
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

**Συγκριτική μελέτη του ρόλου των πολυαμινών
στη φωτοανεξάρτητη και φωτοεξαρτώμενη ανάπτυξη και λειτουργική οργάνωση
του φωτοσυνθετικού μηχανισμού**

Νικόλαος Ε. Ιωαννίδης

Βιολόγος, MSc

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006

**Συγκριτική μελέτη του ρόλου των πολυαμινών
στη φωτοανεξάρτητη και φωτοεξαρτώμενη ανάπτυξη και λειτουργική οργάνωση του
φωτοσυνθετικού μηχανισμού**

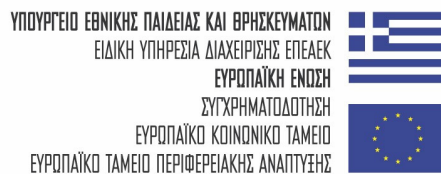
Από

Νικόλαο Ε. Ιωαννίδη

Πτυχ. Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης, 1999

MSc Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών, 2001

Υποβλήθηκε ως μέρος των απαιτήσεων για τον τίτλο του Διδάκτορα
στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ με τίτλο
‘Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών’
του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης



Επιβλέπων: Αναπλ. Καθηγητής **Κυριάκος Κοτζαμπάσης**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κ. Κοτζαμπάσης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Δ. Γανωτάκης, Καθηγητής

Ν. Πανόπουλος, Καθηγητής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κ. Κοτζαμπάσης, Αναπλ. Καθηγητής Τμ. Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων)

Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Καθηγήτρια Τμ. Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ν. Πανόπουλος, Καθηγητής Τμ. Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Δ. Γανωτάκης, Καθηγητής Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Β. Μπουριώτης, Καθηγητής Τμ. Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γ. Τσιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Τμ. Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Σ. Πυρίντσος, Επίκουρος Καθηγητής Τμ. Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Στο εξώφυλλο: Η απεικόνιση επιμέρους βημάτων της παρούσας εργασίας με την παράθεση εικόνων και σχημάτων από τη διεθνή βιβλιογραφία και από τα αποτελέσματα των τεσσάρων κεφαλαίων αυτής της διατριβής. Οι πολυαμίνες τοποθετούνται κεντρικά και τα βέλη καταλήγουν με λογικά βήματα σε δύο μοντέλα. Όλα τα παραπάνω εξηγούνται στο κείμενο.

Αφιερωμένο

σε εκείνο το φυτώριο
που βοηθά ακόμη και τον ταλαιπωρημένο σπόρο
να βλαστήσει
αλλά και επιτρέπει στους δυνατούς
να μεγαλώσουν όσο πιο πολύ μπορούν

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φωτοβιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή **Κ. Κοτζαμπάση**, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την αδιάκοπη επιστημονική καθοδήγηση και συνεργασία στη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ το Υπουργείο Παιδείας για την τρίχρονη υποτροφία ‘Ηράκλειτος’ που μου χορήγησε και την κα. Γ. Σπετσίδου για τον κ. Χ. Στρατήγη που ήταν υπεύθυνοι για τη γραμματειακή υποστήριξη.

Ευχαριστώ την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, τον Επιβλέποντα Καθηγητή Κ. Κοτζαμπάση, τον Καθηγητή Δ. Γανωτάκη και τον Καθηγητή Ν. Πανόπουλο για το χρόνο που διέθεσαν και τα εύστοχα σχόλια.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που αποδέχθηκαν την πρόταση να εξετάσουν τη διατριβή, αλλά και για τις εύστοχες παρατηρήσεις.

Επίσης ευχαριστώ:

Την Καθηγήτρια Ursula Luetz-Meindl (Πανεπιστήμιο Innsbruck, Αυστρία) για την ηλεκτρονική μικροσκοπία σε πολυάριθμα δείγματα.

Τον Dr Dieter Doernemann (Πανεπιστήμιο Marburg, Γερμανία) για τις χρήσιμες επιστημονικές συμβουλές του κατά τις δύο επισκέψεις μου στο εργαστήριο του στη Γερμανία (Αύγουστος 2003 και Σεπτέμβριος 2004).

Τον Καθηγητή Norman Bishop (Πανεπιστήμιο Oregon, Η.Π.Α.) για την ευγενική χορήγηση των πολύτιμων μεταλλαγμάτων C-2A' και Wt-LHC του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*.

