε κατάσταση συναρμογής «πέντε» ή «έξι», δηλαδή με τέσσερις δεσμούς στο επίπεδο του τετραπυρρολικού δακτυλίου με τα τέσσερα άζωτα και έναν ή δύο κάθετα προσανατολισμένους στο επίπεδο του δακτυλίου με έναν ή δύο αξονικούς προσδέτες αντίστοιχα. Η ακόλουθη σειρά μπορεί γενικά να εφαρμοστεί για την πρόβλεψη της σχετικής θερμοδυναμικής σταθερότητας των αξονικών δεσμών, αν δεν παρεμβαίνουν άλλες στερεοχημικές επιδράσεις (Bouamaied et al. 2006):



Παρόλο που υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία για την αξονική πρόσδεση των Chls ή αναλόγων τους και τους μηχανισμούς της, συνήθως τα μόρια των συνδετών είναι ελάχιστης φυσιολογικής σημασίας. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε για πρώτη φορά η ικανότητα κάποιων φυσιολογικά ευρισκόμενων αμινών να δρουν ως αξονικοί προσδέτες των Chls και να αλλάζουν τις ιδιότητες των τελευταίων. Αν και έχουν γίνει υποθέσεις για την αλληλεπίδραση των Chls με τις πολυαμίνες (ΠΑΣ), κάτι τέτοιο δεν έχει διασαφηνιστεί κατηγορηματικά (Duca et al. 1994; Dondini et al. 2001). Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε διεξοδικά ο τρόπος αλληλεπίδρασης των τριών κύριων πολυαμινών (Put, Spd και Spm) με τις Chl a και b, με τις Pheo a και b, καθώς και με ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της χλωροφύλλης, τη χλωροφυλλίνη (Sodium copper chlorophyllin, SCC), μια πορφυρίνη χαλκού που δεν έχει φυτόλη (Εικόνα 39). Η σύγκριση της Chl a με τη Pheo a και της Chl b με τη Pheo b αποτελεί έναν τρόπο διαχωρισμού των φαινομένων που σχετίζονται με το ιόν Mg που φέρουν οι Chls και απουσιάζει από τις φαιοφυτίνες. Οι αλληλεπιδράσεις των χρωστικών με τις ΠΑΣ καταγράφηκαν με συνήθη φασματοσκοπικά εργαλεία (φασματοσκοπία απορρόφησης και φθορισμού) ενώ οι νέοι χημικοί δεσμοί επιβεβαιώθηκαν μέσω φασματοσκοπίας ταλάντωσης αξιοποιώντας υπερσύγχρονα συστήματα οπτικής μικροσκοπίας Raman.



Εικόνα 39. Η δομή του μορίου της χλωροφυλλίνης.

Αποτελέσματα

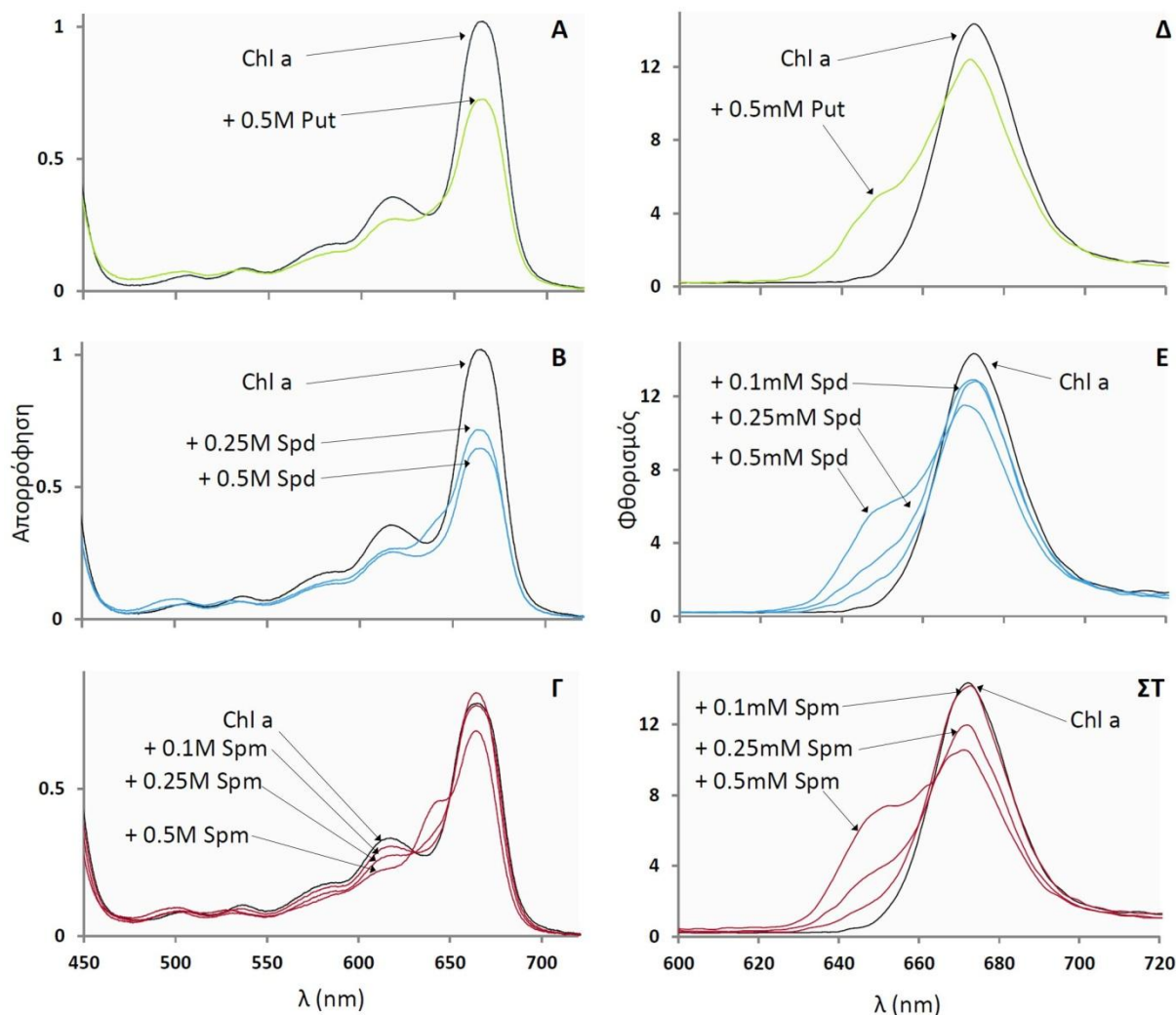
Οι απομονωμένες Chls λόγω του έντονου λιπόφιλου χαρακτήρα τους σχηματίζουν εύκολα συσσωματώματα *in vitro* και είναι επιρρεπείς σε μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με τον εκάστοτε διαλύτη ή προσμίξεις σε αυτόν (π.χ. νερό). Ο οργανικός διαλύτης, που επιλέχτηκε ως το καταλληλότερο περιβάλλον για τις χρωστικές, τις ΠΑΣ και την παρακολούθηση της αλληλεπίδρασής τους ήταν η αιθανόλη, ένας πολικός διαλύτης ο οποίος αλληλεπιδρά με τις Chls δημιουργώντας έναν πέμπτο δεσμό συναρμογής στο κεντρικό άτομο Mg του μορίου τους (Cotton et al. 1974; Fujiwara and Tasumi 1986; Krawczyk 1989). Βασικό πλεονέκτημα αυτού του συστήματος είναι ότι οι ΠΑΣ μπορούν να απομακρύνουν μόρια της αιθανόλης από σημαντικές θέσεις (όπως το κεντρικό Mg και τις φορμυλομάδες των Chls). Έτσι, σε όλες τις περιπτώσεις που ακολουθούν ο διαλύτης των πειραμάτων ήταν η αιθανόλη και μόνο στις περιπτώσεις της SCC ο διαλύτης ήταν το νερό.

1. Επίδραση ΠΑΣ στη Q περιοχή των φασμάτων των Chl a και b

Οι ΠΑΣ φαίνεται να προκαλούν έντονες αλλαγές κυρίως στην κόκκινη περιοχή του φάσματος απορρόφησης της Chl a και να μειώνουν τα επίπεδα του φθορισμού της (Εικόνα 40). Πιο αναλυτικά, στα τρία πρώτα διαγράμματα της Εικόνας 40 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης της Chl a κατά τη μεταχείριση με διαφορετικές συγκεντρώσεις Put (Α), Spd (Β) και Spm (Γ). Και οι τρεις κύριες ΠΑΣ μειώνουν την απορρόφηση της κύριας Qy(0,0) κορυφής στα 662nm (για τις ενεργειακές ταινίες απορρόφησης των πορφυρινών βλέπε «Εισαγωγή», σχετική ενότητα). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η Spm, για την οποία σε συγκεντρώσεις 100 mM και άνω, παρατηρείται μια αύξηση της απορρόφησης στο φάσμα της Chl a στα 640nm που συνοδεύεται από μια ταυτόχρονη μείωση του σήματος στα 615nm (Εικόνα 40Γ). Στη μεταχείριση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση Spm, το σήμα στα 615nm μειώνεται κατά 22% ενώ το σήμα στα 640nm αυξάνεται κατά 64% δημιουργώντας μια νέα κορυφή. Οι δύο μικρότερες ΠΑΣ ακολουθούν την επίδραση της Spm αλλά με μικρότερη ισχύ. 500mM Spd ήταν ικανά να αυξήσουν την απορρόφηση στα 640nm (Εικόνα 40B) ενώ για την ίδια συγκέντρωση Put σημειώθηκε μόνο μια μείωση στα 615nm (Εικόνα 40Α).

Ο φθορισμός της Chl a στα 672nm μειώνεται καθώς μεταβαίνουμε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ΠΑΣ ενώ δεν παρατηρείται καμιά αξιοσημείωτη μετατόπιση της συγκεκριμένης κορυφής. Ταυτόχρονα, αυξάνεται ο φθορισμός στα 652nm και σε 500μM ΠΑΣ αρχίζει να διαγράφεται μια νέα κορυφή. Η επίδραση των ΠΑΣ φαίνεται να ακολουθεί

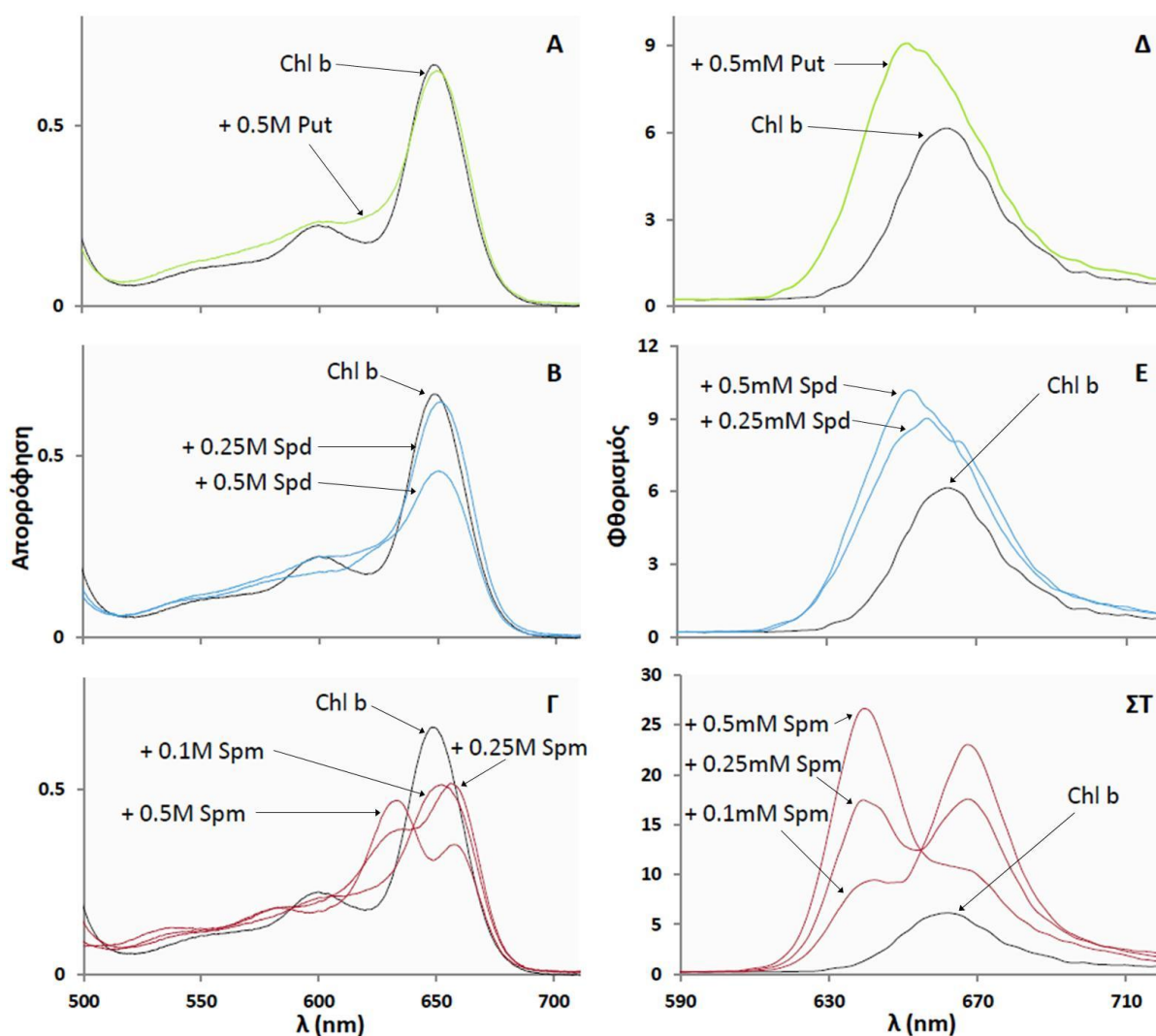
την ισχύ $Spm > Spd > Put$. Η απόσβεση του σήματος στα 672nm είναι της τάξης του 27%, 21% και 15% αντίστοιχα ενώ ο φθορισμός στα 652nm αυξάνεται και στις τρεις μεταχειρίσεις με την ίδια ισχύ (Εικόνα 40Δ-ΣΤ).



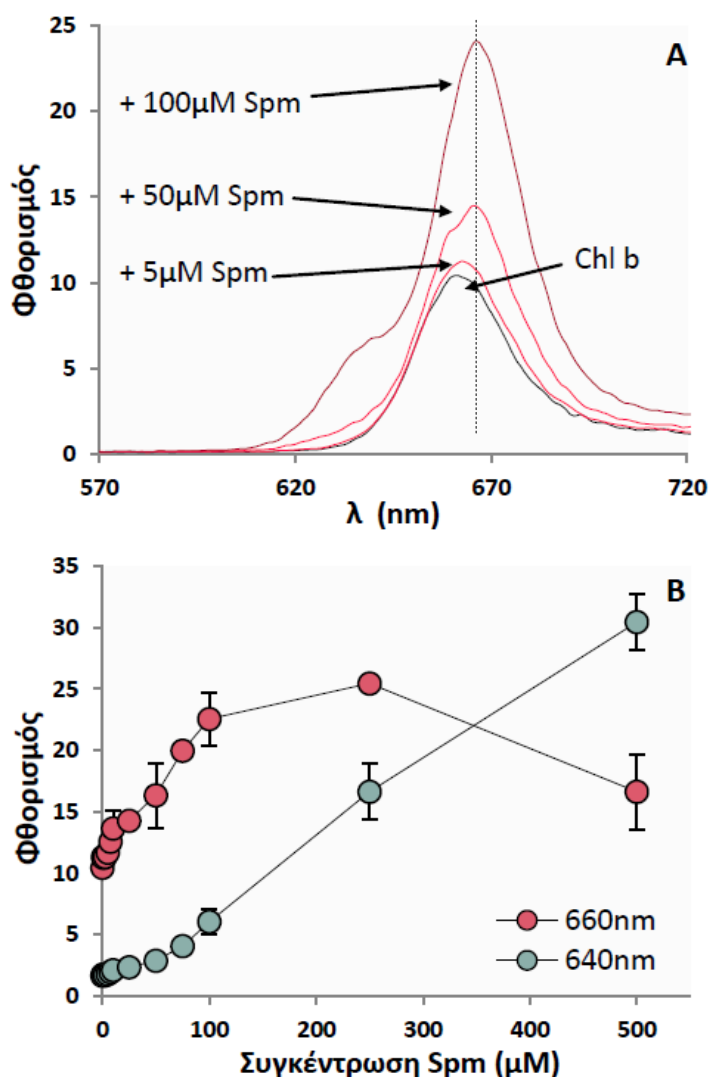
Εικόνα 40. Αλλαγές στην Q περιοχή των φασμάτων απορρόφησης (Α, Β, Γ) και στα φάσματα φθορισμού (Δ, Ε, ΣΤ) της Chl a μετά από δεκάλεπτη επώαση με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις πολυαμινών. Η συγκέντρωση της Chl a ήταν 30 και 0,03μM σε απορρόφηση και φθορισμό αντίστοιχα. Στα φάσματα φθορισμού, το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 425nm, το παράθυρο διέγερσης 15nm και το παράθυρο εκπομπής 5nm.

Η Qy περιοχή του φάσματος απορρόφησης της Chl b επίσης επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη μεταχείριση με τις ΠΑς με την ίδια σχετική ισχύ $Spm > Spd > Put$ (Εικόνα 41Α-Γ). Διακρίνεται μια αισθητή μείωση και βαθυχρωμική μετατόπιση της Qy(0,0) κορυφής που είναι εντονότερη στην περίπτωση της Spm. Το μέγιστο απορρόφησης του μάρτυρα αντιστοιχεί σε μήκος κύματος 647nm. Η μεταχείριση με 100mM σπερμίνη οδηγεί στη μετατόπισή του κατά 4nm προς την κόκκινη φασματική περιοχή και στη μείωση της απορρόφησης κατά 24%. Οι μεταχειρίσεις με 250mM και 500mM σπερμίνης μετατοπίζουν βαθυχρωμικά την κορυφή στα 647nm κατά 7nm και 9nm και προκαλούν μείωση της

απορρόφησης κατά 33% και 49% αντίστοιχα (Εικόνα 41Γ). Όπως είδαμε και στη Chl a, μία νέα κορυφή απορρόφησης δημιουργείται στα 633nm και σχετίζεται άμεσα με τις αλλαγές που συμβαίνουν στη Qy(0,0) κορυφή. Για συγκεντρώσεις σπερμίνης 100, 250 και 500mM, το σήμα απορρόφησης στα 633nm αυξάνεται κατά 3%, 36% και 70% αντίστοιχα (Εικόνα 41Γ). Η Qy (0,0) κορυφή στα 647nm μετατοπίζεται και στις μεταχειρίσεις με Put και Spd μόλις κατά 2-3nm ενώ παρατηρείται μείωση του σήματός της έως και κατά 34% για τα 500 mM Spd. Το σήμα απορρόφησης στην ευρύτερη περιοχή των 633nm βελτιώνεται χωρίς ωστόσο να δημιουργείται κάποιο νέο μέγιστο απορρόφησης όπως συμβαίνει με τη Spm (Εικόνα 41A,B).



Εικόνα 41. Αλλαγές στην Q περιοχή των φασμάτων απορρόφησης (A, B, Γ) και στα φάσματα φθορισμού (Δ, E, ΣΤ) της Chl b μετά από δεκάλεπτη επώαση με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις πολυαμινών. Η συγκέντρωση της Chl b ήταν 30 και 0,03μM σε απορρόφηση και φθορισμό αντίστοιχα. Στα φάσματα φθορισμού, το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 440nm, το παράθυρο διέγερσης 15nm και το παράθυρο εκπομπής 5nm.



Εικόνα 5. Α. Φάσματα εκπομπής φθορισμού της Chl b πριν και μετά τη μεταχείριση με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις Spm. Β. Ο φθορισμός της Chl b στα 660-667 και στα 640 nm σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της σπερμίνης. Η συγκέντρωση της Chl ήταν 0,03 μM. Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 440 nm, το παράθυρο διέγερσης ήταν 15 nm και το παράθυρο εκπομπής ήταν 5nm.

Η κατάσταση στο φθορισμό διαφέρει ωστόσο στην περίπτωση της Chl b, όπου αυτός φαίνεται να επηρεάζεται με ένα σύνθετο τρόπο. Οι ΠΑς μετατοπίζουν το μέγιστο σε μικρότερα μήκη κύματος (blue shift) και αυξάνουν την έντασή του. (Εικόνα 41Δ-ΣΤ). Η Spd και η Put μετατοπίζουν το μέγιστο φθορισμού της Chl b από τα 662nm στα 652nm και αυξάνουν το σήμα του (Εικόνα 41Δ, Ε). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον όμως, παρουσιάζει η ξεχωριστή επίδραση της Spm (Εικόνα 41ΣΤ). Πιο αναλυτικά, σε συγκέντρωση 100μM αυξάνει και μετατοπίζει κατά 5-6nm προς το κόκκινο το φθορισμό της Chl b. Στη συγκέντρωση αυτή ήδη φαίνεται να έχει δημιουργηθεί μια νέα κορυφή γύρω στα 640nm που φτάνει την ένταση της κορυφής στα 652nm της Chl a παρουσία 500μM σπερμίνης. Παρουσία

250μM Spm ο φθορισμός στα 667nm μειώνεται σε σχέση με την προηγούμενη μεταχείριση, ενώ ο φθορισμός στα 640nm αυξάνεται. 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 500μM Spm η κύρια κορυφή του φάσματος γίνεται αυτή στα 640nm ενώ ο φθορισμός στα 667nm μειώνεται κι άλλο, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μια αντιστροφή των εντάσεων των δύο κορυφών σε σχέση με τα 100μM Spm.

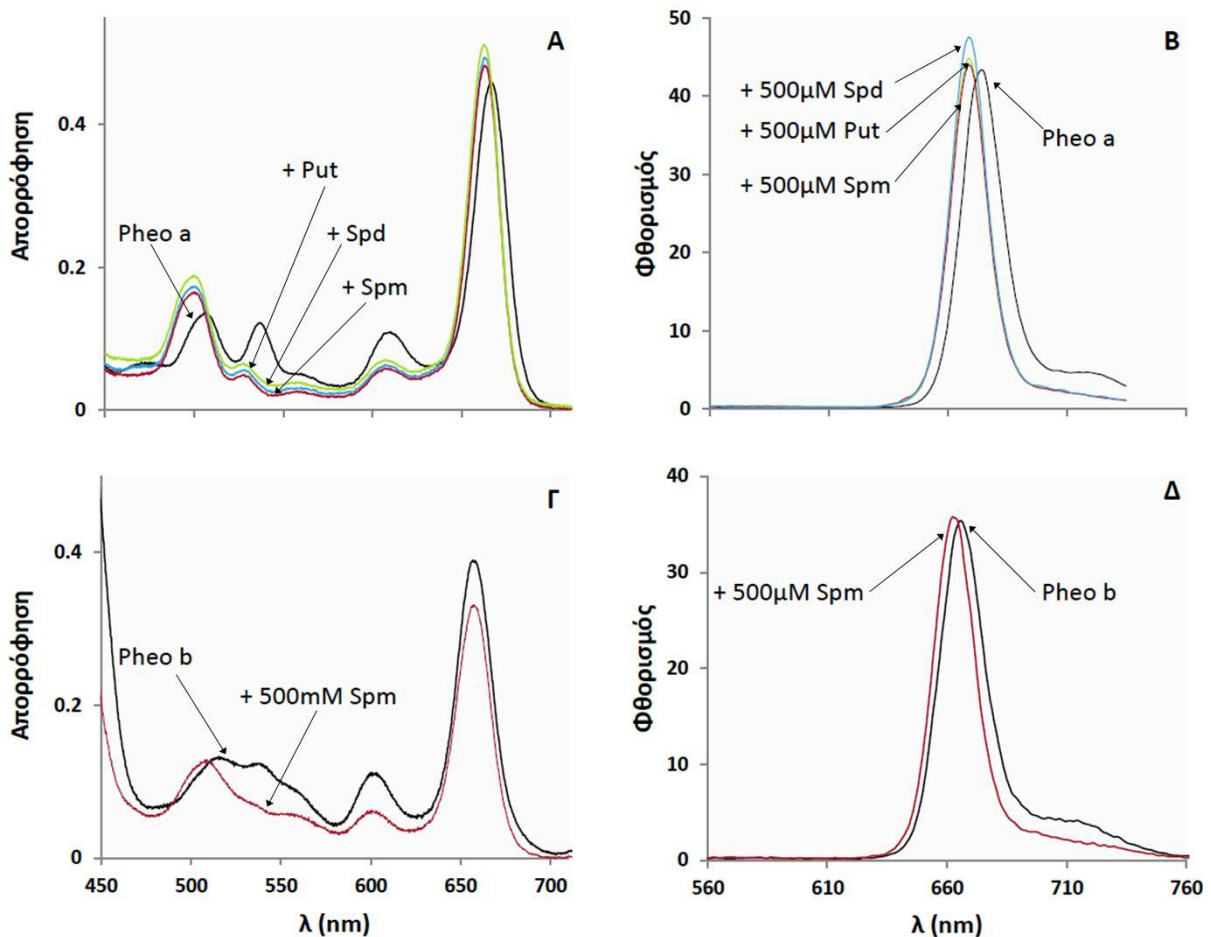
Μελετώντας την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων Spm (από 1μM έως και 500μM) στις ιδιότητες του φθορισμού της Chl b (dose response curve) φάνηκε καθαρά πως υπάρχουν δύο διακριτές διαδικασίες (Εικόνα 42). Μία που ευθύνεται για την κεντρική κορυφή στα 662nm και την μετατόπισή της προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (667nm) και μια δεύτερη που ευθύνεται για την εμφάνιση της κορυφής στα 640nm. Η πρώτη συμβαίνει σε μικρές συγκεντρώσεις Spm ($\leq 100\mu\text{M}$) οι οποίες αυξάνουν δραματικά την κορυφή στα 662-667nm (έως και κατά 250%). Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ο φθορισμός της κύριας κορυφής πέφτει σταδιακά ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται ταχύτατα ο φθορισμός στα 640nm (Εικόνα 42B).

2. Επίδραση ΠΑΣ στη Q περιοχή των φασμάτων των Pheo a και b

Οι φαιοφυτίνες a και b έχουν την ίδια δομή με τις χλωροφύλλες a και b με τη διαφορά ότι φέρουν δύο H αντί του μετάλλου Mg στο κέντρο του τετραπυρρολικού δακτυλίου τους. Εύλογα λοιπόν έγιναν με αυτές τα αντίστοιχα πειράματα που περιγράφηκαν παραπάνω για τις Chls με στόχο να διερευνηθεί ο ρόλος του Mg στην αλληλεπίδραση με τις ΠΑΣ. Στην Εικόνα 43A φαίνεται ότι και οι τρεις κύριες ΠΑΣ σε συγκέντρωση 500mM μετατοπίζουν υψιχρωμικά όλο το φάσμα απορρόφησής της Pheo a, σχεδόν με τον ίδιο τρόπο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η Qx περιοχή του φάσματος όπου οι δύο κορυφές της Pheo a 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 Spm 100mM οι κορυφές στα 505nm και 536nm μετατοπίζονται προς το μπλε κατά 4nm και 2nm αντίστοιχα (δεδομένα δεν παρατίθενται). Αντίστοιχα, στην Pheo b η μεταχείριση με 500mM Spm προκάλεσε μια έντονη μείωση του σήματος στην περιοχή των 535nm (Εικόνα 43Γ).

Αντίθετα με τις Chls, το φάσμα απορρόφησης των Pheo a και b στην Qy περιοχή έχει να καταγράψει μόνο μια υψιχρωμική μετατόπιση της κύριας ταινίας κατά 4nm κατά τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις με τις ΠΑΣ (Εικόνα 43A, Γ). Οι τρεις κύριες ΠΑΣ επιδρούν το ίδιο ασθενώς στο φθορισμό τους, καθώς ακόμα και 500μM Spm δεν προκάλεσαν καμία αξιοσημείωτη αλλαγή πέρα από μια μικρή υψιχρωμική μετατόπιση (Εικόνα 43B,Δ). Η απουσία έντονων φασματοσκοπικών αλλαγών στην Qy περιοχή των φασμάτων των Pheo a και b και στο φθορισμό της Pheo b αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ότι αυτές οι αλλαγές στα

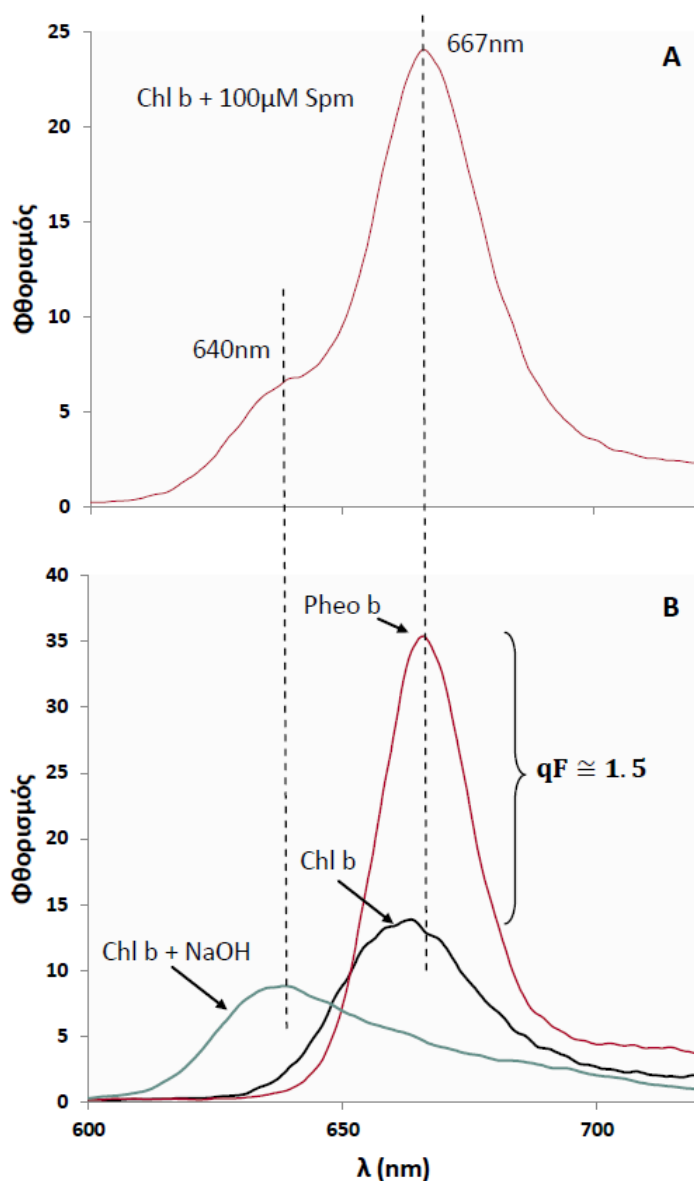
φάσματα των Chls οφείλονται στο κεντρικό άτομο Mg και την αλλαγή της κατάστασης συναρμογής του από «πέντε» σε «έξι». Επιπλέον, το γεγονός ότι και οι τρεις ΠΑς στην ίδια συγκέντρωση προκαλούν τις ίδιες αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης της Pheo a (Εικόνα 43A,B), ενώ η επίδρασή τους διαφέρει στην περίπτωση των χλωροφυλλών, αποτελεί ένδειξη διαφορετικού τρόπου πρόσδεσής τους στο μόριο της χρωστικής παρουσία και απουσία του κεντρικού ατόμου Mg.



Εικόνα 43. Αλλαγές στην Q περιοχή των φασμάτων απορρόφησης (A, Γ) και στα φάσματα φθορισμού (B, Δ) της Pheo a και Pheo b μετά από δεκάλεπτη επώαση με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις πολυαμινών. Η συγκέντρωση της Pheo ήταν 30 και 0,03μM σε απορρόφηση και φθορισμό αντίστοιχα. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 410 και 415nm για τις Pheo a και b αντίστοιχα, το παράθυρο διέγερσης 15nm και το παράθυρο εκπομπής 5nm.

Η Spm φαίνεται να εκτοπίζει/μετατοπίζει σε κάποιο βαθμό το Mg από τον τετραπυρρολικό δακτύλιο της Chl b. Οι ιδιότητες του συμπλόκου Chl b:Spm θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως «Pheo-like» καθώς από τη Pheo b λείπει εντελώς το κεντρικό μέταλλο. Αν η αλληλεπίδραση της Chl b με τη Spm οδηγεί σε κάποια Pheo-like δομή, τότε θα πρέπει να έχει παρόμοιες ιδιότητες με τη Pheo b. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 42, η Spm σε χαμηλές συγκεντρώσεις (μέχρι 100μM) αυξάνει σημαντικά το φθορισμό της Chl b ενώ επιπλέον μετατοπίζει το μέγιστο του φθορισμού από τα 662nm στα 667nm. Η εκτόπιση του

Mg από τη Chl b, προς σχηματισμό Pheo b, αυξάνει επίσης το φθορισμό και μετατοπίζει το μέγιστο στα 667nm (Εικόνα 44). Αντίθετα, η μεταχείριση της Chl b με ισχυρή βάση, όπως το NaOH, μειώνει τα επίπεδα του φθορισμού στα 662nm και αυξάνει την εκπομπή στα 640nm

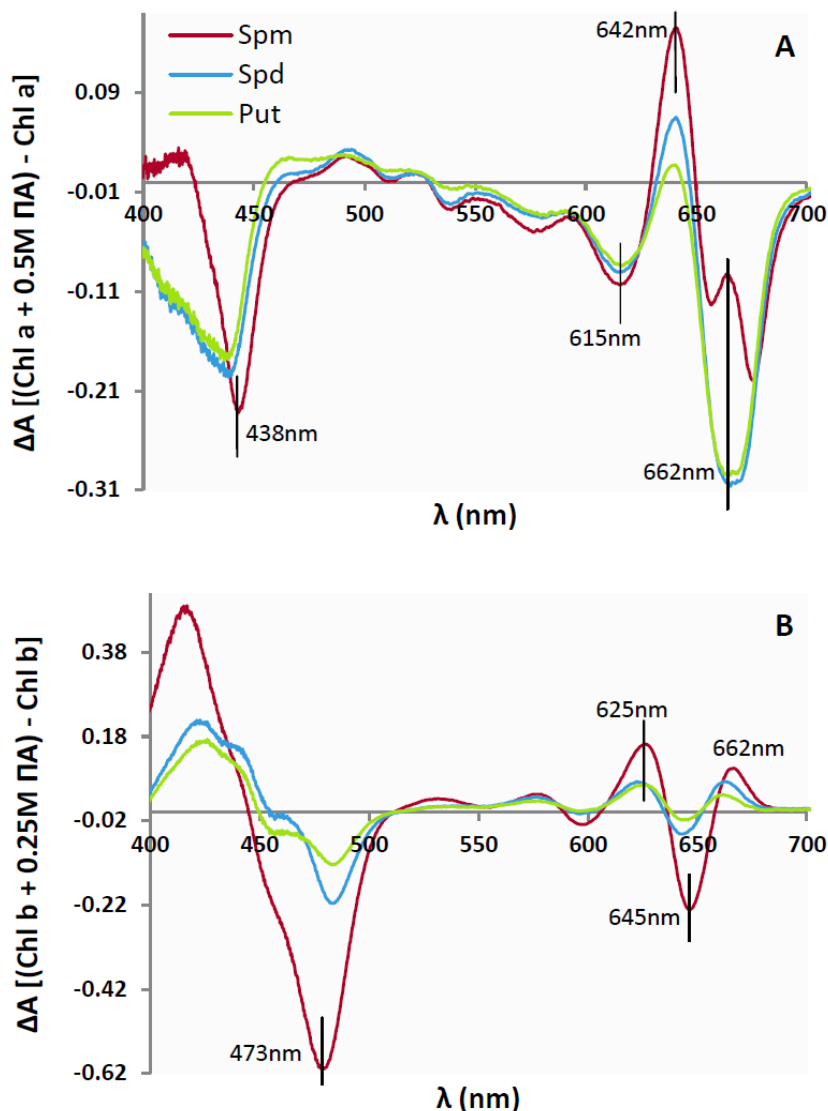


περίπου, δηλαδή η αλκαλική αυτή επίδραση σχετίζεται με τη δεύτερη διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά την αλληλεπίδραση Chl b με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Spm. Συγκρίνοντας τα φάσματα φθορισμού των Chl b και Pheo b προκύπτει ότι η εισαγωγή του Mg στο επίπεδο του δακτυλίου της Chl b επάγει μία μεγάλη απόσβεση του φθορισμού (σε σύγκριση με την απουσία Mg στη Pheo b) που υπολογίζεται περίπου στο 1.5 (Εικόνα 44B).

Εικόνα 44. Οι Pheo-like ιδιότητες του συμπλόκου Chl b:Spm. Α. Φάσμα εκπομπής φθορισμού της Chl b μετά από επώαση με 100μM Spm. Η αλληλεπίδραση προκαλεί αύξηση και μετατόπιση της κύριας κορυφής στα 667nm ενώ έχει ήδη αρχίσει να διαμορφώνεται η νέα κορυφή στα 640nm. Β. Σύγκριση του φάσματος της Chl b πριν και μετά την απομάκρυνση του Mg και το σχηματισμό Pheo b καθώς και μετά τη μεταχείριση με NaOH. Η απόσβεση του φθορισμού υπολογίστηκε με τον τύπο: $qF = [F_{(Pheo\ b)} - F_{(Chl\ b)}] / F_{(Chl\ b)}$, όπου $F_{(Pheo\ b)}$ και $F_{(Chl\ b)}$ τα μέγιστα του φθορισμού των Pheo b και Chl b αντίστοιχα.

3. Φάσματα διαφοράς απορρόφησης

Οι διαφοροποιήσεις στα φάσματα απορρόφησης των Chl a και b από τη μεταχείριση με τις ΠΑΣ, που περιγράφηκαν νωρίτερα, γίνονται ακόμα πιο εμφανείς στα φάσματα διαφοράς απορρόφησης (ΔΑ φάσματα) από τα οποία παίρνουμε επιπλέον πληροφορία για φασματοσκοπικές αλλαγές που είναι δύσκολο να διακριθούν από τα αρχικά φάσματα απορρόφησης.



Εικόνα 45. Φάσματα διαφοράς απορρόφησης των χλωροφυλλών a (A) και b (B) πριν και μετά τη μεταχείριση με 0.5M και 0.25M πολυαμίνης αντίστοιχα.

που περιγράφηκε αναλυτικά νωρίτερα, οι αρνητικές κορυφές στα 662nm και 645nm για τις Chl a και b αντίστοιχα που επισημαίνονται στα φάσματα διαφοράς αφορούν στη μείωση του σήματος της κύριας κορυφής τους από τις ΠΑΣ. Οι θετικές κορυφές στα 640nm και 625nm σχετίζονται με τη δημιουργία των νέων κορυφών σε αυτές τις περιοχές που συνοδεύονται από την ταυτόχρονη μείωση του σήματος στα 615nm και 600nm (αρνητικές κορυφές στα φάσματα διαφοράς). Η θετική κορυφή στα 662nm που προκύπτει από τα φάσματα διαφοράς της Chl b οφείλεται στη βαθυχρωμική μετατόπιση της κύριας κορυφής του φάσματός της.

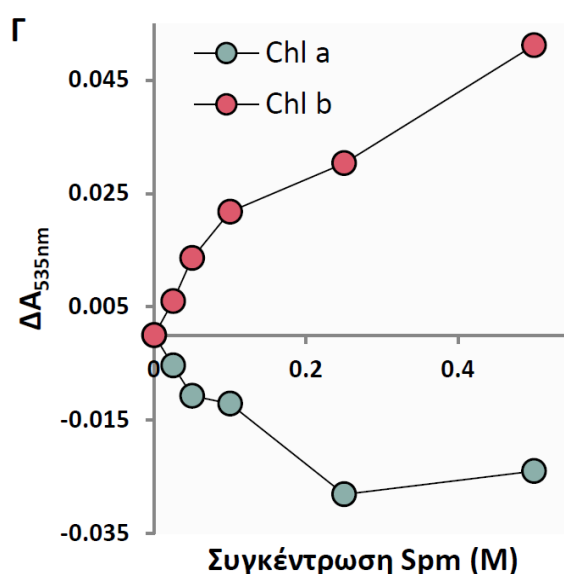
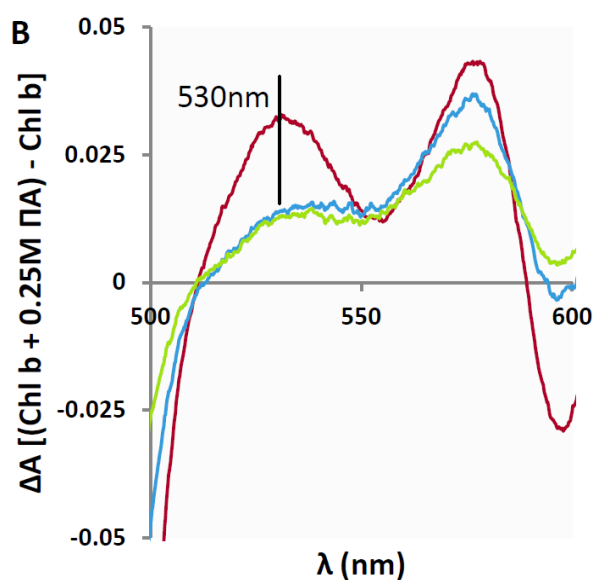
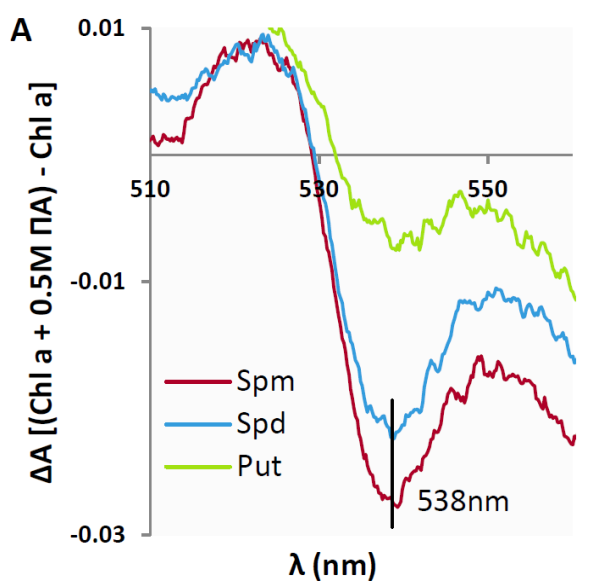
Στα φάσματα διαφοράς φαίνονται επίσης δύο αρνητικές κορυφές στα 438nm και 473nm για τις Chls a και b αντίστοιχα που υποδηλώνουν τον υποχρωμισμό της B ζώνης απορρόφησης κατά τη μεταχείριση με τις ΠΑΣ (Εικόνα 45). Ο υποχρωμισμός αυτός είναι εντονότερος στη Chl b, όπου το μέγιστο στα 460nm μετατοπίζεται υπιχρωμικά (μειώνεται το

Στην Εικόνα 45 παρουσιάζονται τα φάσματα διαφοράς για τις Chls a και b, όπως προέκυψαν από την αφαίρεση των φασμάτων των μεταχειρίσεων από το μάρτυρα. Η επίδραση των ΠΑΣ στο φάσμα της Chl b είναι εντονότερη από ότι στη Chl a και λόγω των διαφορετικών φαινομένων που συμβαίνουν σε χαμηλές και πιο υψηλές συγκεντρώσεις, επιλέχθηκε να δειχθεί η επίδραση 0,25M ΠΑΣ όπου και τα δύο φαινόμενα βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη. Ξεκινώντας από την Qy περιοχή των φασμάτων

σήμα στα 460nm και αυξάνεται το σήμα σε μικρότερα μήκη κύματος). Αυτή η μετατόπιση της B ταινίας έως και 30nm προς την μπλε περιοχή του φάσματος σε μεγάλες συγκεντρώσεις Spm μάλλον αντιστοιχεί στη μετάβαση από τη B στη By διεγερμένη κατάσταση του μορίου. Η μετατόπιση αυτή είναι επίσης ένα φαινόμενο που θυμίζει τη Pheo b η οποία εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στην περιοχή στα 435nm.

Τέλος, αξιοσημείωτη είναι η επίδραση των ΠAs στην Qx περιοχή του φάσματος των Chls που εκτείνεται από τα 500nm μέχρι τα 600nm περίπου και έχει ιδιαίτερη διαγνωστική αξία στη φωτοσύνθεση *in vivo*. Η αλληλεπίδραση με τις τρεις κύριες ΠAs προκάλεσε στη Chl a μια θετική κορυφή στα 520nm και μια αρνητική κορυφή στα 538nm (Εικόνα 46A). Η μείωση του σήματος στα 538nm ακολουθεί την ισχύ Spm>Spd>Put. Με την ίδια ισχύ οι ΠAs αυξάνουν την απορρόφηση της Chl b στην Qx περιοχή, όπως φαίνεται από τις θετικές κορυφές στα 530nm και 575nm των φασμάτων διαφοράς (Εικόνα 46B). Το σήμα στα 530nm αυξάνεται κατά τη μεταχείριση με 100mM, 250mM και 500mM της τετραμίνης Spm κατά 69%, 95% και 163% αντίστοιχα, τη στιγμή που η

Εικόνα 46. Η Qx περιοχή των φασμάτων διαφοράς απορρόφησης των Chl a (A) και b (B). Γ. Η απορρόφηση στα 535nm σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της Spm για τις Chl a και b.



τριαμίνη Spd σε συγκέντρωση 500mM το αυξάνει μόλις κατά 30%. Στην Εικόνα 46Γ παρουσιάζεται συγκριτικά για τις Chls a και b πως επηρεάζεται το σήμα στα 535nm από διαφορετικές συγκεντρώσεις Spm.

4. Οι φασματοσκοπικές ιδιότητες της αξονικής πρόσδεσης

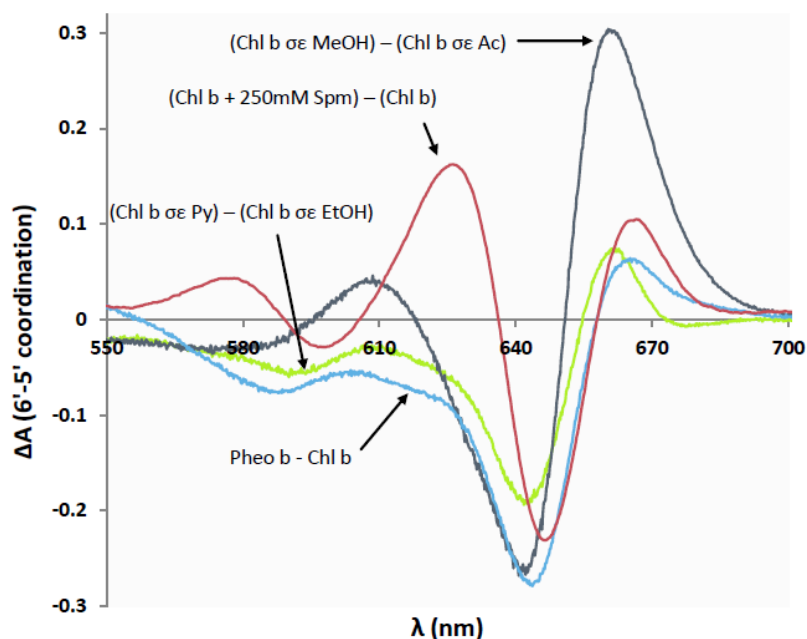
4.1 Από τον 5^ο δεσμό συναρμογής στον 6^ο

Για την περαιτέρω διαλεύκανση της προέλευσης των φασματοσκοπικών φαινομένων που προέκυψαν από την αλληλεπίδραση των Chls με τις ΠΑΣ και ειδικότερα με τη Spm, αναζητήθηκε τρόπος να επαναληφθούν χωρίς την παρουσία των ΠΑΣ. Είναι γνωστό πως η μορφή του φάσματος απορρόφησης των Chls εξαρτάται από τον αριθμό συναρμογής και τον τύπο του δεσμού που δημιουργεί το κεντρικό Mg (Evans and Katz 1975; Krawczyk 1989; Fiedor et al. 2008). Αλληλεπιδρούν με τους οργανικούς διαλύτες μέσω του Mg τους σχηματίζοντας άλλοτε 5 και άλλοτε 6 δεσμούς συναρμογής. Εξετάζοντας λοιπόν τις Chls σε διαφορετικά περιβάλλοντα προέκυψαν φασματοσκοπικές αλλαγές που μοιάζουν με αυτές κατά την μεταχείριση των ΠΑΣ. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται παρακάτω με σειρά αύξουσας ικανότητας να μετακινήσουν την ισορροπία της κατάστασης συναρμογής του κεντρικού μετάλλου από «πέντε» σε «έξι»:

Ακετόνη (Ac) < διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) ≤ αιθανόλη (EtOH) < μεθανόλη (MeOH) ≤ πυριδίνη (Py)

Από τα φάσματα διαφοράς της Chl b σε κάποιον διαλύτη που ευνοεί το σχηματισμό του έκτου δεσμού συναρμογής, όπως η μεθανόλη, από τη Chl b σε κάποιο διαλύτη που δεν ευνοεί τη δημιουργία του, όπως η ακετόνη, προήλθαν στην περιοχή Qy θετικές και αρνητικές κορυφές πολύ κοντά στα μήκη κύματος που βρίσκονται αυτές από τη μεταχείριση της Chl b με Spm (Εικόνα 47). Αυτές αφορούν κυρίως τη βαθυχρωμική μετατόπιση της κύριας κορυφής που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του σήματος στα 660-663nm και δευτερευόντως την αύξηση του σήματος κοντά στα 610-630nm. Στην Εικόνα 47 συγκρίνεται εκτός των άλλων το φάσμα διαφοράς της Pheo b από την Chl b που φωτίζει και εδώ τις Pheo-like ιδιότητες του συμπλόκου Chl b:SpM.

Όλες οι κορυφές που προέκυψαν από ενδεικτικά φάσματα διαφοράς των χλωροφυλλών σε κατάσταση συναρμογής «έξι» από αυτών σε κατάσταση συναρμογής «πέντε» παρατίθενται στον Πίνακα 8. Μεγαλύτερη συνάφεια εμφανίζουν μεταξύ τους τα φάσματα που αφορούν τη Chl b, όπου φαίνεται πως η παρατηρούμενη αύξηση του σήματος



Εικόνα 47. Η Qy περιοχή των φασμάτων διαφοράς απορρόφησης της Chl b που προέκυψαν από τη μεταχείρισή της με διαφορετικούς διαλύτες (γκρι και πράσινη γραμμή) και με 250mM Spm σε αιθανόλη (κόκκινη γραμμή). Σε όλες τις περιπτώσεις, αφαιρέθηκε η μεταχείριση που ευνοεί την 5η κατάσταση συναρμογής του κεντρικού Mg από αυτήν που ευνοεί την 6η. Η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στη διαφορά του φάσματος της Chl b σε αιθανόλη από αυτό της Pheo b σε αιθανόλη.

μεταχείριση με πολικούς διαλύτες και την πυριδίνη, κατ' αντιστοιχία με τη Chl a. Από την άλλη, όταν η Chl b διαλυτοποιήθηκε εξολοκλήρου σε προπυλαμίνη (propylamine), η κύρια κορυφή της στα 647nm εξέλιπε και είχε αντικατασταθεί από την κορυφή στα 630nm. Το τόσο έντονα παραλλαγμένο φάσμα φαίνεται να προκύπτει από τη μη αντιστρεπτή αντίδραση της ισχυρής (μονο)αμίνης με κάποιον εστέρα στο μόριο της Chl b. Η πηρυνόφιλη αυτή επίθεση μπορεί σύμφωνα με τη βιβλιογραφία να οδηγεί στην αμινόλυση του δεσμού C9-C10 του E δακτυλίου της Chl (Weller and Livingston 1954) και επομένως όποια σύνδεση με την κατάσταση συναρμογής της νέας κορυφής στα 630nm στα φάσματα των μεταχειρίσεων με τις ΠΑΣ, πρέπει να γίνει με μεγάλη επιφυλακτικότητα. Σε κάθε περίπτωση, οι ιδιαιτερότητες που παρουσιάζει ο φθορισμός του συμπλόκου Chl b:Spm δεν παρουσιάστηκαν κατά τις παραπάνω μεταχειρίσεις και επομένως ενισχύεται η υπόθεση πως πρόκειται για μια πιο ειδική αλληλεπίδραση. Επιπλέον, το γεγονός πως οι μικρότερες ΠΑΣ δεν προκάλεσαν παρόμοιες αλλαγές στο φθορισμό της Chl b, αποτελεί ένδειξη ότι η αλληλεπίδραση της Spm με τη Chl b γίνεται μέσω των ιμινομάδων της.

στα 662nm οφείλεται στην αλλαγή της κατάστασης συναρμογής του κεντρικού Mg της. Στη Chl a ξεχωρίζει η σταθερή αύξηση του λόγου A640nm/A615nm σε όλες τις περιπτώσεις που και βιβλιογραφικά αποτελεί ένδειξη της δημιουργίας του έκτου δεσμού συναρμογής (Evans and Katz 1975). Πιθανότατα, η κορυφή στα 630nm που εμφανίζεται κατά τη μεταχείριση με Spm στο φάσμα της Chl b να έχει κοινή προέλευση με αυτό γύρω στα 610nm από τη

Πίνακας 8. Οι θετικές και αρνητικές κορυφές των φασμάτων διαφοράς απορρόφησης των Chl a και b στην Qy περιοχή. Τα ΔΑ φάσματα προέκυψαν από την αφαίρεση των φασμάτων τους σε διαλύτες που ευνοούν τη δημιουργία του 6^{ου} δεσμού συναρμογής του κεντρικού Mg από αυτά σε διαλύτες που το διατηρούν στην 5^η κατάσταση συναρμογής (6' – 5'). Συμπεριλαμβάνονται τα ΔΑ φάσματα των μεταχειρίσεων με 0.25M Spm σε μεθανόλη και αιθανόλη. Οι μπλε τιμές αντιστοιχούν σε θετικές κορυφές (ή μέγιστα στα κοίλα τμήματα) και οι κόκκινες σε αρνητικές κορυφές (ή ελάχιστα στα κυρτά τμήματα) των φασμάτων.