Τον Καθηγητή Reto J. Strasser (Πανεπιστήμιο Geneva, Ελβετία) για τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές του για την ανάλυση φυσικοχημικών δεδομένων κατά τα δύο τελευταία διεθνή συνέδρια των Ευρωπαίων Φυσιολόγων Φυτών (FESPB).

Την Dr Nico Cellinese (Πανεπιστήμιο Yale, New Haven) για την πρόσκληση και την ευκαιρία να έρθω σε επαφή με την αμερικάνικη πραγματικότητα.

Τον Dr Ronald Maldonado-Rodriguez για την ευγενική προσφορά του λογισμικού Biolyser 3.0.

Τον Dr Γεώργιο Γουλιέλμο για την βοήθεια στα μοριακά.

Την Dr Ελένη Ναβακούδη για την βοήθεια σε επιστημονικά και τεχνικά ζητήματα .

Τον Dr Λάμπρο Παναγή για την φωτογράφιση δειγμάτων και τις συμβουλές σε υπολογιστικά προγράμματα και λογισμικό.

Τον Dr Νικόλαο Παρανυχιανάκη για τις χρήσιμες συμβουλές στη Φυσιολογία φυτών.

Τη Βιολόγο MSc Liliana Sfichi για τη βοήθεια στην εμβάθυνση της φωτοσύνθεσης.

Τη Βιολόγο MSc Αναστασία Δ. Γαζή για τη βοήθεια σε επιστημονικά και τεχνικά ζητήματα.

Τον Φυσικό MSc Ιωάννη Παπαδάκη για τις γόνιμες συζητήσεις και τις εξηγήσεις δυσνόητων εννοιών.

Το Στέλιο Μαυράκη για τη διάθεση φυτικού υλικού.

Τον Κώστα Πετρόπουλο για την άμεση επιδιόρθωση φυγοκέντρων, φωτομέτρων και άλλων απαραίτητων μηχανημάτων.

Τον Νεκτάριο Παπαδάκη για την υπολογιστική υποστήριξη.

Τη Βάνα Μακράκη για την γραμματειακή υποστήριξη.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου Φωτοβιολογίας για την αγάπη τους και την κατανόησή τους: Χριστίνα Νεονάκη (Βιολόγο), Χρήστο Κοτάκη (Βιολόγο), Κατερίνα Παπαζή (Χημικό Μηχανικό).

Επίσης ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους από το κοντινό εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών για την άμεση βοήθειά τους οποτεδήποτε τους χρειάστηκα: Γιάννη Ντελή, Δαμιανό Σκοπελίτη, Ευθύμη Αδρώνη.

Η ανάγκη προσαρμογής στον τυπικό τρόπο γραφής στεγνώνει αναγκαστικά τον καρπό μιας πολυετούς, εντατικής προσπάθειας από την ιδιαίτερη συγκίνηση που προσέφερε η ερευνητική εργασία στον πιο πολύπλοκο και σημαντικό τομέα του φαινομένου της ζωής. Αν σταματήσει η λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, ελάχιστες μορφές ζωής στον πλανήτη δεν θα εξαφανιστούν. Πάνω από τρία δισεκατομμύρια χρόνια δοκιμάζεται και εξελίσσεται αυτή η μηχανή σε συνεχώς μεταβαλλόμενες συνθήκες. Η φωτοσύνθεση, ειδικά όταν την παρακολουθείς σε πραγματικό χρόνο και σε *in vivo* συνθήκες, σε καθηλώνει. Ο σχεδιασμός και η ανάλυση των πειραμάτων, η αιτιολογική λειτουργία των πολυαμινοξέων, τα παράδοξα της φύσης των βιολογικών συστημάτων, η ελκυστική βιβλιογραφία και η συνεχής εμβάθυνση σε ένα μικρό κομμάτι γνώσης κρύβουν τόσες συγκινήσεις όσες και το ταξίδι ενός Οδυσσέα. Άλλοι δώδεκα θρύλοι, που βοήθησαν με τον τρόπο τους είναι οι: Govindjee, Papageorgiou, Strasser, Mitchel, Williams, Barber, Avron, Horton, Bassi, Dilley, Kramer, Murphy, Feynman.