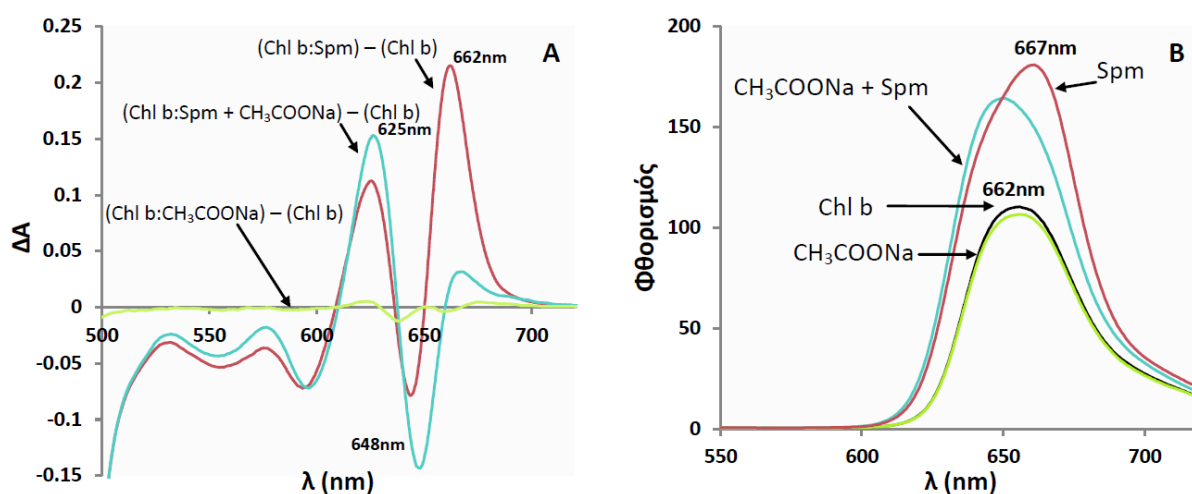
ΔΑ (6' – 5')	Qy ζώνες απορρόφησης							
	Chl b			Chl a				
MeOH – EtOH	-	644	-	615	636	651.5	661	677
MeOH – DMF	610.5	643	663.5	613	635	650	660.5	671
MeOH – Ac	608.5	640.5	660.5	604.5	635	-	665	681
EtOH – Ac	607	640.5	660	-	627	-	658	680
Py – EtOH	608	642	662	605.6	637.5	654	-	681.5
Propylamine – EtOH	626	650.5	-	615	640	-	-	678
(MeOH) 0.25MSpm– Control	624	637.5	662.5	605	640	-	-	675
(EtOH) 0.25M Spm – Control	630	644	662	609	642	-	-	683

4.2 Από τον 6^ο δεσμό συναρμογής στον 5^ο

Παράλληλα με τα πειράματα σε διαφορετικούς διαλύτες όπου το ζητούμενο ήταν η δημιουργία του 6^{ου} δεσμού συναρμογής του ιόντος Mg²⁺ ώστε να εντοπιστούν τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αξονική πρόσδεση των ΠΑΣ, διεξήχθησαν πειράματα ακολουθώντας την αντίστροφη πορεία. Παίρνοντας ως δεδομένο τη δημιουργία του 6^{ου} δεσμού του Mg²⁺ από τη Spm, επιχειρήθηκε η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης τους με ισχυρούς χηλικούς παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες είναι μόρια που φέρουν ακετικές ομάδες, όπως το οξικό νάτριο (sodium acetate) και το οξικό τετραβουτυλαμώνιο (tetrabutylammonium acetate, TBAAc). Τα ακετικά ιόντα προσδένονται στο κεντρικό Mg των Chls πολύ ισχυρότερα από ότι η πυριδίνη, ένας από τους πιο ισχυρούς προσδέτες. Το Mg κατά την αξονική πρόσδεση, «τραβιέται» έξω από το επίπεδο του δακτυλίου και φέρει 5 δεσμούς συναρμογής (Orzel et al. 2008).

Από τα πειράματα αυτά ενδιαφέρουσες πληροφορίες συλλέχθηκαν μόνο για την περίπτωση της Chl b παρουσία οξικού νατρίου. Όταν σε διάλυμα που είχε προηγουμένως δημιουργηθεί το σύμπλοκο Chl b:Spm προστέθηκε οξικό νάτριο, άλλαξαν οι φασματοσκοπικές ιδιότητές του στην Qy περιοχή του φάσματος απορρόφησης δείχνοντας πως η αλληλεπίδραση Chl b:Spm μπορεί να είναι αντιστρεπτή. Η θετική κορυφή στα 662nm

του φάσματος διαφοράς (δείκτης σύμφωνα με τα προηγούμενα του 6^{ου} δεσμού συναρμογής) μειώθηκε αισθητά ενώ δε συνέβη το ίδιο για την θετική κορυφή στα 625nm (Εικόνα 48A). Αλλά και όταν σε διάλυμα που προϋπήρχε οξικό νάτριο προστέθηκε Spm, δε διαφάνηκε ανάπτυξη της κορυφής στα 662nm. Η περίπτωση αυτή παρουσιάζεται στα φάσματα φθορισμού (Εικόνα 48B) όπου η παρουσία οξικού νατρίου εμποδίζει την πρόσδεση της Spm στη Chl b δημιουργώντας τον 6ο δεσμό συναρμογής καθώς δεν είναι σε θέση να μετατοπίσει το μέγιστο του φθορισμού της παρότι σημειώνεται μια αύξηση του φθορισμού, που μοιάζει με την επίδραση των μικρότερων ΠAs στο φθορισμό της Chl b.

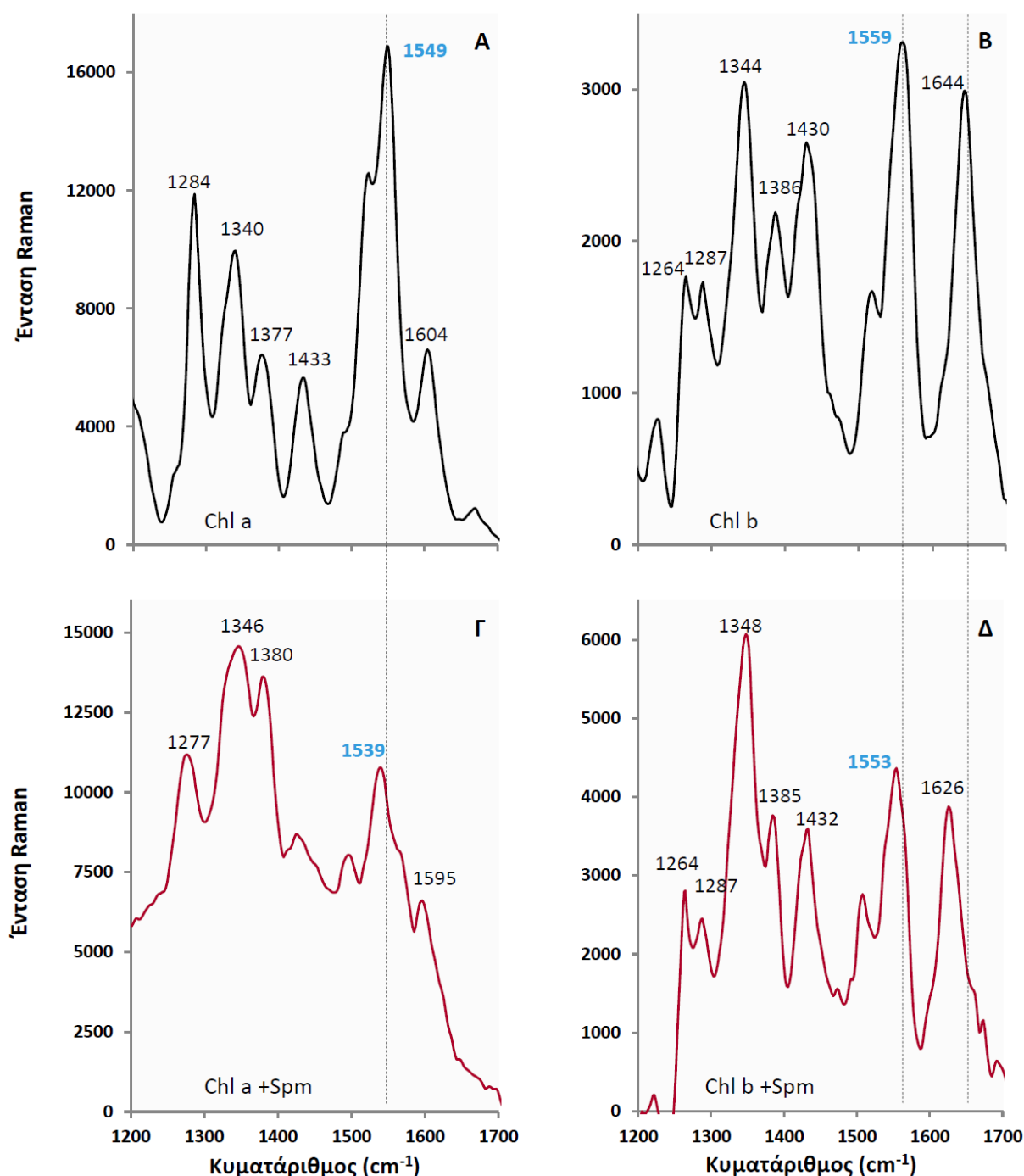


Εικόνα 48. Η ευαίσθητη στην κατάσταση συναρμογής του κεντρικού Mg Qy περιοχή των φάσμάτων απορρόφησης και φθορισμού της Chl b σε αιθανόλη. Α. φάσματα διαφοράς απορρόφησης 30μM Chl b πριν και μετά την επώαση για 15 λεπτά με 0,25 M Spm ή 20mM οξικό νάτριο (CH₃COONa) καθώς επίσης και του συμπλόκου Chl b:Spm πριν και μετά την επώαση με οξικό νάτριο. Β. Φάσματα φθορισμού 0,6μM Chl b χωρίς και έπειτα από μεταχείριση με 5mM Spm (κόκκινη γραμμή) ή 0,4mM οξικό νάτριο (πράσινη γραμμή). Η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στη μεταγενέστερη προσθήκη Spm σε διάλυμα Chl b και οξικού νατρίου. Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 440 nm, το παράθυρο διέγερσης ήταν 15 nm και το παράθυρο εκπομπής ήταν 5nm.

5. Αλλαγή της κατάστασης συναρμογής με τη χρήση φασματοσκοπίας Raman

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν σημαντικές ενδείξεις της αξονικής πρόσδεσης των ΠAs στις Chls. Οι ενδείξεις αυτές αφορούν κυρίως τη Spm η οποία φαίνεται να δημιουργεί τον 6^ο δεσμό συναρμογής με το κεντρικό άτομο Mg των Chl a και b. Η επιβεβαίωση του δεσμού ήρθε με την εφαρμογή της δονητικής φασματοσκοπίας Raman (για περισσότερες πληροφορίες για την αρχή της μεθόδου και τη διέγερση των πορφυρινών, βλέπε «Εισαγωγή», σχετική ενότητα). Οι περισσότερες γραμμές που παρατηρούνται στην υψηλή περιοχή συχνοτήτων (1200 – 1700 cm⁻¹) ενός φάσματος συντονισμού Raman χλωροφύλλης, προέρχονται από τις εντός επιπέδου δονήσεις του μορίου (Lutz 1974). Πιο συγκεκριμένα, οι κύριες ζώνες γύρω στους 1550cm⁻¹ και 1560cm⁻¹ στα φάσματα Raman των

Chl a και b αντίστοιχα (Εικόνα 49Α, Β) αντιστοιχούν στις δονήσεις έκτασης των δεσμών μεθυλενίου του μορίου τους και αποτελούν δείκτες της κατάστασης συναρμογής του



Εικόνα 49. Η περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων Raman των Chl a (Α) και b (Β) και των συμπλόκων τους με τη Spm (Γ και Δ αντίστοιχα). Η συγκέντρωση των Chl a και b ήταν 20 mM και η αναλογία Chl:Spm 1:30. Η ακτινοβολία διεγερσης ήταν 473nm. Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνθήκες χαμηλού φωτισμού. Η μετατόπιση των ζωνών (διακεκομμένες γραμμές) της περιοχής των 1550-1560cm⁻¹ (μπλε γράμματα) υποδηλώνουν τη δημιουργία του βου δεσμού συναρμογής του Mg κατά τη μεταχείριση με Spm.

κεντρικού ατόμου Mg. Η μεταχείριση με Spm μετατοπίζει τις ζώνες αυτές σε μικρότερους κυματάριθμους, κατά 10cm⁻¹ στη Chl a και κατά 6cm⁻¹ στη Chl b (Εικόνα 49Γ,Δ),

υποδεικνύοντας το σχηματισμό του 6^{ου} δεσμού συναρμογής (Cotton and van Duyne 1981; Lutz, 1984; Fujiwara and Tasumi 1986; Tasumi and Fujiwara 1987; Schulz and Baranska 2007). Εκτός από την περιοχή των 1500-1600cm⁻¹, ευαίσθητες στην κατάσταση του κεντρικού Mg και της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του μακρομορίου, είναι και οι ζώνες στην περιοχή των 1200-1400cm⁻¹. Οι μετατοπίσεις των ζωνών αυτών αλλά και η διαφορά της έντασής τους ή και του λόγου των εντάσεων τους, αποτελούν δείκτες της αλληλεπίδρασης που συμβαίνει στο κέντρο του τετραπυρρολικού δακτυλίου των Chls (Εικόνα 49). Πιο συγκεκριμένα, οι ζώνες στους 1200-1350cm⁻¹ και 1370-1380cm⁻¹ αντιστοιχούν στις δονήσεις έκτασης των δεσμών C – N των πυρρολικών δακτυλίων (Lutz 1974; Koyama et al. 1986).

Από τα φάσματα Raman δεν αντλήθηκε πληροφορία μόνο για την επίδραση της Spm στην κατάσταση συναρμογής του κεντρικού Mg των Chls αλλά και για την αλληλεπίδρασή της με κάποιους περιφερειακούς υποκαταστάτες των μορίων τους. Τέτοιοι υποκαταστάτες είναι οι καρβονυλομάδες που φέρουν οι Chls (9-κετο για την Chl a και 9-κετο και 3-φορμυλο για τη Chl b, βλέπε Εικόνα 38) και οι δονήσεις των οποίων δίνουν ζώνες στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων Raman. Η έντονη ζώνη στους 1644cm⁻¹ στην Εικόνα 49B αντιστοιχεί στη δόνηση έκτασης της φορμυλομάδας της Chl b, ενώ κάποια αντίστοιχη ζώνη αναμενόμενα απουσιάζει από το φάσμα της Chl a. Οι συχνότητες των ομάδων αυτών είναι γνωστό πως επηρεάζονται από τυχόν ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως η δημιουργία δεσμών υδρογόνου, και ως αποτέλεσμα αυτών έχουν καταγραφεί ισχυρές μετατοπίσεις προς μικρότερους κυματάρθμους που φτάνουν και τους 40cm⁻¹ (Lutz1984; Koyama et al. 1986; Mattioli et al.1993; Feiler et al. 1994). Η αλληλεπίδραση λοιπόν της Chl b με τη Spm φαίνεται να περιλαμβάνει και υδρογονικούς δεσμούς με τη C-3 φορμυλομάδα του μορίου της όπως υποδηλώνει η μετατόπιση της ζώνης από τους 1644 στους 1626cm⁻¹ (Εικόνα 49Δ). Να σημειωθεί πως η μεταχείριση με προπυλαμίνη σε ίδια συγκέντρωση με τη Spm δεν προκάλεσε καμία αλλαγή στο φάσμα Raman των Chl a και b ενώ από τις μικρότερες ΠΑΣ, μόνο η Spd (που φέρει μια ιμινομάδα) προκάλεσε μια μετατόπιση της τάξης των 4cm⁻¹ στη ζώνη των 1560cm⁻¹ της Chl b συνοδευόμενη από μια εξίσου σημαντική μετατόπιση της ζώνης των 1644cm⁻¹ (δεδομένα δεν παρατίθενται).

Η υπόθεση λοιπόν ότι η Spm προσδένεται στο κεντρικό Mg των Chl a και b αυξάνοντας την κατάσταση συναρμογής του κατά ένα δεσμό επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας Raman. Στη περίπτωση της Chl b, ξεκάθαρα συμπεράσματα εξήχθησαν για τη συμμετοχή της C-3 φορμυλομάδας της στην αλληλεπίδραση. Το υποθετικό μοντέλο που προκύπτει από όλα αυτά και τίθεται προς περαιτέρω διερεύνηση στις επόμενες ενότητες,

περιλαμβάνει τη διπλή πρόσδεση του εύκαμπτου σκελετού της Spm σε δύο θέσεις στο μόριο της Chl b. Με τη μία ή τη συνεισφορά και των δύο ιμινομάδων της, η Spm, προσδέεται στο κεντρικό Mg και με μια τελική αμινομάδα της στη C-3 φορμυλομάδα της Chl b.

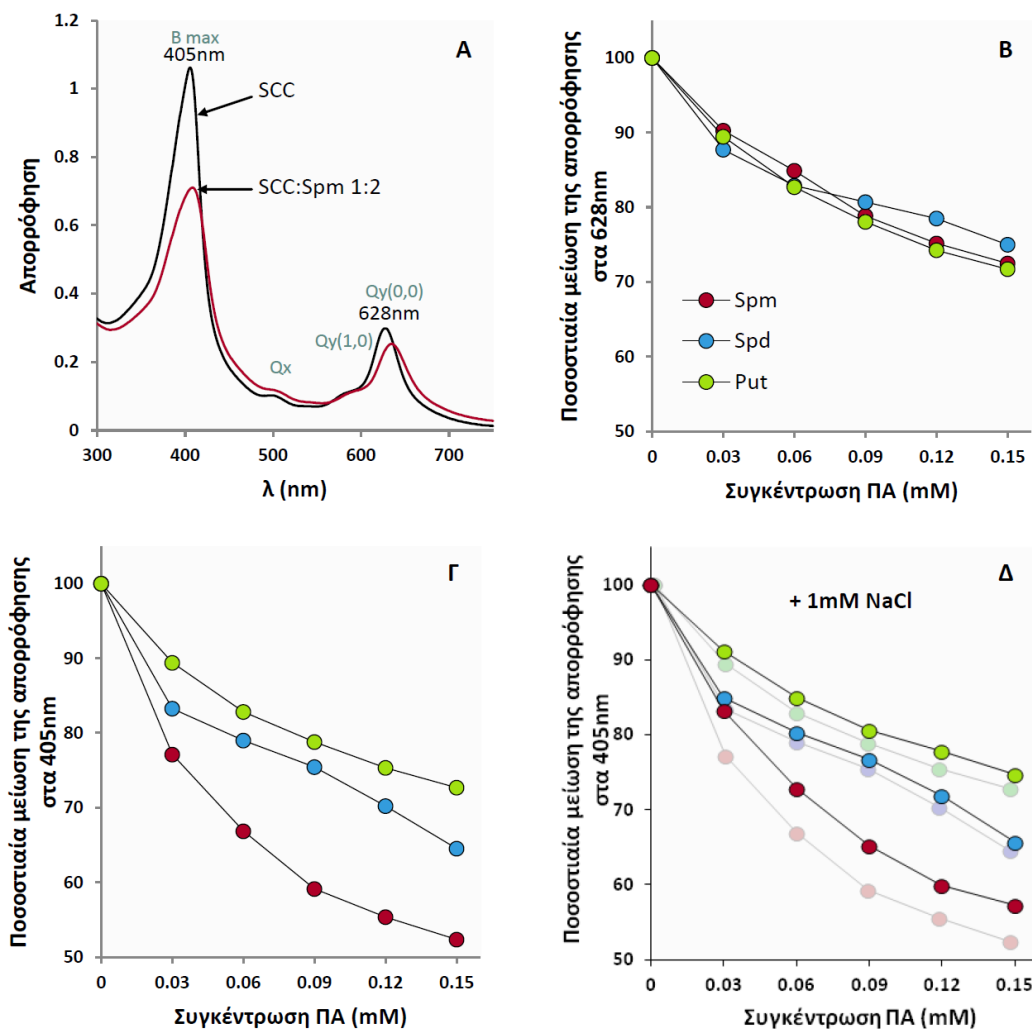
6. Επίδραση ΠΑς στις φασματοσκοπικές ιδιότητες της χλωροφυλλίνης

Ο λιπόφιλος χαρακτήρας των Chls επέτρεψε τη μελέτη τους μόνο σε οργανικούς διαλύτες, κάνοντας αδύνατη τη μελέτη της επίδρασης του pH, ενός πολύ σημαντικού παράγοντα της ενεργοποίησης του μηχανισμού NPQ *in vivo*. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της χλωροφύλλης, η χλωροφυλλίνη (SCC), ιδανικό από φωτοσυνθετικής πλευράς για τέτοιου είδους πειράματα. Το ερώτημα που τέθηκε προς απάντηση ήταν το εάν οι τρεις κύριες ΠΑς λειτουργούν ως αξονικοί προσδέτες στο μόριο της SCC και πως επηρεάζει το pH την πρόσδεσή τους.

6.1 Επίδραση ΠΑς στην απορρόφηση της SCC

Το φάσμα απορρόφησης της SCC παρουσιάζει μια έντονη B ταινία γύρω στα 405nm και μια μεσαία χαμηλής ενέργειας Qy(0,0) ταινία στα 628nm (Εικόνα 50Α). Οι δύο αδύναμες ζώνες στα 500nm και 585nm αντιστοιχούν στην Qx μετάβαση και στο δονητικό υπερτονικό επίπεδο Qy(1,0) αντίστοιχα (Hildebrandt and Spiro 1988). Οι ΠΑς προκαλούν υποχρωμισμό και μια μικρή βαθυχρωμική μετατόπιση του φάσματος (Εικόνα 50Α). Η Qy(0,0) στα 628nm δεν άλλαξε σημαντικά, ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις Spm (Εικόνα 50Β). Ωστόσο, οι Spm, Spd και Put μετατόπισαν βαθυχρωμικά τη συγκεκριμένη κορυφή κατά 8nm, 4nm και 1nm αντίστοιχα. Αντιθέτως, το σήμα στα 405nm μειώθηκε ραγδαία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Spm. Το μέγεθος της διαταραχής του σήματος από τις ΠΑς, μειώνεται με τη σειρά Spm>Spd>Put και σε αναλογία SCC:ΠΑ ίση με 1:5, το σήμα μειώθηκε κατά 25%, 35% και 50% για τις Put, Spd και Spm αντίστοιχα (Εικόνα 50Γ). Για να διαπιστωθεί ο τύπος της αλληλεπίδρασης που προκαλεί αυτές τις αλλαγές, τα πειράματα αυτά επαναλήφθηκαν με την παρουσία στο διάλυμα της χρωστικής υψηλών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου (SCC:NaCl = 1:30) πριν την προσθήκη των ΠΑς. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 50Δ, η παρουσία του NaCl, που εξουδετέρωσε τα αρνητικά φορτία της SCC, μείωσε κατά ένα μικρό ποσοστό την επίδραση των ΠΑς. Αυτό σημαίνει πως ο υποχρωμισμός του φάσματος της SCC δεν οφείλεται στην ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των θετικά φορτισμένων αμινο και ιμινο ομάδων των ΠΑς και των αρνητικά φορτισμένων καρβοξυλικών ομάδων της SCC. Η μείωση κατά 5% της επίδρασης της Spm από το NaCl

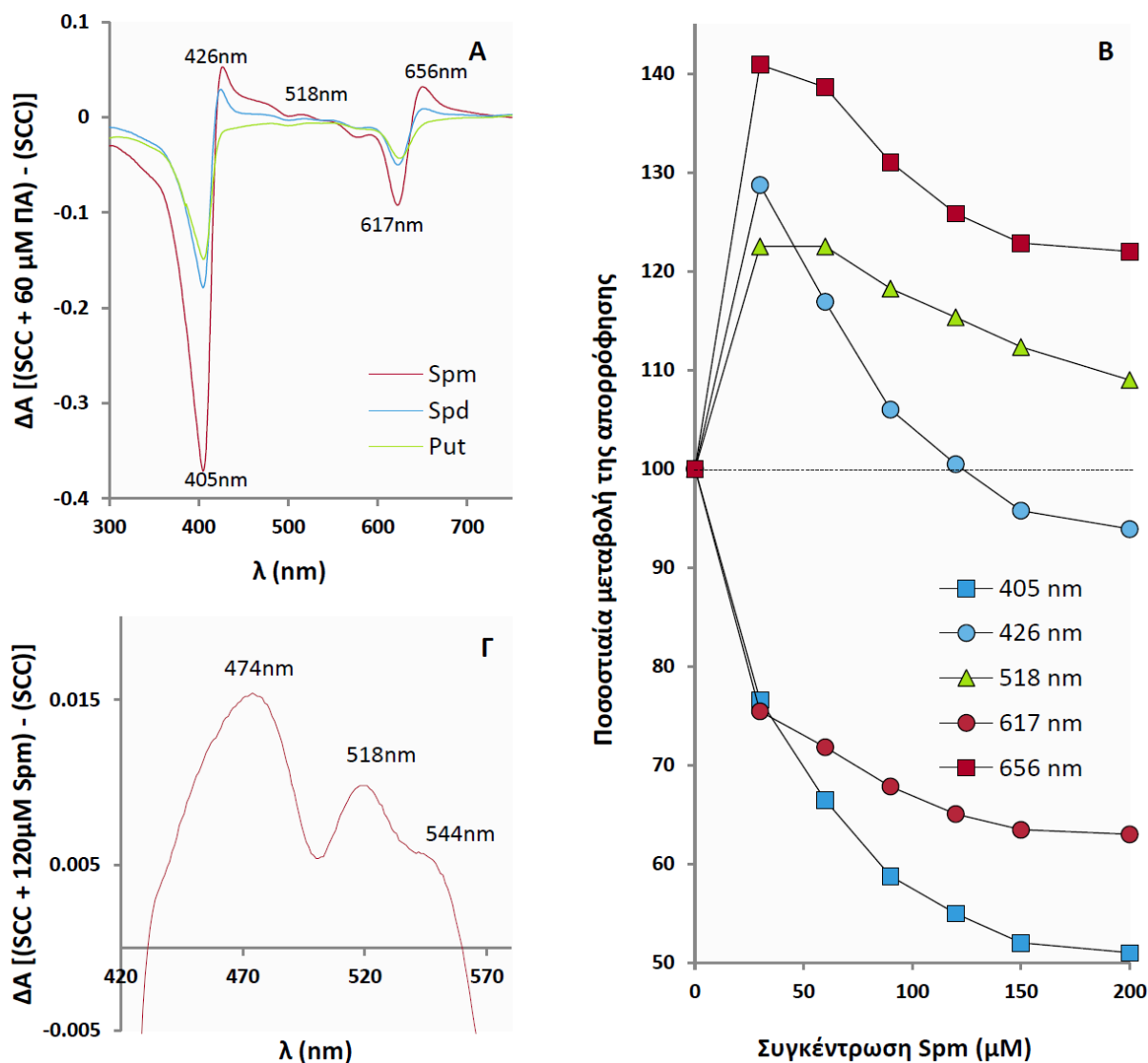
δεν αποκλείει και τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις αλλά πιθανόν, όπως και στην περίπτωση των Chls, η κύρια αλληλεπίδραση να περιλαμβάνει τη δημιουργία δεσμού συναρμογής με το κεντρικό άτομο Cu.



Εικόνα 50. Α. Το φάσμα απορρόφησης 30μM SCC πριν και μετά την προσθήκη 60μM Spm. Β. Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Spm, Spd και Put στη Qy(0,0) κορυφή του φάσματος απορρόφησης της SCC. Γ και Δ. Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Spm, Spd και Put στη Β κορυφή του φάσματος απορρόφησης της SCC απουσία και παρουσία 1mM NaCl αντίστοιχα. Για την ανάδειξη της επίδρασης του NaCl, οι αχνές γραμμές στο διάγραμμα Δ αντιστοιχούν στα επίπεδα της μείωσης εν τη απουσία του.

Τα φάσματα διαφοράς απορρόφησης για τις τρεις ΠAs απεικονίζουν τις αλλαγές που προκαλούν στο φάσμα της SCC (Εικόνα 51A). Αξιοσημείωτη είναι η περιοχή των 425-565nm που παρουσιάζει ευαισθησία στη συγκέντρωση των μεγαλύτερων ΠAs. Δύο θετικές κορυφές προκύπτουν από τη μεταχείριση με Spd και Spm στα 475nm και 520nm. Η κορυφή στα 520nm προκύπτει από τη βαθυχρωμική μετατόπιση της Qx ζώνης, ενώ η βαθυχρωμική μετατόπιση της Qy(0,0) έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση της αρνητικής κορυφής στα 617nm και της θετικής κορυφής στα 656nm, σε κάτι που θυμίζει έντονα το αντίστοιχο ζεύγος

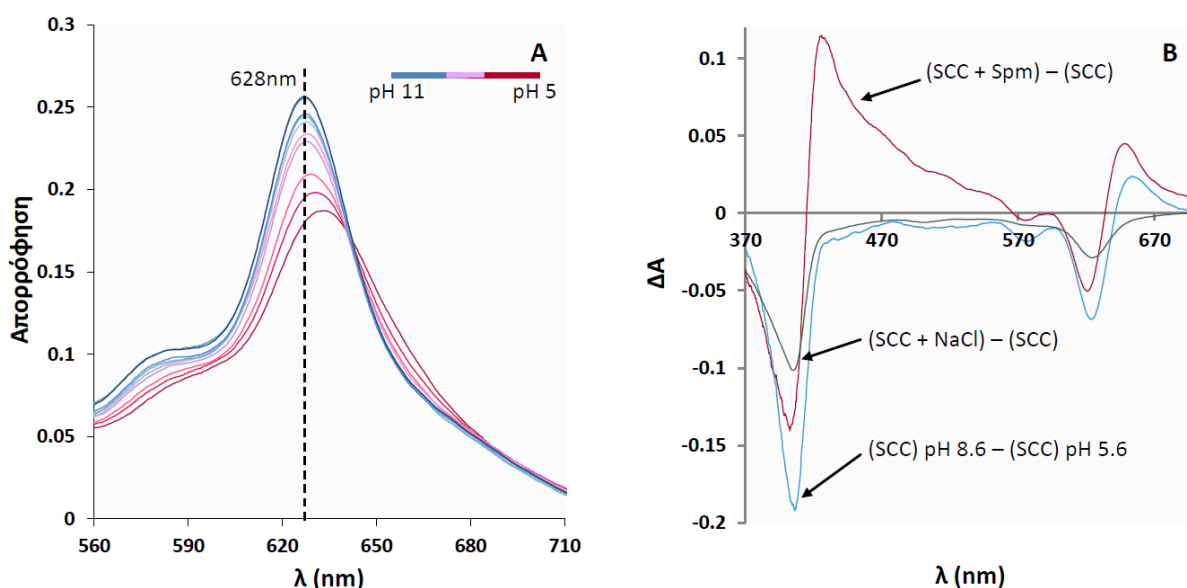
κορυφών της Chl b (645nm και 662nm) που υποδηλώνει την αλλαγή της κατάστασης συναρμογής του κεντρικού μετάλλου. Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Spm στις θετικές και αρνητικές κορυφές των φασμάτων διαφοράς παρουσιάζεται στην Εικόνα 51B. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αύξηση του σήματος κατά 30%, 20% και 40% στα 425nm, 520nm και 655nm αντίστοιχα από στοιχειομετρική ποσότητα Spm.



Εικόνα 51. Α. Φάσματα διαφοράς απορρόφησης των μεταχειρίσεων των τριών ΠAs από το μάρτυρα. Β. Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Spm σε διαφορετικές περιοχές του φάσματος απορρόφησης της SCC. Για κάθε μήκος κύματος, η τιμή της απορρόφησης της χρωστικής πριν τη μεταχείριση με Spm έχει τεθεί ως το 100%. Γ. Η Qx περιοχή σε υψηλή συγκέντρωση Spm, όπου δεν υπάρχει πλέον επικάλυψη από τα 426nm και διαγράφονται καθαρά οι κορυφές στα 474nm και 518nm. Η συγκέντρωση της SCC ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 30μM.

Η μελέτη της SCC σε διαφορετικά pH που κυμαίνονται από την όξινη έως τη βασική περιοχή, έδειξε πως επηρεάζεται το φάσμα απορρόφησης της όταν ο αριθμός των υδρογονοκατιόντων (H^+) στο διάλυμα αυξάνεται σημαντικά (Εικόνα 52A). Σε βασικές τιμές pH η επίδραση των πρωτονίων είναι μικρή προκαλώντας μόνο έναν υποχρωμισμό της κύριας

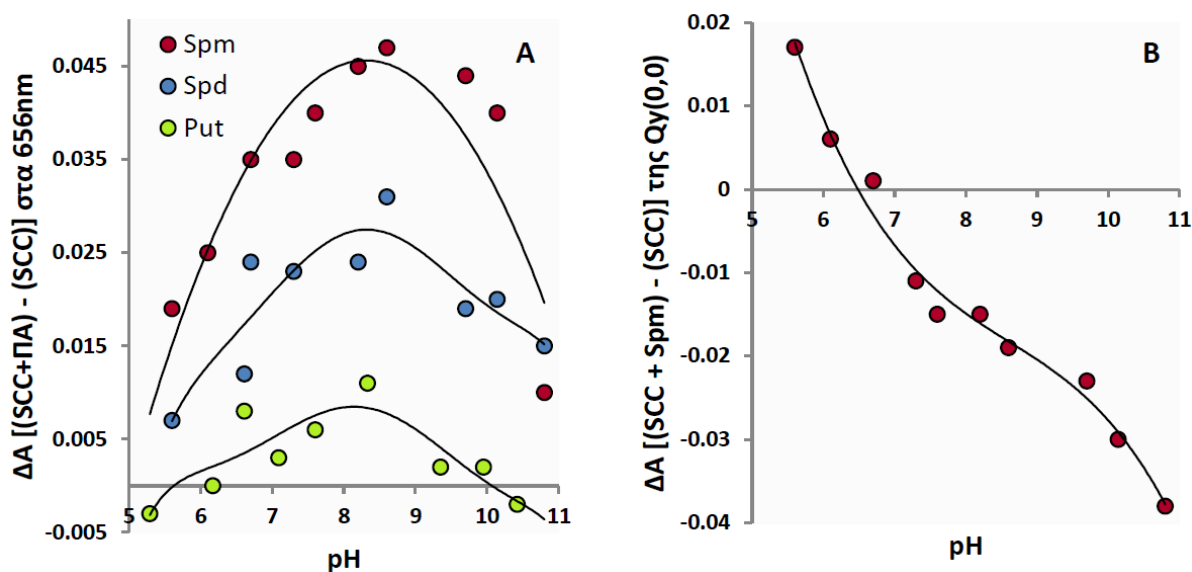
κορυφής που αυξάνεται όσο οι τιμές πλησιάζουν στο 7. Σε όξινες τιμές pH, η Qy(0,0) κορυφή μειώνεται αισθητά και μετατοπίζεται βαθυχρωμικά, όμοια με την επίδραση της Spm. Η επίδραση, από την άλλη, ακόμη μεγαλύτερης συγκέντρωσης NaCl (10mM) προκάλεσε έντονο υποχρωμισμό του φάσματος απορρόφησης της SCC χωρίς ωστόσο να επάγει αύξηση του σήματος στη Qx περιοχή και βαθυχρωμική μετατόπιση της Qy(0,0) (Εικόνα 52B). Με εξαίρεση την αύξηση του σήματος στη Qx περιοχή που υποδηλώνει διαφορετικού τύπου αλληλεπίδραση που προκαλεί φαινόμενα διάθλασης του φωτός, ο τρόπος δράσης των ΠAs φαίνεται να είναι παρόμοιος με αυτόν των πρωτονίων (Εικόνα 52B).



Εικόνα 52. Α. Η επίδραση του pH στην Qy(0,0) κορυφή του φάσματος απορρόφησης της SCC. Β. Φάσματα διαφοράς απορρόφησης 30μM SCC σε 1mM HEPES pH 8,6 από τη μεταχείρισή τους με 30μM Spm (κόκκινη γραμμή), 10mM NaCl (γκρι γραμμή) και πρωτόνια (μπλε γραμμή).

Σε δεδομένες συνθήκες θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, η συγκέντρωση των πρωτονίων καθορίζει το βαθμό διάστασης και το φορτίο των ΠAs. Με δεδομένο ότι οι αμινο και ιμινο-ομάδες τους φορτίζονται με συγκεκριμένη σειρά καθώς μεταβάλλεται το pH, τιτλοδοτήθηκε το σύμπλοκό τους με τη SCC, με σκοπό να βρεθεί η ομάδα ή οι ομάδες που πιθανόν συμμετέχουν στις παραπάνω αλληλεπιδράσεις. Οι διαφορές απορρόφησης που προέκυψαν για την Qy περιοχή μετά τη μεταχείριση με Spm, Spd και Put σε αναλογία 1:1, 2:1 και 3:1 αντίστοιχα με την SCC σε ένα εύρος τιμών pH από 5,5 έως 11, παρουσιάζονται στην Εικόνα 53. Η αύξηση του σήματος στα 656nm, που υποδηλώνει τη βαθυχρωμική μετατόπιση της Qy(0,0), παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή της κοντά στο pH 8,5 (Εικόνα 53A). Όσο μεταβαίνουμε σε χαμηλότερες τιμές pH, η επίδραση των ΠAs είναι μικρότερη καθώς ενισχύεται η επίδραση των πρωτονίων. Η καμπύλη της τιτλοδότησης γίνεται φθίνουσα και σε υψηλότερες τιμές pH και μάλιστα η επίδραση ελαχιστοποιείται απότομα μετά το pH 10.

Μετά το pH 10 η επίδραση της Put έχει ανασταλεί εντελώς, ενώ το ίδιο συμβαίνει για τις Spd και Spm κοντά σε pH 11. Σε αυτές τις τιμές pH οι ΠΑς είναι πλήρως αποπρωτονιωμένες.

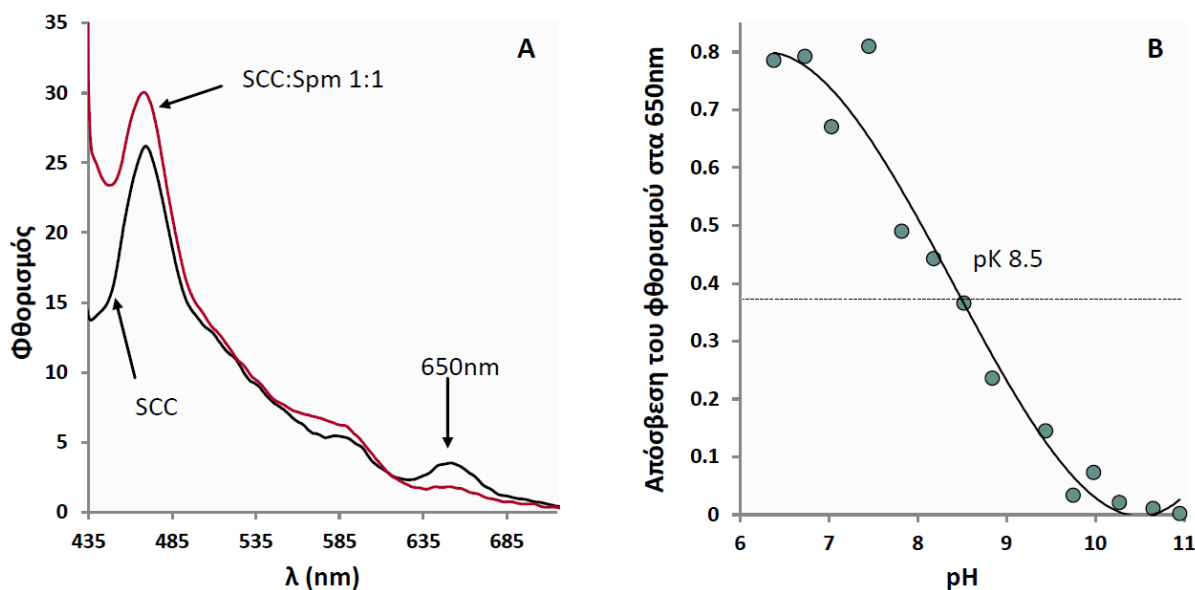


Εικόνα 53. Α. Η παρακολούθηση ως προς το pH των διαφορών της απορρόφησης στα 656nm 30μM SCC που προκαλούνται έπειτα από μεταχείριση με 30μM Spm, 60μM Spd και 90μM Put. Β. Η διαφορά απορρόφησης ως προς το pH της Qy(0,0) στα 628-634nm μετά από τη μεταχείριση με Spm.

Οι παρατηρούμενες διαφορές του σήματος στα 617nm και 656nm αποτελούν δύο συντελεστές του φαινομένου της μείωσης και βαθυχρωμικής μετατόπισης της κύριας Qy(0,0) κορυφής του φάσματος απορρόφησης της SCC από τα 628nm στα 634nm παρουσία Spm. Η διαφορά απορρόφησης της SCC από τη μεταχείριση με Spm σε αναλογία 1:1 στο ίδιο εύρος τιμών pH, έδωσε για το μέγιστο της Qy(0,0) την καμπύλη που παρουσιάζεται στην Εικόνα 53B. Οι θετικές τιμές που εμφανίζει σε pH κάτω του 7 οφείλονται στη δράση των πρωτονίων, η οποία προκαλεί εντονότερο υποχρωμισμό από ότι η Spm. Η σιγμοειδής αυτή καμπύλη εμφανίζει σημείο καμπής κοντά στο pH 8,5, όπου δηλαδή η αύξηση της διαφοράς απορρόφησης για τα 656nm εμφανίζει τη μέγιστη τιμή της.

6.2 Επίδραση ΠΑς στο φθορισμό της SCC

Ένα μειονέκτημα της SCC, που οφείλεται στην ύπαρξη του χαλκού αντί του μαγνησίου, είναι ότι φθορίζει αισθητά λιγότερο από τις Chls, καθώς ο Cu έλκει τα ηλεκτρόνια περισσότερο από το Mg. Παρόλα αυτά, ο φθορισμός του μορίου σχηματίζει μια καθαρή κορυφή στα 650nm, η οποία μειώνεται ακόμα περισσότερο παρουσία Spm. Τα 10μM SCC εμφανίζουν επίσης μια έντονη κορυφή στα 470nm και έναν ώμο στα 583nm, των οποίων το σήμα ενισχύεται παρουσία Spm (Εικόνα 54A).

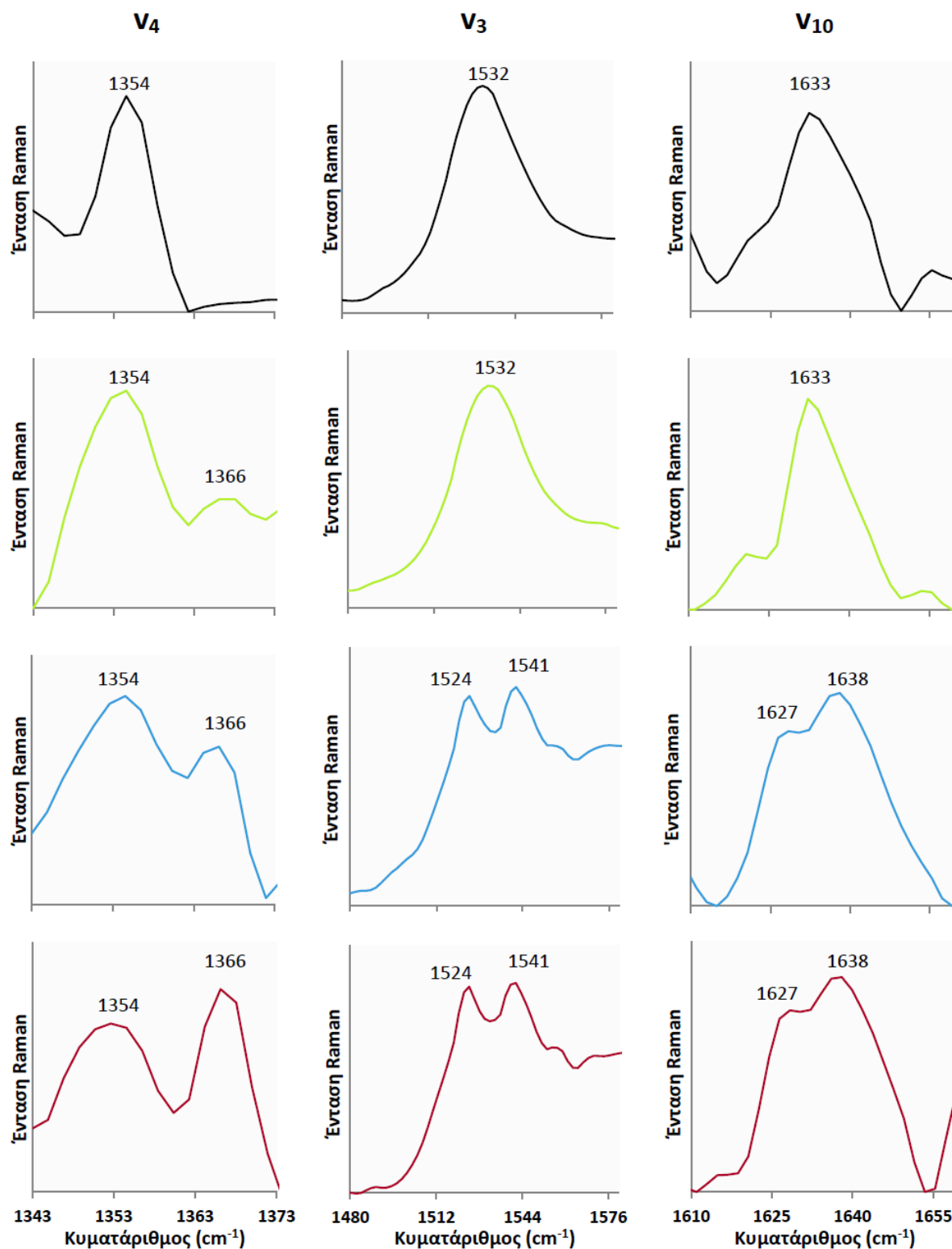


Εικόνα 54. Α. Φάσματα εκπομπής φθορισμού 10μM SCC πριν (μαύρη γραμμή) και μετά την προσθήκη 10μM Spm (κόκκινη γραμμή). Η Spm αποσβένει το φθορισμό στα 650nm (βέλος). Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 405nm και τα παράθυρα διέγερσης και εκπομπής ήταν 15nm. Β. Η παρακολούθηση της απόσβεσης του φθορισμού στα 650nm από τη Spm ως προς το pH. Η απόσβεση του φθορισμού (qF) υπολογίστηκε από τον τύπο $qF = (F_{max} - F) / F$, όπου F_{max} και F οι εντάσεις φθορισμού που καταγράφηκαν πριν και μετά την προσθήκη Spm αντίστοιχα.

Μέσα από την τιτλοδότηση του διαλύματος SCC:Spm σε μοριακή αναλογία 1:1 παρακολούθηθηκε η απόσβεση του φθορισμού στα 650nm και όπως φαίνεται καθαρά αυτή εξουδετερώνεται σε υψηλές τιμές pH (Εικόνα 54B). Από την καμπύλη αυτή προκύπτει ένα pK ίσο με 8.5, σε αντιστοιχία με τα πειράματα της απορρόφησης, που σημαίνει ότι για να γίνει η αλληλεπίδραση, πρέπει μία ομάδα της σπερμίνης με pK 8.5 να είναι πρωτονιωμένη. Οι τιμές pK για τις αμινομάδες της σπερμίνης είναι 8.03, 9.04, 10.27 και 10.97. Οι δύο μεγαλύτερες αντιστοιχούν στις ακριανές αμινομάδες του μορίου ενώ οι δύο μικρότερες στις δύο ιμινομάδες. Επομένως, ισχυροποιείται η υπόθεσή που διατυπώθηκε νωρίτερα, ότι η μία ή και οι δύο ιμινομάδες της Spm συνεισφέρουν στη συναρμογή με το κεντρικό μέταλλο των Chls τραβώντας το έξω από το επίπεδο του μακρομορίου.

6.3 Επίδραση ΠAs στα φάσματα Raman της SCC

Για τη συλλογή φασμάτων Raman χρειάστηκε να χρησιμοποιηθεί αρκετά υψηλή συγκέντρωση SCC (25mM), καθώς σε μικρότερες συγκεντρώσεις το σήμα του φθορισμού ήταν απαγορευτικό. Αν και σε αυτές τις συγκεντρώσεις τα μόρια της SCC σχηματίζουν συσσωματώματα, η παρουσία των ΠAs σε μοριακή αναλογία 1:1 ανέδειξε χαρακτηριστικές διαφορές σε τρεις συχνότητες των φασμάτων που σχετίζονται άμεσα με την αλλαγή της κατάστασης συναρμογής του κεντρικού μετάλλου (Εικόνα 55).



Εικόνα 55. Οι συχνότητες ν_4 (αριστερά) ν_3 (κέντρο) και ν_{10} (δεξιά) των δονήσεων των δεσμών της SCC από τα φάσματα Raman απουσία (μαύρη γραμμή) ή παρουσία Put (πράσινη γραμμή), Srd (μπλε γραμμή) και Spt (κόκκινη γραμμή) σε ισομοριακή αναλογία με τη χρωστική. Η συγκέντρωση της SCC που διαλυτοποιήθηκε σε απιονισμένο νερό ήταν 25mM. Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 473nm.

Η μετατόπιση της ισορροπίας της ν_4 ζώνης από τους 1354 στους 1366cm^{-1} είναι ενδεικτική της αλλαγής της οξειδωτικής κατάστασης του κεντρικού ατόμου Cu και του απεντοπισμού των π -ηλεκτρονίων του τετραπυρρολικού δακτυλίου. Ο λόγος της έντασης των ζωνών ($1354/1366\text{cm}^{-1}$) για το μάρτυρα και τις μεταχειρίσεις με NH_4Cl , Put, Spd και Spm είναι 7.3, 6.4, 1.9, 1.2 και 0.8 αντίστοιχα. Η μείωση του λόγου αυτού αποτελεί ένδειξη της αλλαγής της ισορροπίας της κατάστασης συναρμογής του κεντρικού μετάλλου που μεταβαίνει από την πέμπτη στην έκτη καθώς αυξάνεται το μέγεθος και η δραστικότητα του υποκαταστάτη. Παρουσία Spm η κύρια κορυφή είναι πλέον αυτή στους 1366cm^{-1} υποδεικνύοντας ότι το μεγαλύτερο μέρος των μορίων SCC βρίσκεται σε κατάσταση συναρμογής με αριθμό «έξι».

Η σχέση των ζωνών ν_3 και ν_{10} από τις μεγαλύτερες ΠΑΣ είναι ένα δεύτερο ενδεικτικό στοιχείο της διαφορετικής δόνησης των δεσμών του πορφυρινικού σκελετού της SCC και επομένως σχετίζονται με την αλλαγή της κατάστασης συναρμογής του Cu. Απουσία άλλων ζωνών κοντά στους 1500cm^{-1} , η ζώνη στους 1532cm^{-1} αποδίδεται με επιφύλαξη στη ν_3 δόνηση που σχετίζεται με δονήσεις των δεσμών Ca – Cm και Ca – N των πυρρολικών δακτυλίων (για τις συχνότητες των δονήσεων και τους δεσμούς στους οποίους αντιστοιχούν, βλέπε «Εισαγωγή», σχετική ενότητα). Ενδεχομένως η εμφάνιση της ζώνης στους 1541cm^{-1} να προέρχεται από συνεισφορές των δονήσεων των Cb – Cb δεσμών (ν_{38}). Όσο αφορά τη ζώνη στους 1633cm^{-1} η αντιστοίχιση της με τη δόνηση των δεσμών Ca – Cm (ν_{10}) θεωρείται δεδομένη και σχετίζεται κατεξοχήν με την κατάσταση συναρμογής του κεντρικού μετάλλου. Η εμφάνιση της ζώνης στους 1627cm^{-1} , δηλαδή σε μικρότερους κυματάρθμους, αποτελεί ένδειξη της δημιουργίας του 6^{ov} δεσμού συναρμογής.

Με δεδομένο ότι το μήκος κύματος διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 473nm , δηλαδή στην αδύναμη ζώνη απορρόφησης της χρωστικής στη Qx περιοχή του φάσματος, αναμένεται οι μεγαλύτερες συνεισφορές στα φάσματα Raman να προέρχονται από τα δονητικά επίπεδα της Qx μετάβασης. Ενδεχομένως οι δύο κορυφές που προκύπτουν στις ν_3 και ν_{10} περιοχές των φασμάτων Raman να σχετίζονται με τις δύο κορυφές που προκύπτουν στην Qx περιοχή των φασμάτων διαφοράς απορρόφησης από τη μεταχείριση με τις μεγαλύτερες ΠΑΣ.

Συζήτηση

Η αξονική πρόσδεση των μεταλλοπορφυρινών με αμινικούς υποκαταστάτες είναι γνωστή (Bouamaid et al. 2006 και αναφορές που περιέχονται). Οι περισσότερες όμως μελέτες δεν περιλαμβάνουν τις Chl a και b, κυρίως λόγω του ασταθούς χαρακτήρα τους λόγω της πολυπλοκότητας του μορίου τους. Στην παρούσα διατριβή, επιβεβαιώθηκε ότι οι ΠΑς δημιουργούν δεσμούς συναρμογής με τις Chls μέσω των αμινομάδων τους. Εκτός από τις βιογενείς αμίνες, χρησιμοποιήθηκαν αλειφατικές μονοαμίνες (όπως η προπυλαμίνη) και ετεροκυκλικές ενώσεις (όπως η πυριδίνη) και τα αποτελέσματα ανέδειξαν ομοιότητες και διαφορές στον τρόπο δράσης τους. Συνήθως οι μονοαμίνες ή οι μονοδοντικοί (monodentate) υποκαταστάτες προσδέονται στο ιόν μετάλλου με απλό τρόπο, είτε από τη μια πλευρά του τετραπυρρολικού δακτυλίου, είτε και από τις δύο (Weitman et al. 2009). Αυτή φαίνεται να είναι η υπόθεση και για τις Spm, Spd και Put. Ωστόσο, ένας τετραδοντικός υποκαταστάτης με εύκαμπτο σκελετό, όπως η Spm, είναι αναμενόμενο να αλληλεπιδρά με πιο σύνθετο τρόπο.

Πιο αναλυτικά, οι ΠΑς αυξάνουν την απορρόφηση της Chl a στα 640nm (Εικόνα 40), φαινόμενο ενδεικτικό της δημιουργίας του 6^{ου} δεσμού συναρμογής, όπως προέκυψε από μελέτες με πυριδίνη (Evans and Katz 1975; Fragata et al. 1988; Ratsep et al. 2009). Η κορυφή στα 640nm πιστεύεται ότι αντιστοιχεί στη Qx μετάβαση η οποία με την αλλαγή της κατάστασης συναρμογής μετατοπίζεται βαθυχρωμικά, πιο κοντά στην Qy θέση, ενώ η πιο αδύναμη κορυφή στα 615nm σχετίζεται με την Qy(1,0) (Evans and Katz 1975; Fragata et al. 1988). Στα συστήματα με αριθμό συναρμογής «5» πιστεύεται ότι οι δύο αυτές καταστάσεις επικαλύπτονται δίνοντας μια μοναδική ευρεία κορυφή γύρω στα 615nm. Κατά αντιστοιχία, η κορυφή της Chl b στα 660nm σχετίζεται με την Qy(0,0) και η κορυφή στα 600nm στην Qy(1,0) με συνεισφορές από την Qx. Όπως και στη Chl a, οι ΠΑς μειώνουν την κορυφή της Chl b στα 600nm και αυξάνουν το σήμα στα 633nm (Qx) δείχνοντας πως η αξονική πρόσδεσή τους είναι εφικτή και στη Chl b (Εικόνα 41). Αυτή είναι η πρώτη αναφορά αντίστοιχου ζεύγους ζωνών για τη Chl b που μεταβάλλονται όπως και της Chl a κατά την αλλαγή της συναρμογής του κεντρικού Mg. Σε συμφωνία με αυτήν την παραδοχή, τα αποτελέσματα με τις φαιοφυτίνες έδειξαν ότι όταν έλλειπε το Mg, τα ευαίσθητα στην κατάσταση συναρμογής ζεύγη ζωνών (640/615nm για τη Chl a και 633/600nm για τη Chl b) ήταν επίσης απόντα (Εικόνα 43). Μια εναλλακτική εξήγηση των αλλαγών στις περιοχές αυτών των φασμάτων, που βασίζεται σε δεδομένα της δεκαετίας του '60, είναι ότι σε υψηλές

συγκεντρώσεις αμίνης λύουν το δεσμό C₉-C₁₀ του E δακτυλίου της Chl (Weller and Livingston 1954; Pennington et al. 1967; Pennington et al. 1974). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η αύξηση στα 640nm προέρχεται από την αλλαγή της κατάστασης συναρμογής (Orzel et al. 2008). Σε κάθε περίπτωση, το φαινόμενο αυτό είναι οριακό σε μικρές συγκεντρώσεις ΠΑ που η επίδραση της Spm στις οπτικές ιδιότητες της Chl b παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Ένας άλλος δείκτης, που έχει προταθεί ότι σχετίζεται με την αλλαγή της κατάστασης συναρμογής των μεταλλοπορφυρινών, είναι η βαθυχρωμική μετατόπιση της Qy(0,0). Σύμφωνα με τους Weitman et al. (2009), μια μεγάλη βαθυχρωμική μετατόπιση της τάξης των 10nm αποτελεί ένδειξη της αξονικής πρόσδεσης 2 μορίων πυριδίνης, ενώ μικρότερη μετατόπιση κατά 1-3nm αποτελεί ένδειξη ενός δεσμού συναρμογής με ένα μόριο πυριδίνης. Η βαθυχρωμική μετατόπιση της Qy(0,0) της Chl b έως και κατά 9nm για τα 500mM Spm, μπορεί λοιπόν να αποδοθεί στην αλλαγή της κατάστασης συναρμογής του κεντρικού Mg της (Εικόνα 41Γ). Εξάλλου, η μετατόπιση της κορυφής αυτής παρατηρήθηκε επίσης, αν και σε μικρότερο βαθμό, κατά τη μεταχείριση με διαλύτες που ευνοούν το σχηματισμό του 6^{ου} δεσμού συναρμογής (Εικόνα 47 και Πίνακας 8).

Το ζήτημα της κατάστασης συναρμογής του κεντρικού Mg από τις ΠΑς δεν απαντήθηκε κατηγορηματικά από τα παραπάνω πειράματα. Η τεκμηρίωση του 6^{ου} δεσμού συναρμογής που δημιουργεί η Spm έγινε με τη χρήση της φασματοσκοπίας Raman. Η μετατόπιση των ζωνών στους 1549 και 1559cm⁻¹ των Chl a και b αντίστοιχα στους 1539 και 1553cm⁻¹ δείχνει ότι η ισορροπία του συμπλόκου με τη Spm έχει μετακινηθεί από κατάσταση συναρμογής «πέντε» σε «έξι» (Εικόνα 49). Η ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων είναι η εξής. Υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες, ο διαλύτης (αιθανόλη) προσδένεται πιθανότατα αξονικά με τις Chls, αλλά αντικαθίσταται εύκολα από τους ισχυρότερους υποκαταστάτες (-NH₂ και/ή -NH-). Έτσι, αυξανόμενες συγκεντρώσεις Spm οδηγούν σταδιακά την ισορροπία προς την έκτη κατάσταση συναρμογής. Υπάρχουν δύο τουλάχιστον τρόποι πρόσδεσης της Spm που θα ερμήνευαν αυτά τα αποτελέσματα. Ένας συμμετρικός ως προς τον τετραπυρρολικό δακτύλιο, όπου ο 5^{ος} και 6^{ος} δεσμός συναρμογής δημιουργούνται στις αντίθετες πλευρές του και ένας δευτερός διανυσματικός, όπου οι δύο δεσμοί δημιουργούνται στην ίδια πλευρά του. Σύμφωνα με τα παρόμοια αποτελέσματα με πυριδίνη, σε υψηλές συγκεντρώσεις Spm φαίνεται να επικρατεί η πρώτη διαμόρφωση.

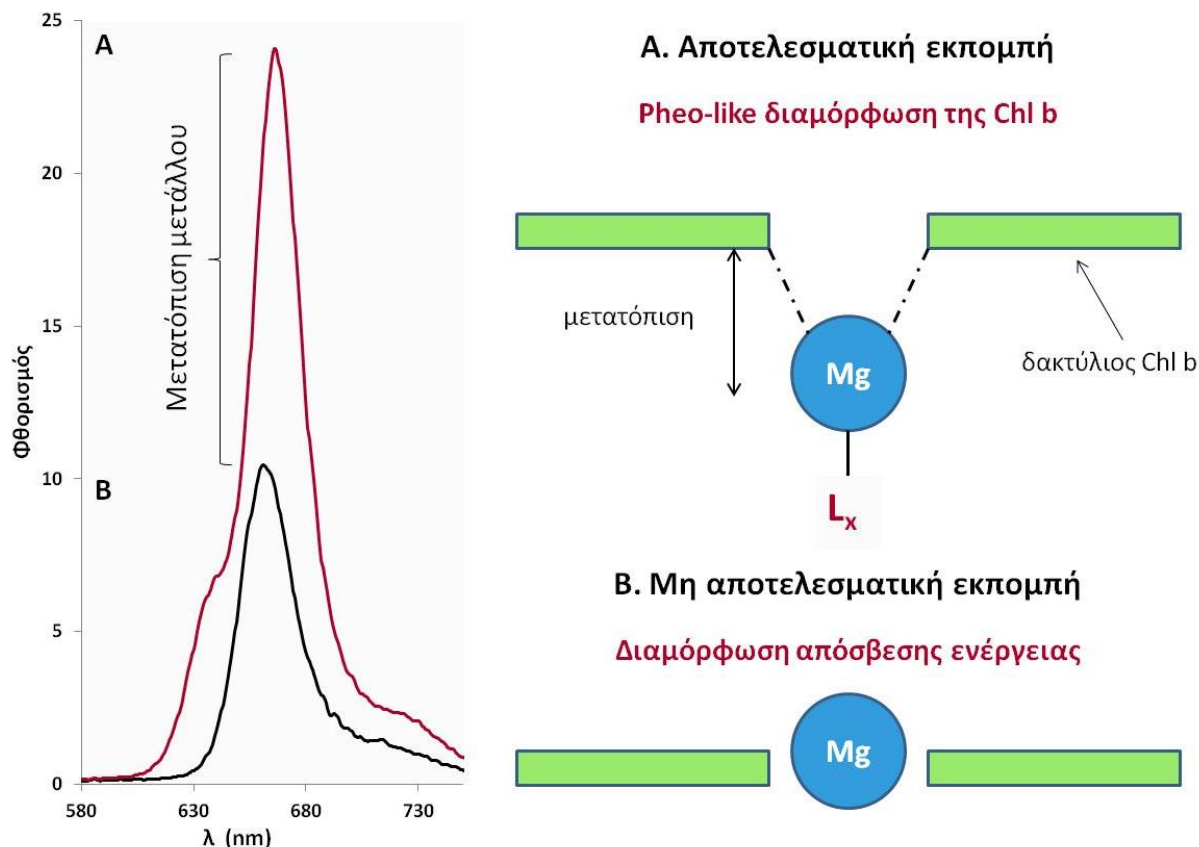
Όσον αφορά την αλληλεπίδραση SCC-Spm στα υδατικά διαλύματα, τα πράγματα φαίνεται να είναι πιο σύνθετα. Αυτό οφείλεται στην υδροποίηση της SCC, δηλαδή τους δεσμούς που δημιουργεί με ένα ή περισσότερα μόρια νερού, όπως είναι γνωστό ότι συμβαίνει σε υδατικά διαλύματα Chls και άλλων μεταλλοπορφυρινών (Katz and Norris 1973; Chow et al. 1974; Shipman et al. 1976; Ben Fredj et al. 2008). Σε αντίθεση με τη Spm, με εξαίρεση τις πολύ βασικές τιμές pH στις οποίες δε φέρει κάποιο θετικό φορτίο, τα υδρογονοκατιόντα προκάλεσαν βαθυχρωμική μετατόπιση και έντονο υποχρωμισμό της Qy(0,0) μόνο σε όξινα pH (Εικόνα 52). Η SCC φέρει τρεις καρβοξυλικές ομάδες (Εικόνα 39). Όσο το pH μεταβαίνει σε χαμηλότερες περιοχές, τα αρνητικά φορτία των ομάδων αυτών ουδετεροποιούνται. Η σταδιακή εξουδετέρωση των αρνητικών φορτίων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς του συστήματος της χρωστικής. Όταν αυτή φτάσει ένα κρίσιμο όριο, τότε επιτρέπεται θερμοδυναμικά η αξονική πρόσδεση μορίων νερού στη χρωστική (Fredj and Ruiz-López 2009). Σύμφωνα με θεωρητικές μελέτες και κρυσταλλογραφικά δεδομένα (Chow et al. 1975; Ben Fredj et al. 2009), πιθανότατα η αλληλεπίδραση έχει ως εξής: Ένα μόριο νερού δημιουργεί τον 5ο δεσμό συναρμογής μέσω του οξυγόνου του με το μέταλλο Cu του τετραπυρρολικού δακτυλίου της SCC. Ένα δεύτερο μόριο νερού συνήθως προσδένεται με δεσμούς υδρογόνου με το πρώτο και με το οξυγόνο κάποιου περιφερειακού εστέρα στο μόριο της χρωστικής. Έτσι, όταν σε αυτές τις συνθήκες (όξινες τιμές pH), προστεθεί η Spm, απομακρύνει ως πιο πυρηνόφιλος υποκαταστάτης τα μόρια νερού και προσδένεται αξονικά στη SCC. Αυτό προκύπτει από την αυξημένη απορρόφηση της Qy(0,0) παρουσία Spm σε σχέση με αυτή του συμπλόκου SCC:2H₂O στο συγκεκριμένο εύρος τιμών pH (Εικόνα 53Γ).

Η χρήση ενός πολύ σημαντικού εργαλείου, της φασματοσκοπίας φθορισμού, ανέδειξε τα πιο ενδιαφέροντα φαινόμενα. Η τετραμίνη Spm, σε χαμηλές συγκεντρώσεις (έως 100μM), αυξάνει τα επίπεδα του φθορισμού της Chl b έως και κατά 250% (Εικόνα 42). Η επίδραση αυτή διαφέρει από τις αντίστοιχες της τριαμίνης Spd και της διαμίνης Put, ενώ δεν μπόρεσε να τη μιμηθεί ούτε η μεταχείριση με την πυριδίνη. Το πιο σημαντικό ίσως είναι ότι η Spm δεν προκαλεί τις ίδιες αλλαγές στο φθορισμό της Chl a. Η μόνη διαφορά στο μόριο της Chl a από αυτό της Chl b είναι η ύπαρξη μιας μεθυλομάδας στη θέση 3 του πυρρολικού δακτυλίου B, αντί μιας φορμυλομάδας (Εικόνα 38). Η ηλεκτραρνητικότητα του οξυγόνου της φορμυλομάδας επιφέρει μια ανακατανομή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας από τα άζωτα του τετραπυρρολικού δακτυλίου προς την περιφέρεια του μορίου με αποτέλεσμα το Mg²⁺ της Chl b να φέρει θετικότερο φορτίο από αυτό της Chl a, καθιστώντας το ισχυρότερο οξύ κατά

Lewis. Επομένως, είναι πιθανό για το λόγο αυτό η Chl b να προσδένει ισχυρότερα υποκαταστάτες. Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η Spm αλληλεπιδρά με τη φορμυλομάδα της Chl b (με το οξυγόνο της φορμυλομάδας πιο συγκεκριμένα). Η φασματοσκοπία Raman επιβεβαίωσε ότι η αλληλεπίδραση της Chl b με τις μεγαλύτερες ΠΑς όντως περιλαμβάνει δεσμούς υδρογόνου με τη φορμυλομάδα της θέσης 3, όπως υποδεικνύεται από τη μετατόπιση της ζώνης από τους 1644 στους 1625cm⁻¹ (Εικόνα 49).

Η Spm, σε χαμηλές και μεσαίες συγκεντρώσεις, αυξάνει τα επίπεδα φθορισμού της Chl b ενώ ταυτόχρονα μετατοπίζει το μέγιστο εκπομπής από τα 661 στα 667nm (Εικόνα 42). Την ίδια ακριβώς επίδραση έχει στο φάσμα φθορισμού η απομάκρυνση του Mg από τον τετραπυρρολικό δακτύλιο της Chl b (Εικόνα 44, φάσμα Pheo b). Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι κατά την αξονική πρόσδεση της Spm στη Chl b, το Mg μετατοπίζεται ελαφρώς από το επίπεδο του τετραπυρρολικού δακτυλίου και αυτό εκδηλώνεται φασματοσκοπικά με την αύξηση του φθορισμού. Η φύση είναι γνωστό ότι έχει επινοήσει και αξιοποιεί τέτοιου είδους μηχανισμούς σε προσθετικές ομάδες όμοιων τετραπυρρολικών δομών, όπως στο σίδηρο της αίμης στη μυοσφαιρίνη και την αιμοσφαιρίνη. Εκεί, ο σίδηρος είναι προσδεδεμένος με μία ιστιδίνη που τον έχει μετατοπίσει από τον τετραπυρρολικό δακτύλιο και η αίμη έχει ένα θολωτό σχήμα, μέχρις ότου το πλήρως επίπεδο σχήμα επανέλθει από την πρόσδεση ενός οξυγόνου που επανεισαγάγει το σίδηρο εντός του δακτυλίου (Perutz 1989).

Σε αυτές τις χαμηλές συγκεντρώσεις Spm φαίνεται να προκρίνεται ο δεύτερος, διανυσματικός, τρόπος αξονικής πρόσδεσής της στο μόριο της Chl b. Το μήκος της Spm (14.6 Å) ισοδυναμεί περίπου με το μήκος της διαγωνίου του τετραπυρρολικού δακτυλίου (10 Å) και φέρει δύο αμινο και δύο ιμινο ομάδες. Είναι πολύ πιθανό ο εύκαμπτος σκελετός της Spm να λειτουργεί ως ασπίδα πάνω από τον δακτύλιο της Chl b, έλκοντας το Mg προς τα έξω μέσω των δύο εσωτερικών ιμινομάδων της. Είναι ξεκάθαρο εξάλλου, από τα αποτελέσματα με τη SCC πως η αλληλεπίδραση με τη Spm εξαρτάται από τις ιμινομάδες της και το βαθμό πρωτονίωσής τους (Εικόνες 53 και 54). Μια τέτοια αλληλεπίδραση απαιτεί δύο επιπλέον θέσεις πρόσδεσης (των δύο άκρων της αλειφατικής Spm) στην περιφέρεια του δακτυλίου. Η μία από αυτές είναι η φορμυλομάδα της θέσης 3 όπως έδειξε καθαρά η φασματοσκοπία Raman.



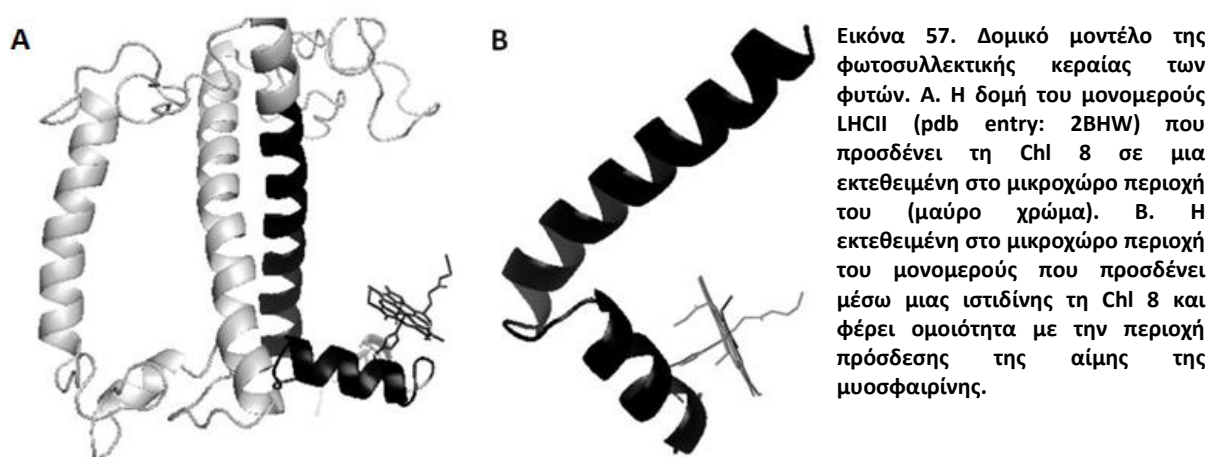
Εικόνα 56. Απλοποιημένο σχήμα της ρύθμισης του φθορισμού της Chl b. Η Chl b απαντάται σε δύο τουλάχιστον καταστάσεις. Στην κατάσταση A η εκπομπή της ενέργειας είναι πολύ αποτελεσματική ενώ στην κατάσταση B λιγότερο αποτελεσματική (διαμόρφωση απόσβεσης της ενέργειας). Ο μηχανισμός διάχυσης της ενέργειας προτείνεται ότι οφείλεται στη θέση του Mg. Όταν αυτό βρίσκεται εντός του τετραπυρρολικού δακτυλίου η ενέργεια διαχέεται. Αντίθετα, όταν μετατοπίζεται εκτός του δακτυλίου (Pheo-like διαμόρφωση) οι απώλειες της ενέργειας μέσω θερμότητας είναι μικρότερες. *In vitro*, αμινικοί υποκαταστάτες (L_x) όπως η Spm μπορούν να μετακινήσουν την ισορροπία της Chl b προς τη μια ή την άλλη διαμόρφωση.

Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι μια ελαφριά μετατόπιση του Mg από το επίπεδο του δακτυλίου μπορεί να αυξήσει σημαντικά το φθορισμό της Chl b ή ότι η επανεισαγωγή του μπορεί να αποσβέσει το φθορισμό. Ένας τέτοιος μηχανισμός απόσβεσης της ενέργειας, που παρουσιάζεται με ένα επεξηγηματικό σχήμα στην Εικόνα 56, θα μπορούσε να παρέχει στον φωτοσυνθετικό οργανισμό την ικανότητα να ενεργοποιεί αστραπιαία (η εισαγωγή του Mg εντός του επιπέδου του δακτυλίου λαμβάνει χώρα σε κλίμακα ms) τη φωτοπροστασία του. Με παρόμοιο τρόπο δράσης, η πρόσδεση του οξυγόνου στον Fe της αιμοσφαιρίνης προκαλεί την επανεισαγωγή του στο επίπεδο της αίμης σε περίπου 10^{-5} s (Trent et al. 2001). Ένας μηχανισμός qE που εκμεταλλεύεται τέτοιες μετατοπίσεις του Mg των Chls δεν είναι ενάντια στα *in vivo* δεδομένα σε ότι αφορά το χρόνο που απαιτείται για την ενεργοποίηση του NPQ, καθώς η πυροδότηση του qE *in vivo* δεν είναι ταχύτερη από το χρόνο μετατόπισης του μετάλλου στο επίπεδο του τετραπυρρολικού δακτυλίου.

Επιπλέον, συγκρίνοντας διαθέσιμες δομές από το LHCIΙ του μπιζελιού και την περιοχή πρόσδεσης της αίμης στην ανθρώπινη μυοσφαιρίνη, προκύπτουν ομοιότητες με μια εκτεθειμένη στο μικροχώρο περιοχή του LHCIΙ (Εικόνα 57). Αυτή η περιοχή προσδέει μια Chl a, τη Chl 8 (βλέπε «Εισαγωγή», σχετική ενότητα) σε LHCIΙ, CP29 και CP26. Η τοπική εγγύτητα της συγκεκριμένης περιοχής με το μικροχώρο την καθιστά προσβάσιμη από τα πρωτόνια αλλά και τις ΠΑΣ που κατά προτίμηση συγκεντρώνονται εκεί κατά τη διάρκεια των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης. Μία ή περισσότερες Chls θα μπορούσαν να είναι οι *in vivo* αποσβέστες του NPQ, αν έχουν το κεντρικό τους μέταλλο μετατοπισμένο εκτός του επιπέδου του δακτυλίου τους στο σκοτάδι και το επαναφέρουν εντός του επιπέδου κάτω από υψηλές συνθήκες φωτός. Αν και κάτω από τις παρούσες *in vitro* συνθήκες, εκδηλώνεται μεγαλύτερη απόσβεση του φθορισμού για τη Chl b από ότι για τη Chl a, *in vivo* η κατάσταση μπορεί να διαφέρει. *In vivo*, μόνο ο φθορισμός της Chl a είναι ανιχνεύσιμος, καθώς η ενέργεια της Chl b μεταφέρεται στην Chl a και επομένως δεν είναι δυνατόν να μελετηθεί η απόσβεση του φθορισμού της. Ωστόσο, το *in vivo* φάσμα απορρόφησης της φωτοσυνθετικής μηχανής θα πρέπει να παρουσιάζει στοιχεία Pheo b – like χαρακτηριστικών. Τέτοια χαρακτηριστικά, όπως είναι η αύξηση του σήματος στην περιοχή των 500-570nm και η διαπλάτυνση της Qy κορυφής, απαντώνται σε προηγούμενες μελέτες (Rivadossi et al. 1999; Rivadossi et al. 2004). Επιπρόσθετα, απομονωμένα CP29 σύμπλοκα βρέθηκε να περιέχουν μόρια χλωροφύλλης με απορρόφηση στα 640nm (Giuffra et al. 1997).

Εκτός από τη συζήτηση που αφορά την προέλευση της κατάστασης υψηλού φθορισμού του PSII (γνωστή ως Fm, η μέγιστη τιμή φθορισμού στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι κλειστά) και της κατάστασης χαμηλού φθορισμού (Fm'), τα αποτελέσματα της ενότητας αυτής ανέδειξαν και άλλα σημαντικά στοιχεία με φυσιολογικές προεκτάσεις. Πρόκειται για τη προέλευση των σημαντικών διαγνωστικών παραμέτρων στις περιοχές των 518 και 520-535nm, που θα μπορούσαν να σχετίζονται με τις Chl a και b. Τα φάσματα διαφοράς των Chl a και b πριν και μετά τη μεταχείριση με τις ΠΑΣ ανέδειξαν μια αρνητική και μια θετική κορυφή στα 538 και 530nm αντίστοιχα (Εικόνα 46). Για την Chl a σημειώνεται και μια θετική κορυφή στα 520nm. Οι πειραματικές συνθήκες είναι με βάση τη διηλεκτρική σταθερά, αρκετά κοντά στο μικροπεριβάλλον του LHCIΙ *in vivo*. Η περιοχή αυτή είναι ένας καλά τεκμηριωμένος δείκτης των αλλαγών που προκαλούνται από την περίσσεια φωτός στο LHCIΙ και σχετίζονται με την ενεργοποίηση του μηχανισμού NPQ (Kramer and Sacksteder 1998; Thibodeau and Koningstein 1989; Livingston et al. 2010). Σύμφωνα με τα δεδομένα, ένας άλλος παράγοντας (εκτός των ξανθοφυλλών) της αύξησης του σήματος στα 535nm που

καταγράφεται *in vivo* κατά την ενεργοποίηση του NPQ θα μπορούσε να είναι είτε η εισαγωγή του Mg της Chl b στο επίπεδο του δακτυλίου είτε η μετατόπιση του Mg της Chl a έξω από αυτό. Η ενίσχυση του qE προκαλεί *in vivo*, εκτός από τη θετική κορυφή στα 520-535nm, τρεις ακόμα αρνητικές κορυφές στα 495, 468 και 438nm. Οι δύο τελευταίες πιθανόν οφείλονται σε αλλαγές της διαμόρφωσης των Chl b και a αντίστοιχα, όπως προκύπτει από τις αρνητικές κορυφές τους στα 473 και 438nm της Εικόνας 45. Τέλος, η περιοχή των 515-520nm, που αποτελεί *in vivo* δείκτη του ηλεκτρικού πεδίου κατά μήκος της μεμβράνης των θυλακοειδών (Witt 1979; Kramer et al. 1999), φαίνεται να είναι ευαίσθητη στην απομάκρυνση του Mg από τη Chl b (Εικόνα 47). Υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες η εκτόπιση του Mg από το δακτύλιο της Chl b, προκαλεί μία έντονη κορυφή στα 516,6nm (Pheo b – Chl b).



Τα πειράματά μας καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων πολυαμινών που κυμαίνεται από 10^{-9} έως 10^{-1} M. Στις μετρήσεις απορρόφησης χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις που έφταναν έως και τα 0,5M. Αυτές οι τιμές είναι συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες δόσεις υποκαταστατών που έχουν χρησιμοποιηθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες στο πεδίο της αξονικής πρόσδεσης των μεταλλοπορφυρινών [για παράδειγμα, οι Evans και Katz (1975) και οι Weitman et al. (2009) χρησιμοποίησαν 0,5 και 0,6M πυριδίνης αντίστοιχα]. Στα αιθανολικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν η μοριακή αναλογία ανάμεσα στη χρωστική και την ΠΑ ήταν χαμηλή (1:16600). Ωστόσο, στα πειράματα με το υδατοδιαλυτό ανάλογο της Chl, τη SCC, η δραστηριότητα των ΠΑς ήταν πολύ έντονη ακόμα και σε 1:1 μοριακές αναλογίες (Εικόνες 50 και 51) υποδεικνύοντας ότι *in vivo* (υδατικά διαλύματα) πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις θα ήταν εξίσου αποτελεσματικές. Οι τίτλοι των ΠΑς στα φυτά κυμαίνονται από μ M έως μερικά mM (Galston 2001). Στις μεμβράνες των

θυλακοειδών, οι ΠΑΣ σχηματίζουν διαβαθμίσεις και σε έντονο φωτισμό υψηλές συγκεντρώσεις εντοπίζονται στο μικροχώρο (Ioannidis et al. 2012). Σύμφωνα με *in vitro* δεδομένα, κατά την ακτινοβολήση η συγκέντρωση τους στο μικροχώρο μπορεί να φτάσει και τα 90mM όταν η συγκέντρωσή τους στο στρώμα είναι περίπου 2mM (Gaensslen and McCarty 1971). Επομένως, οι παρούσες πειραματικές συνθήκες (π.χ. 30μM Chl b και 100mM ΠΑ) μπορεί να μην απέχουν πολύ από τις συγκεντρώσεις των Chls και ΠΑΣ στις θυλακοειδείς μεμβράνες.

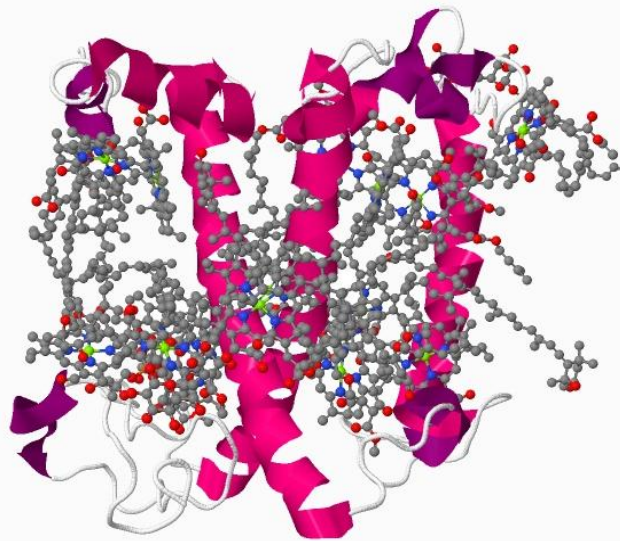
Αν και για την ώρα η *in vivo* σημασία των αποτελεσμάτων αυτής της ενότητας δεν είναι ξεκάθαρη, γίνονται αρκετές βασικές προβλέψεις που θα μπορούσαν να διερευνηθούν σε βάθος από τους επιστήμονες στο πεδίο. Οι Chls θα μπορούσαν να αλληλεπιδρούν με την πλαστιδιακή δεξαμενή των ΠΑΣ σε ένα ή περισσότερα στάδια, όπως πριν την πρόσδεσή τους στις πρωτεΐνες της κεραίας, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας συλλογής του φωτός ή κατά τη διάρκεια της αποδόμησης των συμπλόκων τους με τις πρωτεΐνες. Τα πιθανότερα σημεία της αλληλεπίδρασης είναι εντός της φωτοσυλλεκτικής κεραίας, καθώς οι ομοιοπολικά δεμένες ΠΑΣ σε συγκεκριμένα κατάλοιπα γλουταμινικού, θα μπορούσαν να προσφέρουν νέα ενεργά κέντρα κοντά στα μακρομόρια των Chls μέσω των πρωτοταγών ή δευτεροταγών αμινομάδων τους (Della Mea et al. 2004, Duca et al. 1994, Ioannidis et al. 2009). Επόμενα πειράματα θα απαντήσουν εαν ο μηχανισμός της αξονικής πρόσδεσης που περιλαμβάνει την αντιστρεπτή (μερική) εκτόπιση του μετάλλου, χρησιμοποιείται από τη φωτοσυνθετική μηχανή, έτσι ώστε οι ιδιότητες των Chls να ρυθμίζονται ραγδαία από τις ΠΑΣ ή άλλους υποκαταστάτες (όπως η His212 που προσδένει τη Chl11 στο LHClI). Αλλά ακόμη κι αν ένας τέτοιος μηχανισμός δε λειτουργεί στα σύγχρονα φωτοσυνθετικά συστήματα, εξακολουθεί να έχει βιολογική σημασία. Από εξελικτικής σκοπιάς, τέτοιου είδους Chl-ΠΑ αλληλεπιδράσεις θα είχαν τη σημασία τους για την προστασία των χρωστικών από οξειδωση λόγω υψηλής ακτινοβολίας, σε πρωτόγονες συνθήκες, όταν η κυτταρική μηχανή διέθετε λιγότερο εξελιγμένες πρωτεΐνες αλλά το ίδιο οπλοστάσιο ΠΑΣ με σήμερα.

Συνοψίζοντας, τα κυριότερα συμπεράσματα είναι τα εξής:

- Οι ΠΑΣ Put, Spd και Spm μέσω των αμινομάδων τους προσδένονται αξονικά στο Mg των χλωροφυλλών, όπως είναι γνωστό ότι κάνουν άλλοι πυρηνόφιλοι υποκαταστάτες.
- Η ισχύς της δράσης τους ακολουθεί τη σειρά Spm (τετραμίνη) > Spd (τριαμίνη) > Put (διαμίνη).
- Η αλλαγή της κατάστασης συναρμογής του Mg των Chl a και b από τις ΠΑΣ οδηγεί στη βαθυχρωμική μετατόπιση της Qx μετάβασης και στην εμφάνιση των κορυφών απορρόφησης στα 640 και 633nm αντίστοιχα. Επιπλέον, προκαλείται μια βαθυχρωμική μετατόπιση της Qy(0,0) της Chl b.
- Η αλληλεπίδραση της Chl b με τις μεγαλύτερες ΠΑΣ περιλαμβάνει εκτός από το κεντρικό Mg, τη φορμυλομάδα της στη θέση 3 του μορίου.
- Ο βαθμός πρωτονίωσης των ΠΑΣ είναι σημαντικός για την αλληλεπίδραση. Όταν είναι πλήρως αποπρωτονιωμένες, η αλληλεπίδραση δεν είναι εφικτή. Από την τιτλοδότηση της διαφοράς απορρόφησης και του φθορισμού της Qy(0,0) του συμπλόκου SCC:Spm προέκυψε ένα pK κοντά στο 8.5 που υποδηλώνει ένα σημαντικό ρόλο των ιμινομάδων της Spm στην αλληλεπίδραση.
- Η Spm, σε μικρομεσαίες συγκεντρώσεις, αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα του φθορισμού της Chl b στα 661nm και μετατοπίζει την κορυφή του φάσματος στα 667nm. Αμινικοί υποκαταστάτες όπως η Spm μπορούν να μετακινήσουν την ισορροπία της Chl b από μια διαμόρφωση διάχυσης της ενέργειας σε μια Pheo-like διαμόρφωση (μεγάλης εκπομπής φθορισμού) ή και το αντίθετο.

Κεφάλαιο 2

**Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και πιθανά κέντρα
απόσβεσης της ενέργειας στο LHCII από τις πολυαμίνες**



**Οι πολυαμίνες επάγουν τη συσσωμάτωση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας
του PSII και την απόσβεση του φθορισμού της.**

Στην εικόνα: Η τρισδιάστατη δομή ενός μονομερούς συμπλόκου του LHCII του σπανακιού όπως προέκυψε από κρυσταλλογραφική ανάλυση στα 2,72Å. Με ροζ χρώμα οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Με γκρι, μπλε, κόκκινο και πράσινο χρώμα τα άτομα άνθρακα, αζώτου, οξυγόνου και μαγνησίου των φωτοσυνθετικών χρωστικών αντίστοιχα. Πηγή: RCSB Protein Data Bank (pdb entry: 1RWT).

Κεφάλαιο 2

Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και πιθανά κέντρα απόσβεσης της ενέργειας στο LHCIΙ από τις πολυαμίνες

Εισαγωγή

Η φωτοσυλλεκτική κεραία του φωτοσυστήματος II (LHCII) των φυτών λειτουργεί όχι μόνο απορροφώντας και μεταφέροντας την ηλιακή ενέργεια στα κέντρα αντίδρασης του PSII, αλλά και προστατεύοντάς τα από την περίσσεια πίεση διέγερσης (excitation pressure). Υπό συνθήκες υψηλού φωτισμού, το LHCII διαχέει την επιπλέον φωτονιακή ενέργεια ακίνδυνα στο περιβάλλον ως θερμότητα, μέσω του μηχανισμού NPQ (Horton et al. 1994). Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει εστιαστεί στο συντελεστή qE του NPQ, που επάγεται αστραπιαία όταν αυξάνεται το ΔpH κατά μήκος της μεμβράνης των θυλακοειδών. Αν και ο ακριβής μοριακός μηχανισμός του qE παραμένει άγνωστος, η επικρατούσα θεωρία υποστηρίζει ότι το LHCII λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης αλλάζοντας την οργάνωση των χρωστικών στο εσωτερικό του (Horton et al. 2000; Pascal et al. 2005; Ruban et al. 2007; Ahn et al. 2008).

Οι κύριοι εμπλεκόμενοι στο qE παράγοντες είναι το χαμηλό pH του μικροχώρου (Briantais et al. 1979) και δύο ξανθοφύλλες που διεκδικούν το ρόλο του αποσβέστη. Η ζεαξανθίνη (Zx) που συντίθεται κάτω από αυτές τις συνθήκες μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών (Demmig-Adams 1990) και η λουτεΐνη (Lut). Εκτός από αυτούς, άλλοι εξωγενείς παράγοντες, όπως η παρουσία διβουκαΐνης, έχει διαπιστωθεί ότι ενεργοποιούν την απόσβεση της ενέργειας *in vivo* και *in vitro* (Laasch and Weis 1989; Noctor et al. 1991; Rees et al. 1992; Noctor et al. 1993; Ruban et al. 1994). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι στα μονομερή LHCb σύμπλοκα (CP29, CP26 και CP24), η προσθήκη διβουκαΐνης οδηγεί σε μεγαλύτερη απόσβεση του φθορισμού από ότι στο τριμερές LHCII σύμπλοκο (Lhcb1, Lhcb2 και Lhcb3) (Ruban et al. 1996). Ο τρόπος δράσης της διβουκαΐνης δεν είναι ξεκάθαρος. Η διβουκαΐνη, ένα τοπικό αναισθητικό, είναι μια τριτοταγής αμίνη που επάγει το qE στο σκοτάδι και φαίνεται να το κάνει προκαλώντας τη συσσωμάτωση των LHCII συμπλόκων (Ruban et al. 1994).

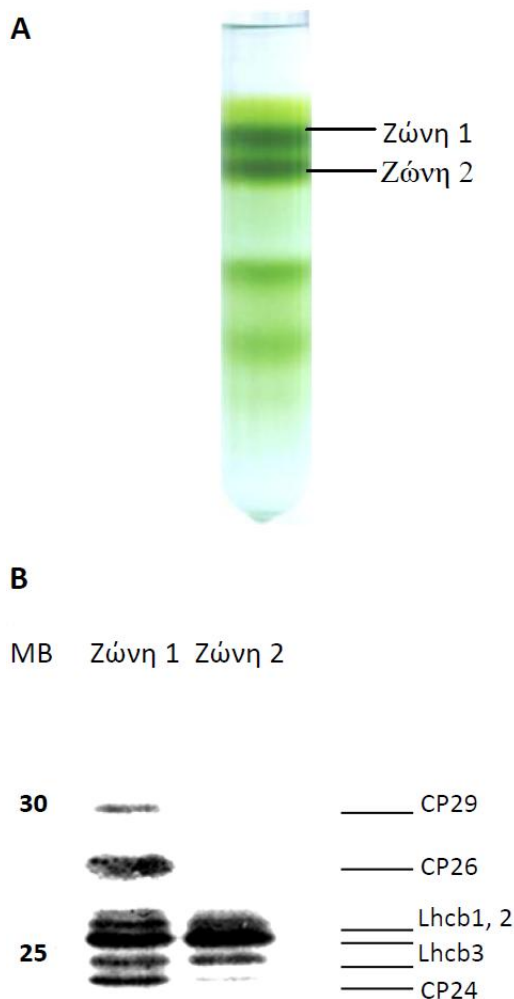
Η φύση θα μπορούσε λοιπόν να χρησιμοποιεί την ενδογενή ικανότητα του LHCIΙ να συσσωματώνεται και να αποσβένει αποτελεσματικά την περίσσεια ενέργεια χρησιμοποιώντας τις βιογενείς αμίνες, με τρόπο παρόμοιο με τη διβουκαΐνη. Είναι γνωστό ότι και οι τρεις κύριες ΠΑΣ εντοπίζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στο LHCIΙ (Navakoudis et al. 2007). Φυσιολογικά, η Spd βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία αλλά η Spm αποτελεί καλύτερο υπόστρωμα για τις τρανσγλουταμινάσες *in vitro* (Della Mea et al. 2004). Τα επίπεδά τους στα κύτταρα των φυτών κυμαίνονται από μM μέχρι κάποια mM . Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι κατά την ακτινοβόληση συσσωρεύονται στο μικροχώρο (Ioannidis et al. 2012) όπου έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση των αμινών μπορεί να φτάσει τα 90mM όταν η αντίστοιχη συγκέντρωσή τους στο στρώμα είναι περίπου 2mM (Gaensslen and McCarty 1971). Με τη διακοπή του ακτινικού φωτός το ΔpH μεταξύ στρώματος και μικροχώρου αναμένεται να ελαχιστοποιηθεί και οι ΠΑΣ να επιστρέψουν στο στρώμα. Το qE είναι αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης της μεμβράνης. Βέβαια, πρέπει κάποιος να έχει υπόψη του, ότι όλοι οι παράγοντες του στρώματος χάνονται κατά την απομόνωση των θυλακοειδών μεμβρανών και επομένως οι ενδογενείς ΠΑΣ δεν εντοπίζονται στα *in vitro* πειράματα. Για να μελετηθεί η επίδρασή τους πρέπει να προστεθούν εξωγενώς. Αυτό έγινε στα πειράματα του κεφαλαίου αυτού σε μια προσπάθεια να αποκατασταθεί (όσο είναι δυνατόν) το φυσιολογικό περιβάλλον της κεραίας.

Το κεφάλαιο αυτό εστιάζει περισσότερο στον μηχανισμό qE μελετώντας τις αλληλεπιδράσεις του προηγούμενου κεφαλαίου όταν οι Chls βρίσκονται στο φυσικό τους περιβάλλον, προσδεδεδεμένες στις πρωτεΐνες της κεραίας. Απομονώνοντας και χρησιμοποιώντας λειτουργικό LHCIΙ από σπανάκι, τα ερωτήματα που τέθηκαν προς απάντηση ήταν αν οι ΠΑΣ αποσβένουν την ενέργεια των τριμερών και μονομερών συμπλόκων της κεραίας των ανώτερων φυτών *in vitro* και αν υπάρχουν ενδείξεις για συσσωμάτωσή τους. Με τις ίδιες φασματοσκοπικές τεχνικές (απορρόφηση, φθορισμού και Raman) μελετήθηκε σε δύο τιμές pH, που προσομοιάζουν τις *in vivo* συνθήκες, ο σχηματισμός της διαμόρφωσης του LHCIΙ που οδηγεί στη διάχυση της ενέργειας. Η προκαλούμενη αλλαγή του pH κατά τη διάρκεια μετρήσεων στο χρόνο, ποσοτικοποίησε το φαινόμενο και επέτρεψε την άμεση σύγκριση με τα δημοσιευμένα για τη διβουκαΐνη δεδομένα. Επιπλέον, ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία μελετήθηκε η επίδραση των ξανθοφυλλών στην *in vitro* απόσβεση του φθορισμού της ενέργειας.

Αποτελέσματα

1. Χαρακτηρισμός απομονωμένων συμπλόκων της φωτοσυλλεκτικής κεραίας

Για τον διαχωρισμό του LHCII από τα κέντρα αντίδρασης και την απομόνωσή του, αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από σπανάκι οι οποίες στη

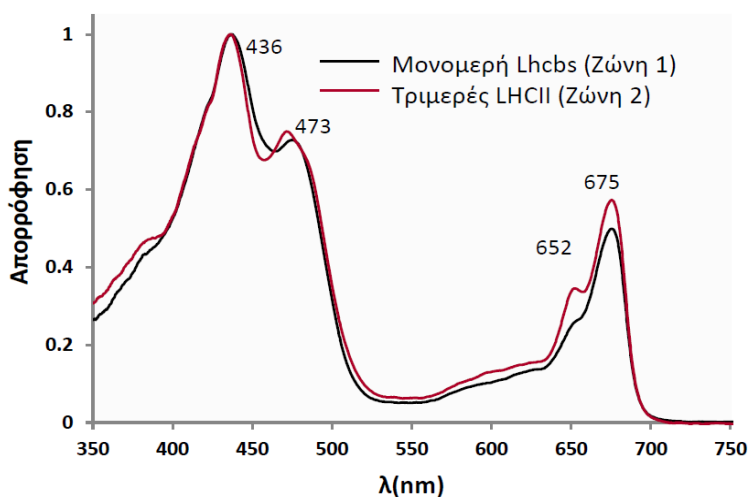


Εικόνα 58. Α. Προφίλ διαβάθμισης συγκέντρωσης σακχαρόζης διαλυτοποιημένων θυλακοειδών μεμβρανών. Από κάθε σωλήνα συλλέχθηκαν τα δύο κλάσματα που σημαίνονται στην Εικόνα (Ζώνες 1 και 2). Β. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) των ζωνών 1 και 2. Αναγράφεται η ταυτότητα κάθε μπάντας Coomassie σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (βλέπε αναφορές κειμένου).

συνέχεια διαλυτοποιήθηκαν με 0,6% dodecyl- β -D-maltoside (β -DM), φορτώθηκαν σε συνεχή κλίση σακχαρόζης (5 έως 22 %) και υπερφυγοκεντρήθηκαν για 19 h στα 210.000g. Οι δύο ανώτερες πράσινες ζώνες που προέκυψαν από τη διαβάθμιση και αντιστοιχούν στα μονομερή και τριμερή σύμπλοκα της κεραίας συλλέχθηκαν και έγινε η ταυτοποίησή τους (Εικόνα 58Α). Η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση έδειξε, σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες (Havaux et al. 2004; Avenson et al. 2008; de Bianchi et al. 2008; Caffarri et al. 2009; Xiaowei et al. 2011), ότι η πρώτη ζώνη περιείχε τις LHCb πρωτεΐνες CP29, CP26 και CP24 καθώς και μονομερείς πρωτεΐνες του LHCII ενώ η δεύτερη ζώνη περιείχε τα τριμερή LHCII σύμπλοκα (Εικόνα 58Β).

Τα φάσματα απορρόφησης σε θερμοκρασία δωματίου των συμπλόκων της κεραίας παρουσίασαν μέγιστα στα 436 και 675nm (Chl a) και στα 473 και 652nm (Chl b) καθώς και κάποιους ώμους κοντά στην μπλε περιοχή του φάσματος, που προήλθαν από τις ξανθοφύλλες (Εικόνα 59). Ο λόγος Chl a/ Chl b ήταν κοντά στο 1,5, υποδεικνύοντας ότι κάθε μονομερές

φέρει περίπου 8 Chl a και 5 Chl b.



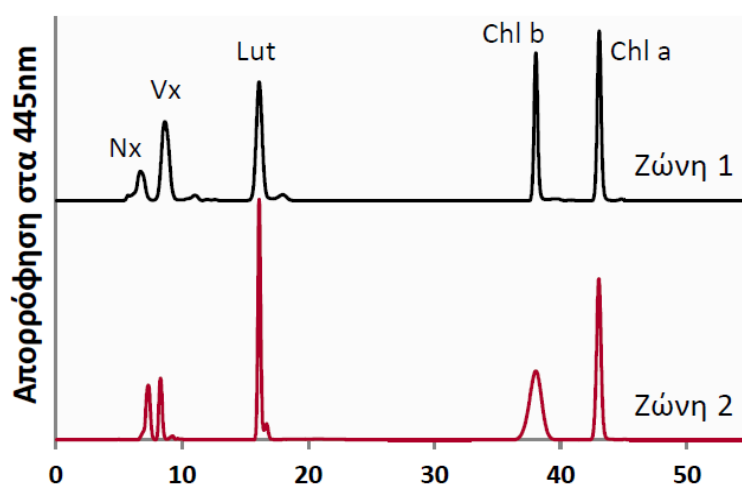
Εικόνα 59. Φάσματα απορρόφησης των κλασμάτων 1 και 2 που αντιστοιχούν στα μονομερή Lhcb σύμπλοκα της κεραίας και τα τριμερή LHCII αντίστοιχα. Τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση το μέγιστο στα 435 nm.

«Μέθοδοι και υλικά», σχετική ενότητα). Στον Πίνακα 9 δίνεται πως κάθε μονομερές του τριμερούς LHC II απαρτίζεται από 13 Chls, περίπου 2 (1,92) λουτεΐνες (Lut), περίπου 1 (0,76) νεοξανθίνη (Nx) και περίπου 1 (0,65) βιολαξανθίνη (Vx). Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες προκύπτει ότι κάθε μονομερές του τριμερούς LHCII φέρει 13 Chls (Caffarri et al. 2001), που είναι μια καλή εκτίμηση σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Με την υπόθεση ότι 13 περίπου Chls

προσδένονται και στις αποπρωτεΐνες των μονομερών συμπλόκων της κεραίας (LHCII, CP29, CP26 και CP24) δίνεται στον Πίνακα 9 το προφίλ των χρωστικών της ζώνης 1. Η παραδοχή αυτή, δεν αποτελεί μια ακριβή εκτίμηση του πραγματικού περιεχομένου της ζώνης 1 σε χρωστικές, αλλά επιτρέπει την άμεση σύγκριση

με τα τριμερή LHCII σύμπλοκα της ζώνης 2. Ως εναλλακτικό τρόπο παρουσίασης των ίδιων αποτελεσμάτων, παρέχεται σε παρένθεση η σύσταση των χρωστικών ανά 100 Chls. Η σχετικά υψηλή περιεκτικότητα της ζώνης 1 σε καροτενοειδή, σε σχέση με τη φυσιολογικά

Επιπλέον HPLC ανάλυση ανέδειξε το σύνολο των χρωστικών που εντοπίζεται στις δύο ζώνες (Εικόνα 60). Η ποσοτικοποίηση των κορυφών των χρωματογραφημάτων έγινε από τη σύγκριση πρότυπων καμπυλών που κατασκευάστηκαν από τα χρωματογραφήματα διαφορετικών συγκεντρώσεων απομονωμένων χρωστικών (βλέπε



Εικόνα 60. Χρωματογραφήματα των χρωστικών των δύο κλασμάτων με HPLC ανάλυση. Οι χρωστικές ταυτοποιήθηκαν με βάση το φάσμα απορρόφησης τους και το χρόνο έκλουσης.

αναμενόμενη, οφείλεται μάλλον στην απώλεια μεγάλου ποσοστού των προσδεμένων Chls (περίπου 30%) κατά την απομόνωση.

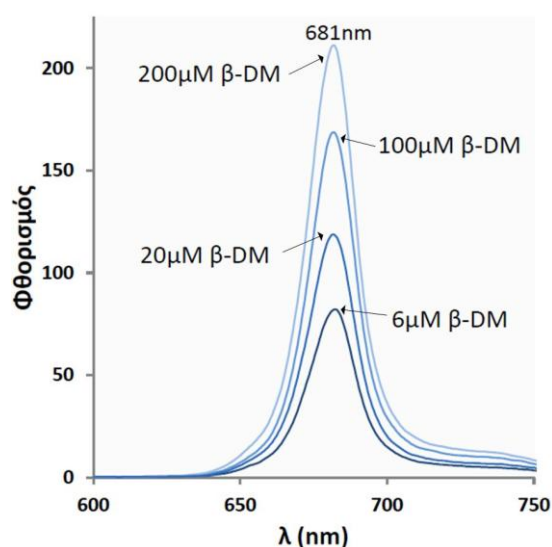
Πίνακας 9. Στοιχειομετρία χρωστικών/πρωτεϊνών των LHCb συμπλόκων των ζωνών 1 και 2. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στην περιεκτικότητα σε χρωστικές ανά μονομερές αφού έχει γίνει κανονικοποίηση για 13 Chls και 100 Chl a + b (αριθμοί στην παρένθεση). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος δύο μετρήσεων δύο διαφορετικών δειγμάτων.