ΒΑΣΙΚΗ ΔΟΜΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ



1^ο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Αποτελέσματα
-
Συζήτηση



2^ο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Αποτελέσματα
-
Συζήτηση



3^ο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Αποτελέσματα
-
Συζήτηση



4^ο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Αποτελέσματα
-
Συζήτηση

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	I
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	II
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	IV
ABSTRACT	VII
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Φωτοσύνθεση	2
2. Πολυαμίνες	19
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	29
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : Ο ρόλος των πολυαμινών στη φωτοεξαρτώμενη, στη φωτοανεξάρτητη βιογένεση και στη λειτουργική ενεργοποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο : Η επίδραση των πολυαμινών στη διαχείριση της φωτονιακής ενέργειας από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	106
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	122
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο : <i>In vitro</i> μελέτη του μηχανισμού μη φωτοχημικής απόσβεσης ενέργειας	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	128
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	136
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο : Κατιοντικές και μη κατιοντικές δράσεις των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό απομονωμένων χλωροπλαστών	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	145
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	156
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	170

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ATP : αδενοσινο-5-τριφωσφορικός εστέρας
ATPση : συνθάση ATP
Chl : χλωροφύλλη
Chlide : χλωροφυλλίδιο
Con : μάρτυρας
CP : σύμπλοκα χλωροφυλλών-πρωτεϊνών
CS : διεγείρομενος τομέας
Cytb₆f : κυτόχρωμα b₆f
ΔpH : διαφορά πρωτονιακής συγκέντρωσης μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης
Δψ : διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού κατά μήκος της μεμβράνης
DAO : οξειδάση των διαμινών
DCMU: 3, (3, 4)-διχλωροφαινυλ-διμεθυλουρία
DDM : δωδεκύλ-β-D-μαλτοπυρανοσίδιο
DI : διαχεόμενη ενέργεια
DTT : διθειοθρεϊτόλη
F_m : μέγιστη τιμή PSII προερχόμενου φθορισμού για δείγμα προσαρμοσμένο στο απόλυτο σκοτάδι
F_m' : μέγιστη τιμή PSII προερχόμενου φθορισμού για δείγμα προσαρμοσμένο σε συγκεκριμένη ένταση φωτισμού
F_o : ελάχιστη τιμή PSII προερχόμενου φθορισμού για δείγμα προσαρμοσμένο στο απόλυτο σκοτάδι
F_s : τιμή PSII προερχόμενου φθορισμού για δείγμα, το οποίο προσαρμόστηκε σε συγκεκριμένη ένταση φωτισμού
Hepes : N-2-υδροξυαιθυλοπιπεραζίνη-N'-2-αιθανοθειικό οξύ
HPLC : υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
kD : kilodalton
LHC : σύμπλοκο συλλογής φωτός
NADP : νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο φωσφορικού εστέρα
NPQ : μη φωτοχημική απόσβεση ενέργειας
OJIP : φάσεις κινητικής φθορισμού του PSII, οι οποίες εμφανίζονται όταν από 100% ανοιχτά κέντρα αντίδρασης καταλήγουμε σε 100% κλειστά κέντρα.
OEC : σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου
PAR : φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία (400-700 nm)
Pchlide : πρωτοχλωροφυλλίδιο
PCV : κυτταρική βιομάζα
PLB : προελασματοειδή
PMS : μεθυλοθειική φαιναζίνη
POR : οξειδοαναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου
PQ : δεξαμενή πλαστοκινόνης
PSI : φωτοσύστημα I
PSII : φωτοσύστημα II
Put : πουτρεσίνη
Q_A : πλαστοκινόνη, πρωτοταγής ηλεκτρονιοδέκτης του φωτοσυστήματος II
Q_B : πλαστοκινόνη, δευτεροταγής ηλεκτρονιοδέκτης του φωτοσυστήματος II
qE : συντελεστής απόσβεσης ενέργειας λόγω ενεργοποίησης της μεμβράνης των θυλακοειδών
qI : συντελεστής απόσβεσης ενέργειας λόγω φωτοαναστολής