	Nx/μονομερές	Vx/μονομερές	Lut/μονομερές	Chl/μονομερές
Μονομερή LHCbs	0,90 ± 0,04	2,11 ± 0,18	2,53 ± 0,04	13
	(6,93)	(16,23)	(19,50)	(100)
Τριμερή LHCII	0,76 ± 0,04	0,65 ± 0,14	1,92 ± 0,05	13
	(5,84)	(5,00)	(14,74)	(100)

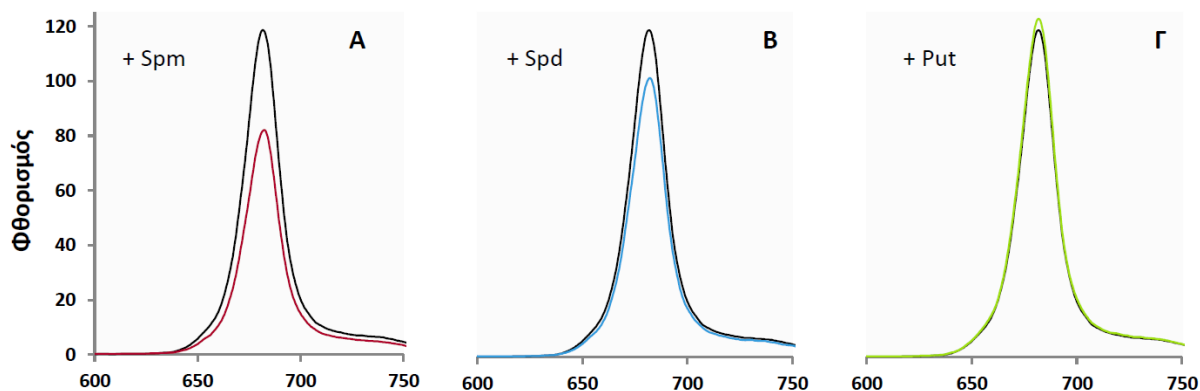
2. Επίδραση ΠΑΣ στις φασματοσκοπικές ιδιότητες του LHCII

Γνωρίζοντας ότι η συσσωμάτωση του LHCII δεν μπορεί να επιτευχθεί σε συγκεντρώσεις β -DM πάνω από μια κρίσιμη συγκέντρωση που δημιουργεί μικήλια (critical micelle concentration, cmc), τα αρχικά διαλύματα αραιώθηκαν σε τελικές συγκεντρώσεις β -DM κάτω των 160 μ M (Ruban et al. 1994). Σε sub-cmc συγκεντρώσεις το LHCII βρίσκεται ήδη με τη μορφή μικρών συσσωματωμάτων (Ide et al. 1987; Horton et al. 1994), ενώ προσθήκη άλατος έχει βρεθεί πως επάγει το σχηματισμό μεγαλύτερων (Ruban et al. 1996; Kirchhoff et al. 2003). Ο βαθμός διαλυτοποίησης του LHCII είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που εξετάστηκε εκτενώς στα πειράματα φθορισμού. Σε συγκεντρώσεις απορρυπαντικού κοντά στα 100 μ M ο φθορισμός των συμπλόκων ήταν μεν σε ικανοποιητικά επίπεδα (Εικόνα 61) αλλά η επίδραση δισθενών κατιόντων, πολυκατιόντων (ΠΑΣ) και υδρογονοκατιόντων ήταν αδύναμη.

Όσο χαμηλότερη η συγκέντρωση του απορρυπαντικού, τόσο ισχυρότερη η επίδρασή τους. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν για τα πειράματα φθορισμού συγκεντρώσεις β -DM κάτω των 20 μ M. Τα 20 μ M είναι η κατώτερη δυνατή συγκέντρωση αραιώσεως των αρχικών διαλυμάτων των συμπλόκων για τις μετρήσεις απορρόφησης.



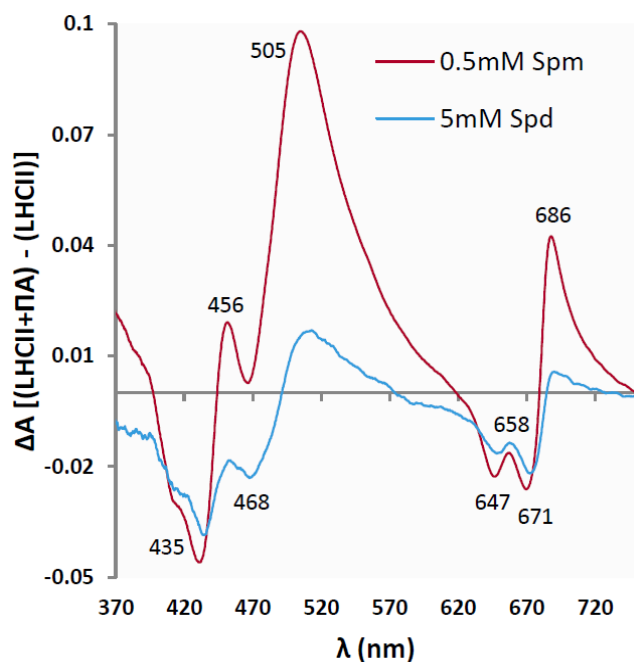
Εικόνα 61. Ο φθορισμός της χλωροφύλλης στα 681nm όταν τα τριμερή LHCII σύμπλοκα σχηματίζουν μικήλια στα 200 μ M β -DM και μικρά ή μεγάλα συσσωματώματα στα 100 μ M, 20 μ M και 6 μ M β -DM.



Εικόνα 62. Η επίδραση 250 μ M Spm (A), Spd (B) και Put (Γ) στην εκπομπή φθορισμού του τριμερούς LHCII σε διάλυμα 20 μ M β -DM και pH 7.5. Η συγκέντρωση της Chl ήταν 0,1 μ M, το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 440nm, το παράθυρο διέγερσης 15nm και το παράθυρο εκπομπής 5nm.

Στις μετρήσεις φθορισμού της ενότητας αυτής, η συγκέντρωση του απορρυπαντικού διαμορφώθηκε στα 20 μ M όπου τα επίπεδα του φθορισμού του LHCII στα 681nm είναι κατά 45% περίπου μειωμένα από αυτά της πλήρους διαλυτοποίησης του συμπλόκου στα 200 μ M β -DM (Εικόνα 61).

Φασματοσκοπική μελέτη των τριμερών LHCII συμπλόκων της κεραίας πραγματοποιήθηκε παρουσία των τριών διαφορετικών ΠΑς. Στην Εικόνα 62 παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού των μεταχειρίσεων με 250 μ M ΠΑς. Η Spm και η Spd φαίνεται να επιδρούν στην εκπομπή φθορισμού προκαλώντας την μείωσή της κατά 32% και 15% αντίστοιχα (Εικόνα 62A,B). Αντίθετα, κάτω από αυτές τις πειραματικές συνθήκες, η Put

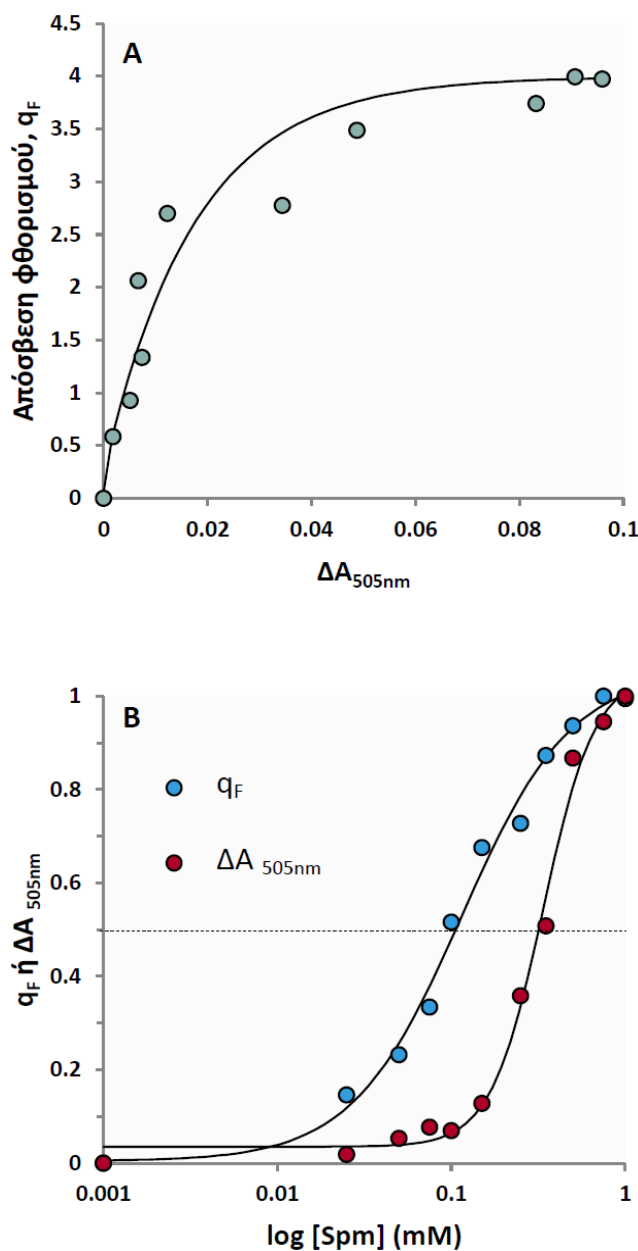


Εικόνα 63. Φάσματα διαφοράς του τριμερούς LHCII με και χωρίς μεταχείριση με 0,5mM Spm και 5mM Spd. Η διαλυτοποίηση των δειγμάτων ήταν σε 20 μ M β -DM (pH 7.5) σε τελική συγκέντρωση χλωροφύλλης 4,5 μ M.

δε φαίνεται να έχει κάποια επίδραση (Εικόνα 62Γ).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 63, η τετραμίνη Spm επάγει αλλαγές στις φασματοσκοπικές ιδιότητες του συμπλόκου, ως αποτέλεσμα της συσσωμάτωσής του. Χαρακτηριστικά του γεγονότος αυτού είναι η παρατηρούμενη αύξηση της απορρόφησης γύρω στα 505 και 686 nm και τα ελάχιστα απορρόφησης του φάσματος διαφοράς της μεταχείρισης με τη Spm από το μάρτυρα, στα 430 και 470nm περίπου (Ruban and Horton 1992;

Ruban et al. 1994; Kirchhoff et al. 2003). Η τριαμίνη Spm προκάλεσε τις ίδιες αλλαγές μόνο όταν η συγκέντρωσή της αυξήθηκε κατά 10 φορές σε σχέση με τη Spm, ενώ η διαμίνη Put και η μονοαμίνη προπυλαμίνη δεν έδωσαν αντίστοιχα αποτελέσματα ακόμα και σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις.



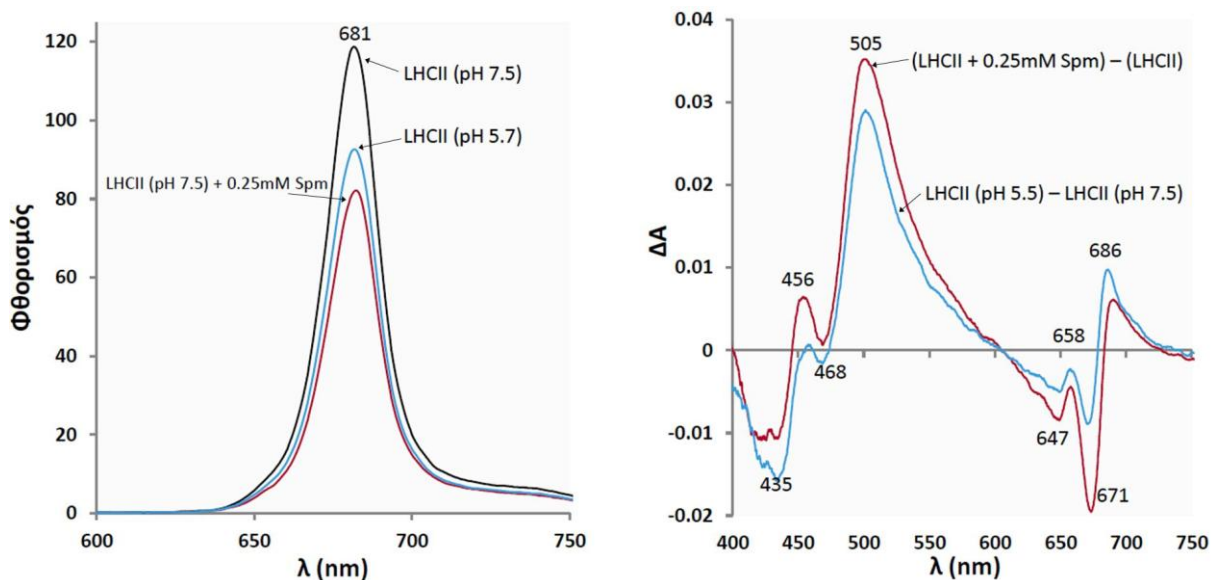
Εικόνα 64. Α. Η σχέση της αύξησης της απορρόφησης στα 505nm (ΔA_{505nm}) και της απόσβεσης του φθορισμού (q_F) του τριμερούς LHCII με τιτλοδότηση με Spm. Β. Η απόσβεση του φθορισμού και οι αλλαγές στην απορρόφηση γύρω στα 505 nm ως προς τη συγκέντρωση της Spm. Οι τιμές του ψ άξονα έχουν κανονικοποιηθεί. Η διαλυτοποίηση των δειγμάτων ήταν σε 14mM HEPES (pH 7.5) και 20μM β-DM ενώ η πλήρης διαλυτοποίησή τους έγινε σε 200μM DM. Η απόσβεση του φθορισμού υπολογίστηκε από τον τύπο $(F_m - F)/F$, όπου F_m η ένταση του φθορισμού στα 20 μM DM (pH 7.5) και F η ένταση του φθορισμού μετά την απόσβεση.

Μελετώντας την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων Spm (dose response) στην απόσβεση του φθορισμού στα 681 nm (q_F) και στο ΔA_{505nm} παρατηρήθηκε ότι η σχέση τους είναι αρχικά γραμμική αλλά επέρχεται κορεσμός σε υψηλές συγκεντρώσεις Spm (Εικόνα 64A). Αυτό ενδεχομένως οφείλεται αφενός σε φαινόμενα διάθλασης του φωτός (scattering effect) από το σχηματισμό μεγάλων συσσωματωμάτων και αφετέρου σε διαφορές στην απορρόφηση λόγω της αλλαγής της στερεοδιαμόρφωσης του LHCII. Τη σχέση αυτήν κατανοούμε καλύτερα στην Εικόνα 64B όπου φαίνεται ότι η απόσβεση του φθορισμού εμφανίζει μικρότερο transition midpoint (~100μM Spm) από αυτό της αλλαγής της απορρόφησης (~350μM Spm). Έτσι, και σύμφωνα με τους Kirchhoff et al. (2003) δύο διακριτά φαινόμενα προκύπτει ότι

λαμβάνουν χώρα κατά την προσθήκη Spm, αρχικά σαρώνεται η αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια του LHCII από τα θετικά φορτισμένα μόρια Spm (Spm^{4+}) και στη συνέχεια σχηματίζονται μεγαλύτερα συσσωματώματα.

3. Επίδραση πρωτονίων (H^+) στις φασματοσκοπικές ιδιότητες του LHCII

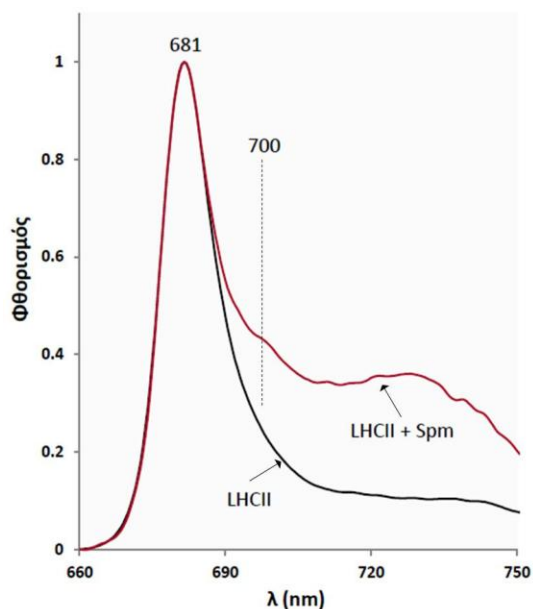
Έχει ήδη προταθεί ότι το χαμηλό pH που ευθύνεται για την ενεργοποίηση του qE στις μεμβράνες των θυλακοειδών, μπορεί να μιμηθεί παρόμοια φαινόμενα *in vitro*. Τα υδρογονοκατιόντα επάγουν τη συσσωμάτωση των απομονωμένων φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων προκαλώντας την απόσβεση του φθορισμού τους (Ruban et al. 1994). Αυτό επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής. Στην Εικόνα 65Α η προσθήκη οξέος στο διάλυμα του LHCII προκάλεσε τη μεταβολή του pH σε όξινες τιμές που είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του φθορισμού του συμπλόκου στα 681nm κατά 25% περίπου. Η μείωση αυτή είναι μικρότερη από αυτή που προκαλεί η προσθήκη 250μM Spm. Αντίστοιχα, η είσοδος των πρωτονίων στο διάλυμα προκάλεσαν αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης του LHCII που έδωσε τις ίδιες θετικές και αρνητικές κορυφές με το φάσμα διαφοράς απορρόφησης της μεταχείρισης με Spm (Εικόνα 65B). Τα παραπάνω δείχνουν ότι οι μεγαλύτερες πολυαμίνες λειτουργούν σαν δότες πρωτονίων στο LHCII αντικαθιστώντας εν μέρει ή πλήρως την υψηλή περιεκτικότητα πρωτονίων του οξέος οδηγώντας σε απόσβεση του φθορισμού που προκαλείται από τη συσσωμάτωση των συμπλόκων της κεραίας (aggregation quenching).



Εικόνα 65. Α. Φάσματα εκπομπής φθορισμού του τριμερούς LHCII σε 20μM β-DM και pH 7.5, πριν (μαύρη γραμμή) και μετά την προσθήκη μικρής ποσότητας HCl που ρίχνει το pH στο 5.7 (μπλε γραμμή) και 250μM Spm (κόκκινη γραμμή). Η συγκέντρωση της Chl ήταν 0,1μM, το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 440nm, το παράθυρο διέγερσης 15nm και το παράθυρο εκπομπής 5nm. Β. Φάσματα διαφοράς των μεταχειρίσεων του LHCII με HCl (μπλε γραμμή) και 250μM Spm (κόκκινη γραμμή). Η διαλυτοποίηση των δειγμάτων ήταν σε 20μM β-DM σε τελική συγκέντρωση χλωροφύλλης 4,5 μM.

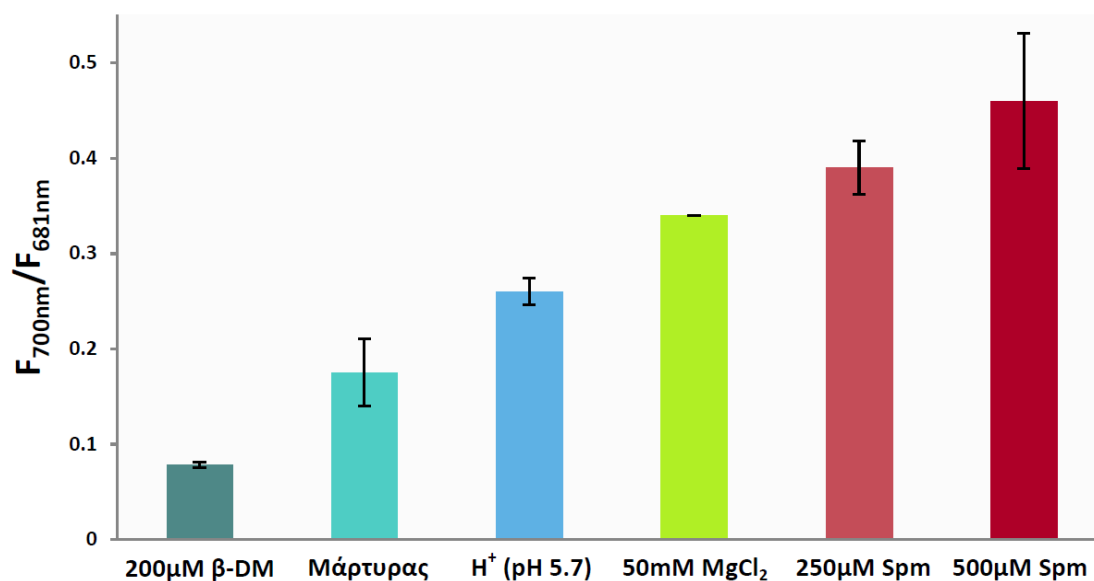
4. Φθορισμός στα 77K κατά τη συσσωμάτωση του LHCII

Εκτός από το χαρακτηριστικό φάσμα διαφοράς απορρόφησης (με τις θετικές κορυφές στα 505 και 686nm και τις αρνητικές κορυφές κοντά στα 430 και 470nm) και την απόσβεση



Εικόνα 66. Φάσματα φθορισμού σε θερμοκρασία 77K του LHCII πριν και μετά τη μεταχείριση με 250μM Spm. Τα φάσματα έχουν κανονικοποιηθεί στα 681nm. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 430nm το παράθυρο διέγερσης 15nm και το παράθυρο εκπομπής 2,5nm.

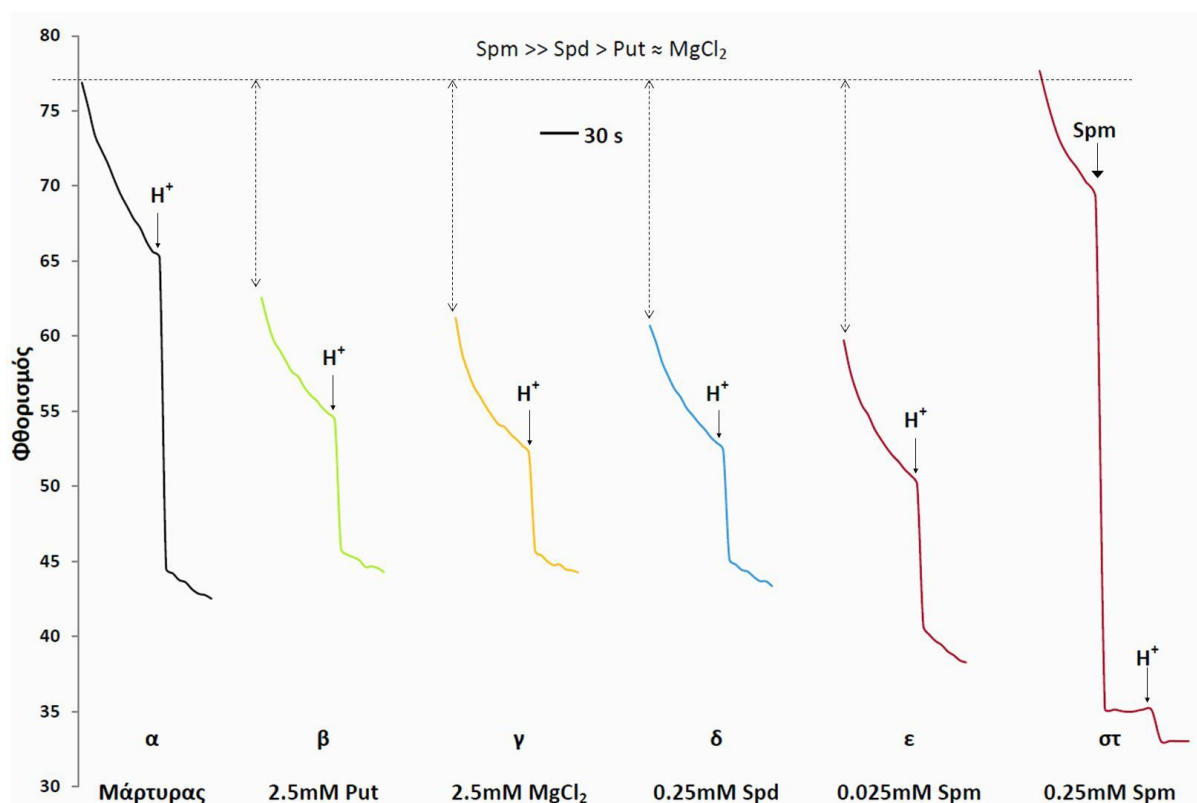
απορρυπαντικού από τα 200μM στα 20μM (μάρτυρας) οδήγησε στην αύξηση του λόγου από 0,08 σε 0,175 (Εικόνα 67). Όταν στο μάρτυρα προστέθηκαν πρωτόνια (pH 5,7), 50mM MgCl₂ και 500μM Spm ο λόγος αυξήθηκε στο 0,26, 0,34 και 0,46 αντίστοιχα (Εικόνα 67).



Εικόνα 67. Ο λόγος του φθορισμού στα 700nm προς το φθορισμό στα 681nm του LHCII στα 77K σε διάφορες μεταχειρίσεις. Ο μάρτυρας αντιστοιχεί σε διάλυμα 14mM HEPES pH 7,5 περιεκτικότητας 20μM β-DM. Οι τιμές και οι κατακόρυφες γραμμές σφάλματος προήλθαν από 2-3 επαναλήψεις διαφορετικών δειγμάτων.

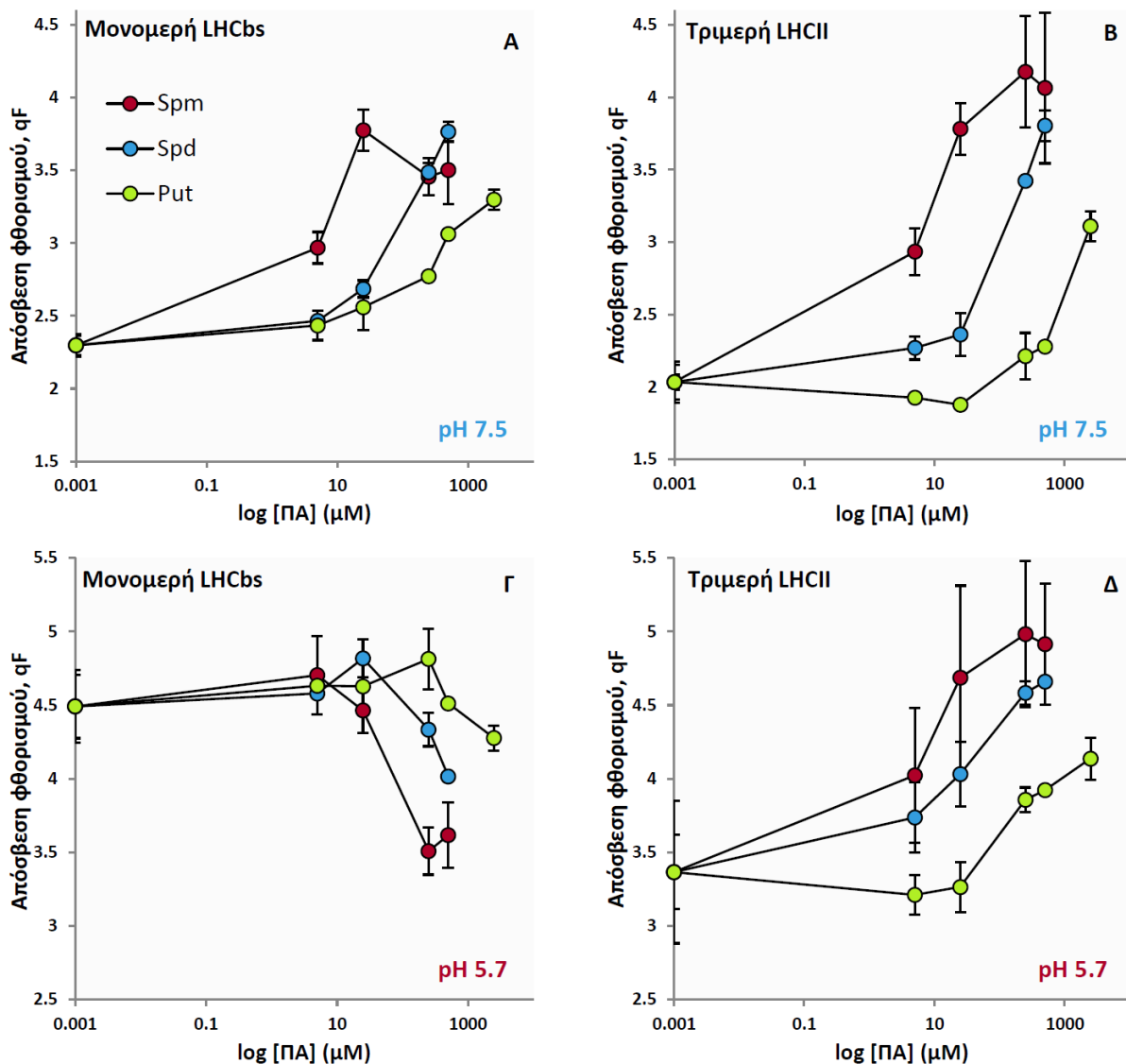
5. Επίδραση ΠΑΣ στο φθορισμό των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας σε διαφορετικά pH

Η Εικόνα 68 δείχνει την προκαλούμενη από τις ΠΑΣ απόσβεση του φθορισμού των τριμερών LHCII πριν και μετά την οξίνιση του διαλύματος με μικρή ποσότητα HCl. Πρόκειται για μετρήσεις φθορισμού στο χρόνο. Στα 0sec προστέθηκε σε διάλυμα χαμηλής περιεκτικότητας σε απορρυπαντικό (6μM β-DM) και με pH 7,5 το LHCII (αρχικά διαλυτοποιημένο σε 200μM β-DM) απουσία ή παρουσία ΠΑΣ και άλλων κατιόντων. Η διαλυτοποίηση στα 6μM β-DM, που επιλέχτηκε στα πειράματα της ενότητας αυτής για την άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά της διβουκαΐνης, είχε ως αποτέλεσμα την αυθόρμητη απόσβεση του φθορισμού των συμπλόκων, που ήταν μεγαλύτερη παρουσία ΠΑΣ (Εικόνα 68, διπλά, κάθετα βέλη). Η παρουσία στο διάλυμα του LHCII, 25μM Spm, προκάλεσε μία σημαντική μείωση του φθορισμού σε pH 7,5 (Εικόνα 68ε). Αντίστοιχη μείωση παρατηρήθηκε μόνο όταν χρησιμοποιήθηκε 10 φορές υψηλότερη συγκέντρωση Spd



Εικόνα 68. Απόσβεση του φθορισμού στα τριμερή LHCII κατά τη διαλυτοποίηση σε 14 mM HEPES (pH 7,5), 6 μM DM, χωρίς (α) και με προσθήκη 2,5mM Put (β), 2,5mM MgCl₂ (γ), 0,25mM Spd (δ) και 0,025mM Spm (ε). Στ. 0,25mM Spm προστέθηκαν πριν την οξίνιση (παχύ βέλος). Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν την προσθήκη HCl που αλλάζει το pH του διαλύματος από 7,5 σε 5,7. Τα διπλά βέλη αντιστοιχούν στην απόσβεση του φθορισμού που προκαλείται από τα αντιδραστήρια σε pH 7,5. Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 440 nm και η εκπομπή του φθορισμού καταγράφηκε στα 681 nm. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν 0,1μM.

(Εικόνα 68δ) και 100 φορές υψηλότερη συγκέντρωση Put και $MgCl_2$ (Εικόνα 68β και γ). Στα 60sec προστέθηκαν πρωτόνια (H^+), όπως υποδηλώνεται με τα κάθετα βέλη. Η αλλαγή του pH από το 7,5 στο 5,7 από την προσθήκη οξέος προσομοιάζει τη δημιουργία του ΔpH στις *in vivo* συνθήκες. Η προσθήκη οξέος προκάλεσε μια περαιτέρω απόσβεση του φθορισμού του LHCII της τάξης του 30%. (Εικόνα 68α). Όπως φαίνεται στο διάγραμμα στ της Εικόνας 68, τα 250 μM Sprm, ήταν ικανά να μιμηθούν πλήρως την επίδραση του pH. Η προσθήκη Sprm πριν (25 μM Sprm, Εικόνα 68ε) ή μετά (250 μM Sprm, Εικόνα 68στ) την είσοδο του LHCII στο διάλυμα προκάλεσε μία 10% επιπλέον μείωση του φθορισμού με την οξίνιση.



Εικόνα 69. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Sprm (κόκκινο) Spd (μπλε) και Put (πράσινο) στο φθορισμό των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της φωτοσυλλεκτικής κεραίας σε pH 7,5 (πάνω) και pH 5,7 (κάτω). Η διαλυτοποίηση των συμπλόκων έγινε σε διάλυμα 14mM Hesperes που περιείχε 6 μM β -DM σε τελική συγκέντρωση Chl 0,1 μM . Τα δείγματα διεγέρθηκαν στα 440nm. Η απόσβεση qF υπολογίστηκε από τον τύπο $qF = (F_{max} - F) / F$, όπου F_{max} ο φθορισμός στα 681nm του πλήρως διαλυτοποιημένου συμπλόκου στα 200 μM β -DM και F η μέγιστη τιμή του φθορισμού τους κατά τη διαλυτοποίηση στα 6 μM β -DM απουσία ή παρουσία ΠΑς. Οι τιμές και οι κατακόρυφες γραμμές σφάλματος προήλθαν από 3-6 επαναλήψεις διαφορετικών δειγμάτων.

Ο τρόπος δράσης των ΠΑΣ στο φθορισμό των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας στα 6μM β-DM σε pH 7,5 φαίνεται να είναι κοινός, αν και τα μονομερή LHCbs φτάνουν σε κορεσμό σε μικρότερες συγκεντρώσεις Spm (Εικόνα 69A,B). Όλες οι κύριες ΠΑΣ προκάλεσαν απόσβεση του φθορισμού (qF) των συμπλόκων στα 681nm, με τη Spm να αναδεικνύεται ως ο ισχυρότερος αποσβέστης. Το μέγεθος της απόσβεσης ακολουθεί τη σειρά Spm > Spd >> Put. Η απόσβεση των μονομερών LHCbs και των τριμερών LHCII από την οξίνιση (pH 5,7), απουσία ΠΑΣ, είναι 4,49 και 3,36 αντίστοιχα (Εικόνα 69Γ,Δ). Η απόσβεση που προκάλεσαν οι ΠΑΣ σε pH 7,5 στα μονομερή σύμπλοκα φτάνει, αλλά δεν ξεπερνά τα επίπεδα της απόσβεσης από την οξίνιση (Εικόνα 69A, $qF_{\max}=3,75$ για 25μM Spm). Αντίθετα, στα τριμερή σύμπλοκα, με εξαίρεση την Put, οι δύο μεγαλύτερες ΠΑΣ αποδείχθηκαν

Πίνακας 10. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Spm, Spd και Put στο φθορισμό των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της φωτοσυλλεκτικής κεραίας σε pH 7,5, 5,7 και 5. Η διαλυτοποίηση των συμπλόκων έγινε σε διάλυμα 14mM HEPES που περιείχε 6μM β-DM σε τελική συγκέντρωση Chl 0,1μM. Τα δείγματα διεγέρθηκαν στα 440nm. Η απόσβεση qF υπολογίστηκε από τον τύπο $qF=(F_{\max}-F)/F$, όπου F_{\max} ο φθορισμός στα 681nm του πλήρως διαλυτοποιημένου συμπλόκου στα 200μM β-DM και F η μέγιστη τιμή του φθορισμού τους κατά τη διαλυτοποίηση στα 6μM β-DM απουσία ή παρουσία ΠΑΣ. Οι τιμές και τα ± σφάλματα προήλθαν από 3-6 επαναλήψεις διαφορετικών δειγμάτων.

Μεταχείριση	Απόσβεση φθορισμού $qF=[(F_{\max}-F)/F]$		
	Μονομερή LHCbs	Τριμερή LHCII	
pH 7.5	Μάρτυρας	2.35 ± 0.21	2.03 ± 0.23
	5μM Spm	2.95 ± 0.29	2.94 ± 0.36
	25μM Spm	3.75 ± 0.38	3.78 ± 0.44
	250μM Spm	3.48 ± 0.35	4.20 ± 0.85
	25μM Spd	2.86 ± 0.33	2.36 ± 0.25
	250μM Spd	3.59 ± 0.25	3.42 ± 0.21
	250μM Put	2.83 ± 0.14	2.21 ± 0.23
	2.5mM Put	3.30 ± 0.12	3.11 ± 0.15
pH 5.7	Μάρτυρας	4.49 ± 0.43	3.36 ± 0.35
	5μM Spm	4.70 ± 0.59	4.02 ± 0.91
	25μM Spm	4.46 ± 0.34	4.69 ± 0.97
	250μM Spm	3.51 ± 0.36	4.98 ± 0.99
	25μM Spd	4.82 ± 0.22	4.03 ± 0.31
	250μM Spd	4.33 ± 0.20	4.58 ± 0.12
	250μM Put	4.81 ± 0.36	3.86 ± 0.12
	2.5mM Put	4.28 ± 0.15	4.14 ± 0.20
~ pH 5	Μάρτυρας	7.05 ± 1.96	5.21 ± 0.38
	5μM Spm	6.80 ± 1.43	4.67 ± 0.04
	25μM Spm	5.07 ± 1.17	4.29 ± 0.10
	250μM Spm	3.87 ± 0.21	4.20 ± 0.01

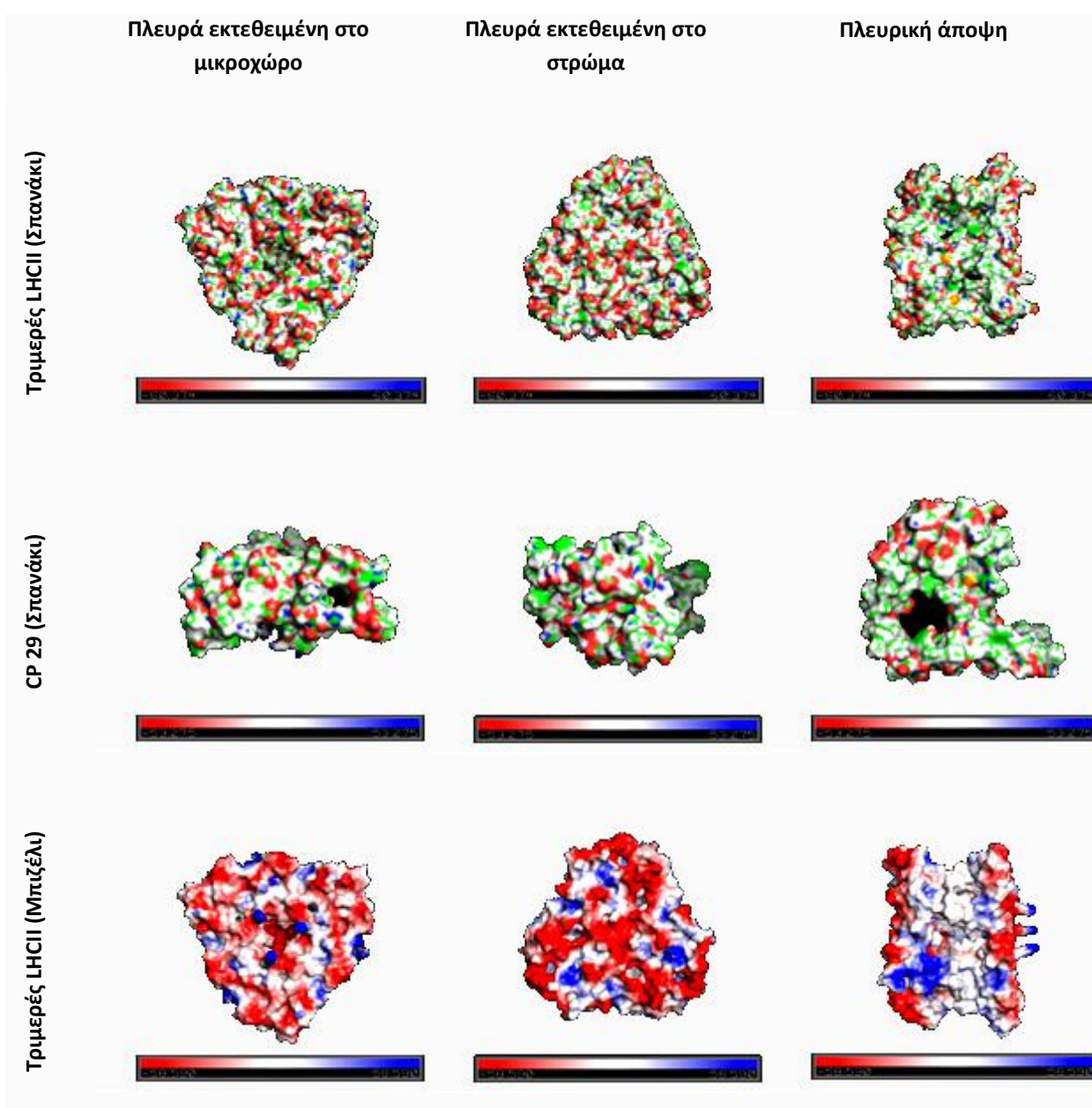
αποτελεσματικότεροι αποσβέστες από τα πρωτόνια (Εικόνα 69B, $qF_{\max}=4,20$ για 250μM Spm). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση των ΠΑΣ σε όξινα pH όπου ενώ συνεχίζουν να αυξάνουν την απόσβεση του φθορισμού των τριμερών συμπλόκων, αντιστρέφουν τη δράση τους στα μονομερή σύμπλοκα μειώνοντας την συνολική απόσβεση του φθορισμού τους (Εικόνα 69Γ,Δ). Στον Πίνακα 10 παρατίθενται ενδεικτικές τιμές qF που αφορούν όλες τις μεταχειρίσεις με ΠΑΣ των μονομερών και τριμερών συμπλόκων για τις παραπάνω τιμές pH. Επιπλέον, συμπληρώνεται με τις τιμές qF των μεταχειρίσεων με Spm σε pH 5, όπου φαίνεται πως όσο

μεταβαίνουμε σε ακόμη πιο όξινες τιμές pH, η επίδραση αντιστρέφεται τόσο στα μονομερή όσο και στα τριμερή σύμπλοκα, με τα πρώτα να είναι πιο ευαίσθητα στις αλλαγές του pH. Σε αντίστοιχα πειράματα που έγιναν σε συγκεντρώσεις 100μM και 200μM β-DM, δηλαδή λίγο κάτω και λίγο πάνω από τη cmc αντίστοιχα, η οξίνιση των διαλυμάτων είχε αμελητέα επίδραση στην απόσβεση του φθορισμού των συμπλόκων (δεδομένα δεν παρατίθενται).

6. *In silico* μελέτη της κατανομής του φορτίου στην επιφάνεια των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας

Στην προηγούμενη ενότητα δείχτηκε ότι η απόσβεση του φθορισμού των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων αυξάνεται με την αύξηση του κατιονικού φορτίου στις διάφορες μεταχειρίσεις ($Mg^{2+} \approx Put^{2+} < Spd^{3+} < Spm^{4+}$). Για το λόγο αυτό, είναι πολύ πιθανό η συσσωμάτωση των συμπλόκων να προκαλείται από μη ειδικές αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικού τύπου. Μια προσπάθεια να απεικονιστεί ο αριθμός των αρνητικών φορτίων και η κατανομή τους στην επιφάνεια του τριμερούς LHCP και του CP29 από διαθέσιμα 3D δομικά δεδομένα φαίνεται στη Εικόνα 70. Κάποια αμινοτελικά κατάλοιπα απουσιάζουν από τις δομές αυτές (13 από το τριμερές LHCP του σπανακιού, 87 από το CP29 και 9 από το τριμερές LHCP του μπιζελιού). Ωστόσο, αυτό δεν επηρεάζει σημαντικά την κατανομή των θετικών και αρνητικών φορτίων που διακρίνονται στην Εικόνα με μπλε και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα. Τα περισσότερα αρνητικά φορτία εντοπίζονται στις εκτεθειμένες στο στρώμα και στο μικροχώρο πλευρές των συμπλόκων, κάτι που φαίνεται πιο καθαρά στο τριμερές του μπιζελιού λόγω της υψηλότερης ευκρίνειάς του.

Είναι λοιπόν αναμενόμενο, θετικά φορτισμένα μόρια, όπως οι αμίνες ή τα ανόργανα κατιόντα, να αλληλεπιδρούν μέσω δυνάμεων Coulomb με τις εκτεθειμένες στο στρώμα και το μικροχώρο πλευρές των μονομερών και τριμερών συμπλόκων. Ειδικότερα, μόρια που φέρουν θετικά φορτισμένες ομάδες σε απόσταση μεταξύ τους, όπως η Spm με 4 θετικά φορτία, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αρκετά αρνητικά φορτισμένα σημεία της επιφάνειάς τους ταυτόχρονα. Η αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων αμινομάδων της Spm, όπως και των υδρογονοκατιόντων, ουδετεροποιεί τα αρνητικά φορτισμένα μόρια στην επιφάνεια των συμπλόκων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των απωθητικών δυνάμεων που ασκούνται μεταξύ τους και κατ' επέκταση τη συσσωμάτωσή τους.

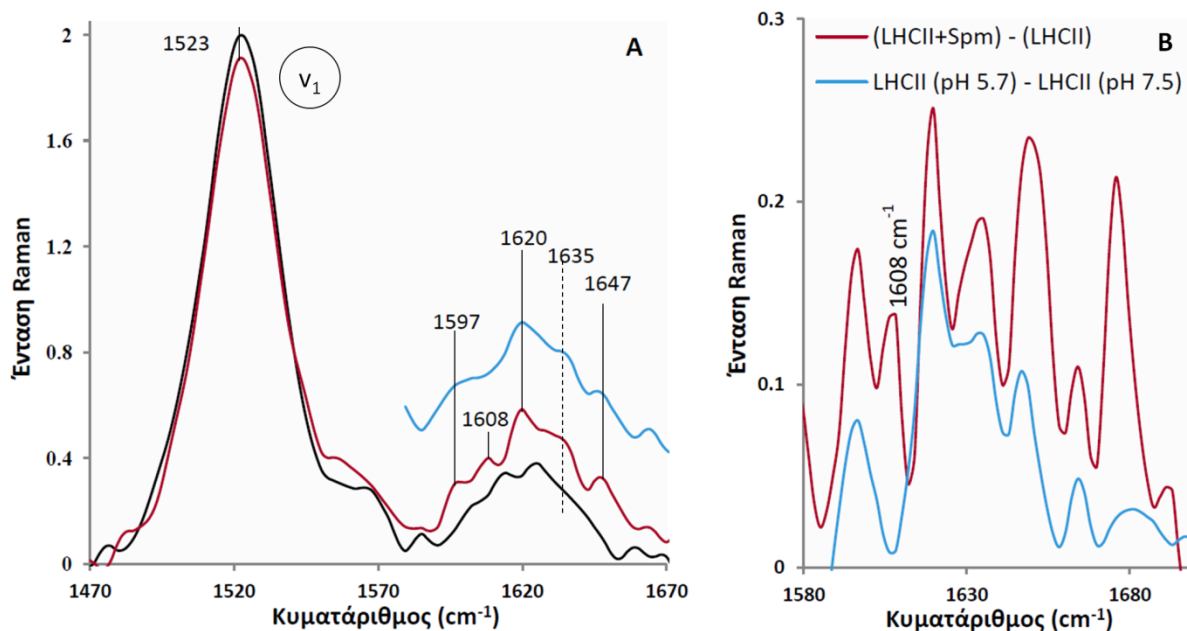


Εικόνα 70. Η κατανομή των θετικών (μπλε) και αρνητικών (κόκκινο) φορτίων στην επιφάνεια του τριμερούς LHCII (από σπανάκι και μπιζέλι) και του CP29 (από σπανάκι). Η δημιουργία των Εικόνων έγινε στο PyMOL για το CP29 του σπανακιού (PDB ID: 3PL9), για το τριμερές LHCII του σπανακιού (PDB ID: 1RWT) και για το τριμερές LHCII του μπιζελιού(PDB ID: 2BHW).

7. Επίδραση Spm στα φάσματα Raman του LHCII

Σημαντικά αποτελέσματα σχετικά με τις δομικές αλλαγές του συμπλόκου που μεταβαίνει από μονομερή και τριμερή κατάσταση σε ολιγομερή από τη Spm, προέκυψαν από τη χρήση της δονητικής φασματοσκοπίας Raman. Εκτός από χαρακτηριστικές αλλαγές στα φάσματα Raman που σχετίζονται με τη συσσωμάτωση των συμπλόκων κατά την ενεργοποίηση του qE, ζητούμενο ήταν η εύρεση και ειδικών αλληλεπιδράσεων (πέρα από τις ηλεκτροστατικές) μεταξύ της Spm και των συμπλόκων. Τα φάσματα Raman των μονομερών και τριμερών

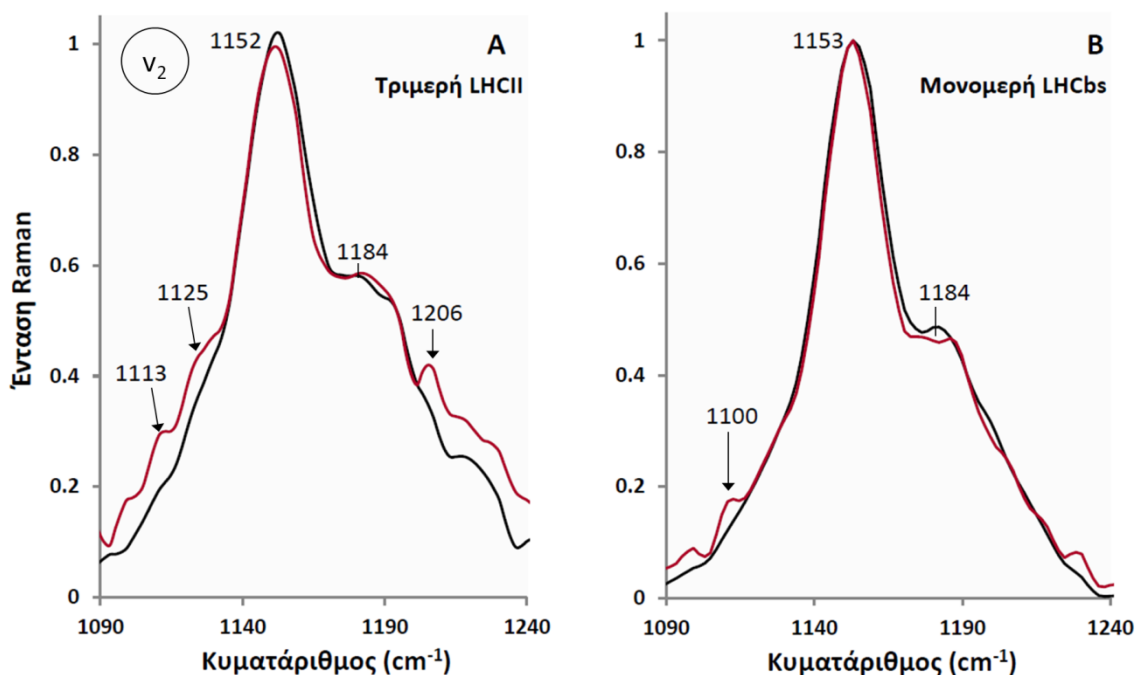
συμπλόκων της φωτοσυλλεκτικής κεραίας δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ τους. Ωστόσο, κάτω από τις συνθήκες των πειραμάτων της ενότητας αυτής, η μεταχείριση με Spm προκάλεσε εντονότερες αλλαγές με καλύτερη επαναληψιμότητα στα φάσματα των τριμερών LHCII, πιθανότατα λόγω των μεγαλύτερων συσσωματωμάτων που σχηματίζουν από τα μονομερή LHCb σύμπλοκα.



Εικόνα 71. Α. Οι περιοχές ν_1 και υψηλών συχνοτήτων φασμάτων Raman του τριμερούς LHCII σε $40\mu\text{M}$ $\beta\text{-DM}$ και pH 7,5 πριν (μαύρη γραμμή) και μετά τη μεταχείριση με 1mM Spm (κόκκινη γραμμή). Με μπλε χρώμα εμφανίζεται το φάσμα στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων του LHCII σε pH 5,7. Β. Φάσματα διαφοράς Raman της μεταχείρισης με 1mM Spm και HCl που άλλαξε το pH από 7,5 σε 5,7. Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 473nm .

Όλα τα φάσματα Raman κυριαρχούνται από την έντονη ζώνη στους 1523cm^{-1} (Εικόνα 71A) που ονομάζεται ν_1 και προκαλείται από τις δονήσεις έκτασης των διπλών δεσμών άνθρακα $\text{C} = \text{C}$ (για την ονοματολογία των ζωνών και την προέλευσή τους βλέπε «Εισαγωγή», σχετική ενότητα). Στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων Raman, παρατηρούνται δύο νέες ζώνες στους 1635 και 1647cm^{-1} κατά τη μεταχείριση του LHCII με Spm και τη διαλυτοποίησή του σε χαμηλό pH (Εικόνα 71A). Οι ζώνες αυτές, που απουσιάζουν από το φάσμα του LHCII, προέρχονται από δονήσεις έκτασης των φορμυλομάδων των Chls (Pascal et al. 2000). Η εμφάνιση των ζωνών αυτών είναι ένδειξη της δημιουργίας δεσμών υδρογόνου των φορμυλομάδων δύο τουλάχιστον πληθυσμών Chl b παρουσία Spm και πρωτονίων. Επιπλέον, στην ίδια περιοχή παρατηρείται παρουσία Spm η μετατόπιση των κορυφών του τριμερούς LHCII από τους 1625 , 1615 και 1604cm^{-1} στους 1620 , 1608 και 1597cm^{-1} αντίστοιχα. Οι ζώνες αυτές αντιστοιχούν στις δονήσεις έκτασης των δεσμών μεθυλενίου των Chls ή συνεισφορές αυτών και ως εκ τούτου σχετίζονται άμεσα

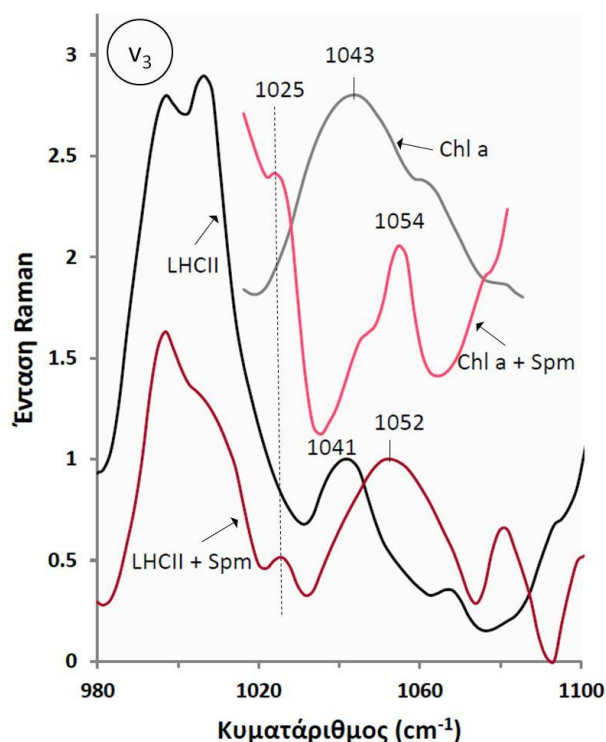
με την κατάσταση συναρμογής τους (Robert 2004). Στα φάσματα διαφοράς της Εικόνας 71B φαίνεται ξεκάθαρα ότι με εξαίρεση την κορυφή στους 1608cm^{-1} οι ίδιες αλλαγές στα μόρια Chls του LHCII συμβαίνουν κατά τη συσσωμάτωση του συμπλόκου από τα πρωτόνια κατά την οξίνιση του διαλύματος. Η μετατόπιση της ζώνης από τους 1615 στους 1608cm^{-1} που προκαλεί μόνο η Spm, αποτελεί ένδειξη ειδικής αλληλεπίδρασης κάποιου μορίου Spm με το κεντρικό Mg του τετραπυρρολικού δακτυλίου κάποιας Chl.



Εικόνα 72. Η v_2 περιοχή του φάσματος Raman των τριμερών (A) και μονομερών (B) συμπλόκων της φωτοσυνθετικής κεραίας σε $40\mu\text{M}$ $\beta\text{-DM}$ και $\text{pH } 7,5$, απουσία (μαύρη γραμμή) ή παρουσία 1mM Spm (κόκκινη γραμμή). Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 473nm . Με τα βέλη υποδεικνύονται οι νέες ζώνες-δορυφόροι που προκύπτουν από τη μεταχείριση με Spm.

Η v_2 ζώνη του φάσματος Raman, που προέρχεται από δονήσεις έκτασης των απλών δεσμών άνθρακα (C – C) συζευγμένων είτε με δονήσεις κάμψης δεσμών C – H ή με δονήσεις έκτασης δεσμών C – CH_3 , επίσης επηρεάζεται από τη Spm τόσο στα τριμερή LHCII όσο και στα μονομερή LHCb σύμπλοκα (Εικόνα 72). Οι νέες ζώνες που εμφανίζονται στους 1113 , 1125 και 1206cm^{-1} σχετίζονται με τη στρέβλωση του μορίου της N_x που αποτελεί μια ακόμη ένδειξη της συσσωμάτωσης των συμπλόκων (Ruban et al. 2001).

Η v_3 ζώνη, που προέρχεται από τις λικνιζόμενες (rocking) δονήσεις κάμψης των μεθυλομάδων (CH_3), χωρίζεται υπό τις παρούσες συνθήκες σε δύο επιμέρους κορυφές στους 997 και 1006cm^{-1} , όπως φαίνεται στην Εικόνα 73. Μια ζώνη-δορυφόρος εμφανίζεται στους 1025cm^{-1} παρουσία Spm. Συγκρίνοντας τα φάσματα Raman των απομονωμένων συμπλόκων με αυτά των απομονωμένων χλωροφυλλών σε αιθανόλη, εντοπίστηκαν αρκετές ομοιότητες



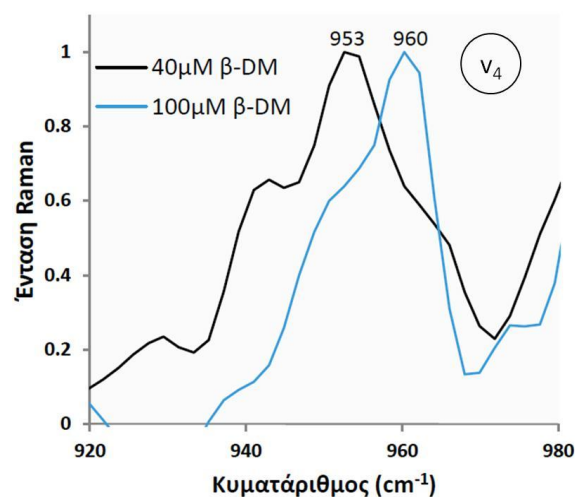
Εικόνα 73. Η v_3 περιοχή του φάσματος Raman των τριμερών LHCII συμπλόκων της φωτοσυλλεκτικής κεραίας σε $40\mu\text{M}$ $\beta\text{-DM}$ και pH 7.5, απουσία (μαύρη γραμμή) ή παρουσία 1mM Spm (κόκκινη γραμμή). Παρατίθενται επίσης τα φάσματα στην ίδια περιοχή της απομονωμένης Chl a σε αιθανόλη, απουσία (γκρι γραμμή) ή παρουσία Spm σε μοριακή αναλογία 1:30 (ροζ γραμμή).

δείκτη της κατάστασης ολιγομερισμού των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων (Ruban et al. 2007). Κατά τη συσσωμάτωση των συμπλόκων εμφανίζεται μια νέα κορυφή στους 953cm^{-1} που σχετίζεται και πάλι με τη στρέβλωση της N_x . Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι όσο αυξάνεται η κατάσταση ολιγομερισμού των συμπλόκων, η ισορροπία των δύο ζωνών μεταβαίνει προς τους 953cm^{-1} . Κάτω από τις παρούσες πειραματικές συνθήκες δεν παρατηρήθηκε κάτι παρόμοιο, γεγονός που μάλλον οφείλεται στη σχετικά υψηλή κατάσταση συσσωμάτωσης των συμπλόκων στα $40\mu\text{M}$ $\beta\text{-DM}$. Στην Εικόνα 74 φαίνεται ότι η ζώνη στους 960cm^{-1} στα $100\mu\text{M}$ $\beta\text{-DM}$ είναι ήδη μετατοπισμένη στους 953cm^{-1} στα $40\mu\text{M}$ $\beta\text{-DM}$ απουσία Spm.

Εικόνα 74. Η v_4 ζώνη του φάσματος Raman των μονομερών LHCb συμπλόκων της φωτοσυλλεκτικής κεραίας σε $40\mu\text{M}$ $\beta\text{-DM}$ και $100\mu\text{M}$ $\beta\text{-DM}$. Τα φάσματα έχουν κανονικοποιηθεί στα μέγιστα τους στους 953 και 960cm^{-1} αντίστοιχα.

στην περιοχή αυτή. Η ζώνη στους 1025cm^{-1} ενώ απουσιάζει από το φάσμα της Chl a, εμφανίζεται ξανά κατά τη μεταχείρισή της με Spm (Εικόνα 73, διακεκομμένη κάθετη γραμμή). Επιπλέον, η ζώνη στους 1041cm^{-1} του LHCII φαίνεται να αντιστοιχεί σε δόνηση κάποιου μορίου Chl a μιας και το φάσμα της τελευταίας εμφανίζει μια αντίστοιχη ζώνη στην ίδια περιοχή. Η ζώνη αυτή επηρεάζεται έντονα από τη Spm τόσο στην περίπτωση του LHCII όσο και της Chl a και μετατοπίζεται κατά 10cm^{-1} σε μεγαλύτερες συχνότητες, ένδειξη άλλης μιας άμεσης αλληλεπίδρασης κάποιας Chl a του συμπλόκου με τη Spm (Εικόνα 73).

Τέλος, η v_4 ζώνη που εμφανίζεται συνήθως γύρω στους 964cm^{-1} αποτελεί σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έναν καλό

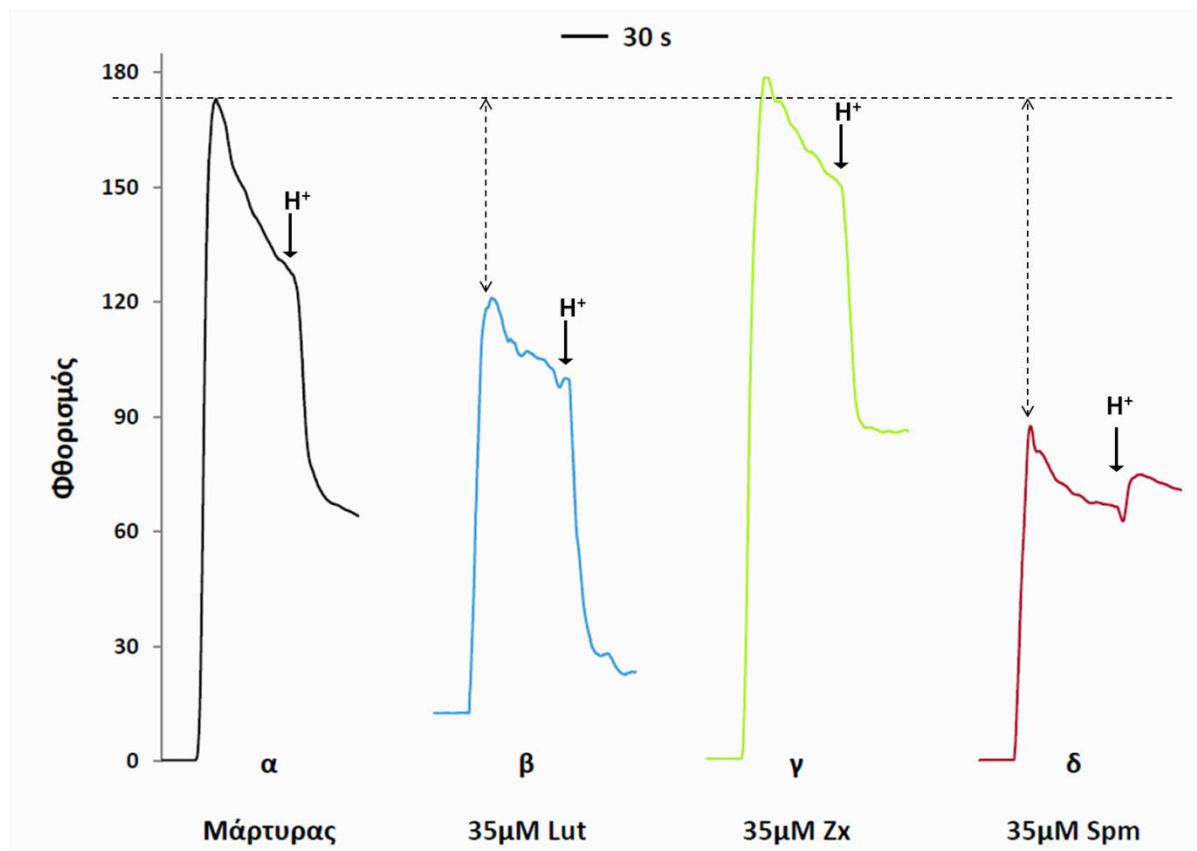


8. Επίδραση ξανθοφυλλών στο φθορισμό των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας σε διαφορετικά pH

Στην ενότητα 5 παρουσιάστηκε αναλυτικά η επίδραση των τριών κύριων ΠAs στο φθορισμό των μονομερών LHCB και των τριμερών LHCIII συμπλόκων σε διαφορετικές τιμές pH. Σε pH 7,5, μικρές συγκεντρώσεις Spm ήταν ικανές να προκαλέσουν μεγάλη απόσβεση του φθορισμού τόσο των μονομερών όσο και των τριμερών συμπλόκων της κεραίας, ενώ τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας Raman έδειξαν ότι αυτό το πετυχαίνει η Spm αλλάζοντας τη διαμόρφωση των χρωστικών τους και σχηματίζοντας μεγαλύτερα συσσωματώματα. Όλα τα μέχρι τώρα *in vivo* και *in vitro* δεδομένα (βλέπε «Εισαγωγή» σχετική ενότητα), συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της διατριβής αυτής, υποστηρίζουν έναν ρόλο αποσβέστη της περίσσειας ενέργειας για τη Spm κατά την ενεργοποίηση του qE. Για το λόγο αυτό, παρουσιάζει υψηλό ενδιαφέρον η μελέτη της επίδρασης των ξανθοφυλλών στις φασματοσκοπικές ιδιότητες των συμπλόκων. Η άμεση ή έμμεση συμμετοχή της Zx και της Lut στο μηχανισμό qE θεωρείται δεδομένη. Έτσι, στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την επίδραση και των τριών υποψήφιων αποσβεστών (Zx, Lut, Spm) στο φθορισμό των μονομερών και τριμερών συμπλόκων *in vitro*. Οι συγκεντρώσεις των ξανθοφυλλών και της Spm που εξετάστηκαν, επιλέχτηκαν με βάση παρόμοιες μελέτες που αφορούσαν τη ζεαξανθίνη και τη βιολαξανθίνη (Ruban et al. 1996).

Στην Εικόνα 75 παρουσιάζεται η κινητική του φθορισμού των τριμερών συμπλόκων που προστίθενται στα 20s σε διάλυμα 14mM Hepes (pH 7,5) περιεκτικότητας 20μM β-DM, απουσία ή παρουσία 35μM Lut, Zx ή Spm. Στα 80s, όπως υποδηλώνεται με τα κάθετα βέλη, προστίθεται μικρή ποσότητα HCl που μεταβάλλει το pH σε όξινες τιμές (pH 5,7). Σε pH 7,5, η παρουσία 35μM Lut προκάλεσε μια αυθόρμητη μείωση του φθορισμού του LHCIII κατά 32% περίπου (Εικόνα 75β, διπλό βέλος). Η απόσβεση του φθορισμού για την ίδια συγκέντρωση Spm έφτασε κοντά στο 50% (Εικόνα 75δ, διπλό βέλος), ενώ η Zx δεν είχε καμία επίδραση στο φθορισμό των συμπλόκων (Εικόνα 75γ). Υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες, η μείωση του φθορισμού που προκλήθηκε από την οξύνιση ήταν περίπου 45% (Εικόνα 75α). Παρουσία Zx παρέμεινε στα ίδια επίπεδα, ενώ παρουσία Spm δεν προκλήθηκε περαιτέρω μείωση λόγω του χαμηλού pH στον ήδη δραματικά μειωμένο φθορισμό των συμπλόκων. Αντίθετα, όταν στο διάλυμα υπήρχε Lut, παρατηρήθηκε μια επιπλέον 73% μείωση του φθορισμού κατά την οξύνιση (Εικόνα 75β). Από τα αντίστοιχα πειράματα σε μονομερή σύμπλοκα ξεχωρίζει και πάλι η επίδραση της Lut που προκαλεί την αυθόρμητη

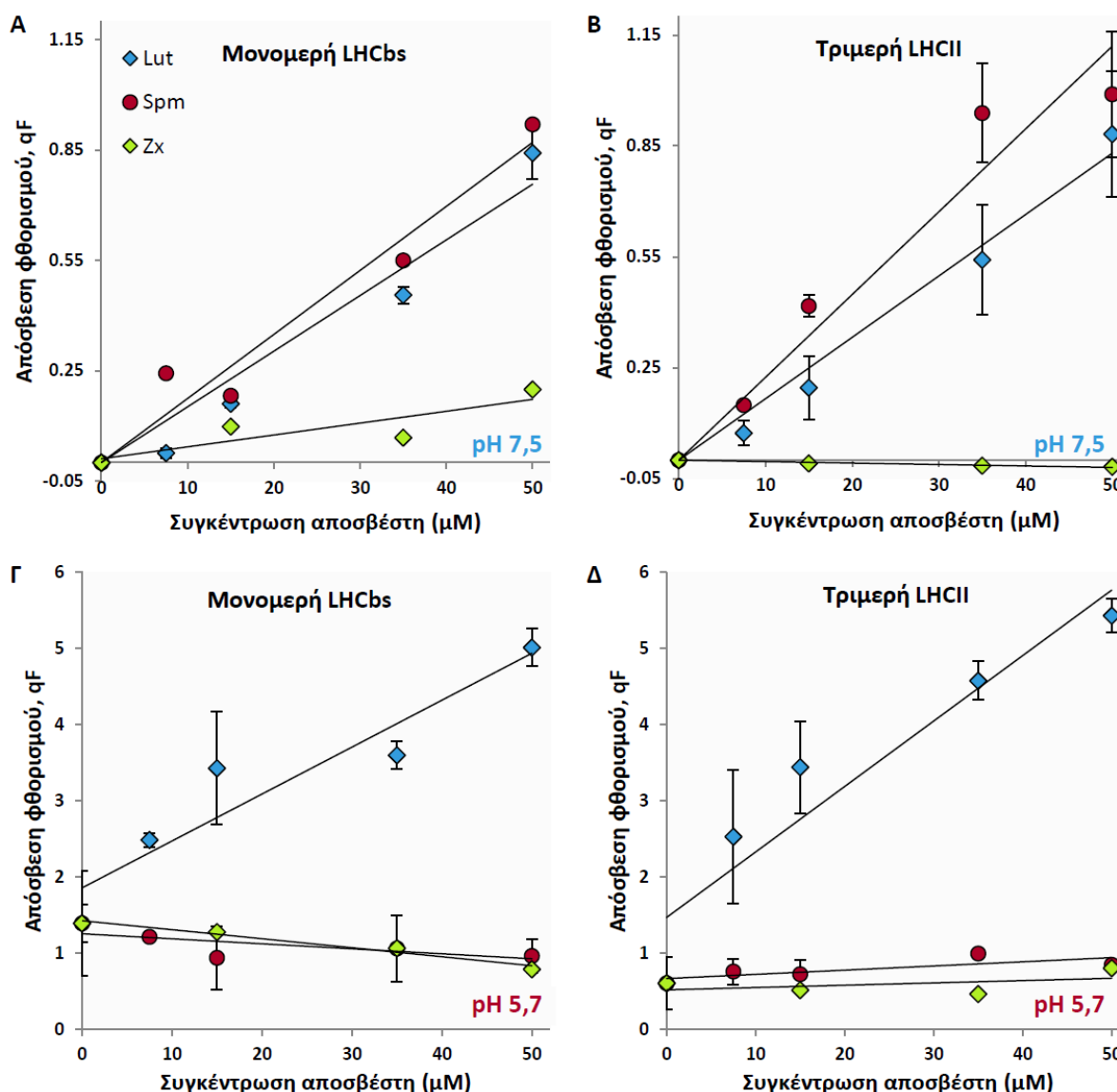
μείωση του φθορισμού τους κατά 30% σε σχέση με το μάρτυρα και την συνολική μείωση της τάξης του 66% μετά την οξίνιση (δεδομένα δεν παρατίθενται).



Εικόνα 75. Απόσβεση του φθορισμού Chl στα τριμερή LHCII κατά τη διαλυτοποίηση σε 14 mM HEPES (pH 7,5), 20μM DM, απουσία (α) και παρουσία 35μM Lut (β), Zx (γ) και Spm (δ). Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν την προσθήκη HCl που αλλάζει το pH του διαλύματος από 7,5 σε 5,7. Τα διπλά βέλη αντιστοιχούν στην απόσβεση του φθορισμού που προκαλείται από τα αντιδραστήρια σε pH 7,5. Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 440 nm και η εκπομπή του φθορισμού καταγράφηκε στα 681 nm. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν 0,1μM.

Συγκριτικά, η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Lut, Zx και Spm στη μείωση του φθορισμού των μονομερών και τριμερών συμπλόκων στα 681nm στις δύο τιμές pH παρουσιάζεται στην Εικόνα 76. Η απόσβεση του φθορισμού (qF) έχει οριστεί και σε αυτήν την περίπτωση από τον τύπο $qF = (F_{max} - F) / F$, όπου F_{max} όμως εδώ είναι ο φθορισμός των διαλυτοποιημένων συμπλόκων στα 20μM β-DM (και όχι αυτός των πλήρως διαλυτοποιημένων συμπλόκων στα 200μM β-DM). Σε pH 7,5, οι τιμές qF αυξάνονται με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις Lut και Spm τόσο στα μονομερή όσο και στα τριμερή σύμπλοκα, ενώ παραμένουν περίπου στα ίδια επίπεδα με το μάρτυρα (20μM β-DM) στην περίπτωση της Zx (Εικόνα 76A,B). Ωστόσο, η παρουσία της στα μονομερή προκαλεί μια μικρή απόσβεση του φθορισμού τους της τάξης του 4% περίπου (Εικόνα 76A). Η σχέση της απόσβεσης με τη συγκέντρωση της Lut και της Spm είναι μάλλον γραμμική καθώς δε φαίνεται να επέρχεται κορεσμός σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Η κλίση ευθείας είναι ελαφρώς

μεγαλύτερη για τη Spm στην περίπτωση των μονομερών LHCbs σε σχέση με αυτήν της Lut, ενώ στα τριμερή είναι ξεκάθαρα μεγαλύτερη για τη Spm (Εικόνα 76Α,Β).



Εικόνα 76. Απόσβεση του φθορισμού (qF) Chl των τριμερών LHCII συμπλόκων σε διάλυμα 14 mM HEPES, 20μM DM συναρτήσει της συγκέντρωσης Lut, Spm και Zx σε pH 7,5 (A) και 5,7 (B). Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν 0,1μM. Τα δείγματα διεγέρθηκαν στα 440nm. Η απόσβεση qF υπολογίστηκε από τον τύπο $qF = (F_{max} - F) / F$, όπου F_{max} ο φθορισμός στα 681nm του διαλυτοποιημένου συμπλόκου στα 20μM β-DM απουσία των αντιδραστηρίων και F η μέγιστη τιμή του φθορισμού τους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων. Οι τιμές και οι κατακόρυφες γραμμές σφάλματος προήλθαν από 2-3 επαναλήψεις διαφορετικών δειγμάτων.

Σε pH 5,7 η απόσβεση αυξάνεται μόνο με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις Lut, ενώ η Spm, όπως και η Zx δεν επηρεάζουν την απόσβεση που προκαλούν τα πρωτόνια (Εικόνα 76Γ,Δ). Αντιθέτως, φάνηκε να αυξάνουν το φθορισμό των μονομερών κυρίως συμπλόκων σε όξινες τιμές pH, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ενότητας 5 και τα πειράματα σε 6μM β-DM. Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο που επαναλαμβάνεται στα 20μM β-DM είναι η υπεροχή των μονομερών συμπλόκων ($qF=1,4$) σε σχέση με τα τριμερή

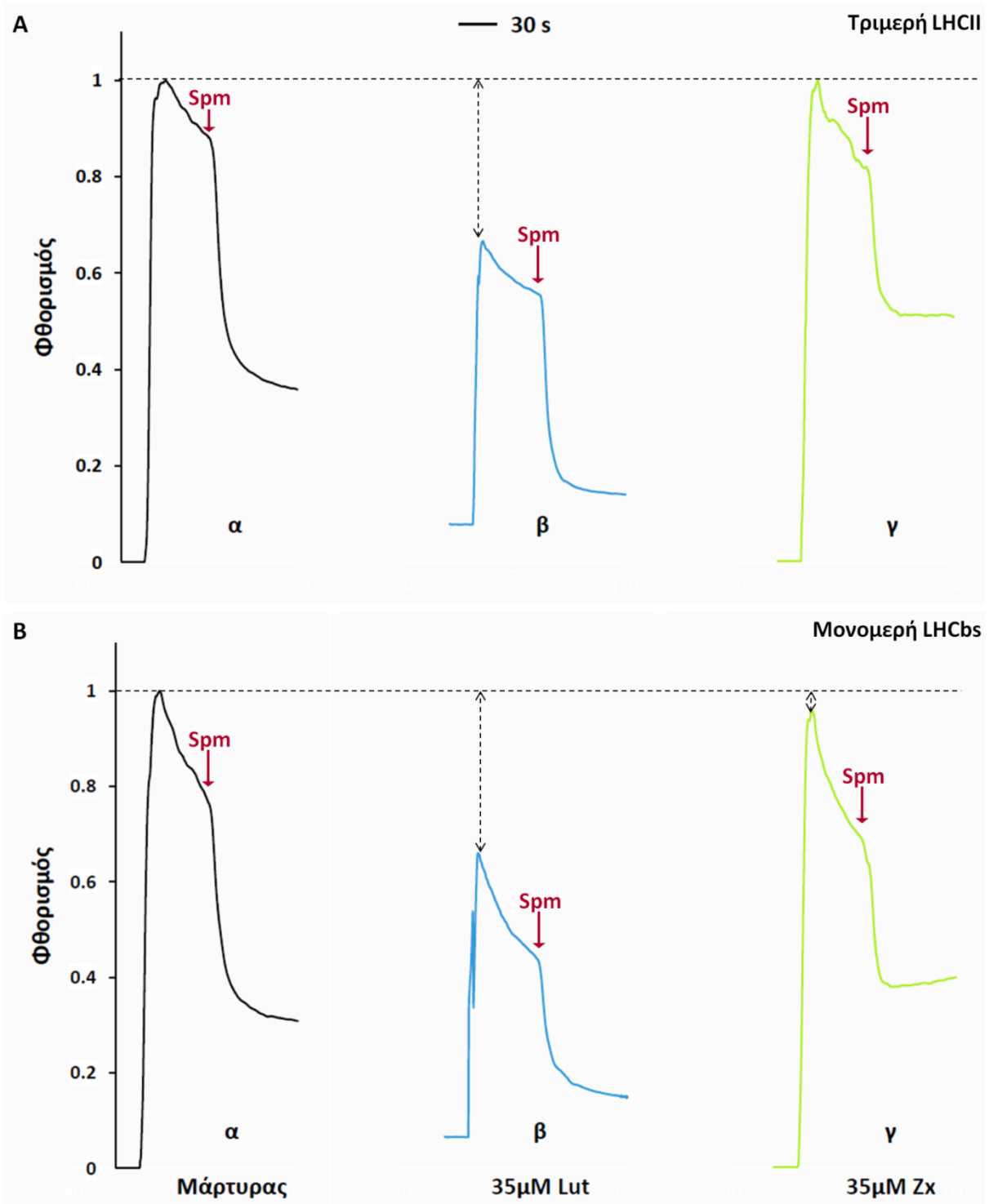
($qF=0,6$) στην απόσβεση της ενέργειας σε χαμηλό pH. Η συνολική απόσβεση από τη Lut και τα πρωτόνια φτάνει σε τιμές κοντά στο 5 για τα μονομερή και στο 5,4 για τα τριμερή σύμπλοκα της κεραίας σε συγκέντρωση 50 μ M Lut (Εικόνα 76Γ και Δ αντίστοιχα). Φυσικά, τέτοιες τιμές qF είναι πολύ υψηλές και σίγουρα ένα μεγάλο μέρος της παρατηρούμενης απόσβεσης δεν έχει βιολογική σημασία, καθώς είναι αδύνατον να εκδηλωθούν *in vivo*.

Η δράση της Spm φαίνεται να είναι παρόμοια με τη δράση της Lut σε ουδέτερα pH και παρόμοια με της Zx σε όξινα pH. Από τα *in vitro* αυτά πειράματα προκύπτει ότι η Zx είναι μάλλον κακός αποσβέστης της ενέργειας, η Spm είναι καλός αποσβέστης σε ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών pH και η Lut είναι ένας καλός αποσβέστης τόσο σε ουδέτερα όσο και σε όξινα περιβάλλοντα. Πιθανότατα η Spm έχει ήδη δράσει στην διαμόρφωση των συμπλόκων μέσω ηλεκτροστατικών κυρίως αλληλεπιδράσεων, αφήνοντας μικρό πεδίο δράσης στα πρωτόνια. Από την άλλη, η επίδραση της Lut μπορεί να αποδοθεί σε άμεσες αλληλεπιδράσεις με τις χρωστικές των συμπλόκων και όχι στην υδροφοβικότητά της, καθώς το πιο υδρόφοβο μόριο της Zx δεν προκαλεί παρόμοιες αλλαγές στις φασματοσκοπικές ιδιότητες των συμπλόκων.

9. Συνδυαστική δράση ξανθοφυλλών και Spm στο φθορισμό των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας

Από όλα τα προηγούμενα προκύπτει ότι τόσο η Spm, όσο και κάποιες από τις ξανθοφύλλες (Lut) μεταβάλλουν το φθορισμό των υποσυμπλόκων της κεραίας. Το επόμενο στάδιο ήταν ο έλεγχος της συνδυαστικής επίδρασης της Spm με καθεμία από τις ξανθοφύλλες στο φθορισμό. Έτσι πραγματοποιήθηκαν πειράματα που έγιναν άλλοτε με την επώαση των υποσυμπλόκων σε αμίνη (Spm) και στη συνέχεια προστέθηκε η ξανθοφύλλη επιλογής ή το αντίστροφο. Τα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στην ενότητα αυτή, πάρθηκαν όταν προστέθηκε Spm (αντί για πρωτόνια) σε προεπωασμένα με κάποια ξανθοφύλλη φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα.

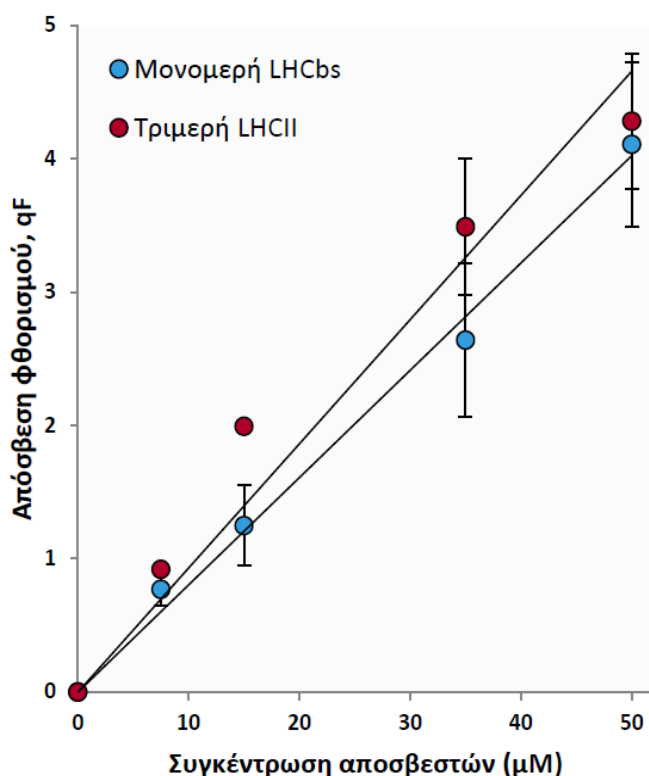
Στην Εικόνα 77 παρουσιάζεται η κινητική του φθορισμού των τριμερών και μονομερών συμπλόκων της κεραίας του PSII που προστίθενται στα 20s σε διάλυμα 14mM HEPES (pH 7,5) περιεκτικότητας 20 μ M β -DM, απουσία ή παρουσία 35 μ M Lut ή Zx. Στα 80s, όπως υποδηλώνεται με τα κάθετα κόκκινα βέλη, προστίθεται ίση συγκέντρωση Spm (35 μ M) που μειώνει τα επίπεδα του φθορισμού, προσομοιώνοντας τη δράση των πρωτονίων. Η απόσβεση που προκάλεσε η Spm τόσο στα τριμερή LHCI₂ όσο και στα μονομερή LHCb υπό τις



Εικόνα 77. Απόσβεση του φθορισμού Chl στα τριμερή LHCII (A) και στα μονομερή LHCbs (B) κατά τη διαλυτοποίηση σε 14 mM HEPES (pH 7,5), 20 μ M DM, απουσία (α) και παρουσία 35 μ M Lut (β) και Zx (γ). Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν την προσθήκη 35 μ M Spm που προκαλεί επιπλέον απόσβεση του φθορισμού. Τα διπλά βέλη αντιστοιχούν στην απόσβεση του φθορισμού που προκαλείται από τα αντιδραστήρια σε pH 7,5. Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 440 nm και η εκπομπή του φθορισμού καταγράφηκε στα 681 nm. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν 0,1 μ M.

παρούσες συνθήκες ήταν κοντά στο 55% (Εικόνα 77Aα και Βα αντίστοιχα). Παρουσία όμως

Lut η απόσβεση αυξήθηκε στο 72% για τα τριμερή LHCI (Εικόνα 77Aβ) και στο 60% για τα μονομερή LHCbs (Εικόνα 77Bβ). Αντίθετα, παρουσία Zx η επίδραση της Spm μειώθηκε με την απόσβεση του φθορισμού των τριμερών LHCI να φτάνει μόλις στο 37% (Εικόνα 77Aγ) και των μονομερών LHCbs στο 45% (Εικόνα 77Bγ). Η συνολική ποσοστιαία μείωση του φθορισμού των τριμερών και μονομερών συμπλόκων της κεραίας που παρατηρείται εξαιτίας της συνδυαστικής δράσης Lut και Spm είναι κοντά στο 85% και στις δύο περιπτώσεις.



Εικόνα 78. Συνδυαστική επίδραση ίσων συγκεντρώσεων Lut και Spm στην απόσβεση του φθορισμού (qF) των μονομερών και τριμερών συμπλόκων της κεραίας. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν 0,1μM. Τα δείγματα διεγέρθηκαν στα 440nm. Η απόσβεση qF υπολογίστηκε από τον τύπο $qF = (F_{max} - F) / F$, όπου F_{max} ο φθορισμός στα 681nm του διαλυτοποιημένου συμπλόκου στα 20μM β-DM σε pH 7,5 απουσία των αντιδραστηρίων και F η μέγιστη τιμή του φθορισμού τους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων. Οι τιμές και οι κατακόρυφες γραμμές σφάλματος προήλθαν από 2-3 επαναλήψεις διαφορετικών δειγμάτων

Οι ταυτόχρονες μεταχειρίσεις των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων με τους δύο αυτούς καλούς αποσβέστες, της Lut και της Spm, έδειξαν ότι όχι μόνο δεν επηρεάζει ο ένας την επίδραση του άλλου, αλλά ότι μπορούν να δρουν συνεργιστικά. Αξιοσημείωτο είναι ότι η συνδυαστική επίδραση της Lut και της Spm προκαλεί τετραπλάσια απόσβεση (qF) τόσο στα μονομερή όσο και στα τριμερή σύμπλοκα της κεραίας (Εικόνα 78) από ότι η καθεμία ξεχωριστά (Εικόνα 76A και B). Το γεγονός ότι και οι δύο υπάρχουν φυσιολογικά στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της κεραίας επιτρέπει την προέκταση των αποτελεσμάτων και σε *in vivo* συνθήκες, με την προϋπόθεση ότι οι συγκεντρώσεις που

χρησιμοποιήθηκαν είναι εντός του φυσιολογικού εύρους.

Συζήτηση

Τα αποτελέσματα του κεφαλαίου αυτού που προέκυψαν από τα πειράματα απορρόφησης και φθορισμού, έδειξαν ότι οι ΠΑς αλλάζουν τις οπτικές ιδιότητες του LHCII (Εικόνες 62, 63) με παρόμοιο τρόπο με τα δισθενή κατιόντα Mg^{2+} και τη διβουκαΐνη και επάγουν τη συσσωμάτωσή του (Ruban and Horton 1992; Mullineaux et al. 1993; Ruban et al. 1994; Vasil'ev et al. 1997; Kirchhoff et al. 2003; van Oort et al. 2007). Οι ΠΑς μειώνουν το φθορισμό του LHCII στα 681nm σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος και αυξάνουν το φθορισμό στα 700nm σε κρυογονικές θερμοκρασίες (Εικόνες 62, 66). Τα φαινόμενα αυτά έχουν επίσης παρατηρηθεί σε απομονωμένα θυλακοειδή (Ruban et al. 1991; Gilmore et al. 1995) και φύλλα φυτών (Ruban and Horton 1994) σε συνθήκες ενεργοποίησης του qE, υποδεικνύοντας ένα μοντέλο για το qE *in vivo* που σχετίζεται με την απόσβεση του φθορισμού από τη συσσωμάτωση των συμπλόκων της κεραίας (Horton et al. 1991; Horton et al. 2005). Πρόσφατα δομικά στοιχεία δείχνουν ότι ο μηχανισμός qE περιλαμβάνει την ομαδοποίηση του LHCII στις μεμβράνες των θυλακοειδών, ερμηνεύοντας τη συνεχώς παρατηρούμενη φασματοσκοπικά συσχέτιση του qE και του ολιγομερισμού του LHCII *in vitro* (Johnson et al. 2011). Αν και έχει προταθεί ότι ο μηχανισμός απόσβεσης της ενέργειας μέσω συσσωμάτωσης που παρατηρείται *in vitro* και ο μηχανισμός NPQ *in vivo* μπορεί να είναι ο ίδιος (van Oort et al. 2007; Miloslavina et al. 2008), το ακριβές μέρος της απόσβεσης και τα μόρια που το αποτελούν παραμένουν άγνωστα (Ruban et al. 2012). Από την άλλη πλευρά, λόγω των διαφορών ανάμεσα στο δίκτυο των 3D δομών των LHCII συμπλόκων *in vitro* και των δομικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά την ενεργοποίηση του qE *in vivo*, όλα τα δεδομένα από απομονωμένα σύμπλοκα, συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης, δε θα πρέπει να οδηγούν σε κατηγορηματικά συμπεράσματα.

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Ruban et al. 1994; Ruban et al. 1996; Phillip et al. 1996), τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής έδειξαν ότι το μέγεθος της απόσβεσης των μονομερών LHCbs είναι μεγαλύτερο από αυτό των τριμερών LHCII σε χαμηλό pH (Εικόνες 69, 76 και Πίνακας 10). Η διαφορά αυτή οφείλεται ενδεχομένως στις διαφορές στη σύσταση των χρωστικών τους. Ωστόσο, η άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων σε ότι αφορά τα μονομερή σύμπλοκα με αυτά της ομάδας του Horton παρουσιάζει δυσκολίες, καθώς στη διατριβή αυτή δεν χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά CP26 και CP29. Μια σημαντική διαδικασία, που συνήθως αγνοείται, στα φαινόμενα απόσβεσης/ολιγομερισμού είναι η μετα-μεταφραστική πολυαμινοβύλιωση των LHCbs (Ioannidis et al. 2009). Τόσο τα τριμερή LHCII

όσο και τα CP29, CP26 και CP24 αποτελούν φυσικά υποστρώματα της πλαστιδιακής τρανσγλουταμινάσης (Duca et al. 1994; Della Mea et al. 2004) και πιθανοί τόποι του qE (Pascal et al. 2005; Kovacs et al. 2006). Επιπλέον, έχει βρεθεί πως η ενεργότητα μιας πλαστιδιακής τρανσγλουταμινάσης που πολυαμινυλιώνει το LHCII στο καλαμπόκι, είναι φωτοεξαρτώμενη (Della Mea et al. 2004). Έτσι, έχει προταθεί ότι τα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα διαχέουν την περίσσεια ενέργεια αλλάζοντας τη στερεοδιαμόρφωσή τους λόγω της πολυαμινυλίωσης (Ioannidis et al. 2009).

Στις ίδιες συνθήκες με αυτές της ομάδας του Horton (6μM β-DM) οι ΠΑΣ φάνηκε να επάγουν την απόσβεση του φθορισμού τόσο των μονομερών όσο και τριμερών συμπλόκων, ακόμα και απουσία ΔpH (Εικόνες 68, 69 και Πίνακας 10), όπως και η διβουκαΐνη (Ruban et al. 1994, Ruban et al. 1996). Η παρατηρούμενη απόσβεση αυξάνεται με την αύξηση του κατιονικού φορτίου ($\text{Put}^{2+} < \text{Spd}^{3+} < \text{Spm}^{4+}$) υποδεικνύοντας ότι λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικού τύπου. Παρόμοια επίδραση στο LHCII έχει αναφερθεί εξάλλου σε μελέτες με μονοσθενή, δισθενή και τρισθενή ανόργανα κατιόντα (Kirchhoff et al. 2003). Η ερμηνεία του φαινομένου υποστηρίζεται από την *in silico* ανάλυση διαθέσιμων 3D δομών του LHCII και του CP29, η οποία έδειξε ότι το μεγαλύτερο μέρος των αρνητικών φορτίων στην επιφάνεια τους εντοπίζεται στις εκτεθειμένες στο στρώμα και στο μικροχώρο πλευρές τους (Εικόνα 70). Οι ΠΑΣ και ειδικά η Spm που φέρει 4 θετικά φορτισμένες ομάδες ουδετεροποιεί τα αρνητικά φορτία στην επιφάνεια των πρωτεϊνικών συμπλόκων, ελαχιστοποιώντας τις μεταξύ τους απωθητικές δυνάμεις και επάγοντας τη συσσωμάτωσή τους. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Kirchhoff et al. 2003), η παρούσα *in vitro* εργασία παραθέτει στοιχεία που δείχνουν ότι η απόσβεση του φθορισμού δε σχετίζεται εντελώς με τη συσσωμάτωση του LHCII. Η μετάβαση που παρατηρείται από την απόσβεση του φθορισμού συμβαίνει σε αρκετά μικρότερες συγκεντρώσεις Spm από τη μετάβαση των αλλαγών της απορρόφησης, που αντιστοιχούν στο βαθμό του ολιγομερισμού των συμπλόκων (Εικόνα 64). Έχει προταθεί πως οι καταγραφόμενες αλλαγές του φθορισμού σχετίζονται με αλλαγές στην πλευρική μικρο-οργάνωση των συμπλόκων που έχουν ήδη σχηματίσει μικρά συσσωματώματα σε τέτοιες συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης απορρυπαντικού (Kirchhoff et al. 2003). Με βάση όλα τα παραπάνω, ένα μοντέλο για την επαγόμενη από τις ΠΑΣ συσσωμάτωση του LHCII θα μπορούσε να περιλαμβάνει τη σάρωση της αρνητικά φορτισμένης επιφάνειάς του ωστόσο μπορούν να δημιουργηθούν μεγαλύτερα συσσωματώματα.

Οι ΠΑΣ αυξάνουν *in vitro* την απόσβεση του φθορισμού τόσο του LHCP των ανώτερων φυτών (παρούσα διατριβή), όσο και του LHCP των χλωροφυκών (Ioannidis et al. 2011). Επιπλέον, *in vivo* μελέτες σε ανώτερα φυτά έχουν δείξει ότι η Spm και η Spd επάγουν τη μη-φωτοχημική μείωση του φθορισμού (μηχανισμό NPQ) σε συνθήκες χαμηλής έντασης ακτινοβολίας (Low Light, LL) ενώ η επίδρασή τους αντιστρέφεται ελαφρώς σε συνθήκες υψηλής έντασης ακτινοβολίας (High Light, HL) (Ioannidis and Kotzabasis 2007a). Αντίστοιχα, από τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου προέκυψε ότι η Spm επάγει την απόσβεση του φθορισμού των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων σε pH 7,5 ενώ η επίδρασή της εξασθενεί ή αντιστρέφεται σε όξινα pH (Εικόνες 69, 76 και Πίνακας 10). Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να σχετίζονται καθώς η αλλαγή του pH από το 7,5 στο 5,7 από την προσθήκη οξέος στα *in vitro* πειράματα προσομοιάζει τη δημιουργία του ΔpH στις *in vivo* HL συνθήκες. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 69, η τιμή pH 5,7 είναι οριακή για την αλλαγή της επίδρασης της Spm, αφού η απόσβεση του φθορισμού των τριμερών συμπλόκων εξακολουθεί να αυξάνεται. Έχει μεγάλη σημασία το γεγονός πως η Spm αυξάνει την απόσβεση του φθορισμού σε ουδέτερες έως ελαφρώς όξινες τιμές pH. Σε συνδυασμό με τα *in vivo* δεδομένα, φαίνεται η Spm καθώς αυξάνεται η ένταση φωτισμού και μειώνεται το pH του μικροχώρου να επιτρέπει το σχηματισμό του qE και να ενισχύει τη φωτοπροστασία σε μη κορεσμένα επίπεδα του ΔpH. Ο μηχανισμός που οδηγεί στη μείωση της απόσβεσης του φθορισμού του LHCP και του qE από τη Spm σε χαμηλές τιμές pH (HL συνθήκες) μπορεί να περιλαμβάνει φαινόμενα επαναδιαλυτοποίησης των συμπλόκων που σχετίζονται είτε με την αντιστροφή του φορτίου τους είτε με την αύξηση της διηλεκτρικής σταθεράς πάνω από κάποιο κρίσιμο όριο. Σε κάθε περίπτωση η αντιστροφή του φαινομένου γίνεται όταν οι τιμές qF είναι αφύσικα υψηλές. Ενδεχομένως, η αύξηση του φθορισμού κάτω από αυτές τις συνθήκες του χαμηλού pH να αποτελεί μία ακόμα δικλίδα ασφαλείας του συνολικού μηχανισμού.

Από την άλλη, αντίστοιχα πειράματα με Lut έδειξαν ότι αυτή μπορεί να αποσβένει σημαντικά το φθορισμό των μονομερών και τριμερών συμπλόκων σε όξινα pH, οπότε και η ανάγκη για φωτοπροστασία είναι μεγάλη (Εικόνες 75, 76). Η υπόθεση πως η Lut συμμετέχει άμεσα στη δημιουργία του κέντρου απόσβεσης της ενέργειας *in vivo* (Ruban et al. 2007) ενισχύεται από τα αποτελέσματα αυτά. Αντίθετα με τις Spm και Lut, η Zx δεν προκάλεσε σημαντική απόσβεση του φθορισμού των συμπλόκων σε καμία από τις δύο τιμές pH που εξετάστηκε η επίδρασή της (Εικόνες 75, 76). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες σε τριμερή LHCP (Ruban et al. 1994) ενώ έρχονται σε αντίθεση με

προηγούμενες μελέτες σε μονομερή LHCbs, όπου η Zx βρέθηκε να μειώνει αποτελεσματικά το φθορισμό τους (Ruban et al. 1996). Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι η συσχέτιση όλων αυτών των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις παρούσες *in vitro* συνθήκες με τις ισχύουσες *in vivo* συνθήκες, θα πρέπει να γίνεται με επιφύλαξη, καθώς η αναλογία των υποψήφιων αποσβεστών που χρησιμοποιήθηκαν με τη Chl είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι στο χλωροπλάστη.

Η Spm λοιπόν είναι ένας αποτελεσματικός αποσβεστής της ενέργειας τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Ο τρόπος δράσης της φαίνεται να μιμείται πρωτίστως αυτόν των πρωτονίων (Εικόνα 65) προκαλώντας τη συσσωμάτωση των συμπλόκων. Το μεγάλο ερώτημα όμως είναι αν αυτή η συσσωμάτωση των συμπλόκων που προκαλείται από τη Spm αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωση τους με τον ίδιο τρόπο που γίνεται κατά την ενεργοποίηση του NPQ. Την απάντηση έδωσε η δονητική φασματοσκοπία Raman που ανέδειξε γνωστές και άγνωστες πτυχές της συσσωμάτωσης του LHCI. Οι περισσότερες πληροφορίες που αντλούνται από τα φάσματα Raman και σχετίζονται με τη διαμόρφωση διάχυσης της ενέργειας του LHCI, προκύπτουν από τη διαμόρφωση του μορίου της νεοξανθίνης. Αν και δεν απαιτείται Nx για την απόσβεση του φθορισμού, αλλαγές στη διαμόρφωσή της έχουν συσχετιστεί με το μηχανισμό NPQ *in vivo* και ειδικά με το μοντέλο (βλέπε «Εισαγωγή») για την απόσβεση που λαμβάνει χώρα στο τριμερές LHCI (Ruban et al. 2007). Έτσι, σύμφωνα με μελέτες της ομάδας του Ruban, αποδώσαμε τις νέες κορυφές στους 1113, 1125 και 1206cm⁻¹ που προέκυψαν στη ν₂ περιοχή των φασμάτων Raman από τη μεταχείριση με Spm (Εικόνα 72), στη στρέβλωση της Nx που συμβαίνει κατά τον ολιγομερισμό των τριμερών συμπλόκων (Ruban et al. 2000; Ruban et al. 2001).

Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό των φασμάτων Raman που προσφέρει στοιχεία για την ταυτότητα των μοριακών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν κατά τη συσσωμάτωση του LHCI από τη Spm παρουσιάστηκε στην Εικόνα 73. Οι ζώνες στους 1041 και 1052cm⁻¹ του LHCI πριν και μετά τη μεταχείριση με Spm αντίστοιχα, μπορούν να αποδοθούν σε δονήσεις έκτασης δεσμών C – O συζευγμένων με άλλες σκελετικές δονήσεις (Bernhard and Crosjean 1995). Εδώ, οι ζώνες αυτές μπορούν να αποδοθούν πιο συγκεκριμένα σε δονήσεις δεσμών C – O της Chl a, της οποίας το φάσμα εμφανίζει στην περιοχή ομοιότητα με αυτό του LHCI. Υπάρχουν μελέτες φασματοσκοπίας FTIR που δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση απομονωμένης Chl a και 9-cis βιολαξανθίνης οδηγούν στην ίδια μετατόπιση της συγκεκριμένης ζώνης (Niedzwiadzki and Gruszecki 2003). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η 9-cis Vx μπορεί να μιμηθεί τις ιδιότητες της Nx στο LHCI (Snyder et al. 2004), η μετατόπιση της ζώνης αυτής μπορεί

να αποδοθεί και πάλι στην αλλαγή της διαμόρφωσης της N_x στο LHCII. Ωστόσο, απουσία καρτενοειδών, η αλληλεπίδραση της Chl a με τη Spm μετατοπίζει τη ζώνη στους 1041cm⁻¹, αντίστοιχα με τη ζώνη που προκύπτει από τη μεταχείριση του LHCII με τη Spm. Αυτό ίσως είναι ένδειξη μιας άμεσης αλληλεπίδρασης Chl a – Spm στο σύμπλοκο.

Εκτός όμως από τις δονήσεις που σχετίζονται με τις ξανθοφύλλες του LHCII, η περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων Raman αποκάλυψε δονήσεις που σχετίζονται με τις χλωροφύλλες του συμπλόκου. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν δύο τουλάχιστον πληθυσμοί Chl b, ελεύθεροι από αλληλεπιδράσεις στη μορφή του τριμερούς, να εμφανίζουν δονήσεις των φορμυλομάδων τους σε διαφορετικές συχνότητες παρουσία Spm ή πρωτονίων (Εικόνα 71). Η ζώνη στους 1647cm⁻¹ μπορεί να αποδοθεί σε μια φορμυλομάδα που είτε συμμετέχει σε κάποια μεσαία έντασης μοριακή αλληλεπίδραση, είτε βρίσκεται σε πιο πολικό μικροπεριβάλλον, και η ζώνη στους 1630cm⁻¹ μπορεί να αποδοθεί σε μια φορμυλομάδα που σχηματίζει κάποιον ασθενή δεσμό υδρογόνου με κάποιο πεπτίδιο (Pascal et al. 2000). Η δημιουργία δεσμών υδρογόνου από τις φορμυλομάδες των Chl b κατά τη συσσωμάτωση του LHCII είναι καλά τεκμηριωμένη (Ruban et al. 1995; Pascal et al. 2000; Pascal et al. 2005).

Σε αντίθεση με τα φάσματα Raman των απομονωμένων Chls του πρώτου κεφαλαίου, η παρουσία της έντονης ν₁ ζώνης στα φάσματα Raman του LHCII, δεν επιτρέπει την παρακολούθηση των αλλαγών στην κρίσιμη για την κατάσταση συναρμογής των Chls περιοχή. Ωστόσο, σημαντικές ενδείξεις της αλλαγής της κατάστασης συναρμογής τους προέρχεται από την περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων. Μια τέτοια ένδειξη που δείχνει ότι κάποια Chl έχει μεταβεί στην έκτη κατάσταση συναρμογής είναι η μετατόπιση της ζώνης από τους 1615cm⁻¹ στους 1608cm⁻¹ (Robert 2004). Η μετατόπιση της ζώνης αυτής συμβαίνει μόνο από τη μεταχείριση με Spm και όχι από τα πρωτόνια και ως εκ τούτου αποτελεί ισχυρή ένδειξη ειδικής αλληλεπίδρασης με τη Spm (Εικόνα 71). Πιο συγκεκριμένα, ο νέος υποκαταστάτης του Mg θα μπορούσε να είναι μια Spm ή κάποιο γειτονικό αμινοξικό κατάλοιπο που έχει “πλησιάσει” τη Chl από τις αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση που προκάλεσε η Spm.

Το εν λόγω Mg που δημιουργεί τον έκτο δεσμό συναρμογής θα μπορούσε να ανήκει στη Chl 8 του LHCII (ή b3 Chl που εντοπίζεται σε LHCII, CP29 και CP26). Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, η περιοχή που προσδένει τη συγκεκριμένη Chl εμφανίζει δομική ομοιότητα με την αντίστοιχη περιοχή της αίμης στη μυοσφαιρίνη που διαμορφώνει τη θέση του μετάλλου στην αίμη. Η περιοχή αυτή μπορεί να προμηθεύει τον 6^ο προσδέτη στη Chl 8,

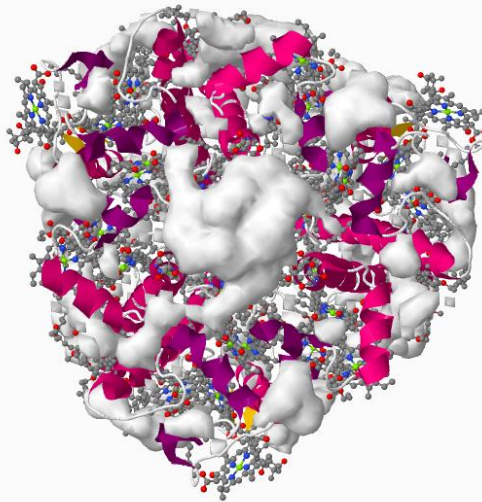
ο οποίος με τη σειρά του μπορεί να επηρεάζει τη θέση του Mg στον τετραπυρρολικό δακτύλιο. Έτσι, μια πιθανή ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτής της διατριβής (καθώς και προγενέστερων μελετών στο πεδίο της επαγωγής του qE από αμίνες και κατιόντα *in vitro*) είναι η εξής. Οι αμίνες, άμεσα (ως υποκαταστάτες του Mg, βλέπε «Κεφάλαιο 1») ή/και έμμεσα (μέσω της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνικών συμπλόκων) οδηγούν στην μετατόπιση του Mg μιας Chl (π.χ. Chl 8) εντός του τετραπυρρολικού δακτυλίου της, γεγονός που μειώνει το φθορισμό της και διακόπτει τη μεταφορά ενέργειας στο δίκτυο των Chls. Η δημιουργία αυτής της «μαύρης τρύπας» καταλήγει στην απόσβεση του φθορισμού όλου του LHCI. Με βάση αυτή τη λογική, η θετική κορυφή στα φάσματα απορρόφησης στα 470-600nm μπορεί να προέρχεται από την επανατοποθέτηση του Mg από μια θέση εκτός επιπέδου σε μια θέση εντός επιπέδου του τετραπυρρολικού δακτυλίου. Μια τέτοια Chl, όπως η Chl 8, με το κεντρικό μέταλλο εκτός δακτυλίου θα παρουσιάζει μεγάλο φθορισμό και μικρή απορρόφηση στην περιοχή των 535nm ενώ η ίδια Chl με το μέταλλο εντός δακτυλίου θα παρουσιάζει μειωμένο φθορισμό και υψηλότερη απορρόφηση στα 535nm.

Συνοψίζοντας, τα κυριότερα συμπεράσματα είναι τα εξής:

- Οι ΠΑς Put, Spd και Spm επάγουν την *in vitro* απόσβεση του φθορισμού των τριμερών LHCIΙ και των μονομερών LHCb συμπλόκων σε φυσιολογικές τιμές pH.
- Η αποτελεσματικότητά τους στην απόσβεση του φθορισμού των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων μειώνεται με τη σειρά Spm > Spd > Put.
- Η δράση τους μιμείται σε μεγάλο βαθμό αυτή των πρωτονίων κατά την οξίνιση του διαλύματος.
- Σε χαμηλό pH, τα πρωτόνια επάγουν μεγαλύτερη απόσβεση του φθορισμού των μονομερών συμπλόκων.
- Όσο μεταβαίνουμε σε πιο όξινες τιμές pH, η επίδραση των ΠΑς στην απόσβεση του φθορισμού των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων εξασθενεί ή αντιστρέφεται, επαναφέροντας τις τιμές της απόσβεσης (qF) σε φυσιολογικά επίπεδα.
- Οι ΠΑς επάγουν τη συσσωμάτωση των τριμερών LHCIΙ συμπλόκων.
- Η απόσβεση του φθορισμού του LHCIΙ συμβαίνει ταχύτατα μέσω της σάρωση των αρνητικών φορτίων στην επιφάνειά του από τη Spm και δεν προϋποθέτει τη δημιουργία μεγάλων συσσωματωμάτων, η οποία λαμβάνει χώρα μεταγενέστερα (σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Spm).
- Η συσσωμάτωση που επάγεται από τη Spm οδηγεί στη διαμόρφωση διάχυσης της ενέργειας του LHCIΙ, που απαντάται κατά την ενεργοποίηση του qE.
- Η Lut αποδεικνύεται ως ένας καλός αποσβέστης του φθορισμού των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων *in vitro* τόσο σε ουδέτερα όσο και σε όξινα pH.
- Συνδυασμός Lut και Spm προκαλεί σημαντικότερη μείωση του φθορισμού (85%) πιθανότατα μέσω συνεργιστικής δράσης.
- Η Zx αποδεικνύεται ως ένας κακός αποσβέστης του φθορισμού των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων *in vitro* τόσο σε ουδέτερα όσο και σε όξινα pH.

Κεφάλαιο 3

Ενσωμάτωση των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων σε λιποσώματα και μετρήσεις αγωγιμότητας σε πρωτόνια



Η Spm ρυθμίζει τη δίοδο των πρωτονίων διαμέσου του LHCII άμεσα και έμμεσα, μέσω της συσσωμάτωσής του.

Στην εικόνα: Η τρισδιάστατη δομή του τριμερούς συμπλόκου του LHCII του μπιζελιού όπως φαίνεται από την πλευρά του στρώματος και προέκυψε από κρυσταλλογραφική ανάλυση στα 2,5Å. Με λευκό χρώμα οι κοιλότητες που σχηματίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές αυτής της επιφάνειας από τη στερεοδιαμόρφωση των διαμεμβρανικών ελίκων και των χρωστικών που φέρουν. Με ροζ χρώμα οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Με γκρι, μπλε, κόκκινο και πράσινο χρώμα τα άτομα άνθρακα, αζώτου, οξυγόνου και μαγνησίου των φωτοσυνθετικών χρωστικών αντίστοιχα. Πηγή: RCSB Protein Data Bank (pdb entry: 2BHW).

Κεφάλαιο 3

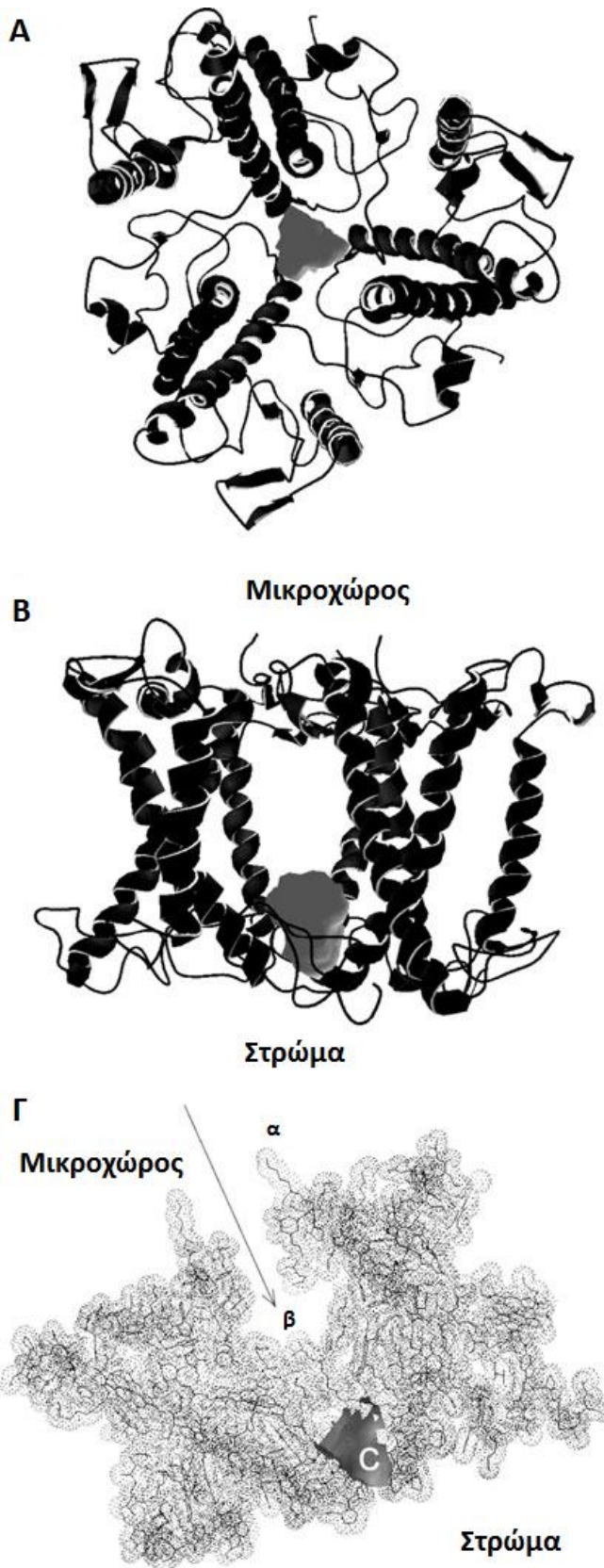
Ενσωμάτωση των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων σε λιποσώματα και μετρήσεις αγωγιμότητας σε πρωτόνια

Εισαγωγή

Από τα *in vitro* πειράματα του προηγούμενου κεφαλαίου προέκυψε ότι πρωτίστως η Spm επάγει τη συσσωμάτωση των συμπλόκων της κεραίας και αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωσή τους προάγοντας την μη-φωτοχημική διάχυση της ενέργειας. Αυτό το πετυχαίνει εξουδετερώνοντας τα αρνητικά φορτία στην επιφάνεια τους και δημιουργώντας, άμεσα ή έμμεσα, νέους δεσμούς στα μόρια των Chls. Σε μεγάλο βαθμό η δράση της μιμείται αυτή των πρωτονίων κατά την οξίνιση του διαλύματος. Ένα πολύ σημαντικό ζήτημα ήταν και παραμένει το πώς και που δρουν τα πρωτόνια *in vivo* και πυροδοτούν το qE. Έχει προταθεί ότι ο μηχανισμός του qE δεν προκαλείται απευθείας από το χαμηλό pH του μικροχώρου, αλλά από μια μη ευαίσθητη στη διβουκαϊνη περιοχή που εντοπίζεται στο LHCI και στην οποία συσσωρεύονται πρωτόνια (Horton et al. 1996). Συμπληρωματικά στοιχεία κάνουν λόγο για μια H⁺ περιοχή στο LHCI η οποία εξαλείφεται μετά από μεταχείριση των θυλακοειδών με υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (Renganathan and Dilley 1994). Από τότε, χρειάστηκε να περάσει μια δεκαετία, ώστε η δομή του τριμερούς LHCI να είναι διαθέσιμη σε υψηλή ευκρίνεια (2.5 Å), τέτοια που να επιτρέπει τον εντοπισμό πιθανών H⁺ περιοχών στο LHCI (Standfuss et al. 2005). Πρόσφατα, *in silico* ανάλυση της δομής του τριμερούς LHCI από μπιζέλι, ανέδειξε συγκεκριμένες κοιλότητες και εσοχές οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελούν περιοχές πρωτονίων (ή/και πυρήνες συσσωμάτωσης) και είναι αρκετά μεγάλες ώστε να εισχωρήσει ένα μόριο Spd ή Spm (όγκος > 150 Å³) (Ioannidis et al. 2011).

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 79 δύο μόνο περιοχές είναι ικανές να «φιλοξενήσουν» ΠAs. Η πρώτη είναι μια μεγάλη κοιλότητα 599 Å³ κοντά στην εκτεθειμένη στο στρώμα επιφάνεια του τριμερούς (Εικόνα 79A, B). Όλες οι άλλες κοιλότητες που εντοπίστηκαν είχαν όγκο μικρότερο των 60 Å³ καθώς η πρωτεϊνική δομή στις συγκεκριμένες περιοχές προσδένει πολλά μόρια χρωστικών. Η δεύτερη είναι μια ακόμα μεγαλύτερη εκτεθειμένη στο μικροχώρο εσοχή η οποία σχηματίζεται στο κέντρο του τριμερούς (Εικόνα 79Γ). Είναι εξίσου πιθανό, οι περιοχές αυτές να επιτελούν άλλες λειτουργίες που δε σχετίζονται άμεσα με τις ΠAs. Για

παράδειγμα, η εσοχή θα μπορούσε να είναι η θέση πρόσδεσης ενζύμων του μικροχώρου,



όπως η απεποξειδάση της βιολαξανθίνης. Αλλά θα μπορούσε ακόμα και να αποτελεί ένα ψευδο-πόρο ενός καναλιού ιόντων, όπως έχει προταθεί ότι αποτελεί το LHCII (Wardak et al. 2000; Iwaszko et al. 2004). Όπως υποδεικνύεται στην Εικόνα 79Γ με το γράμμα β, η εσοχή αυτή είναι αρκετά μεγάλη ώστε να επιτρέπει την είσοδο μεγάλου αριθμού πρωτονίων από το μικροχώρο βαθιά μέσα στο κέντρο του τριμερούς. Η δομή αυτή αυξάνει την επιφάνεια του LHCII που μπορεί να αλληλεπιδρά με τα συστατικά του μικροχώρου και μειώνει την απόσταση ανάμεσα στο μικροχώρο και το στρώμα. Η μείωση του φραγμού των δύο πλευρών της μεμβράνης από τις δύο αυτές περιοχές διευκολύνει το σχηματισμό κυκλωμάτων πρωτονίων. Αξιοσημείωτες είναι οι τρεις εύκαμπτες πλευρικές αλυσίδες καταλοίπων λυσίνης (μία από αυτές υποδεικνύεται με το

Εικόνα 79. In silico υπολογισμοί των κοιλοτήτων του τριμερούς LHCII και αναπαράσταση των δομών τους από τους Ioannidis et al., (2011). Α. Άποψη του τριμερούς LHCII από την πλευρά του στρώματος. Μόνο κοιλοότητες μεγαλύτερες των 60Å υποδεικνύονται με γκρι χρώμα. Οι διαμεμβρανικές έλικες δίνονται με μαύρο χρώμα. Β. Πλευρική άποψη του LHCII (στο επίπεδο της μεμβράνης) και η κοιλοότητα (γκρι χρώμα). Γ. Η εσοχή του LHCII (β) που είναι προσβάσιμη από το μικροχώρο και απέχει μόλις 7Å περίπου από την κοιλοότητα (Cavity) που υποδεικνύεται με το γράμμα C. Εύκαμπτες πλευρικές αλυσίδες (α) στην πλευρά του μικροχώρου μπορεί να ρυθμίζουν το μέγεθος του πόρου.

γράμμα α στην Εικόνα 79Γ), που μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην είσοδο της εσοχής. Έχει προταθεί ότι τα αμινικά μόρια, όπως η Spm (MB 202.3) και η διβουκαΐνη (343.4) ενδεχομένως εισέρχονται στις περιοχές αυτές και δημιουργούν κέντρα απόσβεσης της ενέργειας (Ioannidis et al. 2011).

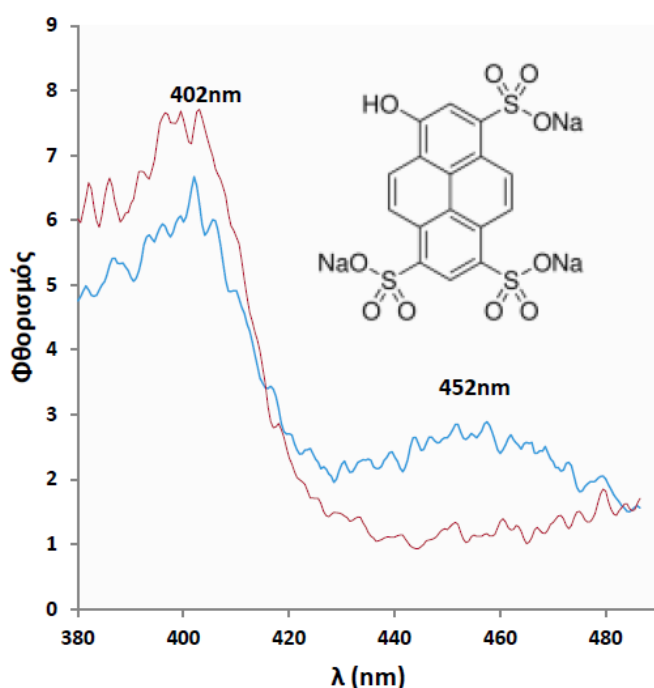
Έτσι, στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η μελέτη της ικανότητας του LHCIΙ να λειτουργεί ως κανάλι μεταφοράς πρωτονίων, καθώς και ο ρόλος των ΠΑΣ στη μεταφορά πρωτονίων. Αν περνούν πρωτόνια (και ιόντα γενικά) δια μέσω του καναλιού αυτού, τότε η Spm θα μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητές του προσδεδεμένη εκεί. Αν όντως το LHCIΙ αποτελεί διάυλο ανάμεσα στο στρώμα και το μικροχώρο, όπως δείχνουν άλλωστε προηγούμενες μελέτες (Iwaszko et al. 2004), τότε το μοντέλο λειτουργίας του μηχανισμού qE θα μπορούσε να εμπλουτιστεί και να στηθεί σε νέες βάσεις. Όσο αφορά τη δράση των ΠΑΣ και ειδικά της Spm, αυτές είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν πληθώρα καναλιών ιόντων και κατ' επέκταση την ομοιοστασία των κυττάρων σε Ca^{2+} , Na^{+} και K^{+} (βλέπε «Εισαγωγή», σχετική ενότητα). Άρα, εύλογα, θα περίμενε κανείς να έχουν κάποια επίδραση στις ιδιότητες και του συγκεκριμένου καναλιού.

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικότερα στην κύρια εισαγωγή της διατριβής, μελέτες με [^{14}C]DCCD έδειξαν την προτίμησή του στην πρόσδεση των CP26 και CP29 (Walters et al. 1994), παρότι το τριμερές LHCIΙ παρουσιάζει μεγαλύτερη χωρητικότητα σε πρωτόνια όντας σε κατάσταση απόσβεσης *in vitro* (Zolotareva et al. 1999). Επειδή τα κατάλοιπα των μονομερών συμπλόκων δε μπορούν να περικλείσουν ολόκληρη την περιοχή των πρωτονίων, προτάθηκε ότι ενδεχομένως αποτελούν τμήματα ενός καναλιού πρωτονίων που συνδέεται με την περιοχή του qE, η οποία βρίσκεται κάπου αλλού στο PS II. Για αυτόν τον λόγο, εκτός από το τριμερές LHCIΙ, στις μελέτες διαπερατότητας και αγωγιμότητας του παρόντος κεφαλαίου συμπεριλήφθηκαν αντίστοιχες για τα μονομερή σύμπλοκα της κεραίας. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν εφικτές με την κατασκευή μεμβρανικών συστημάτων, όπως τα λιποσώματα και την ενσωμάτωση σε αυτά των απομονωμένων και λειτουργικών συμπλόκων της κεραίας, σε μια προσπάθεια προσομοίωσης *in vitro* των *in vivo* συνθηκών στη μεμβράνη των θυλακοειδών.

Αποτελέσματα

1. Παρακολούθηση πρωτονιοκινητικής δύναμης στα λιποσώματα

Για τη μελέτη της αγωγιμότητας των λιποσωμάτων σε πρωτόνια επιλέχθηκε 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.

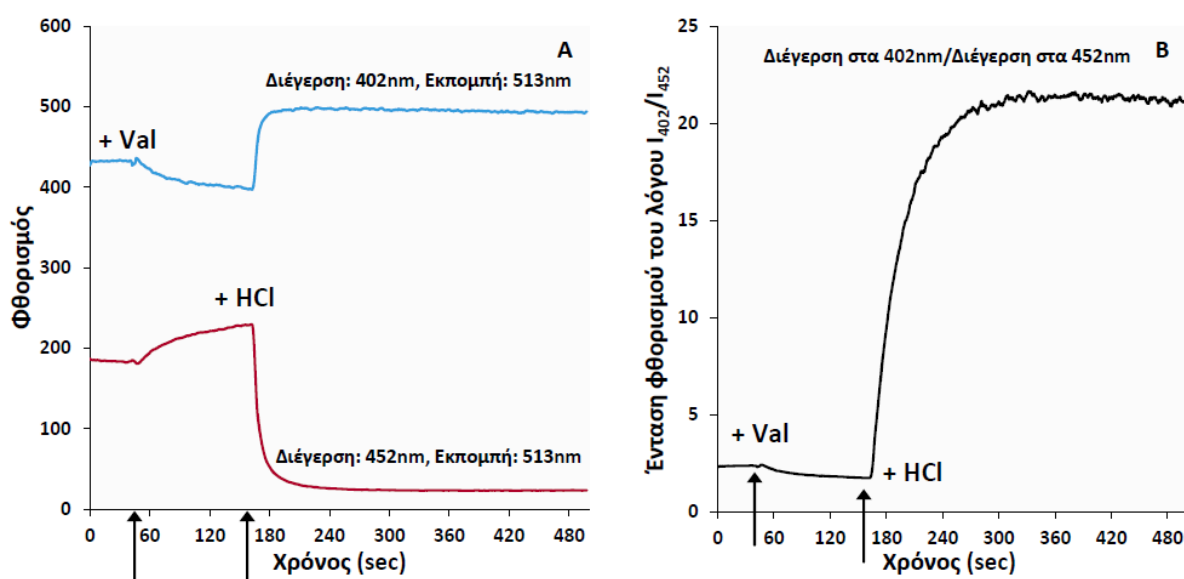


Εικόνα 80. Φάσματα διέγερσης φθορισμού της PTS σε ελαφρώς όξινο διάλυμα (μπλε γραμμή) και σε όξινο διάλυμα (κόκκινη γραμμή). Το μήκος κύματος εκπομπής φθορισμού ήταν 513nm. Όσο τα επίπεδα του pH μεταβαίνουν σε μικρότερες τιμές, αυξάνεται η διέγερση της πρωτονιωμένης κορυφής στα 402nm και ταυτόχρονα μειώνεται η διέγερση της μη-πρωτονιωμένης κορυφής στα 452nm. Η μοριακή δομή της χρωστικής παρουσιάζεται πάνω αριστερά.

Μετά από εκτενή βιβλιογραφική έρευνα φάνηκε ότι η πυρανίνη (8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt ή PTS) 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; Iwazsko 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 μήκος κύματος εκπομπής φθορισμού τα 513nm, μακριά από την περιοχή εκπομπής φθορισμού των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων

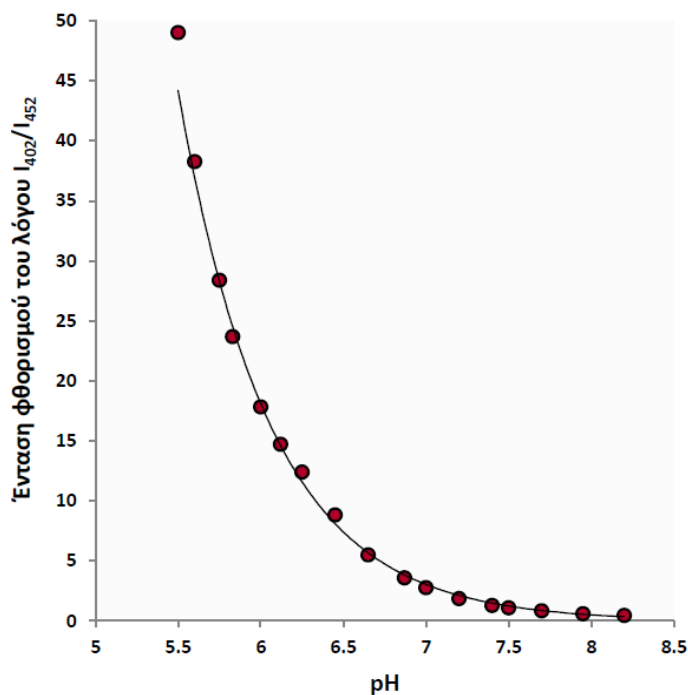
(681nm). Το φάσμα απορρόφησής της περιλαμβάνει δύο κορυφές μία στα 402nm που αντιστοιχεί στην πρωτονιομένη μορφή της και μία στα 452nm που αντιστοιχεί στη μη-πρωτονιομένη μορφή της (Εικόνα 80). Έτσι, παρατηρώντας το λόγο της έντασης του

φθορισμού I_{402}/I_{452} μπορούν να εξαχθούν 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 (New 1990; Zignani et al. 2000). Τα λιποσώματα δημιουργούνται παρουσία της πυρανίνης ενώ η απομάκρυνση της ελεύθερης πυρανίνης, που δεν έχει εγκλωβιστεί στα λιποσώματα, απομακρύνεται εύκολα με χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή (βλέπε «Μέθοδοι και υλικά», σχετική ενότητα). Επιπλέον, η διαρροή είναι ελάχιστη ενώ τα χαρακτηριστικά της χρωστικής μέσα στα λιποσώματα δεν αλλοιώνονται σημαντικά σε σχέση με αυτά της ελεύθερης χρωστικής.



Εικόνα 81. Η φθορισμομετρική παρακολούθηση της διακίνησης των πρωτονίων στο εσωτερικό των λιποσωμάτων και πρωτεολιποσωμάτων. Α. Διατηρώντας σταθερό το μήκος κύματος εκπομπής φθορισμού της PTS στα 513nm, καταγράφηκαν ξεχωριστά τα επίπεδα της διέγερσής της στα 402 και 452nm στην πορεία του χρόνου (Time drive φάσματα φθορισμού). Β. Η διαίρεση των δύο φασμάτων, δηλαδή ο λόγος της έντασης φθορισμού στα 402nm προς αυτή στα 452nm, δίνει την κινητική πρωτονίωσης της παγιδευμένης στο εσωτερικό των λιποσωμάτων PTS. 40sec μετά την έναρξη της μέτρησης προστέθηκε βαλινομυκίνη (Val) και σε χρόνο 160sec μικρή ποσότητα HCl, όπως υποδεικνύεται με τα κάθετα βέλη.

Όλες οι μετρήσεις αγωγιμότητας των λιποσωμάτων και πρωτεολιποσωμάτων σε πρωτόνια που περιγράφονται στις επόμενες ενότητες του κεφαλαίου, έγιναν σε δύο βήματα. Διατηρώντας σταθερό το μήκος κύματος εκπομπής φθορισμού της παγιδευμένης PTS στα 513nm, καταγράφηκαν σε ξεχωριστές μετρήσεις αρχικά η ενίσχυση του σήματος διέγερσής της στα 402nm μετά την οξίνιση του διαλύματος και έπειτα η μείωση του σήματός της διέγερσης στα 452nm. Η κινητική της πρωτονίωσης της PTS προήλθε από το λόγο των δύο σημάτων (I_{402}/I_{452}) σε κάθε χρονική στιγμή των μετρήσεων (Εικόνα 81). Στα 160sec από την έναρξη της καταγραφής προστέθηκαν τα πρωτόνια ενώ νωρίτερα, στα 40sec, για την



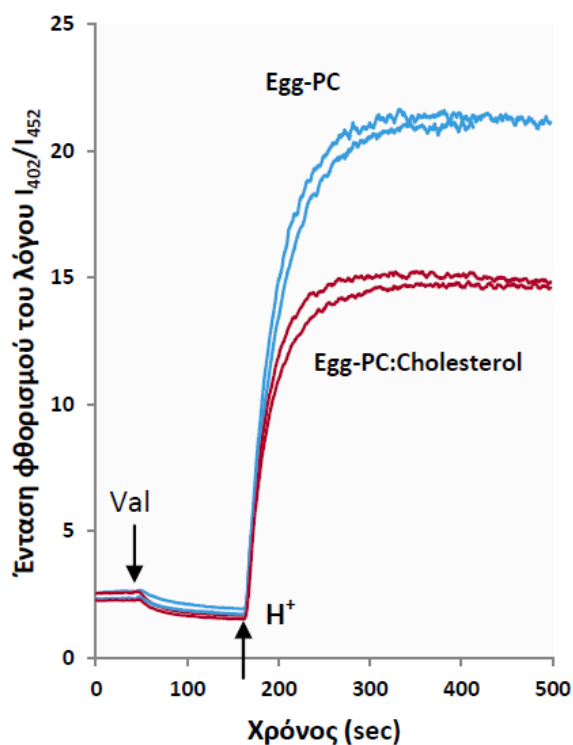
Εικόνα 82. pH-μετρική καμπύλη τιτλοδότησης του δείκτη πυρανίνη. Ο λόγος I_{402}/I_{452} αυξάνεται με τη μείωση του pH. Η συγκέντρωση της PTS ήταν στα 0,2μΜ. Το μήκος κύματος εκπομπής φθορισμού ήταν 513nm και τα παράθυρα διέγερσης και εκπομπής 5nm.

στο διάλυμα της κυψελίδας δεν ξεπερνούσε σε καμία περίπτωση τα 2,25mM. Η ακριβέστερη εκτίμηση των επιπέδων του pH στο εσωτερικό των λιποσωμάτων και πρωτεολιποσωμάτων μετά την οξίνιση, προήλθε από τη σύγκριση του λόγου I_{402}/I_{452} των μετρήσεων με μια σταθερή καμπύλη τιτλοδότησης του ίδιου λόγου που έγινε με ελεύθερη χρωστική όμοιας συγκέντρωσης με αυτή που περικλείεται εντός των λιποσωμάτων (Εικόνα 82). Όπως φαίνεται, η χρωστική είναι πλήρως αποπρωτονιωμένη σε τιμές pH μεγαλύτερες του 8, ενώ ο λόγος της έντασης φθορισμού I_{402}/I_{452} αυξάνεται σχεδόν γραμμικά κάτω από την τιμή pH 6,5.

2. Μετρήσεις διαπερατότητας των πρωτεολιποσωμάτων σε πρωτόνια

Ένα σύνηθες πρόβλημα σε τέτοιου είδους μετρήσεις αγωγιμότητας, όπου τα τελικά παρασκευάσματα προκύπτουν μετά από αρκετά στάδια ενός απαιτητικού πρωτοκόλλου και κάθε φορά από την αρχή, είναι η επαναληψιμότητά τους. Ένας βασικός παράγοντας που έπρεπε να ληφθεί υπόψη ήταν η σταθερότητα των τεχνητά κατασκευασμένων μεμβρανικών δομών και η μέγιστη δυνατή αδιαπερατότητά τους σε πρωτόνια και ιόντα. Γνωρίζοντας ότι τα λιποσώματα που προκύπτουν από λιπίδια φωσφατιδυλοχολίνης (Egg-PC) δεν είναι τέλειες κλειστές δομές, χρησιμοποιήθηκε ένα μείγμα λιπιδίων από Egg-PC και χοληστερόλη σε μοριακή αναλογία 9:1 (για το πρωτόκολλο παρασκευής των λιποσωμάτων βλέπε «Μέθοδοι και υλικά», σχετική ενότητα). Η χοληστερόλη «μπάλωσε» τα ανοίγματα στην επιφάνεια των

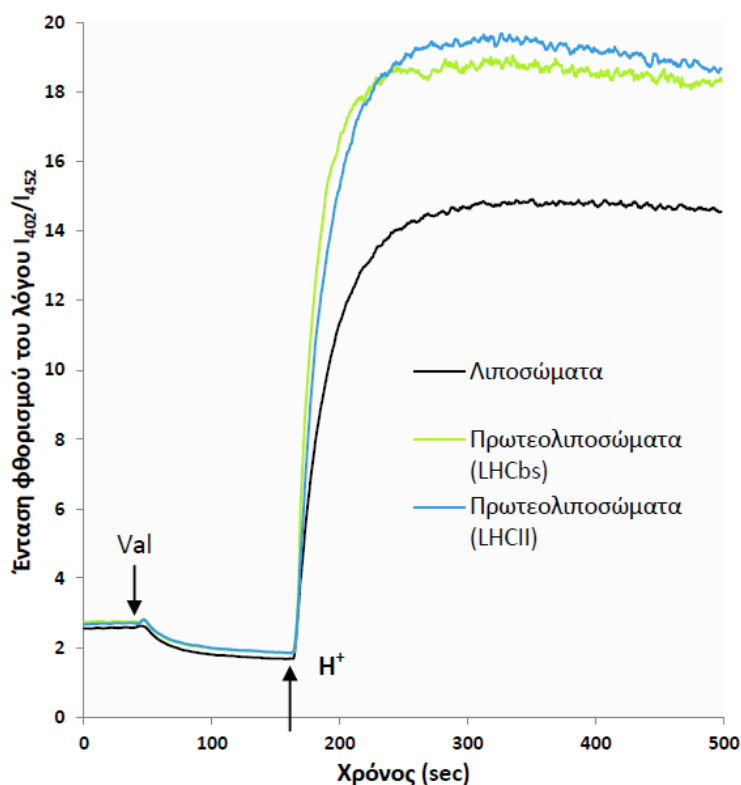
αποφυγή ηλεκτροστατικού φραγμού κατά τη διακίνησή τους, είχε προστεθεί ελάχιστη ποσότητα Βαλινομυκίνης (Valinomycin ή Val). Η προσθήκη Val μείωσε το λόγο I_{402}/I_{452} υποδεικνύοντας την έξοδο πρωτονίων από το εσωτερικό των λιποσωμάτων καθώς εισέρχονται ιόντα K^+ . Η ποσότητα HCl που χρησιμοποιήθηκε ώστε να μεταβάλλει το pH του διαλύματος από το 7,5 στο 5,7 καθορίζονταν κάθε φορά με διάφορες δοκιμές επί του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους και η τελική συγκέντρωσή του



Εικόνα 83. Μετρήσεις αγωγιμότητας σε λιποσώματα παρασκευασμένα από Egg-PC (μπλε γραμμές) και παρασκευασμένα από Egg-PC και χοληστερόλη σε μοριακή αναλογία 9:1 (κόκκινες γραμμές). Η παρουσία χοληστερόλης μειώνει αισθητά τη διαπερατότητα της μεμβράνης σε πρωτόνια (H^+). Δύο μετρήσεις από κάθε μεταχείριση αναπαριστώνται με το ίδιο χρώμα.

Τα πειράματα με τα λιποσώματα ανέδειξαν μια αξιοσημείωτη αύξηση της ικανότητάς τους να άγουν πρωτόνια όταν αυτά έφεραν ενσωματωμένα τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της κεραίας. Τόσο τα τριμερή LHCIΙ όσο και τα μονομερή LHCb σύμπλοκα αύξησαν τη διαπερατότητα των λιποσωμάτων, όπως προκύπτει από τη μεγαλύτερη και γρηγορότερη μείωση του pH στο εσωτερικό τους (Εικόνα 84). Σύμφωνα με την pH-μετρική καμπύλη της Εικόνας 82, το αρχικό διάλυμα στο εσωτερικό των λιποσωμάτων και των πρωτεολιποσωμάτων ξεκινάει από τιμές pH κοντά στο 7,3 (όπου σταθεροποιείται μετά την προσθήκη της Val). Μετά την οξίνιση του διαλύματος, ο λόγος I_{402}/I_{452} της χρωστικής στο εσωτερικό τους σταθεροποιείται στις 14,8 μονάδες για τα λιποσώματα που αντιστοιχούν σε τιμές pH κοντά στο 6,15 (Εικόνα 84). Ο ίδιος λόγος για τα πρωτεολιποσώματα που έφεραν ενσωματωμένα LHCIΙ και LHCb σύμπλοκα άγγιξε τις 19,7 και 19 μονάδες αντίστοιχα, που αντιστοιχούν σε τιμές pH κοντά στο 5,95 (Εικόνα 84). Η παρατηρούμενη αύξηση της πρωτονιακής διαπερατότητας των πρωτεολιποσωμάτων σε σχέση με τα λιποσώματα ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις κοντά στο 40%.

λιποσωμάτων και των πρωτεολιποσωμάτων και τους προσέδωσε μεγαλύτερη σταθερότητα. Η παρουσία χοληστερόλης μείωσε κατά 25-35% τη διαπερατότητα του μάρτυρα, την είσοδο των πρωτονίων στο εσωτερικό των λιποσωμάτων που δεν έφεραν ενσωματωμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα (Εικόνα 83). Στην Εικόνα 83 παρουσιάζονται δύο επαναλήψεις για κάθε περίπτωση, που είναι ενδεικτικές των μικρών συνήθως διαφορών που παρουσιάστηκαν μεταξύ των ίδιων μεταχειρίσεων. Παρόλα αυτά, οι διαφορές αυτής της τάξης μεγέθους δεν επηρεάζουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, ενώ σε κάθε περίπτωση οι μετρήσεις που ακολουθούν επιλέχθηκαν ως οι πιο χαρακτηριστικές της κάθε μεταχείρισης, που πλησιάζουν περισσότερο στο μέσο όρο.



Εικόνα 84. Μεταφορά πρωτονίων διαμέσου λιποσωμάτων και πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα τριμερή LHCII και μονομερή LHCb πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Οι κινητικές προέρχονται από την καταγραφή του ρυθμού πρωτονίωσης της PTS στο εσωτερικό τους. Η μεγαλύτερη αύξηση του λόγου I_{402}/I_{452} στα πρωτεολιποσώματα υποδεικνύει την είσοδο περισσότερων πρωτονίων (H^+) στο εσωτερικό τους διαμέσου των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων. Από την απλή εκθετική προσαρμογή των πρώτων 50 s μετά την οξίνιση υπολογίστηκαν οι αγωγιμότητες των μεμβρανών σε πρωτόνια (g_{H^+}). Οι τιμές g_{H^+} για τα λιποσώματα, τα πρωτεολιποσώματα (LHCII) και τα πρωτεολιποσώματα (LHCbs) ήταν $2,5 \pm 0,13$, $2,75 \pm 0,06$ και $3,0 \pm 0,09$ αντίστοιχα. Οι τιμές και τα \pm σφάλματα προήλθαν από 2-4 επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση.

(min). Για τον υπολογισμό της g_{H^+} αγωγιμότητας των μεμβρανών σε πρωτόνια χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση $g_{H^+} = 1 / \tau$. Η παρουσία των LHCII και LHCb συμπλόκων στις μεμβράνες αύξησε την αγωγιμότητά τους κατά 10% και 20% αντίστοιχα (για τις τιμές g_{H^+} βλέπε λεζάντα Εικόνας 84).

Όμοιες μετρήσεις παρακολούθησης του φθορισμού στα 513nm διεγείροντας στα 402nm αλλά και στα 440nm πραγματοποιήθηκαν με πρωτεολιποσώματα που δεν περιείχαν στο εσωτερικό τους πυρανήνη. Τα επίπεδα του φθορισμού που καταγράφηκαν ήταν μηδενικά και επομένως ο φθορισμός από την παρουσία των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων δεν επηρεάζει στο ελάχιστο τις μετρήσεις αγωγιμότητας (δεδομένα δεν παρατίθενται).

Ωστόσο, αν και από τα τελικά επίπεδα του φθορισμού προκύπτει ότι εισέρχεται διαμέσου των συμπλόκων περίπου ίδιος αριθμός πρωτονίων, παρατηρείται μια διαφοροποίηση στην κινητική της εισόδου. Πιο συγκεκριμένα, τα πρωτόνια φαίνεται ότι εισέρχονται πιο γρήγορα (υψηλότερες τιμές g_{H^+}) στο εσωτερικό των πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα μονομερή LHCb σύμπλοκα από ότι στο εσωτερικό των

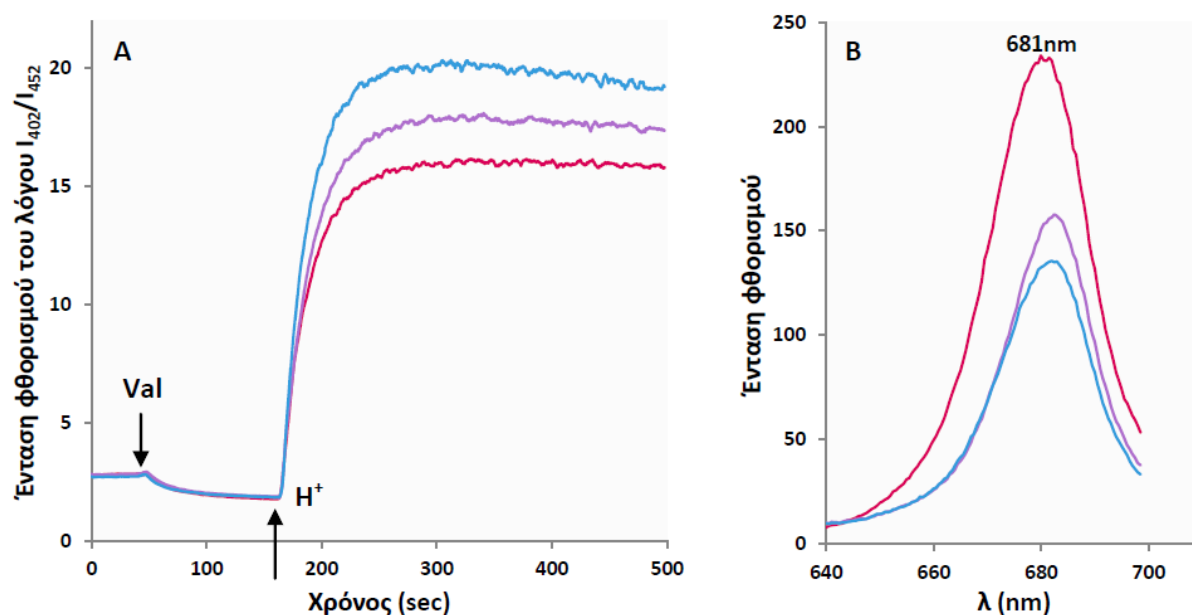
πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα τριμερή LHCII σύμπλοκα. Η μονή εκθετική προσαρμογή της γρήγορης φάσης του φαινομένου που διαρκεί για περίπου 50sec από τη στιγμή της οξίνισης, έδωσε την παράμετρο τ

3. Επίδραση της κατάστασης συσσωμάτωσης του LHCII στη διαπερατότητα των πρωτεολιποσωμάτων

Δύο βήματα του πρωτοκόλλου παρασκευής των πρωτεολιποσωμάτων είναι πολύ κρίσιμα για τα επίπεδα συσσωμάτωσης των συμπλόκων που ενσωματώνονται σε αυτά. Το ένα είναι η επώαση των πρωτεϊνικών συμπλόκων με ειδικά προσροφητικά σφαιρίδια πολυστυρενίου (SM-2 Biobeads) πριν την ανάμειξή τους με τα λιποσώματα για το σχηματισμό πρωτεολιποσωμάτων και το δεύτερο είναι η διαλυτοποίηση των λιποσωμάτων από την προσθήκη 0,65mM β -DM (για το αναλυτικό πρωτόκολλο, βλέπε «Μέθοδοι και υλικά», σχετική ενότητα). Η απομάκρυνση του β -DM από το αρχικό διάλυμα των πρωτεϊνικών συμπλόκων, αλλά και η παρουσία 50mM KCl στο τελικό διάλυμά τους οδήγησε στη μερική συσσωμάτωσή τους με αποτέλεσμα να εντοπίζονται στα πρωτεολιποσώματα εκτός από μονομερή ή τριμερή μορφή και σε ολιγομερή. Αυτό έγινε κατανοητό από τα μειωμένα επίπεδα του φθορισμού των πρωτεολιποσωμάτων στα 681nm σε σχέση με πρωτεολιποσώματα που περιείχαν σύμπλοκα με μικρότερα ποσοστά συσσωμάτωσης. Από το κεφάλαιο 2 είναι γνωστό ότι η συσσωμάτωση των συμπλόκων οδηγεί στην απόσβεση του φθορισμού τους. Διαφορετικά επίπεδα διαλυτοποίησης των ενσωματωμένων συμπλόκων επιτεύχθηκαν είτε αποφεύγοντας την προεπώασή τους με τα προσροφητικά σφαιρίδια, είτε αλλάζοντας επιπλέον ελαφρώς τη συγκέντρωση του απορρυπαντικού στο διάλυμα των προσχηματισμένων λιποσωμάτων.

Στην Εικόνα 85 παρουσιάζονται οι κινητικές διαπερατότητας σε πρωτόνια και τα επίπεδα του φθορισμού στα 681nm πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα LHCII σύμπλοκα σε διαφορετικά στάδια συσσωμάτωσης. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση της κατάστασης συσσωμάτωσης στην ικανότητα των συμπλόκων να άγουν πρωτόνια. Όταν το πρωτόκολλο παρασκευής των πρωτεολιποσωμάτων ακολουθήθηκε κατά γράμμα (κατάσταση μερικής συσσωμάτωσης LHCII συμπλόκων), η διαπερατότητά τους ήταν σε υψηλά επίπεδα ενώ ο φθορισμός τους σε χαμηλά επίπεδα (Μπλε γραμμή, Εικόνα 85). Αντίθετα, όταν το διάλυμα του LHCII δεν είχε επωαστεί με τα προσροφητικά σφαιρίδια (LHCII σύμπλοκα σε τριμερή μορφή), η διαπερατότητά τους σε πρωτόνια ήταν ασθενής, λίγο πάνω από τα επίπεδα του μάρτυρα, ενώ ο φθορισμός τους σε υψηλά επίπεδα (Ροζ γραμμή, Εικόνα 85). Τέλος, μια ενδιάμεση κατάσταση δημιουργήθηκε όταν τα LHCII σύμπλοκα δεν επώαστηκαν με τα προσροφητικά σφαιρίδια και μειώθηκε στο μισό (0,3mM) η συγκέντρωση του β -DM στο διάλυμα των λιποσωμάτων με το οποίο αναμείχθηκαν (Μωβ γραμμή, Εικόνα 85). Είναι

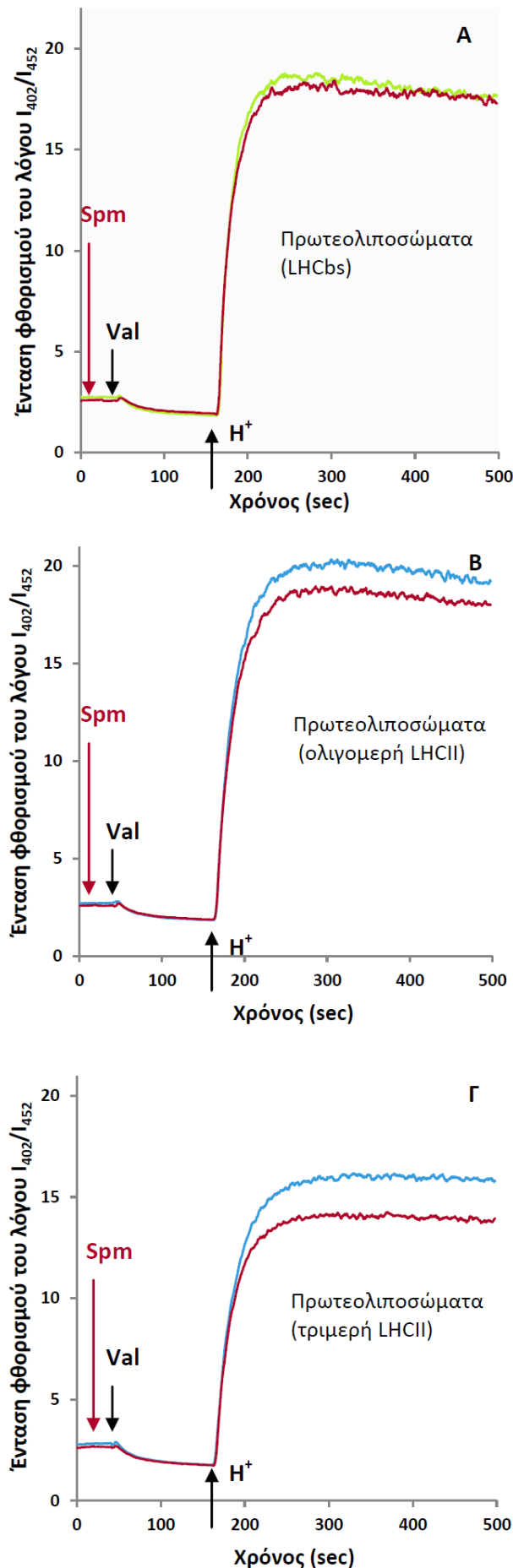
φανερό ότι όσο αυξάνεται η κατάσταση συσσωμάτωσης του LHCII στις μεμβράνες, αυξάνεται και η διαπερατότητά τους σε πρωτόνια.



Εικόνα 85. Α. Μεταφορά πρωτονίων διαμέσου πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα τριμερή LHCII σε κατάσταση μερικής συσσωμάτωσης (μπλε γραμμή), σε κατάσταση διαλυτοποιημένων τριμερών συμπλόκων (ροζ γραμμή) και σε μια ενδιάμεση κατάσταση (μωβ γραμμή). Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν τις χρονικές στιγμές της προσθήκης βαλινομυκίνης (Val) και πρωτονίων (H^+) στο διάλυμα της κυψελίδας. Β. Η εκπομπή φθορισμού των πρωτεολιποσωμάτων στα 681nm έπειτα από διέγερση στα 402nm. Τα παράθυρα διέγερσης και εκπομπής ήταν 5nm. Τα επίπεδα του φθορισμού είναι αντιστρόφως ανάλογα της διαπερατότητας σε πρωτόνια.

4. Επίδραση Spm στη διαπερατότητα των πρωτεολιποσωμάτων

Οι μετρήσεις αγωγιμότητας των πρωτεολιποσωμάτων έδειξαν ότι τα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα της κεραίας μπορούν να λειτουργούν ως κανάλια μεταφοράς πρωτονίων. Επομένως, η Spm ενδεχομένως να επηρεάζει τις ιδιότητες των καναλιών αυτών προσδεδεμένη εκεί. Για τον έλεγχο της παραπάνω υπόθεσης, τα πειράματα επαναλήφθηκαν με την προσθήκη 100 μ M Spm στο εναιώρημα των σχηματισμένων πρωτεολιποσωμάτων στα 20sec από την έναρξη της καταγραφής του φθορισμού, δηλαδή πριν την προσθήκη της βαλινομυκίνης (40sec) και των πρωτονίων (160sec). Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάστηκαν μικρές αυξομειώσεις, σε γενικές γραμμές, η επίδραση της Spm (κάτω από αυτές τις συνθήκες) στην κινητική πρωτονίωσης της PTS και τα τελικά επίπεδα της πρωτονιωμένης χρωστικής στο εσωτερικό των λιποσωμάτων ήταν αμελητέα (δεδομένα δεν παρατίθενται). Ομοίως, η προσθήκη Spm δε διαφοροποίησε σημαντικά την τελική τιμή του pH στο εσωτερικό των πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα LHCbs (Εικόνα 86Α). Για να εξεταστεί η υπόθεση ότι η Spm εισχωρεί σε συγκεκριμένες εσοχές ή/και κοιλότητες του τριμερούς LHCII, μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης της σε πρωτεολιποσώματα που



Εικόνα 86. Μεταφορά πρωτονίων διαμέσου πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα μονομερή LHCbs (A) και πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα LHCII σύμπλοκα μερικώς συσσωματωμένα (B) και πλήρως διαλυτοποιημένα (Γ) απουσία και παρουσία 100μM Spm (κόκκινες γραμμές στα A,B και Γ). Η προσθήκη της Spm (100μM) στο διάλυμα έγινε στα 20sec, όπως υποδεικνύεται με τα κόκκινα βέλη. Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν τις χρονικές στιγμές της προσθήκης βαλινομυκίνης (Val) και πρωτονίων (H⁺) στο διάλυμα της κυψελίδας. Απουσία Spm, οι τιμές g_{H^+} των πρωτεολιποσωμάτων στα A, B και Γ ήταν $3,0 \pm 0,09$, $2,75 \pm 0,06$ και $2,71$ αντίστοιχα. Παρουσία Spm, οι τιμές g_{H^+} των πρωτεολιποσωμάτων στα A, B και Γ ήταν $2,76 \pm 0,15$, $3,15 \pm 0,29$ και $3,1$ αντίστοιχα. Οι τιμές με τα \pm σφάλματα προήλθαν από 2-4 επαναλήψεις από κάθε μεταχείριση.

έφεραν διαλυτοποιημένα τριμερή LHCII αλλά και σε πρωτεολιποσώματα με ενσωματωμένα μερικώς συσσωματωμένα LHCII, λόγω της προεπάσής τους με τα προσροφητικά σφαιρίδια. Η Spm φάνηκε να μειώνει κατά 8% τη διαπερατότητα των πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα μερικώς συσσωματωμένα LHCII σύμπλοκα (Εικόνα 86B). Η μείωση αυτή ήταν ακόμα μεγαλύτερη στην περίπτωση των διαλυτοποιημένων τριμερών συμπλόκων και έφτανε το 14% (Εικόνα 86Γ).

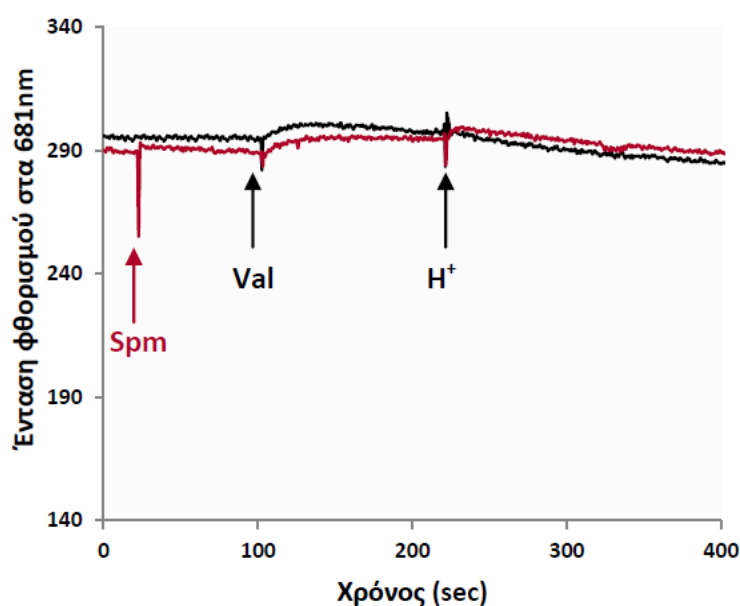
Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η επίδραση της Spm στη g_{H^+} αγωγιμότητα των μεμβρανών σε πρωτόνια. Η g_{H^+} αγωγιμότητα των λιποσωμάτων παρουσία Spm αυξήθηκε κατά 12% ενώ των πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα είτε διαλυτοποιημένα είτε μερικώς συσσωματωμένα LHCII κατά 16%. Μόνο στην περίπτωση των πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα LHCbs η Spm

προκάλεσε μείωση της g_{H^+} αγωγιμότητάς τους κατά 8%.

Όπως φάνηκε από τα παραπάνω, η Spm εμποδίζει σε κάποιο βαθμό τη μεταφορά των πρωτονίων μόνο διαμέσου των LHClI συμπλόκων. Η διαφοροποίηση αυτή θα μπορούσε να υποστηρίξει τη θεωρία της ειδικής μεταφοράς πρωτονίων διαμέσου κάποιου καναλιού που σχηματίζεται στα τριμερή LHClI από υπάρχουσες κοιλότητες και εσοχές, στις οποίες η Spm μπορεί να εισχωρήσει ευκολότερα όταν τα τριμερή σύμπλοκα δεν είναι

συσσωματωμένα. Αν και τα αποτελέσματα αυτά έχουν εξαιρετική σημασία για τη ρύθμιση του qE *in vivo*, λείπει πληροφορία σχετικά με τη δημιουργία κάποιου κέντρου διάχυσης της ενέργειας από τη Spm εντός ή εκτός του καναλιού αυτού.

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φθορισμού στα 681nm πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα LHClI, χωρίς PTS στο εσωτερικό τους. Ο φθορισμός εκπομπής της Chl a στα 681nm μετά από διέγερση στα 440nm, προέρχεται αποκλειστικά από τη διέγερση των Chl a και b των LHClI συμπλόκων. Τα αποτελέσματα του 2^{ου} κεφαλαίου έδειξαν ότι η προσθήκη Spm επάγει τη συσσωμάτωση των συμπλόκων που οδηγεί στην απόσβεση του φθορισμού τους, μιμούμενη σε μεγάλο βαθμό την προσθήκη πρωτονίων. Όπως φαίνεται όμως στην Εικόνα 87, ούτε η προσθήκη Spm στα 20sec, αλλά ούτε η προσθήκη οξέος στα 220sec επηρέασαν σημαντικά τα επίπεδα του φθορισμού των τριμερών LHClI, που διατηρούν την ακεραιότητά τους μέσα στο λιπιδικό περιβάλλον. Απουσία έντονου ολιγομερισμού των συμπλόκων, καθίσταται λοιπόν μάλλον αδύνατη η δημιουργία κάποιου κέντρου απόσβεσης της ενέργειας.



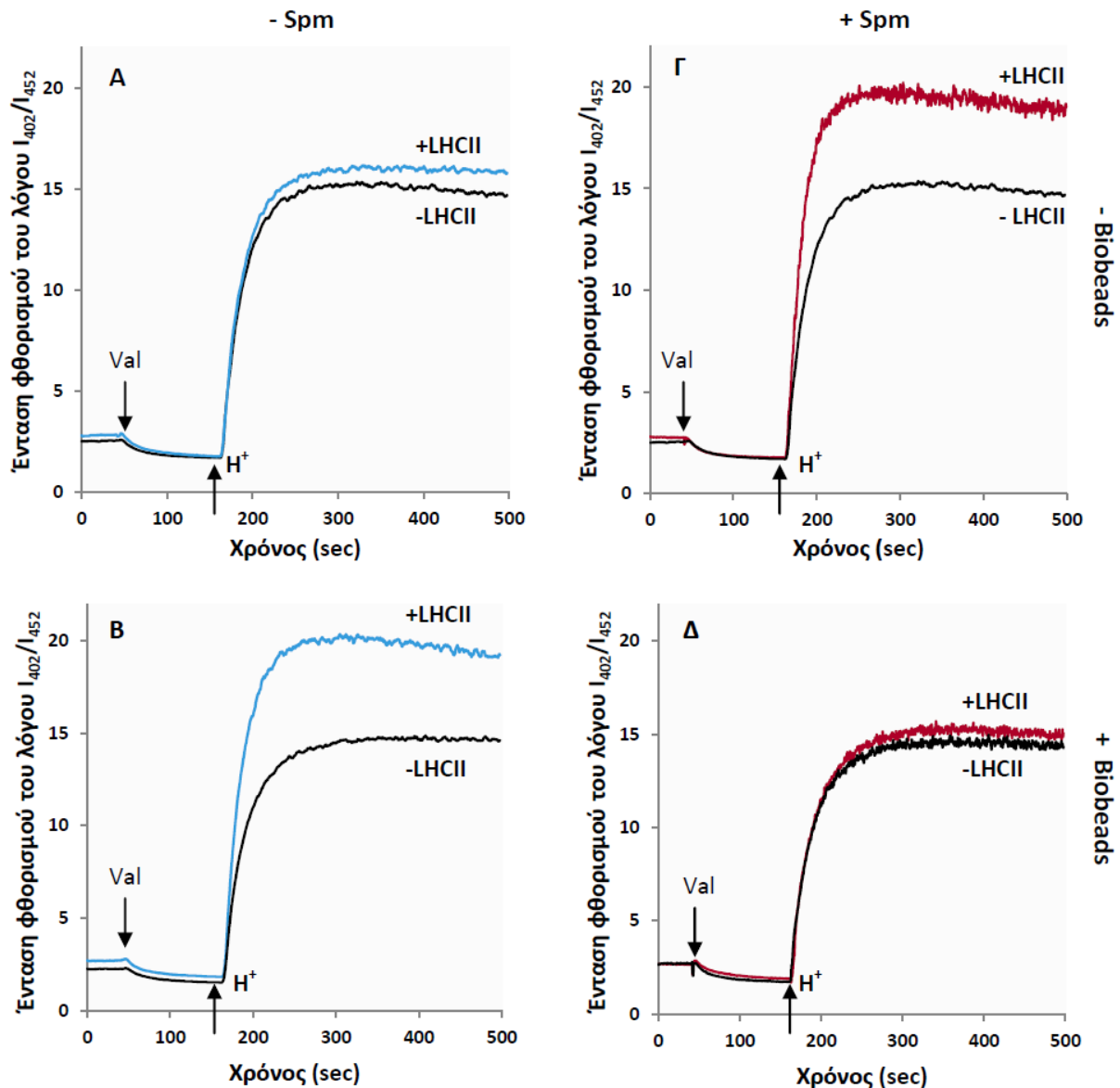
Εικόνα 87. Η καταγραφή ως προς το χρόνο του φθορισμού της Chl a στα 681nm των ενσωματωμένων σε λιποσώματα LHClI συμπλόκων. Με μπλε και κόκκινο χρώμα ο φθορισμός των πρωτεολιποσωμάτων απουσία και παρουσία 100μM Spm αντίστοιχα. Η προσθήκη Spm έγινε στα 20sec, της Val στα 100sec και του HCl στα 220sec, όπως υποδηλώνεται με τα κάθετα βέλη. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 440nm, το παράθυρο διέγερσης 15nm και το παράθυρο εκπομπής 5nm.

5. Μετρήσεις διαπερατότητας σε πρωτεολιποσώματα με ενσωματωμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προεπωασμένα με Spm

Πέρα από την υποτιθέμενη ειδική μεταφορά πρωτονίων μέσω κάποιου καναλιού στο LHCI₂, η πιθανότερη δίοδος των πρωτονίων στο εσωτερικό όλων των πρωτεολιποσωμάτων είναι μη-ειδική, διαμέσου των συσσωματωμάτων των συμπλόκων αλλά και των συνόρων μεταξύ των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Στην ενότητα 3 καταγράφηκε η αύξηση της διαπερατότητας των πρωτεολιποσωμάτων σε πρωτόνια με την αύξηση του ολιγομερισμού των ενσωματωμένων συμπλόκων, ενώ από το κεφάλαιο 2 έγινε γνωστό ότι η Spm επάγει τη συσσωμάτωση των συμπλόκων της κεραίας. Για να ελεγχθεί λοιπόν περαιτέρω η μη-ειδική μεταφορά των πρωτονίων διαμέσου των φωτοσυνθετικών συμπλόκων αλλά και για να μελετηθεί η ικανότητά τους να άγουν πρωτόνια όταν βρίσκονται σε επαγόμενη από τη Spm κατάσταση απόσβεσης της ενέργειας, ακολούθησαν πειράματα όπου τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα είχαν προεπωαστεί με Spm. Η δεκαπεντάλεπτη επώαση των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων με τη Spm έγινε ακριβώς πριν την ανάμειξή τους με το διάλυμα των προσχηματισμένων λιποσωμάτων προς δημιουργία πρωτεολιποσωμάτων. Ίδια συγκέντρωση Spm προστέθηκε και στο μάρτυρα (λιποσώματα χωρίς ενσωματωμένες πρωτεΐνες) και το πρωτόκολλο συνεχίστηκε κανονικά.

Στην Εικόνα 88 παρουσιάζεται η κινητική της μεταφοράς πρωτονίων στο εσωτερικό των λιποσωμάτων (-LHCI₂) και των πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα LHCI₂ σύμπλοκα (+LHCI₂), τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές καταστάσεις συσσωμάτωσης. Οι καταστάσεις αυτές προήλθαν από 4 διαφορετικές μεταχειρίσεις των συμπλόκων πριν την ενσωμάτωσή τους στις μεμβράνες. Οι μεταχειρίσεις αυτές αφορούν την προεπώαση ή μη των συμπλόκων με SM-2 Bio-beads και Spm. Όταν τα τριμερή LHCI₂ ενσωματώθηκαν στη μεμβράνη χωρίς να προεπωαστούν με κάποιον από τους δύο αυτούς παράγοντες που προκαλεί συσσωμάτωση, η διαπερατότητα των πρωτεολιποσωμάτων ήταν ελαφρώς αυξημένη από την αντίστοιχη των λιποσωμάτων (Εικόνα 88Α). Αντίθετα, όταν τα σύμπλοκα προεπωάστηκαν είτε με τα προσροφητικά σφαιρίδια (Εικόνα 88Β), είτε με 100μM Spm (Εικόνα 88Γ), η ροή των πρωτονίων κατά μήκος των πρωτεολιποσωμάτων έφτασε τα υψηλότερα επίπεδα της κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Ο συνδυασμός όμως προεπώασης με SM-2 Bio-beads και στη συνέχεια με 500μM Spm των LHCI₂ συμπλόκων, έριξε το λόγο I₄₀₂/I₄₅₂ στα επίπεδα του μάρτυρα, ο οποίος δεν διαφοροποιήθηκε παρουσία 500μM Spm στο αντίστοιχο στάδιο του πρωτοκόλλου (Εικόνα 88Δ). Με άλλα

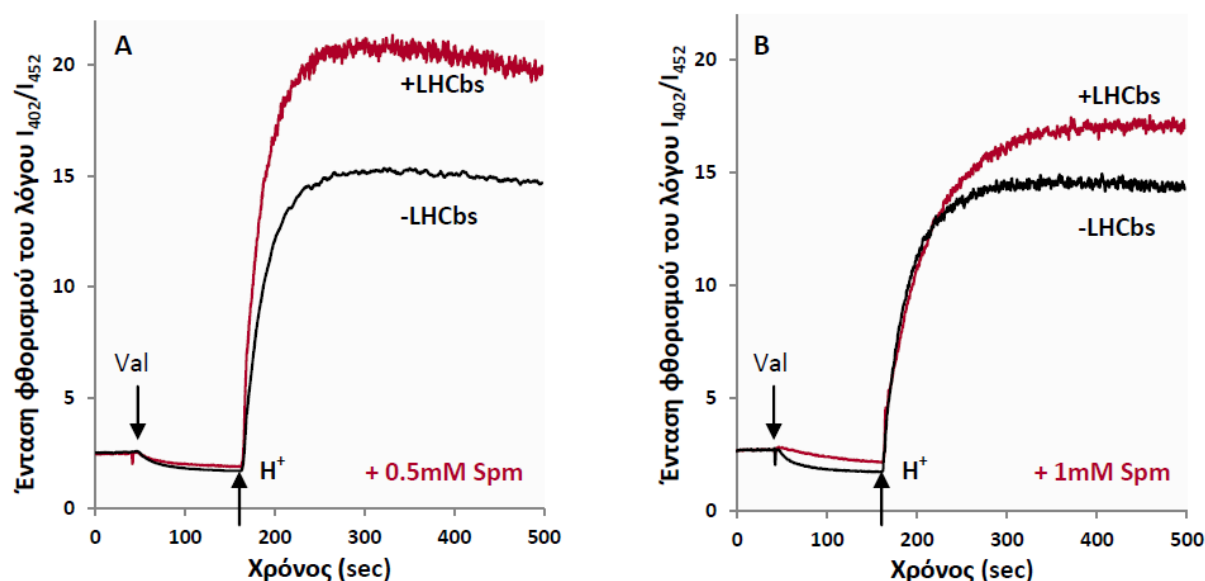
λόγια, η επαγόμενη από τη Spm μερική συσσωμάτωση των LHCII συμπλόκων αύξησε τη διαπερατότητά τους σε πρωτόνια ενώ η πλήρης συσσωμάτωσή τους έκλεισε κάθε δίοδο μεταφοράς πρωτονίων από τη μια πλευρά της μεμβράνης στην άλλη.



Εικόνα 88. Μεταφορά πρωτονίων διαμέσου λιπιδωμάτων (-LHCII) και πρωτεολιπιδωμάτων με ενσωματωμένα τριμερή LHCII σύμπλοκα (+LHCII) μέσω της καταγραφής του ρυθμού πρωτονίωσης της PTS στο εσωτερικό τους. Α. Πρωτεολιπιδωμάτα με ενσωματωμένα διαλυτοποιημένα LHCII σύμπλοκα, χωρίς καμία προεπάωση (-biobeads/-Spm). Β. Πρωτεολιπιδωμάτα με ενσωματωμένα μερικών συσσωματωμένα LHCII σύμπλοκα μετά από επώαση με Biobeads (+biobeads/-Spm). Γ. Πρωτεολιπιδωμάτα με ενσωματωμένα μερικών συσσωματωμένα LHCII σύμπλοκα μετά από επώαση με 100μM Spm (-biobeads/+Spm). Δ. Πρωτεολιπιδωμάτα με ενσωματωμένα πλήρως συσσωματωμένα LHCII σύμπλοκα μετά από διπλή επώαση με Biobeads και 500μM Spm (+biobeads/+Spm). Ίδια συγκέντρωση Spm προστέθηκε και στο μάρτυρα στο ίδιο στάδιο του πρωτοκόλλου (-LHCII). Τα βέλη υποδεικνύουν τις χρονικές στιγμές της προσθήκης βαλινομυκίνης (Val) και πρωτονίων (H^+) στο διάλυμα της κυψελίδας.

Τα μονομερή LHCb σύμπλοκα, όπως έγινε φανερό στο κεφάλαιο 2, δεν εμφανίζουν την ίδια ικανότητα συσσωμάτωσης με τα τριμερή LHCII. Η διπλή επώαση των μονομερών LHCb συμπλόκων με biobeads και 500μM Spm δεν επηρέασε αρνητικά την ικανότητα των

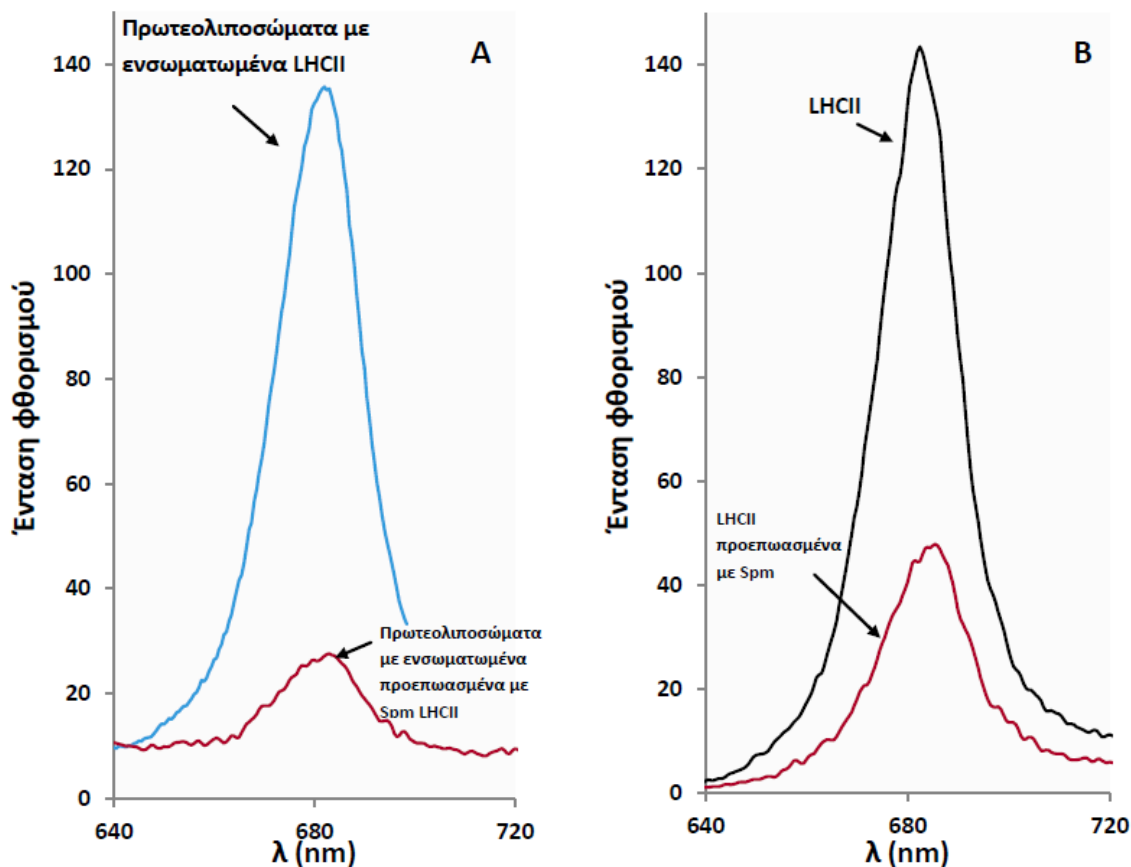
πρωτεολιποσωμάτων που τα έφεραν να άγουν πρωτόνια. Αντιθέτως, μάλλον οδήγησε στη μερική αντί για πλήρη συσσωμάτωσή τους (Εικόνα 89A). Χρειάστηκε η διπλάσια συγκέντρωση Spm (1mM) ώστε να μειωθεί αισθητά η διαπερατότητά τους. Ωστόσο, ακόμα και κάτω από αυτές τις συνθήκες, η συσσωμάτωση δεν φάνηκε να είναι τέτοια που να μπλοκάρει τελείως τη δίοδο των πρωτονίων (Εικόνα 89B). Περισσότερα πρωτόνια κατέληξαν στο εσωτερικό των πρωτεολιποσωμάτων από ότι στο εσωτερικό των λιποσωμάτων που υπέστησαν όμοια μεταχείριση.



Εικόνα 89. Α. Μεταφορά πρωτονίων διαμέσου λιποσωμάτων (-LHCbs) και πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα μονομερή LHCb σύμπλοκα (+LHCbs) μέσω της καταγραφής του ρυθμού πρωτονίωσης της PTS στο εσωτερικό τους. Α. Πρωτεολιποσώματα με ενσωματωμένα μερικώς συσσωματωμένα LHCb σύμπλοκα μετά από επώαση με biobeads και 0.5mM Spm. Β. Πρωτεολιποσώματα με ενσωματωμένα πλήρως συσσωματωμένα LHCb σύμπλοκα μετά από επώαση με biobeads και 1mM Spm. Ίδια συγκέντρωση Spm προστέθηκε και στο μάρτυρα στο ίδιο στάδιο του πρωτοκόλλου (-LHCbs). Τα βέλη υποδεικνύουν τις χρονικές στιγμές της προσθήκης βαλινομυκίνης (Val) και πρωτονίων (H⁺) στο διάλυμα της κυψελίδας.

Η διπλή επώαση των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων με SM-2 Bio-beads και υψηλές συγκεντρώσεις Spm προκάλεσε την έντονη συσσωμάτωσή τους. Ο ολιγομερισμός των τριμερών LHCIΙ συμπλόκων οδήγησε σε πιο σφικτές δομές από ότι των μονομερών συμπλόκων της κεραίας με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μεταφοράς των πρωτονίων στο εσωτερικό των λιποσωμάτων που αυτά ενσωματώθηκαν. Ένα χαρακτηριστικό φαινόμενο της υφιστάμενης συσσωμάτωσης είναι η απόσβεση του φθορισμού των συμπλόκων στα 681nm. Η εκπομπή φθορισμού των πρωτεολιποσωμάτων εμφάνισε όπως ήταν αναμενόμενο δύο κορυφές. Μία έντονη στα 513nm που προέρχεται από την πυρανίνη και μια μικρότερη στα 681nm από τις Chls των ενσωματωμένων συμπλόκων. Τα επίπεδα του φθορισμού της Chl a στα πρωτεολιποσώματα που περιείχαν LHCIΙ προεπωασμένα με Spm ήταν πολύ χαμηλότερα (κατά 79%) από τα αντίστοιχα των πρωτεολιποσωμάτων που τα σύμπλοκά τους δεν είχαν

υποστεί μεταχείριση με Spm (Εικόνα 90Α). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη μικρών ποσοστών ενσωμάτωσης των συμπλόκων στη μεμβράνη λόγω του μεγάλου μεγέθους των συσσωματωμάτων.



Εικόνα 90. Α. Φθορισμός στα 681nm πρωτεολιποσωμάτων των οποίων τα ενσωματωμένα LHCII σύμπλοκα δεν είχαν (μπλε γραμμή) ή είχαν προεπωαστεί με 0.5mM Spm (κόκκινη γραμμή). Β. Ο φθορισμός στα 681nm απομονωμένων LHCII συμπλόκων που επώαστηκαν μόνο με SM-2 Bio-beads (μαύρη γραμμή) ή επώαστηκαν και με 0.5mM Spm (κόκκινη γραμμή). Η ακτινοβολία διέγερσης ήταν 402nm και τα παράθυρα διέγερσης και εκπομπής ήταν 5nm.

Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης έγιναν πειράματα με απομονωμένα LHCII σύμπλοκα ίδιας τελικής συγκέντρωσης με αυτήν που εμπεριέχεται στα πρωτεολιποσώματα. Τα σύμπλοκα διαλυτοποιήθηκαν στο ίδιο διάλυμα με αυτό που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή και μέτρηση των πρωτεολιποσωμάτων αφού πρώτα είχαν επωαστεί για 1h με τα προσροφητικά σφαιρίδια SM-2 Bio-beads, ώστε τα επίπεδα ολιγομερισμού τους να είναι τα ίδια με αυτά κατά την ενσωμάτωσή τους στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Ο φθορισμός των LHCII συμπλόκων που καταγράφηκε ήταν στα ίδια επίπεδα με των πρωτεολιποσωμάτων (Εικόνα 90B). Όταν τα LHCII σύμπλοκα επώαστηκαν μετά την απομάκρυνση των σφαιριδίων για 15min με 0.5mM Spm, ο φθορισμός τους μειώθηκε δραματικά (Εικόνα 90B). Η απόσβεση του φθορισμού που προκλήθηκε από τη Spm ήταν της τάξης του 68%. Επομένως, μόνο το 10% του φαινομένου μπορεί να οφείλεται σε λιγότερη συγκέντρωση

πρωτεΐνης στα πρωτεολιποσώματα. Τα χαμηλά επίπεδα του φθορισμού των πρωτεολιποσωμάτων με σύμπλοκα προεπωασμένα με Spm είναι ενδεικτικά της κατάστασης συσσωμάτωσης των συμπλόκων.

Συζήτηση

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες από την ομάδα του Gruszecki (Wardak et al. 2000; Iwaszko et al. 2004), τα αποτελέσματα του 3^{ου} κεφαλαίου της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι η ενσωμάτωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων της κεραίας του PSII σε λιπιδικές μεμβράνες αυξάνει τη διαπερατότητά τους σε πρωτόνια (Εικόνα 84). Για τη μελέτη της αγωγιμότητας των συμπλόκων χρησιμοποιήθηκε η πυρανίνη ως φθορισμομετρικός δείκτης στο εσωτερικό των πρωτεολιποσωμάτων ενώ οι μετρήσεις αγωγιμότητας πραγματοποιήθηκαν υπό συνθήκες στις οποίες η μεταφορά πρωτονίων δεν περιορίζεται από κάποιο μηχανικό ή ηλεκτροστατικό φραγμό. Αυτό κατέστη δυνατόν με τη δημιουργία μεγάλων λιποσωμάτων μιας λιπιδικής διπλοστιβάδας και με την προσθήκη βαλινομυκίνης στο σύστημα που επιτρέπει την μεταφορά ιόντων K^+ προς την αντίθετη κατεύθυνση από τη μεταφορά ιόντων H^+ . Επιπλέον, εξασφαλίστηκε η μέγιστη δυνατή αδιαπερατότητα των λιποσωμάτων με την προσθήκη χοληστερόλης στο αρχικό διάλυμα των λιπιδίων (Εικόνα 83). Η οξίνιση του pH του αρχικού διαλύματος των μεμβρανικών συστημάτων από το 7,3 στο 5,7 οδήγησε σε μια διαβάθμιση πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης (pH 5,7 στο εξωτερικό των λιποσωμάτων και pH 7,3 στο εσωτερικό τους) που αποτέλεσε το έναυσμα για την είσοδο των πρωτονίων στο εσωτερικό της. Τα επίπεδα του pH στο εσωτερικό των λιπιδικών διπλοστιβάδων ανιχνεύτηκαν από τα επίπεδα της πρωτονιωμένης πυρανίνης (Εικόνα 82). Η επιλογή του συγκεκριμένου ΔpH επιλέχτηκε με βάση τη φυσιολογική σημασία του αλλά και ως συνέχεια στα πειράματα του 2^{ου} κεφαλαίου με τα απομονωμένα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 84, η ένταση φθορισμού του λόγου I_{402}/I_{452} έφτασε στο 14,8 στις μετρήσεις των λιποσωμάτων μετά την οξίνιση του διαλύματος, που συνεπάγεται μια αλλαγή του pH στο εσωτερικό τους της τάξης των 1,15 μονάδων (μετάβαση του pH από το 7,3 στο 6,15). Η ένταση αυτή στην περίπτωση των πρωτεολιποσωμάτων ήταν κοντά στο 19,7, που συνεπάγεται μια αλλαγή του pH στο εσωτερικό τους της τάξης των 1,35 μονάδων (μετάβαση του pH από το 7,3 στο 5,95). Τα αντίστοιχα αποτελέσματα της ομάδας του Gruszecki, παρά τα διαφορετικά πρωτόκολλα απομόνωσης του LHCI και ενσωμάτωσής του στα λιποσώματα βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με αυτά της παρούσας διατριβής. Η οξίνιση του διαλύματος των λιποσωμάτων και των πρωτεολιποσωμάτων προκάλεσε τη μείωση του pH στο εσωτερικό τους από το 6,6 στο 5,5 και 5,3 αντίστοιχα, δηλαδή κατά 1,1 και 1,3 μονάδες (Iwaszko et al. 2004).

Η αύξηση της αγωγιμότητας των μεμβρανών από την παρουσία των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων μπορεί γενικά να αποδοθεί σε δύο διαφορετικά φαινόμενα, που αναφέρονται ως ειδικά και μη-ειδικά ως προς τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Από τη μια πλευρά, το LHCI μπορεί να λειτουργεί ως κανάλι ειδικής μεταφοράς πρωτονίων (Jahns et al. 1988a; Jahns and Junge 1990). Από την άλλη, μη-ειδική μεταφορά ιόντων κατά μήκος της μεμβράνης στα όρια των πρωτεϊνικών και λιπιδικών φάσεων μπορεί να αναμένεται στις φωτοσυνθετικές μεμβράνες (Weeb and Green 1991). Η ύπαρξη κάποιου ειδικού καναλιού εντός του LHCI στηρίζεται αφενός σε μελέτες που δείχνουν ότι το σύμπλοκο είναι ενεργό κατά την βραχυκύκλωση πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης των θυλακοειδών (Jahns and Junge 1990; Jahns et al., 1988) και αφετέρου σε *in silico* μελέτες της δομής του LHCI που έχουν φανερώσει την ύπαρξη μεγάλων εσοχών και κοιλοτήτων που μειώνουν σημαντικά την απόσταση ανάμεσα στο μικροχώρο και το στρώμα (Εικόνα 79). Μη-ειδική διαρροή πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης των θυλακοειδών έχει επίσης αναφερθεί (Schönfeld and Schickler 1984, Schönfeld and Kopeliovitch 1985). Χωρίς να αποκλείεται η ειδική μεταφορά των πρωτονίων διαμέσου κάποιου καναλιού στο LHCI, προκρίνεται από τα αποτελέσματα του κεφαλαίου η μη-ειδική μεταφορά τους διαμέσου των συσσωματωμάτων που σχηματίζουν. Αυτό προκύπτει από την ίδια ικανότητα αγωγιμότητας που εμφάνισαν τα πρωτεολιποσώματα με LHCI και LHCB σύμπλοκα (Εικόνα 84). Μάλιστα, η ταχύτερη είσοδος των πρωτονίων διαμέσου των LHCB συμπλόκων πιθανότατα αντανακλά την ευκολότερη μεταφορά τους λόγω της ύπαρξης μικρότερων συσσωματωμάτων που σχηματίζουν τα μονομερή σύμπλοκα σε σχέση με τα τριμερή. Όπως αναλύθηκε στο 2^ο κεφάλαιο, το διάλυμα των μονομερών LHCBs που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε τα μονομερή CP29, CP26 και CP24 καθώς και τα Lhcb1,2 και 3 (μονομερείς πρωτεΐνες του LHCI). Ενδεχομένως, υπό μερική συσσωμάτωση, τα σύμπλοκα αυτά να σχηματίζουν δομές που μοιάζουν περισσότερο με αυτές της κεραίας του PSII στα υπερσύμπλοκα C₂S₂M₂.

Μελέτες αγωγιμότητας σε μεμβρανικά συστήματα με ενσωματωμένα LHCI σύμπλοκα έδειξαν μια συσχέτισή της με την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση του KCl, τόσο μεγαλύτερη η αγωγιμότητα των πρωτεολιποσωμάτων (Wardak et al. 2000). Επιπλέον, στις συγκεκριμένες μελέτες η απομόνωση των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων από τις μεμβράνες των θυλακοειδών έγινε με διαδοχικά στάδια διαλυτοποίησης και κατακρήμνισης με τη χρήση κατιόντων Mg²⁺ και K⁺ με αποτέλεσμα την απομόνωση LHCI συμπλόκων σε μορφή μεγάλων συσσωματωμάτων (Krupa et al. 1987; Krupa et al. 1992). Όλα αυτά υποδηλώνουν, πως τουλάχιστον εν μέρει, η αύξηση της αγωγιμότητας των

πρωτεολιποσωμάτων σε σχέση με τα λιποσώματα οφείλεται στη μεταφορά ιόντων διαμέσου των συσσωματωμάτων των ενσωματωμένων πρωτεϊνικών συμπλόκων. Έχει βρεθεί εξάλλου ότι η προσθήκη DCCD στα πρωτεολιποσώματα (που αλληλεπιδρά με τα σύμπλοκα της κεραίας και παρεμποδίζει τη απελευθέρωση πρωτονίων στο μικροχώρο των θυλακοειδών μεμβρανών) δεν είχε καμία επίδραση στη μεταφορά των πρωτονίων (Wardak et al. 2000). Αντίστοιχα, τα πρωτεολιποσώματα της παρούσας εργασίας έφεραν LHCIΙ σύμπλοκα σε κατάσταση μερικής συσσωμάτωσης, όπως προέκυψαν από την επώαση τους με τα προσροφητικά σφαιρίδια SM-2 Bio beads αλλά και λόγω της παρουσίας 50mM KCl στο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των πρωτεολιποσωμάτων και τις μετρήσεις αγωγιμότητας. Παραλλάζοντας το πρωτόκολλο ενσωμάτωσης των συμπλόκων στα λιποσώματα, έτσι ώστε να προκύψουν πρωτεολιποσώματα με ενσωματωμένα LHCIΙ σύμπλοκα σε διαφορετικά στάδια συσσωμάτωσης, επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση της διαπερατότητάς τους με την κατάσταση συσσωμάτωσής τους (Εικόνες 85, 88).

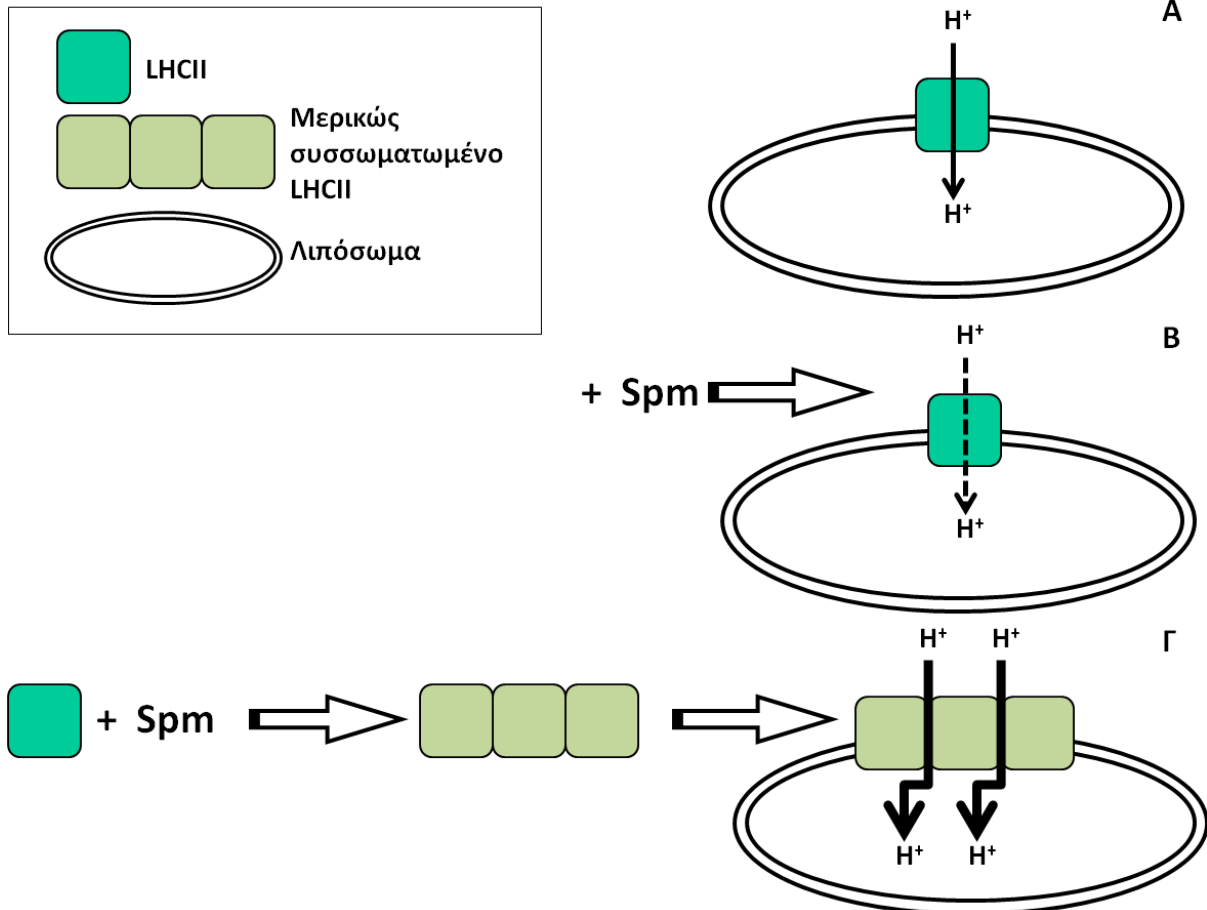
Η συσσωμάτωση του LHCIΙ στη μεμβράνη των θυλακοειδών λαμβάνει χώρα σε συνθήκες αυξημένης πίεσης διέγερσης των φωτοσυστημάτων (Horton and Ruban 2005). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένα, η διεργασία αυτή θεωρείται κομβική στην αύξηση της μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας (NPQ) υπό συνθήκες υψηλού φωτισμού. Επάγεται από τη συσσώρευση πρωτονίων στο μικροχώρο και έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης των χρωστικών του που οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις που διαχέουν την καταστροφική περίσσεια ενέργεια ως θερμότητα. Ένας δεύτερος όμως μηχανισμός φωτοπροστασίας που σχετίζεται με τη συσσωμάτωση των συμπλόκων κάτω από αυτές τις συνθήκες θα μπορούσε να περιλαμβάνει την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης των θυλακοειδών σε πρωτόνια. Η αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών αυτών είναι πιθανό να αποτελεί μια δικλίδα ασφαλείας για το φωτοσυνθετικό μηχανισμό καθώς η ικανότητα του LHCIΙ να άγει πρωτόνια ελεγχόμενα διπλασιάζει τον αριθμό των πρωτεϊνών (ATP συνθάση, LHCIΙ) που καθορίζουν την έξοδο και κατ' επέκταση την εκφόρτιση του μικροχώρου ρυθμίζοντας τα επίπεδα της πρωτονιοκινητικής δύναμης.

Για όλα τα παραπάνω, η επίδραση της Spm στη διαπερατότητα των πρωτονίων διαμέσου των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων αποκτά ιδιαίτερη σημασία. Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα των προηγούμενων κεφαλαίων, η τετραμίνη Spm επάγει τη συσσωμάτωση των συμπλόκων υπό φυσιολογικές συνθήκες (σε ένα εύρος pH αντίστοιχο με των μετρήσεων αυτού του κεφαλαίου) τόσο μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις αρνητικά φορτισμένες επιφάνειές τους, όσο και μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με κάποιες χρωστικές

τους. Η Spm προστέθηκε στα μεμβρανικά συστήματα με δύο τρόπους, είτε με την προσθήκη της στα πρωτεολιποσώματα κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, είτε με την προσθήκη της στα απομονωμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα πριν την ενσωμάτωσή τους στα λιποσώματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι *in vitro* η Spm ρυθμίζει τόσο άμεσα, όσο και έμμεσα (μέσω της επαγωγής της συσσωμάτωσης) τη μεταφορά των πρωτονίων στο εσωτερικό των λιποσωμάτων μέσω του LHCI (Εικόνα 91). Η ενσωμάτωση του LHCI στα λιποσώματα αύξησε την αγωγιμότητά τους σε πρωτόνια (Εικόνα 91Α). Η Spm που προστέθηκε στο εναιώρημα των πρωτεολιποσωμάτων έδειξε μια επιλεκτική παρεμπόδιση της μεταφοράς πρωτονίων διαμέσου μόνο των LHCI συμπλόκων που ήταν ισχυρότερη στην περίπτωση των μη συσσωματωμένων, τριμερών συμπλόκων (Εικόνα 86). Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν στην εισαγωγή του κεφαλαίου, η Spm ενδεχομένως να εισχωρεί στην εσοχή που σχηματίζεται στο LHCI από την πλευρά που *in vivo* είναι εκτεθειμένη στο μικροχώρο και να μπλοκάρει την ειδική μεταφορά των πρωτονίων (Εικόνα 91Β). Ένας τέτοιος ρόλος διαμορφωτή καναλιού για τη Spm θα ήταν αναμενόμενος, μιας και έχει βρεθεί να ρυθμίζει την είσοδο διαφόρων καναλιών ιόντων σε κυτταρικά και υποκυτταρικά συστήματα φυτών και ζώων (Schuster and Bernhardt 2011). Χαρακτηριστική είναι η παρεμπόδιση της μεταφοράς ιόντων K^+ στα Kir κανάλια (βλέπε «Γενική εισαγωγή», εικόνα 16). Από την άλλη, όπως απεικονίζεται στο σχήμα της εικόνας 91Γ, η επαγωγή της μερικής συσσωμάτωσης του LHCI από τη Spm, που οδήγησε στην μείωση του φθορισμού τους, προκάλεσε την αύξηση της μεταφοράς πρωτονίων από τα πρωτεολιποσώματα στα οποία ενσωματώθηκαν (Εικόνα 88Γ). Ένας τέτοιος μηχανισμός ρύθμισης της μεταφοράς πρωτονίων από τη Spm μέσω της αλλαγής της κατάστασης συσσωμάτωσης των συμπλόκων φαίνεται ο πιθανότερος *in vivo*.

Η ρύθμιση της ειδικής μεταφοράς των πρωτονίων δια μέσου του LHCI δεν φάνηκε να σχετίζεται με τη δημιουργία κάποιου κέντρου απόσβεσης της ενέργειας, αφού ούτε η προσθήκη Spm, αλλά ούτε η προσθήκη πρωτονίων προκάλεσαν κάποια σημαντική απόσβεση του φθορισμού των ενσωματωμένων στις μεμβράνες LHCI συμπλόκων (Εικόνα 87). Αφενός, τα επίπεδα της συσσωμάτωσής τους και η διαμόρφωση των χρωστικών τους δεν έδειξαν να τροποποιούνται κατά τη συγκεκριμένη μεταχείριση σε αυτό το λιπιδικό περιβάλλον και αφετέρου δεν υπήρξε κάποια ειδική αλληλεπίδραση της Spm με κάποια Chl στη συγκεκριμένη περιοχή του καναλιού τέτοια που να οδηγήσει σε απόσβεση του φθορισμού της. Βέβαια, ο φθορισμός μπορεί να παρέμεινε σταθερός λόγω της ήδη μερικής συσσωμάτωσης των συμπλόκων πριν την προσθήκη Spm και πρωτονίων. Σε κάθε

περίπτωση, η ρύθμιση της φωτοσπροστασίας από τη Spm, φαίνεται από τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου να περιλαμβάνει ένα δεύτερο μονοπάτι που σχετίζεται με τη ρύθμιση της διαπερατότητας της φωτοσυνθετικής μεμβράνης σε πρωτόνια. Η spm είτε άμεσα, εισχωρώντας στο εσωτερικό του τριμερούς LHCII, είτε έμμεσα μέσω της επαγωγής της συσσωμάτωσής του, ρυθμίζει την απελευθέρωση πρωτονίων από το μικροχώρο πίσω στο στρώμα.



Εικόνα 91. Απλουστευμένο μοντέλο που αφορά στην επίδραση της Spm στην αγωγιμότητα των πρωτεολιποσωμάτων με ενσωματωμένα LHCII σε πρωτόνια. Α. Πρωτεολιποσώματα με ενσωματωμένα τριμερή LHCII χαρακτηρίζονται από αυξημένη αγωγιμότητα σε πρωτόνια σε σχέση με τα λιποσώματα. Β. Η Spm που προστίθεται στο εναιώρημα των σχηματισμένων πρωτεολιποσωμάτων παρεμποδίζει σε ένα ποσοστό την ειδική μεταφορά πρωτονίων δια μέσου των τριμερών LHCII. Γ. Η Spm που προστίθεται σε απομονωμένα τριμερή LHCII πριν την ενσωμάτωσή τους στα λιποσώματα, αυξάνει τη ροή των πρωτονίων στο εσωτερικό τους, όπως υποδηλώνουν τα έντονα μαύρα βέλη. Η μεταφορά των πρωτονίων στην περίπτωση αυτή φαίνεται να είναι μη-ειδική, δια μέσου των συσσωματωμάτων του LHCII που έχουν σχηματιστεί από την αλληλεπίδραση τους με τη θετικά φορτισμένη Spm.

Συνοψίζοντας, τα κυριότερα συμπεράσματα είναι τα εξής:

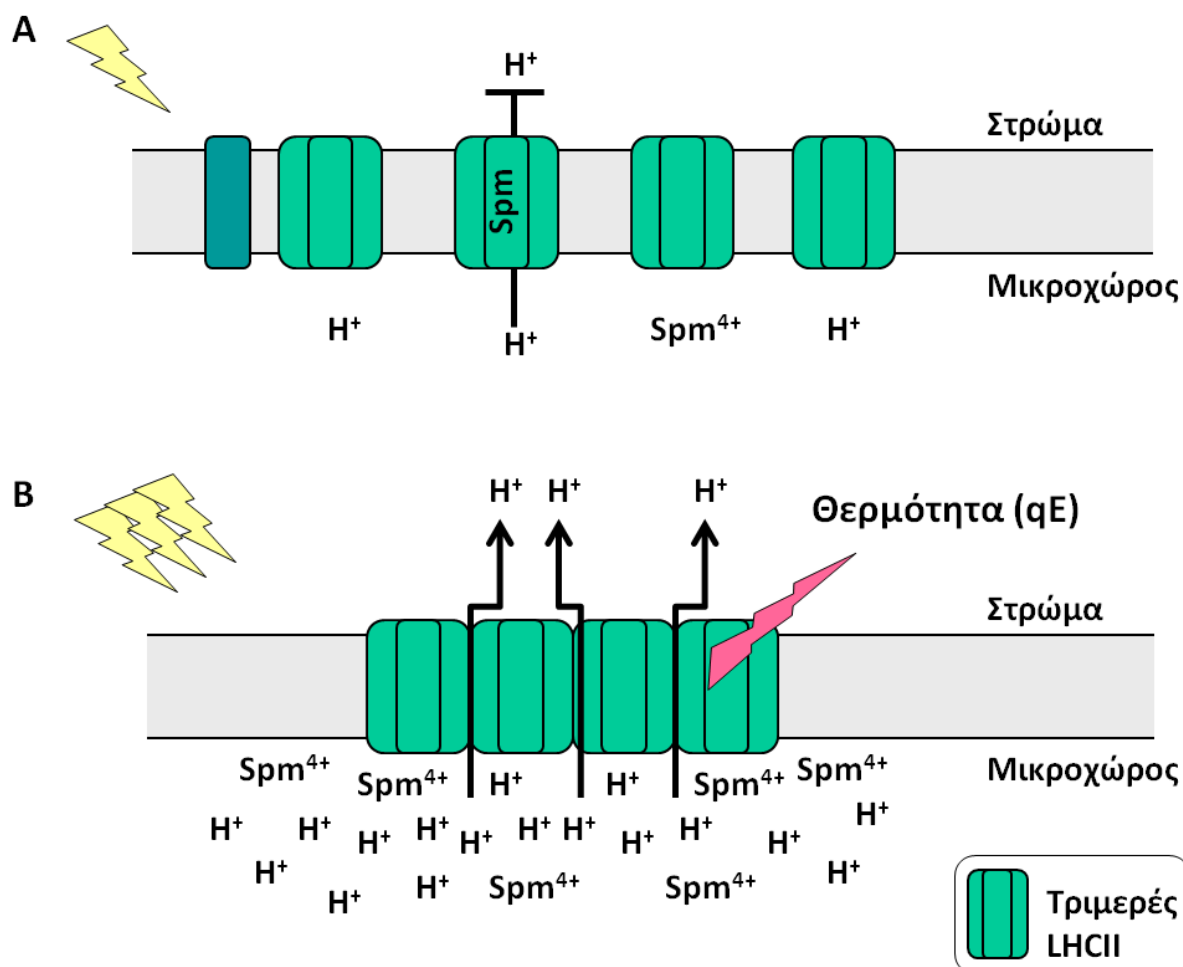
- Η ενσωμάτωση των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων της κεραίας του PSII σε λιποσώματα αυξάνει την αγωγιμότητά τους σε πρωτόνια. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την ιδιότητα των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων (μεμβρανικών πρωτεϊνών/ φωτοσυνθετικών χρωστικών) να μεταφέρουν πρωτόνια από τη μια πλευρά της φωτοσυνθετικής μεμβράνης στην άλλη *in vivo*.
- Ίδιος αριθμός πρωτονίων μεταφέρεται διαμέσου των ενσωματωμένων τριμερών LHCII και μονομερών LHCb συμπλόκων.
- Η μεταφορά των πρωτονίων είναι ταχύτερη (υψηλότερες τιμές g_{H^+}) διαμέσου των μονομερών LHCb συμπλόκων.
- Η διαπερατότητα των πρωτεολιποσωμάτων σε πρωτόνια εξαρτάται από την κατάσταση συσσωμάτωσης των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων. Ως εκ τούτου, η μεταφορά των πρωτονίων φαίνεται να γίνεται πρωτίστως μη-ειδικά, διαμέσου των συσσωματωμάτων των συμπλόκων.
- Η Spm επάγει τη μερική συσσωμάτωση των LHCII συμπλόκων, που όταν ενσωματωθούν σε λιποσώματα αυξάνουν τη δίοδο των πρωτονίων από το εσωτερικό τους.
- Υψηλές συγκεντρώσεις όμως Spm σε ήδη μερικώς συσσωματωμένα LHCII σύμπλοκα προκαλούν την πλήρη συσσωμάτωσή τους που όταν ενσωματωθούν σε λιποσώματα κλείνουν τη δίοδο των πρωτονίων από το εσωτερικό τους. Τα πρωτεολιποσώματα με ενσωματωμένα LHCb σύμπλοκα σε υψηλή κατάσταση συσσωμάτωσης εμφανίζουν επίσης μειωμένη διαπερατότητα. Απαραίτητη προϋπόθεση λοιπόν για τη μεταφορά των πρωτονίων είναι η μερική συσσωμάτωση των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων.
- Η Spm παρεμποδίζει σε κάποιο βαθμό την είσοδο πρωτονίων διαμέσου μόνο των τριμερών LHCII (και όχι των LHCb) συμπλόκων, όταν προστίθεται σε ήδη κατασκευασμένα πρωτεολιποσώματα. Η παρεμπόδιση είναι ισχυρότερη όταν στη μεμβράνη έχουν ενσωματωθεί τριμερή, μη-συσσωματωμένα σύμπλοκα. Αυτό αποτελεί ένδειξη ειδικής μεταφοράς των πρωτονίων μέσω της ύπαρξης κάποιου δομικού καναλιού στο LHCII.
- Ο φθορισμός του ενσωματωμένου LHCII στα 681nm δεν επηρεάζεται από την προσθήκη Spm και πρωτονίων, επιβεβαιώνοντας τη θεωρία της δημιουργίας κέντρων απόσβεσης μέσω της συσσωμάτωσης των συμπλόκων.

Εν κατακλείδι

Ο βιοενεργητικός ρόλος των ΠΑΣ έχει ιδιαίτερη σημασία αφού καθορίζει τις δύο κεντρικές διαδικασίες της φωτοσύνθεσης, την απόδοση μετατροπής της ηλιακής ενέργειας σε χημική και τη φωτοπροστασία. *In vivo* μετρήσεις έχουν δείξει ότι η Put ενισχύει τη φωτοφωσφορυλίωση ενώ οι Spd και Spm ενισχύουν τη μη-φωτοχημική διάχυση της ενέργειας και τη φωτοπροστασία (Ioannidis et al. 2006; Ioannidis et al. 2007). Η παρούσα μελέτη επιχείρησε να φωτίσει τον μοριακό τρόπο δράσης των βιογενών αυτών αμινών στο μηχανισμό του NPQ. Αναδείχθηκαν οι ειδικές και μη-ειδικές (κατιοντικές) αλληλεπιδράσεις τους με τα σύμπλοκα χρωστικών/πρωτεϊνών της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII αλλά και με τις απομονωμένες χρωστικές τους. Η διεξοδική μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων οδήγησε στην πρόταση ενός πρωτότυπου μηχανισμού απόσβεσης της ενέργειας ενός μορίου Chl της κεραίας από ένα μόριο Spm, που προσδένεται μέσω των ιμινομάδων της αξονικά στο Mg αλλάζοντας τη θέση του στο επίπεδο του τετραπυρρολικού δακτυλίου (βλέπε «Κεφάλαιο 1», Εικόνα 56). Ακόμη, προτάθηκε έπειτα από ανάλυση της δομής της κεραίας, ως επικρατέστερη για αυτόν το ρόλο η Chl 8. Η περιοχή πρόσδεσης της συγκεκριμένης Chl εμφανίζει ομολογία με την περιοχή πρόσδεσης της αίμης στην ανθρώπινη μυοσφαιρίνη, όπου με έναν παρόμοιο μηχανισμό το οξυγόνο μετατοπίζει τη θέση του Fe της αίμης.

Από τα αποτελέσματα του 2^{ου} κεφαλαίου, προέκυψε ο διττός τρόπος δράσης της Spm, αλλά και των άλλων ΠΑΣ, στη δομική και λειτουργική οργάνωση των φωτοσυλλεκτικών συμπλόκων. Στο *in vitro* περιβάλλον που μελετήθηκαν οι φασματοσκοπικές ιδιότητες των συμπλόκων, φάνηκε να προηγείται η κατιοντική δράση των ΠΑΣ έναντι όλων των άλλων. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των θετικά φορτισμένων ΠΑΣ με τις αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες των πρωτεϊνικών συμπλόκων του LHClI οδηγεί στην απόσβεση του φθορισμού τους και στην επαγωγή της συσσωμάτωσής τους. Η μερική συσσωμάτωση του LHClI από τη Spm εμφανίζει όλα τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της κατάστασης διάχυσης της ενέργειας του LHClI που απαντώνται στη διεθνή βιβλιογραφία και τα οποία για πρώτη φορά σχετίζονται με τις άμεσες (ειδικές) ή έμμεσες αλληλεπιδράσεις της Spm. Η μερική συσσωμάτωση του LHClI φαίνεται να αποτελεί τον κεντρικό μηχανισμό ρύθμισης της φωτοπροστασίας. Τα *in vitro* αποτελέσματα της διατριβής αυτής έδειξαν ότι οι δύο μεγαλύτερες ΠΑΣ μιμούνται σε μεγάλο βαθμό το ρόλο των πρωτονίων. Με δεδομένο ότι οι ΠΑΣ εντοπίζονται *in vivo* στο χλωροπλάστη και τα επίπεδά τους ρυθμίζονται ανάλογα με τις

εξωτερικές συνθήκες, στοιχειοθετείται ένας μηχανισμός φωτοπροστασίας στον οποίο έχουν βασικό ρόλο.



Εικόνα 92. Προτεινόμενο γενικό μοντέλο φωτοπροστατευτικών μηχανισμών από τη Spm. Α. Υπό φυσιολογικές συνθήκες φωτός, η φωτοσυλλεκτική κεραία σε τριμερή μορφή συλλέγει την ηλιακή ενέργεια για τις ανάγκες τις φωτοχημείας. Μόρια Spm προσδεμένα σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στα τριμερή, παρεμποδίζουν την απελευθέρωση πρωτονίων πίσω στο στρώμα. Β. Μια ξαφνική, μεγάλη αύξηση της έντασης του φωτός οδηγεί στη μείωση του pH του μικροχώρου από την υπερσυσσώρευση πρωτονίων και στη συσσώρευση της Spm στο μικροχώρο. Η συσσώρευση της Spm επάγει τη συσσωμάτωση των LHCII συμπλόκων, που οδηγεί στην ενεργοποίηση του μηχανισμού του qE και στην ταυτόχρονη αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης των θυλακοειδών σε πρωτόνια. Η απελευθέρωση των πρωτονίων πίσω στο στρώμα αποφορτίζει τη μεμβράνη και μειώνει τον κίνδυνο οξειδωτικής καταστροφής της.

Στην Εικόνα 92 παρουσιάζεται ένα απλοποιημένο μοντέλο ενός τέτοιου μηχανισμού φωτοπροστασίας όπως αυτό διαμορφώθηκε από όλα τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής αλλά και από προηγούμενα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες φωτός (συνθήκες όπου είναι προσαρμοσμένος ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός), η φωτοσυλλεκτική κεραία του PSII, στην τριμερή της μορφή, συλλέγει την ηλιακή ενέργεια και τη μεταφέρει στα κέντρα αντίδρασης του PSII. Σε αυτές τις συνθήκες, μόρια Spm, που εντοπίζονται φυσιολογικά στο χλωροπλάστη και προσδεμένες στο LHCII (Navakoudis et al. 2007), πιθανώς παρεμποδίζουν (σύμφωνα με τα *in vitro* αποτελέσματα του 3^{ου} κεφαλαίου) την απελευθέρωση πρωτονίων

πίσω στο στρώμα διαμέσου του LHCI_{II} λόγω της ανάγκης εγκαθίδρυσης της πρωτονιοκινητικής δύναμης (Εικόνα 92A). Μια μετάβαση σε υψηλές συνθήκες φωτός, μειώνει αισθητά το pH του μικροχώρου λόγω της υπερσυσσώρευσης πρωτονίων. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως οι ΠΑΣ με την αύξηση του φωτισμού συσσωρεύονται στο μικροχώρο (Ioannidis et al. 2012), ενώ διαφάνηκε από τα αποτελέσματα του 2^{ου} κεφαλαίου η δράση της Spm στη συσσωμάτωση του LHCI_{II} και την ενίσχυση της απόσβεσης του φθορισμού του. Επομένως, μια ξαφνική, μεγάλη αύξηση της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας θα μπορούσε να προκαλέσει τη συσσωμάτωση του LHCI_{II} λόγω της συσσώρευσης της Spm στο μικροχώρο. Αυτό θα οδηγούσε στη δημιουργία κέντρων διάχυσης της ενέργειας και στην ενεργοποίηση του μηχανισμού qE (Εικόνα 92B). Επιπλέον, η επαγόμενη από τη Spm συσσωμάτωση του LHCI_{II} μπορεί να οδηγήσει και στην αύξηση της διαπερατότητας των θυλακοειδών μεμβρανών σε πρωτόνια σύμφωνα με τα *in vitro* αποτελέσματα του 3^{ου} κεφαλαίου. Ταυτόχρονα με την ενεργοποίηση του qE, σε αυτές τις ακραίες συνθήκες θα μπορούσε να λαμβάνει χώρα η απελευθέρωση πρωτονίων πίσω στο στρώμα διαμέσου των συσσωματωμάτων του LHCI_{II} (Εικόνα 92B). Η απελευθέρωση πρωτονίων πίσω στο στρώμα σε συνθήκες υψηλής πίεσης διέγερσης μέσω αυτού του εναλλακτικού μηχανισμού, θα αποφόρτιζε το μικροχώρο και θα μείωνε τον κίνδυνο οξειδωτικής καταστροφής της φωτοσυνθετικής μεμβράνης.

Βιβλιογραφία

- 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. *International journal of food, agriculture and environment* 2: 114-120.
- Ahn TK, Avenson TJ, Ballottari M, Cheng Y-C, Niyogi KK, Bassi R, Fleming GR. (2008)** Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein. *Science* 320: 794-797.
- Åkerlund H-E, Andersson B, Persson A, Albertsson P-Å. (1979)** Isoelectric points of spinach thylakoid membrane surfaces as determined by cross partition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 552: 238-246.
- Allen JF. (1992)** Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1098: 275-335.
- Allen JF. (2003)** State transitions - a question of balance. *Science* 299: 1530-1532.
- Allen JF, Forsberg J. (2001)** Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends in Plant Science* 6: 317-326.
- Anderson J, Chow W, Goodchild D. (1988)** Thylakoid membrane organisation in sun/shade acclimation. *Functional Plant Biology* 15: 11-26.
- Anderson J, Chow W, Park Y-I. (1995)** The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynthesis Research* 46: 129-139.
- Andersson B, Aro E-M. (1997)** Proteolytic activities and proteases of plant chloroplasts. *Physiologia Plantarum* 100: 780-793.
- Andersson J, Walters RG, Horton P, Jansson S. (2001)** Antisense inhibition of the photosynthetic antenna proteins CP29 and CP26: implications for the mechanism of protective energy dissipation. *The Plant Cell Online* 13: 1193-1204.
- Andersson J, Wentworth M, Walters RG, Howard CA, Ruban AV, Horton P, Jansson S. (2003)** Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II - Effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *Plant Journal* 35: 350-361.
- Aro E-M, Virgin I, Andersson B. (1993)** Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1143: 113-134.
- Aspinall-O'Dea M, Wentworth M, Pascal A, Robert B, Ruban A, Horton P. (2002)** In vitro reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 16331-16335.
- Avenson TJ, Ahn TK, Zigmantas D, Niyogi KK, Li Z, Ballottari M, Bassi R, Fleming GR. (2008)** Zeaxanthin radical cation formation in minor light-harvesting complexes of higher plant antenna. *Journal of Biological Chemistry* 283: 3550-3558.
- Bachrach U. (2005)** Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Current Protein and Peptide Science* 6: 559-566.
- Baker NR, Horton P. (1987)** Physiological factors associated with fluorescence quenching during photoinhibition. In: Arntzen CJ, Kyle DJ, Osmond CB. (Eds). *Topics in photosynthesis, photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam 9: 145-168.

- Barber J. (1995)** Molecular basis of the vulnerability of photosystem II to damage by light. *Functional Plant Biology* 22: 201-208.
- Barber J. (2004)** Engine of life and big bang of evolution: a personal perspective. *Photosynthesis Research* 80: 137-155.
- Barber J. (2008)** Crystal structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Inorganic Chemistry* 47: 1700-1710.
- Barros T, Kühlbrandt W. (2009)** Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787: 753-772.
- Bassi R, Machold O, Simpson D. (1985)** Chlorophyll-proteins of two photosystem I preparations from maize. *Carlsberg Res. Commun.* 50: 145-162.
- Beauchemin R, N'Soukpoé-Kossi CN, Thomas TJ, Thomas T, Carpentier R, Tajmir-Riahi HA. (2007a)** Polyamine analogues bind human serum albumin. *Biomacromolecules* 8: 3177-3183.
- Beauchemin R, Gauthier A, Harnois J, Boisvert S, Govindachary S, Carpentier R. (2007b)** 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 QA- to QB. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767: 905-912.
- Ben Fredj A, Ben Lakhdar Z, Ruiz-Lopez MF. (2008)** The structure of chlorophyll a-water complexes: insights from quantum chemistry calculations. *Chemical Communications (Camb)*: 718-720.
- Bencini A, Bianchi A, Enrique, Micheloni M, Ramirez JA. (1999)** Proton coordination by polyamine compounds in aqueous solution. *Coordination Chemistry Reviews* 188: 97-156.
- Bendall DS, Howe CJ, Nisbet EG, Nisbet RER. (2008)** Introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 2625-2628.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2002)** The light reactions of photosynthesis. In: 5th edition Freeman HW. (Ed) *Biochemistry*. New York Ch 19.
- Bernhard K, Crosjean M. (1995)** Carotenoids. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. (eds.) *Infrared Spectroscopy*. Berlin: Birkhäuser Verlag 1B: 117-134.
- Besford RT, Richardson CM, Campos JL, Tiburcio AF. (1993)** Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* 189: 201-206.
- Biegel CM, Gould JM. (1981)** Kinetics of hydrogen ion diffusion across phospholipid vesicle membranes. *Biochemistry* 20: 3474-3479.
- Biesiadka J, Loll B, Kern J, Irrgang K-D, Zouni A. (2004)** Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3.2 Å resolution: a closer look at the Mn-cluster. *Physical Chemistry Chemical Physics* 6: 4733-4736.
- Bilger W, Bjorkman O, Thayer SS. (1989)** Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. *Plant Physiology* 91: 542-551.
- Boekema EJ, Hankamer B, Bald D, Kruij J, Nield J, Boonstra AF, Barber J, Rögner M. (1995)** Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 175-179.
- Boekema EJ, Nield J, Hankamer B, Barber J. (1998)** Localization of the 23-kD subunit of the oxygen-evolving complex of photosystem II by electron microscopy. *European Journal of Biochemistry* 252: 268-276.

Boekema EJ, Van Roon H, Van Breemen JF, Dekker JP. (1999) Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *European Journal of Biochemistry* 266: 444-452.

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

Boldt NJ, Donohoe RJ, Birge RR, Bocian DF. (1987) Chlorophyll model compounds: effects of low symmetry on the resonance Raman spectra and normal mode descriptions of nickel(II) dihydroporphyrins. *Journal of the American Chemical Society* 109: 2284-2298.

Bonente G, Howes BD, Caffarri S, Smulevich G, Bassi R. (2008) Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 283: 8434-8445.

Bouamaied I, Coskun T, Stulz E. (2006) Axial coordination to metalloporphyrins leading to multinuclear assemblies. *Structure & Bonding* 121: 1-47.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the estimation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Briantais JM, Verotte C, Picaud M, Krause GH. (1979) A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 548: 128-138.

Bruggemann LI, Pottosin II, Schonknecht G. (1998) Cytoplasmic polyamines block the fast-activating vacuolar cation channel. *The Plant Journal* 16: 101-105.

Caffarri S, Croce R, Breton J, Bassi R. (2001) The major antenna complex of photosystem II has a xanthophyll binding site not involved in light harvesting. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 35924-35933.

Caffarri S, Kouril R, Kereiche S, Boekema EJ, Croce R. (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO Journal* 28: 3052-3063.

Choi S, Spiro TG, Langry KC, Smith KM. (1982) Vinyl influences on protoheme resonance Raman spectra: nickel(II) protoporphyrin IX with deuterated vinyl groups. *Journal of the American Chemical Society* 104: 4337-4344.

Chow HC, Serlin R, Strouse CE. (1975) The crystal and molecular structure and absolute configuration of ethyl chlorophyllide a dihydrate. A model for the different spectral forms of Chlorophyll a. *Journal of American Chemical Society* 97: 7230.

Chow WS, Anderson J, Hope AB. (1988) Variable stoichiometries of photosystem II to photosystem I reaction centres. *Photosynthesis Research* 17: 277-281.

Clarke OB, Caputo AT, Hill AP, Vandenberg JI, Smith BJ, Gulbis JM. (2010) Domain reorientation and rotation of an intracellular assembly regulate conduction in Kir potassium channels. *Cell* 141: 1018-1029.

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

Cochón AC, González N, San Martín de Viale LC. (2002) Effects of the porphyrinogenic compounds hexachlorobenzene and 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine on polyamine metabolism. *Toxicology* 176: 209-219.

Cohen SS. (1988) A guide to polyamines. New York, NY: Oxford University Press.

- Corella D, Guille M, Hernandez JM, Hernandez-Yago J. (1998)** Effects of polyamine levels on the degradation of short-lived and long-lived proteins in cultured L-132 human lung cells. *Biochemical Journal* 334: 367-375.
- Cotton TM, Trifunac AD, Ballschmitter K, Katz JJ. (1974)** State of chlorophyll a in vitro and in vivo from electronic transition spectra, and the nature of antenna chlorophyll. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 368: 181-198.
- Cotton TM, van Duyne RP. (1981)** Characterization of bacteriochlorophyll interactions in vitro by resonance Raman spectroscopy. *Journal of American Chemical Society* 103: 6020-6026.
- Crimi M, Dorra D, Böisinger CS, Giuffra E, Holzwarth AR, Bassi R. (2001)** Time-resolved fluorescence analysis of the recombinant photosystem II antenna complex CP29. *European Journal of Biochemistry* 268: 260-267.
- Croce R, Canino G, Ros F, Bassi R. (2002)** Chromophore organization in the higher-plant photosystem II antenna protein CP26. *Biochemistry* 41: 7334-7343.
- de Bianchi S, Dall'Osto L, Tognon G, Morosinotto T, Bassi R. (2008)** Minor antenna proteins CP24 and CP26 affect the interactions between photosystem II subunits and the electron transport rate in grana membranes of Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 20: 1012-1028.
- Dekker JP, van Roon H, Boekem EJ. (1999)** Heptameric association of light-harvesting complex II trimers in partially solubilized photosystem II membranes. *FEBS letters* 449: 211-214.
- Dekker JP, Boekema EJ. (2005)** Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1706: 12-39.
- Della Mea M, Di Sandro A, Dondini L, Del Duca S, Vantini F, Bergamini C, Bassi R, Serafini-Fracassini D. (2004)** A Zea mays 39-kD thylakoid transglutaminase catalyses the modification by polyamines of light-harvesting complex II in a light-dependent way. *Planta* 219: 754-764.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767: 272-280.
- Demmig B, Winter K, Kruger A, Czygan F-C. (1987)** Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves : A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiology* 84: 218-224.
- Demmig-Adams B, Winter K, Krüger A, Czygan F-C. (1989a)** Zeaxanthin synthesis, energy dissipation, and photoprotection of photosystem II at chilling temperatures. *Plant Physiology* 90: 894-898.
- Demmig-Adams B, Winter K, Krüger A, Czygan F-C. (1989b)** Light response of CO₂ assimilation, dissipation of excess excitation energy, and zeaxanthin content of sun and shade leaves. *Plant Physiology* 90: 881-886.
- Demmig-Adams B. (1990)** Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1020: 1-24.
- Demmig-Adams B, Adams WW. (1992)** Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599-626.
- Dobrovinskaya OR, Muñoz J, Pottosin II. (1999)** Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *Journal of Membrane Biology* 167: 127-140.
- Dominici P, Caffarri S, Armenante F, Ceoldo S, Crimi M, Bassi R. (2002)** Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *Journal of Biological Chemistry* 277: 22750-22758.

Dondini L, Bonazzi S, Del Duca S, Bregoli A, Serafini-Fracassini D. (2001) Acclimation of chloroplast transglutaminase to high NaCl concentration in a polyamine-deficient variant strain of *Dunaliella salina* and in its wild type. *Plant Physiology* 158: 185-197.

Donohoe RJ, Frank HA, Bocian DF. (1988) Resonance Raman spectra and normal mode descriptions of a bacteriochlorophyll a model complex. *Photochemistry and Photobiology* 48: 531-537.

Dörnemann D, Navakoudis E, Kotzabasis K. (1996) Changes in the polyamine content of plastidal membranes in light- and dark-grown wildtype and pigment mutants of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* and their possible role in chloroplast photodevelopment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 36: 293-299.

Duca S, Tidu V, Bassi R, Esposito C, Serafini-Fracassini D. (1994) Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L. *Planta* 193: 283-289.

Dudley HW, Rosenheim O, Starling WW. (1927) The constitution and synthesis of spermidine, a newly discovered base isolated from animal tissues. *Biochemical Journal* 21: 97-103.

Eberhard S, Finazzi G, Wollman F-A. (2008) The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics* 42: 463-515.

Evans TA, Katz JJ. (1975) Evidence for 5- and 6-coordinated magnesium in bacteriochlorophyll a from visible absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 396: 414-426.

Feiler U, Mattioli TA, Katheder I, Scheer H, Lutz M, Robert B. (1994) Effects of vinyl substitutions on resonance Raman spectra of (bacterio)chlorophylls. *Journal of Raman Spectroscopy* 25: 365-370.

Felton RH, Yu NT, O'Shea DC, Shelnutz JA. (1974) Structural implication in metalloporphyrins of the 1590 cm^{-1} anomalously polarized resonance Raman line. *Journal of the American Chemical Society* 96: 3675-3676.

Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303: 1831-1838.

Ficker E, Taghialatela M, Wible BA, Henly CM, Brown AM. (1994) Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K^+ channels. *Science* 266: 1068-1072.

Fiedor L, Kania A, Mysliwa-Kurdziel B, Orzel L, Stochel G. (2008) Understanding chlorophylls: Central magnesium ion and phytol as structural determinants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777: 1491-1500.

Fragata M, Nordén B, Kurucsev T. (1988) Linear dichroism (250-700 nm) of chlorophyll a and pheophytin a oriented in a lamellar phase of glycerylmonooctanoate/ H_2O . Characterization of electronic transitions. *Photochemistry and Photobiology* 47: 133-143.

Fredj AB, Ruiz-López MF. (2009) Theoretical study of chlorophyll a hydrates formation in aqueous organic solvents. *The Journal of Physical Chemistry B* 114: 681-687.

Fujiwara M, Tasumi M. (1986) Resonance Raman and infrared studies on axial coordination to chlorophylls a and b in vitro. *The Journal of Physical Chemistry* 90: 250-255.

Funk C, Adamska I, Green BR, Andersson B, Renger G. (1995a) The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments. *Journal of Biological Chemistry* 270: 30141-30147.

Funk C, Schroeder WP, Napiwotzki A, Tjus SE, Renger G, Andersson B. (1995b) The PSII-S protein of higher plants: A new type of pigment-binding protein. *Biochemistry* 34: 11133-11141.

- Gaensslen RE, McCarty RE. (1971)** Amine uptake in chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 147: 55-65.
- Galston AW. (2001)** Plant biology - Retrospect and prospect. *Current Science* 80: 143-152.
- 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 Physiology* 48: 434-440.
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR. (1989)** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 990: 87-92.
- Genty B, Goulas Y, Dimon B, Peltier G, Briantais JM, Moya I. (1992)** Modulation of efficiency of primary conversion in leaves. *Photosynthesis Research* 34: 106.
- Gilmore AM, Hazlett TL, Govindjee. (1995)** Xanthophyll cycle-dependent quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence: formation of a quenching complex with a short fluorescence lifetime. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 2273-2277.
- Giuffra E, Zucchelli G, Sandona D, Croce R, Cugini D, Garlaschi FM, Bassi R, Jennings R.C. (1997)** Analysis of some optical properties of a native and reconstituted photosystem II antenna complex, CP29: pigment binding sites can be occupied by chlorophyll a or chlorophyll b and determine spectral forms. *Biochemistry* 36: 12984-12993.
- Gouterman M. (1978)** Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings. In: David D. (ed.) *Academic Press. The Porphyrins* Pages: 1-165.
- Green 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. *Photosynthesis Research* 39: 149-162.
- Hager A. (1966)** Die zusammenhänge zwischen lichtinduzierten xanthophyll-umwandlungen und hill-reaktion. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 79: 94-107.
- Hager A, Meyer-Bertenrath T. (1966)** Die isolierung und quantitative bestimmung der carotinoide und chlorophylle von blättern, algen und isolierten chloroplasten mit hilfe dünnschichtchromatographischer methoden. *Planta* 69: 198-217.
- Hamada H, Arakawa T, Shiraki K. (2009)** Effect of additives on protein aggregation. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10: 400-407.
- Hamdani S, Yaakoubi H, Carpentier R. (2011)** Polyamines interaction with thylakoid proteins during stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104: 314-319.
- Hankamer B, Morris E, Nield J, Gerle C, Barber J. (2001)** Three-dimensional structure of the photosystem II core dimer of higher plants determined by electron microscopy. *Journal of Structural Biology* 135: 262-269.
- Hanson LK. (1991)** Molecular orbital theory of monomer pigments. In: Scheer H. (ed) *Chlorophylls*. Boca Raton CRC Press pages 993-1014.
- Havaux M, Dall'Osto L, Cuié S, Giuliano G, Bassi R. (2004)** The effect of zeaxanthin as the only xanthophyll on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 13878-13888.
- Heby O, Sarna GP, Marton LJ, Omine M, Perry S, Russell DH. (1973)** Polyamine content of AKR leukemic cells in relation to the cell cycle. *Cancer Research* 33: 2959-2964.
- Helenius A, Simons K. (1975)** Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 415: 29-79.

- Hildebrandt P, Spiro TG. (1988)** Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of copper chlorophyllin on silver and gold colloids. *The Journal of Physical Chemistry* 92: 3355-3360.
- Hobe S, Foerster R, Klingler J, Paulsen H. (1995)** N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll a/b complex. *Biochemistry* 34: 10224-10228.
- Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, Li X-P, Niyogi KK, Fleming GR. (2005)** Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science* 307: 433-436.
- Horton P, Ruban AV, Rees D, Pascal AA, Noctor G, Young AJ. (1991)** Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex. *FEBS letters* 292: 1-4.
- Horton P, Ruban AV. (1992)** Regulation of photosystem II. *Photosynthesis Research* 34: 375-385.
- Horton P, Ruban AV. (1993)** ΔpH-dependent quenching of the Fo level of chlorophyll fluorescence in spinach leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1142: 203-206.
- Horton P, Ruban AV, Walters RG. (1994)** Regulation of light harvesting in green plants (indication by non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence). *Plant Physiology* 106: 415-420.
- Horton P, Ruban AV, Walters RG. (1996)** Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 655-684.
- Horton P, Ruban AV, Wentworth M. (2000)** Allosteric regulation of the light-harvesting system of photosystem II. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 355: 1361-1370.
- Horton P, Ruban A. (2005)** Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 56: 365-373.
- 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. *Journal of the American Chemical Society* 92: 779-791.
- Humbeck K, Römer S, Senger H. (1988)** Changes in carotenoid composition and function of the photosynthetic apparatus during light-dependent chloroplast differentiation in mutant C-6D of *Scenedesmus obliquus*. *Botanica acta* 101: 220-228.
- Icekson I, Apelbaum A. (1987)** Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiology* 84: 972-974.
- Ide JP, Klug DR, Kühlbrandt W, Giorgi LB, Porter G. (1987)** The state of detergent solubilised light-harvesting chlorophyll-a/b protein complex as monitored by picosecond time-resolved fluorescence and circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 893: 349-364.
- Ilioaia C, Johnson MP, Horton P, Ruban AV. (2008)** Induction of efficient energy dissipation in the isolated light-harvesting complex of photosystem II in the absence of protein aggregation. *Journal of Biological Chemistry* 283: 29505-29512.
- Ioannidis NE, Sfichi L, Kotzabasis K. (2006)** Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757: 821-828.
- Ioannidis NE, Kotzabasis K. (2007)** Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane in vivo and in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767: 1372-1382.

- Ioannidis NE, Ortigosa SM, Veramendi J, Pintó-Marijuan M, Fleck I, Carvajal P, Kotzabasis K, Santos M, Torné JM. (2009)** Remodeling of tobacco thylakoids by over-expression of maize plastidial transglutaminase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787: 1215-1222.
- Ioannidis NE, Sfichi-Duke L, Kotzabasis K. (2011)** Polyamines stimulate non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Scenedesmus obliquus*. *Photosynthesis Research* 107: 169-175.
- Ioannidis NE, Cruz JA, Kotzabasis K, Kramer DM. (2012)** Evidence that putrescine modulates the higher plant photosynthetic proton circuit. *PLoS ONE* 7: e29864.
- Iwaszko E, Wardak A, Krupa Z, Gruszecki WI. (2004)** Ion transport across model lipid membranes containing light-harvesting complex II: an effect of light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 74: 13-21.
- Jahns P, Polle A, Junge W. (1988)** The photosynthetic water oxidase: its proton pumping activity is short-circuited within the protein by DCCD. *EMBO J* 7: 589-594.
- Jahns P, Junge W. (1990)** Dicyclohexylcarbodiimide-binding proteins related to the short circuit of the proton-pumping activity of photosystem II. *European Journal of Biochemistry* 193: 731-736.
- Jahns P, Latowski D, Strzalka K. (2009)** Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787: 3-14.
- Jansson S, Pichersky E, Bassi R, Green B, Ikeuchi M, Melis A, Simpson D, Spangfort M, Staehelin LA, Thornber JP. (1992)** A nomenclature for the genes encoding the chlorophylla/b-binding proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 10: 242-253.
- Jansson S. (1999)** A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 4: 236-240.
- Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW. (1997)** Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO Publishing, pp. 661.
- Johnson MP, Perez-Bueno ML, Zia A, Horton P, Ruban AV. (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.
- Johnson MP, Ruban AV. (2010)** Arabidopsis plants lacking PsbS protein possess photoprotective energy dissipation. *Plant Journal* 61: 283-289.
- Johnson MP, Zia A, Horton P, Ruban AV. (2010)** Effect of xanthophyll composition on the chlorophyll excited state lifetime in plant leaves and isolated LHCII. *Chemical Physics* 373: 23-32.
- Johnson MP, Goral TK, Duffy CDP, Brain APR, Mullineaux CW, Ruban AV. (2011)** Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts. *The Plant Cell Online* 23: 1468-1479.
- Johnson TD. (1996)** Modulation of channel function by polyamines. *Trends in Pharmacological Sciences* 17: 22-27.
- Jones C, Hare D, Compton S. (1989)** Measuring plant protein with Bradford assay. Evaluation and standard method. *Journal of Chemical Ecology* 15: 979-992.
- Kano K, Fendler JH. (1978)** Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 509: 289-299.
- Katz JJ, Norris JR. (1973)** Chlorophyll and light-energy transduction in photosynthesis. *Current Topics in Bioenergetics* 5: 41-75.

- Kee HL, Kirmaier C, Tang Q, Diers JR, Muthiah C, Taniguchi M, Laha JK, Ptaszek M, Lindsey JS, Bocian DF, Holten D. (2007)** Effects of substituents on synthetic analogs of chlorophylls. Part 2: Redox properties, optical spectra and electronic structure. *Photochemistry and Photobiology* 83: 1125-1143.
- Kim S, Sandusky P, Bowlby NR, Aebersold R, Green BR, Vlahaskis S, Yocum CF, Pichersky E. (1992)** Characterization of a spinach psbS cDNA encoding the 22 kD protein of photosystem II. *FEBS letters* 314: 67-71.
- Kirchhoff H, Hinz HJ, Rosgen J. (2003)** Aggregation and fluorescence quenching of chlorophyll a of the light-harvesting complex II from spinach in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1606: 105-116.
- Kitigawa 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. *Journal of Biochemistry* 78: 719-728.
- Kitigawa T, Nagai K, Tsubaki M. (1979)** Assignment of the Fe-Nepsilon (His F8) stretching band in the resonance Raman spectra of deoxy myoglobin. *FEBS Letters* 104: 376-378.
- Kitagawa T, Ozaki Y. (1987)** Infrared and Raman spectra of metalloporphyrins. In: Buchler J. (ed.) Springer Berlin Heidelberg. *Metal Complexes with Tetrapyrrole Ligands I* 64: 71-114.
- Kloppstech K. (1997)** Light regulation of photosynthetic genes. *Physiologia Plantarum* 100: 739-747.
- Koller D. (1990)** Light-driven leaf movements. *Plant, Cell & Environment* 13: 615-632.
- Kotzabasis K, Fotinou C, Roubelakis-Angelakis KA, Ghanotakis D. (1993)** Polyamines in the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research* 38: 83-88.
- Kotzabasis K, Strasser B, Navakoudis E, Senger H, Dörnemann D. (1999)** The regulatory role of polyamines in structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 50: 45-52.
- Kovacs L, Damkjaer J, Kereiche S, Illoaia C, Ruban AV, Boekema EJ, Jansson S, Horton P. (2006)** Lack of the light-harvesting complex CP24 affects the structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts. *Plant Cell* 18: 3106-3120.
- Koyama Y, Kito M, Takii T, Saiki K, Tsukida K, Yamashita J. (1982)** Configuration of the carotenoid in the reaction centers of photosynthetic bacteria. Comparison of the resonance Raman spectrum of the reaction center of *Rhodospseudomonas sphaeroides* G1C with those of *cis-trans* isomers of β -carotene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics* 680: 109-118.
- Koyama Y, Umemoto Y, Akamatsu A, Uehara K, Tanaka M. (1986)** Raman spectra of chlorophyll forms. *Journal of Molecular Structure* 146: 273-287.
- Koyama Y, Takasuka I, Nakata M, Tasumi M. (1988)** Raman and infrared spectra of the all-trans, 7-cis, 9-cis, 13 cis and 15 cis isomers of β -carotene: key bonds distinguishing stretched or terminal-bent configurations from central-bent configurations. *Journal of Raman Spectroscopy* 19: 37-49.
- Kramer DM, Sacksteder CA. (1998)** A diffused-optics flash kinetic spectrophotometer (DOFS) for measurements of absorbance changes in intact plants in the steady-state. *Photosynthesis Research* 56: 103-112.
- Kramer DM, Sacksteder C, Cruz J. (1999)** How acidic is the lumen? *Photosynthesis Research* 60: 151-163.
- Kramer DM, Cruz JA, Kanazawa A. (2003)** Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. *Trends in Plant Science* 8: 27-32.

- Kramer GF, Krizek DT, Mirecki RM. (1992)** Influence of photosynthetically active radiation and spectral quality on UV-B-induced polyamine accumulation in soybean. *Phytochemistry* 31: 1119-1125.
- Krause GH. (1974)** Changes in chlorophyll fluorescence in relation to light-dependent cation transfer across thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 333: 301-313.
- Krause GH, Weis E. (1991)** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- Krawczyk S. (1989)** The effects of hydrogen bonding and coordination interaction in visible absorption and vibrational spectra of chlorophyll a. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 976: 140-149.
- Krupa Z, Huner NPA, Williams JP, Maissan E, James DR. (1987)** Development at cold-hardening temperatures : The structure and composition of purified rye light harvesting complex II. *Plant Physiology* 84: 19-24.
- Krupa Z, Williams JP, Khan MU, Huner NPA. (1992)** The role of acyl lipids in reconstitution of lipid-depleted light-harvesting complex II from cold-hardened and nonhardened rye. *Plant Physiology* 100: 931-938.
- Kuhlbrandt W, Wang DN, Fujiyoshi Y. (1994)** Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614-621.
- Kung SD, Thornber JP, Wildman SG. (1972)** Nuclear DNA codes for the photosystem II chlorophyll—protein of chloroplast membranes. *FEBS letters* 24: 185-188.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. (2008)** Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228: 367-381.
- Laasch H, Weis E. (1989)** Photosynthetic control, “energy-dependent” quenching of chlorophyll fluorescence and photophosphorylation under influence of tertiary amines. *Photosynthesis Research* 22: 137-146.
- Ladenburg A, Abel J. (1888)** Ueber das Aethylenimin (Spermin?). *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 21: 758-766.
- Laemmli UK. (1970)** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lambert O, Levy D, Ranck JL, Leblanc G, Rigaud JL. (1998)** A new gel-like phase in dodecyl maltoside lipid mixtures: implications in solubilization and reconstitution studies. *Biophysical journal* 74: 918-930.
- Li J, Doyle KM, Tatlisumak T. (2007)** Polyamines in the brain: distribution, biological interactions and their potential therapeutic role in brain ischaemia. *Current Medical Chemistry* 14: 1804-1813.
- Li XP, Bjorkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK. (2000)** A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391-395.
- Li XP, Müller-Moulé P, Gilmore AM, Niyogi KK. (2002)** PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 15222-15227.
- Li XP, Gilmore AM, Caffarri S, Bassi R, Golan T, Kramer D, Niyogi KK. (2004)** Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *Journal of Biological Chemistry* 279: 22866-22874.
- Line MA. (2002)** The enigma of the origin of life and its timing. *Microbiology* 148: 21-27.

- 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 Physiology* 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 2.72Å resolution. *Nature* 428: 287-292.
- Livingston AK, Cruz JA, Kohzuma K, Dhingra A, Kramer DM. (2010)** An Arabidopsis mutant with high cyclic electron flow around photosystem I (hcef) involving the NADPH dehydrogenase complex. *Plant Cell* 22: 221-233.
- Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J. (2005)** Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* 438: 1040-1044.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. (1995)** The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *The Journal of General Physiology* 106: 923-955.
- Lu Z. (2004)** Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annual Review of Physiology* 66: 103-129.
- Lutz M. (1974)** Resonance Raman spectra of chlorophyll in solution. *Journal of Raman Spectroscopy* 2: 497-516.
- Lutz M. (1979)** Diffusion Raman de résonance des chlorophylles : application à l'étude de l'organisation de la membrane photosynthétiques. Thèse de doctorat d'état, Université Pierre et Marie Curie Paris VI.
- Lutz M. (1984)** Resonance Raman studies in photosynthesis. In: Clark RJH, Hester RE. (eds) *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons Chichester Vol 11: 211-300.
- Lutz M, Szponarski W, Berger G, Robert B, Neumann J-M. (1987)** The stereoisomerism of bacterial, reaction-center-bound carotenoids revisited: an electronic absorption, resonance Raman and [1]H NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 894:423-433.
- Lutz M, Robert B. (1988)** Chlorophylls and the photosynthetic membrane. In: Spiro T. (ed) *Biological applications of Raman spectroscopy*. Wiley, New York Vol III: 347-411.
- Lutz M, Mantele W. (1991)** Vibrational spectroscopy of chlorophylls. In: Scheer H. (ed) *Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton, FL pages 855-902.
- Martin-Tanguy J. (1997)** Conjugated polyamines and reproductive development: Biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiologia Plantarum* 100: 675-688.
- Mattioli TA, Hoffmann A, Sockalingum DG, Schrader B, Robert B, Lutz M. (1993)** Application of near-IR Fourier transform resonance Raman spectroscopy to the study of photosynthetic proteins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* 49: 785-799.
- Mattoo AK, Pick U, Hoffman-Falk H, Edelman M. (1981)** The rapidly metabolized 32,000-dalton polypeptide of the chloroplast is the "proteinaceous shield" regulating photosystem II electron transport and mediating diuron herbicide sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 78: 1572-1576.
- Meyer G, Kloppstech K. (1984)** A rapidly light-induced chloroplast protein with a high turnover coded for by pea nuclear DNA. *European Journal of Biochemistry* 138: 207-207.
- Miloslavina Y, Wehner A, Lambrev PH, Wientjes E, Reus M, Garab G, Croce R, Holzwarth AR. (2008)** Far-red fluorescence: A direct spectroscopic marker for LHClI oligomer formation in non-photochemical quenching. *FEBS letters* 582: 3625-3631.
- Mullet JE. (1983)** The amino acid sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 258: 9941-9948.

- Mullineaux CW, Pascal AA, Horton P, Holzwarth AR. (1993)** Excitation-energy quenching in aggregates of the LHC II chlorophyll-protein complex: a time-resolved fluorescence study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1141: 23-28.
- Navakoudis E, Lütz C, Langebartels C, Lütz-Meindl U, Kotzabasis K. (2003)** Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1621: 160-169.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767: 261-271.
- Nelson N, Ben-Shem A. (2004)** The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 971-982.
- Nelson N. (2011)** Photosystems and global effects of oxygenic photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807: 856-863.
- New RRC. (1990)** Liposomes: a practical approach. Oxford: Oxford University Press.
- Nichols CG, Lopatin AN. (1997)** Inward rectifier potassium channels. *Annual Review of Physiology* 59: 171-191.
- Niedzwiedzki D, Gruszecki WI. (2003)** Interaction between chlorophyll a and violaxanthin in different steric conformations: Model studies in monomolecular layers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 28: 27-38.
- Niyogi KK. (1999)** Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 333-359.
- Niyogi KK, Shih C, Soon Chow W, Pogson B, DellaPenna D, Björkman O. (2001)** Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. *Photosynthesis Research* 67: 139-145.
- Noctor G, Rees D, Young A, Horton P. (1991)** The relationship between zeaxanthin, energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence, and trans-thylakoid pH gradient in isolated chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1057: 320-330.
- Noctor G, Ruban AV, Horton P. (1993)** Modulation of Δ pH-dependent nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1183: 339-344.
- Oba T, Tamiaki H. (2002)** Which side of the π -macrocycle plane of (bacterio)chlorophylls is favored for binding of the fifth ligand? *Photosynthesis Research* 74: 1-10.
- Ohad I, Kyle DJ, Arntzen CJ. (1984)** Membrane protein damage and repair: removal and replacement of inactivated 32-kilodalton polypeptides in chloroplast membranes. *The Journal of Cell Biology* 99: 481-485.
- Oliver AE, Deamer DW. (1994)** Alfa-helical hydrophobic polypeptides form protonselective channels in lipid bilayers. *Biophysical Journal* 66: 1364-1379.
- Oliver D, Baukowitz T, Fakler B. (2000)** Polyamines as gating molecules of inwardrectifier K^+ channels. *European Journal of Biochemistry* 267: 5824-5829.
- Orzel L, Fiedor L, Wolak M, Kania A, van Eldik R, Stochel G. (2008)** Interplay between acetate ions, peripheral groups, and reactivity of the core nitrogens in transmetalation of tetrapyrroles. *Chemistry - A European Journal* 14: 9419-9430.

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. *The Journal of Physical Chemistry* 90: 6105-6112.

Pagano A, Cinque G, Bassi R. (1998) In vitro reconstitution of the recombinant photosystem II light-harvesting complex CP24 and its spectroscopic characterization. *The Journal of biological chemistry* 273: 17154-17165.

Pal Bais H, Ravishankar GA. (2002) Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 1-34.

Papageorgiou GC. (2004) Fluorescence of photosynthetic pigments in vitro and in vivo. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds.) Springer Dordrecht. *Chlorophyll a Fluorescence, a signature of photosynthesis* p43-63.

Pascal AA, Caron L, Rousseau B, Lapouge K, Duval JC, Robert B. (1998) Resonance Raman spectroscopy of a light-harvesting protein from the brown alga *Laminaria saccharina*. *Biochemistry* 37: 2450-2457.

Pascal AA, Wacker U, Irrgang KD, Horton P, Renger G, Robert B. (2000) Pigment binding site properties of two photosystem II antenna proteins. A resonance raman investigation. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 22031-22036.

Pascal AA, Liu Z, Broess K, van Oort B, van Amerongen H, Wang C, Horton P, Robert B, Chang W, Ruban A. (2005) Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature* 436: 134-137.

Pegg AE. (1988) Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Research* 48: 759-774.

Pegg AE. (2009) Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61: 880-889.

Pennington FC, Boyd SD, Horton H, Taylor SW, Wulf DG, Katz JJ, Strain HH. (1967) Reaction of chlorophylls a and b with amines. Isocyclic ring rupture and formation of substituted chlorin-6-amides. *Journal of the American Chemical Society* 89: 3871-3875.

Pennington FC, Boettcher NB, Katz JJ. (1974) Ring V reactions of chlorophylls and pheophytins with amines. *Bioorganic Chemistry* 3: 204-212.

Pera PJ, Kramer DL, Sufrin JR, Porter CW. (1986) Comparison of the biological effects of four irreversible inhibitors of ornithine decarboxylase in two murine lymphocytic leukemia cell lines. *Cancer Research* 46: 1148-1154.

Perutz MF. (1989) Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 22: 139-236.

Peter GF, Thornber JP. (1991) Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *Journal of Biological Chemistry* 266: 16745-16754.

Phillip D, Ruban AV, Horton P, Asato A, Young AJ. (1996) Quenching of chlorophyll fluorescence in the major light-harvesting complex of photosystem II: a systematic study of the effect of carotenoid structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 1492-1497.

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE. (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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 975: 384-394.

- Powles SB. (1984)** Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 15-44.
- Ratsep M, Linnanto J, Freiberg A. (2009)** Mirror symmetry and vibrational structure in optical spectra of chlorophyll a. *Journal of Chemical Physics* 130: 194501.
- Rees D, Young A, Noctor G, Britton G, Horton P. (1989)** Enhancement of the Δ pH-dependent dissipation of excitation energy in spinach chloroplasts by light-activation: correlation with the synthesis of zeaxanthin. *FEBS letters* 256: 85-90.
- Rees D, Noctor G, Ruban AV, Crofts J, Young A, Horton P. (1992)** pH dependent chlorophyll fluorescence quenching in spinach thylakoids from light treated or dark adapted leaves. *Photosynthesis Research* 31: 11-19.
- Renganathan M, Dilley RA. (1994)** Evidence that the intrinsic membrane protein LHCII in thylakoids is necessary for maintaining localised Δ H⁺energy coupling. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26: 101–109.
- Rigaud JL, Pitard B, Levy D. (1995)** Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1231: 223-246.
- Rigaud JL, Lévy D. (2003)** Reconstitution of membrane proteins into liposomes. In: Nejat D. (ed.) Academic Press. *Methods in Enzymology* 372: 65-86.
- Rimai L, Heyde ME, Gill D. (1973)** Vibrational spectra of some carotenoids and related linear polyenes. A Raman spectroscopic study. *Journal of American Chemical Society* 95: 4493-4501.
- Rivadossi A, Zucchelli G, F.M. G, R.C. J. (1999)** The importance of PSI chlorophyll red forms in light-harvesting by leaves. *Photosynthesis Research* 60: 209–215.
- Rivadossi A, Zucchelli G, Garlaschi FM, Jennings RC. (2004)** Light absorption by the chlorophyll a/b complexes of photosystem II in a leaf with special reference to LHCII. *Photochemistry and Photobiology* 80: 492-498.
- Robert B. (2004)** Resonance Raman studies in photosynthesis — chlorophyll and carotenoid molecules. In: Amesz J, Hoff AJ. (eds.) Springer Netherlands. *Biophysical Techniques in Photosynthesis* 3: 161-176.
- Robert B. (2009)** Resonance Raman spectroscopy. *Photosynthesis Research* 101: 147-155.
- Ruban AV, Rees D, Noctor GD, Young A, Horton P. (1991)** Long-wavelength chlorophyll species are associated with amplification of high-energy-state excitation quenching in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1059: 355-360.
- Ruban AV, Horton P. (1992)** Mechanism of Δ pH-dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. I. Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1102: 30-38.
- Ruban AV, Walters RG, Horton P. (1992a)** The molecular mechanism of the control of excitation energy dissipation in chloroplast membranes Inhibition of Δ pH-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by dicyclohexylcarbodiimide. *FEBS letters* 309: 175-179.
- Ruban AV, Rees D, Pascal AA, Horton P. (1992b)** Mechanism of Δ pH-dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. II. The relationship between LHCII aggregation in vitro and qE in isolated thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1102: 39-44.
- Ruban AV, Young AJ, Horton P. (1993)** Induction of nonphotochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves (evidence for changes in the state of the light-harvesting system of photosystem II in vivo). *Plant Physiology* 102: 741-750.

- Ruban AV, Horton P. (1994)** Spectroscopy of non-photochemical and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in leaves; evidence for a role of the light harvesting complex of Photosystem II in the regulation of energy dissipation. *Photosynthesis Research* 40: 181-190.
- Ruban AV, Young A, Horton P. (1994)** Modulation of chlorophyll fluorescence quenching in isolated light harvesting complex of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1186: 123-127.
- Ruban AV, Horton P, Robert B. (1995)** Resonance Raman spectroscopy of the photosystem II light-harvesting complex of green plants: a comparison of trimeric and aggregated states. *Biochemistry* 34: 2333-2337.
- Ruban AV, Young AJ, Horton P. (1996)** Dynamic properties of the minor chlorophyll a/b binding proteins of photosystem II, an in vitro model for photoprotective energy dissipation in the photosynthetic membrane of green plants. *Biochemistry* 35: 674-678.
- Ruban AV, Phillip D, Young AJ, Horton P. (1997a)** Carotenoid-dependent oligomerization of the major chlorophyll a/b light harvesting complex of photosystem II of plants. *Biochemistry* 36: 7855-7859.
- Ruban AV, Calkoen F, Kwa SLS, van Grondelle R, Horton P, Dekker JP. (1997b)** Characterisation of LHC II in the aggregated state by linear and circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1321: 61-70.
- Ruban AV, Horton P. (1999)** The Xanthophyll Cycle Modulates the Kinetics of Nonphotochemical Energy Dissipation in Isolated Light-Harvesting Complexes, Intact Chloroplasts, and Leaves of Spinach. *PLANT PHYSIOLOGY* 119: 531-542.
- Ruban AV, Lee PJ, Wentworth M, Young AJ, Horton P. (1999)** Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. *Journal of Biological Chemistry* 274: 10458-10465.
- Ruban AV, Pascal AA, Robert B. (2000)** Xanthophylls of the major photosynthetic light-harvesting complex of plants: identification, conformation and dynamics. *FEBS letters* 477: 181-185.
- Ruban AV, Pascal AA, Robert B, Horton P. (2001)** Configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants. *Journal of Biological Chemistry* 276: 24862-24870.
- Ruban AV, Wentworth M, Yakushevskaya AE, Andersson J, Lee PJ, Keegstra W, Dekker JP, Boekema EJ, Jansson S, Horton P. (2003)** Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization. *Nature* 421: 648-652.
- Ruban AV, Berera R, Ilioaia C, van Stokkum IHM, Kennis JTM, Pascal AA, 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 AV, Johnson MP, Duffy CDP. (2012)** The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817: 167-181.
- Sapozhnikov DI, Krasovskaya TA, Maevskaya AN. (1957)** Change in the interrelationship of the basic carotenoids of the plastids of green leaves under the action of light. *Doklady Akademicheskikh Nauk SSSR* 113: 465-467.
- Schönfeld M, Schickler H. (1984)** The permeability of the thylakoid membrane for protons. *FEBS Letters* 167: 231-234.
- Schönfeld M, Kopeliovitch BS. (1985)** Kinetics of dark proton efflux in chloroplasts. *FEBS Letters* 193: 79-82.

- Schreiber U. (1986)** Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynthesis Research* 9: 261-272.
- Schulz H, Baranska M. (2007)** Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 43: 13-25.
- Schuster I, Bernhardt R. (2011)** Interactions of natural polyamines with mammalian proteins. *BioMolecular Concepts* 2: 79-94.
- Serafini-Fracassini D, Del Duca S, Beninati S. (1995)** Plant transglutaminases. *Phytochemistry* 40: 355-365.
- Sfakianaki M, Sfichi L, Kotzabasis K. (2006)** The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 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. *Photochemistry and Photobiology* 80: 499-506.
- Shabala S, Cuin TA. (2008)** Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* 133: 651-669.
- Shipman LL, Cotton TM, Norris JR, Katz JJ. (1976)** An analysis of the visible absorption spectrum of chlorophyll a monomer, dimer, and oligomers in solution. *Journal of the American Chemical Society* 98: 8222-8230.
- Snyder AM, Clark BM, Robert B, Ruban AV, Bungard RA. (2004)** Carotenoid specificity of light-harvesting complex II binding sites. *Journal of Biological Chemistry* 279: 5162-5168.
- Spaulding LC, Chang CC, Yu NT, Felton RH. (1975)** Resonance Raman spectra of metalloctaethylporphyrins. A structural probe of metal displacement. *Journal of American Chemical Society* 97: 2517-2525.
- Spiro TG, Strekas TC. (1974)** Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state. *Journal of the American Chemical Society* 96: 338-345.
- Spiro TG, Stong JD, Stein P. (1979)** Porphyrin core expansion and doming in heme proteins. New evidence from resonance Raman spectra of six-coordinate high-spin iron(III) hemes. *Journal of the American Chemical Society* 101: 2648-2655.
- Standfuss J, Kuhlbrandt W. (2004)** The three isoforms of the light-harvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation, and functional roles. *Journal of Biological Chemistry* 279: 36884-36891.
- Standfuss J, Terwisscha van Scheltinga AC, Lamborghini M, Kuhlbrandt W. (2005)** Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5Å resolution. *EMBO Journal* 24: 919-928.
- Steiner E, Fowler PW. (2002)** Ring currents in the porphyrins: a four-orbital model. *ChemPhysChem* 3:114-116.
- Sundholm D. (1999)** Density functional theory calculations of the visible spectrum of chlorophyll a. *Chemical Physics Letters* 302: 480-484.
- Tabor CW, Tabor H. (1984)** Polyamines. *Annual Review of Biochemistry* 53: 749-790.
- Tao X, Avalos JL, Chen J, MacKinnon R. (2009)** Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K⁺ channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 326: 1668-1674.

- Tasumi M, Fujiwara M. (1987)** Vibrational spectra of chlorophylls. In: Clark RJH, Hester RE. (Eds) *Advances in Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester, Vol 14: 407-428.
- Telfer A, He W-Z, Barber J. (1990)** Spectral resolution of more than one chlorophyll electron donor in the isolated Photosystem II reaction centre complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1017: 143-151.
- Teraoka J, Kitagawa T. (1980)** Resonance Raman study of the heme-linked ionization in reduced horseradish peroxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 93: 694-700.
- Thibodeau DL, Koningstein JA. (1989)** Resonance Raman excitation profiles and structure of a T-shaped chlorophyll dimer in solution. *Journal of Physical Chemistry* 93: 7713-7717.
- Thomas LL, Kim JH, Cotton TM. (1990)** Comparative study of resonance Raman and surface-enhanced resonance Raman chlorophyll a spectra using solet and red excitation. *Journal of the American Chemical Society* 112: 9378-9386.
- Thomas T, Thomas TJ. (2001)** Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 244- 258.
- Tiburcio AF, Altabella T, Borell A, Masgrau C. (1997)** Polyamine metabolism and its regulation. *Physiologia Plantarum* 100: 664-674.
- Trent JT, Watts RA, Hargrove MS. (2001)** Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen. *Journal of Biological Chemistry* 276: 30106-30110.
- Valkunas L, Trinkunas G, Chmeliov J, Ruban AV. (2009)** Modeling of exciton quenching in photosystem II. *Physical Chemistry Chemical Physics* 11: 7576-7584.
- van Amerongen H, Dekker JP. (2003)** Light-harvesting in photosystem II. In: Green BR, Parson WW. (eds.) *Light-harvesting antennas in photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pages 219-251.
- van Leeuwenhoek A. (1678)** *Observationes D. Anthonii Leeuwenhoek, de natis e semine genital animalculis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 12: 1040-1043.
- van Oort B, van Hoek A, Ruban AV, van Amerongen H. (2007)** Aggregation of light-harvesting complex II leads to formation of efficient excitation energy traps in monomeric and trimeric complexes. *FEBS letters* 581: 3528-3532.
- Vasil'ev S, Irrgang KD, Schrotter T, Bergmann A, Eichler HJ, Renger G. (1997)** Quenching of chlorophyll a fluorescence in the aggregates of LHCII: Steady state fluorescence and picosecond relaxation kinetics. *Biochemistry* 36: 7503-7512.
- Votyakova TV, Wallace HM, Dumber B, Wilson SB. (1999)** The covalent attachment of polyamines to proteins in plant mitochondria. *European Journal of Biochemistry* 260: 250-257.
- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. (2003)** A perspective of polyamine metabolism. *Biochemical Journal* 376: 1-14.
- Walters RG, Ruban AV, Horton P. (1994)** Higher plant light-harvesting complexes LHCIIa and LHCIIc are bound by dicyclohexylcarbodiimide during inhibition of energy dissipation. *European Journal of Biochemistry* 226: 1063-1069.
- Wardak A, Brodowski R, Krupa Z, Gruszecki WI. (2000)** Effect of light-harvesting complex II on ion transport across model lipid membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 56: 12-18.
- Wedell N, Klein R, Ljungberg U, Andersson B, Herrmann RG. (1992)** The single-copy gene psbS codes for a phylogenetically intriguing 22 kD polypeptide of photosystem II. *FEBS letters* 314: 61-66.

- Weeb MS, Green BR. (1991)** Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1060: 133-158.
- Weis E, Berry JA. (1987)** Quantum efficiency of Photosystem II in relation to energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 894: 198-208.
- Weiss C. (1975)** The molecular orbital theory of chlorophyll. *Annals of the New York Academy of Sciences* 244: 204-213.
- Weiss TS, Herfarth H, Obermeier F, Quart J, Vogl D, Schölmerich J, Jauch KW, Rogler G. (2004)** Intracellular polyamine levels of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 10: 529-535.
- Weitman H, Shatz S, Ehrenberg B. (2009)** Complexation of Mg-tetrabenzoporphyrin with pyridine enhances singlet oxygen generation and affects its partitioning into apolar microenvironments. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 203: 7-12.
- Weller A, Livingston R. (1954)** The reaction of chlorophyll in amines. *Journal of the American Chemical Society* 76: 1575-1578.
- Williams-Ashman HG, Canellakis ZN. (1980)** Transglutaminase-mediated covalent attachment of polyamines to proteins: mechanisms and potential physiological significance. *Physiological Chemistry and Physics* 12(5): 457-472.
- Williams K. (1997a)** Modulation and block of ion channels: A new biology of polyamines. *Cellular Signalling* 9: 1-13.
- Williams K. (1997b)** Interactions of polyamines with ion channels. *Biochemical Journal* 325: 289-297.
- Witt HT. (1979)** Energy conversion in the functional membranes of photosynthesis analysis by light pulse and electric pulse methods. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 505: 355-427.
- Wraight CA, Crofts AR. (1970)** Energy-dependent quenching of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *European Journal of Biochemistry* 17: 319-327.
- Wu J, Shang Z, Wu J, Jiang X, Moschou PN, Sun W, Roubelakis-Angelakis KA, Zhang S. (2010)** Spermidine oxidase-derived H₂O₂ regulates pollen plasma membrane hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channels and pollen tube growth. *The Plant Journal* 63: 1042-1053.
- Xiaowei P, Mei L, Tao W, Longfei W, Chenjun J, Zhiqiang H, Xuelin Z, Jiping Z, Wenrui C. (2011)** Structural insights into energy regulation of light-harvesting complex CP29 from spinach. *Nature Structural & Molecular Biology* 18: 309-315.
- Yamamoto HY, Nakayama TOM, Chichester CO. (1962)** Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 97: 168-173.
- Yamamoto T, Palmer G, Gill D, Salmeen IT, Rimai L. (1973)** The valence and spin state of iron in oxyhemoglobin as inferred from resonance Raman spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* 248: 5211-5213.
- Zia A, Johnson MP, Ruban AV. (2011)** Acclimation- and mutation-induced enhancement of PsbS levels increase photoprotective energy dissipation in the absence of antheraxanthin and zeaxanthin. *Planta* 233: 1253-1264.
- Zignani M, Drummond DC, Meyer O, Hong K, Leroux JC. (2000)** In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1463: 383-394
- Zolotareva EK, Podorvanov VV, Tereshchenko AF, Ruban AV, Horton P. (1999)** Energy-dependent tritium incorporation into LHCII proteins of chloroplasts. *Doklady of National Academy of Science of Ukraine SSR B* 11: 152-156.

Γανωτάκης Δ, Κοτζαμπάσης Κ. (2003) Φωτοσύνθεση Ι: Μετατροπή της ηλιακής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια. Στο βιβλίο: Φυσιολογία φυτών Από το μόριο στο περιβάλλον. Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη (Επιμ.) Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, ISBN: 978-960-524-168-1 σελ. 147-159.