qT : συντελεστής απόσβεσης ενέργειας λόγω μετακίνησης μέρους της φωτοσυλλεκτικής
κεραίας από το φωτοσύστημα I στο φωτοσύστημα II
SDS : δωδεκυλοθειϊκό νάτριο
Spd : σπερμιδίνη
Spm : σπερμίνη
TCA : τριχλωροοξικό οξύ
TEMED : N, N, N', N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη
TGase : τρανσγλουταμινάση
Tricine : N-τρικς (υδροξυμεθυλο-) μεθυλο-γλυκίνη
Tris : τρικς-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο
Tris : τρικς-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο
Triton X-100 : πολύ-αιθυλένο γλυκόλ οκτυλ-φαινόλικός αιθέρας
Wt : άγριος τύπος
Zea : ζεαξανθίνη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός στα ανώτερα φυτά και τα χλωροφύκη αποτελείται από τέσσερα μεγαλομοριακά σύμπλοκα, που εδράζονται ανυσματικά στις θυλακοειδείς μεμβράνες του χλωροπλάστη και κατηγοριοποιούνται σε δύο είδη φωτοσυστημάτων (I και II), ένα κυτόχρωμα (Cytb₆f) και μία συνθάση ATP. Τα τρία πρώτα είναι υπεύθυνα για τη ροή των ηλεκτρονίων και την φόρτιση της μεμβράνης των θυλακοειδών από πρωτόνια, που απελευθερώνονται προς την πλευρά του μικροχώρου. Η τελευταία (ATPάση) είναι υπεύθυνη για την αποφόρτιση της μεμβράνης και την παραγωγή ενέργειας υπο μορφή ATP. Τα σύμπλοκα λειτουργούν συγχρόνως και η ροή των ηλεκτρονίων είναι συζευγμένη με την σύνθεση ATP. Η λειτουργικότητα του μηχανισμού κάτω από τις διαρκώς μεταβαλλόμενες συνθήκες (π.χ. θερμοκρασίας, έντασης φωτός, διαθεσιμότητας θρεπτικών), εξασφαλίζεται με πολύπλοκους μηχανισμούς αυτορρύθμισης. Η ταχύτατη ενεργοποίηση (ακόμη και εντός δευτερολέπτων) αυτών των εξειδικευμένων δικλείδων ασφαλείας και η ελεγχόμενη ενεργοποίηση, μόνο όταν το απαιτούν οι συνθήκες, εξασφαλίζει υψηλότερες αποδόσεις σε χαμηλό φωτισμό και από την άλλη υψηλή φωτοπροστασία σε έντονο φωτισμό. Η παρούσα εργασία αφιερώθηκε στη μελέτη του ρόλου των πολυαμινών (πουτρεσίνη: Put, σπερμιδίνη: Spd και σπερμίνη: Spm) κατά την ανάπτυξη και τη λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Οι πολυαμίνες είναι χαμηλού μοριακού βάρους αμίνες με 2, 3, και 4 αμινομάδες, αντίστοιχα, που απαντώνται σε όλα τα κύτταρα (προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά). Θεωρούνται αυξητικοί παράγοντες χωρίς όμως να έχει βρεθεί ο μοριακός μηχανισμός δράσης τους. Επίσης, συνδέονται με την αντοχή των κυττάρων σε καταπονήσεις και συνήθως ανικανότητα αύξησης των πολυαμινών σε συνθήκες καταπόνησης αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων/οργανισμών. Στο χλωροπλάστη είναι παρούσες σε φυσιολογικές συνθήκες και σταθεροποιούνται σε νέα επίπεδα μετά από μία σημαντική μείωση κατά τη διαφοροποίηση του πλαστιδίου, αλλά η γνώση για τον τρόπο με το οποίο δρουν είναι αποσπασματική. Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να αποσαφηνισθεί ο ρόλος τους στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Τα πειραματικά αποτελέσματα είναι χωρισμένα σε 4 θεματικές ενότητες (4 Κεφάλαια). Στο 1^ο κεφάλαιο, η συγκριτική μελέτη της φωτοανεξάρτητης και της φωτοεξαρτώμενης βιογένεσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αποκάλυψε ότι ο λόγος που οι πολυαμίνες μειώνονται φυσιολογικά κατά τη βιογένεση είναι διότι πρέπει να επιτρέψουν τη βιοσύνθεση της χλωροφύλλης και την συνεπακόλουθη δημιουργία των φωτοσυστημάτων. Αν διατηρηθούν σε υψηλά επίπεδα (>2mM Spm) αναστέλλουν την αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου, εμποδίζουν τη σύνθεση της χλωροφύλλης και ως εκ τούτου

εμποδίζουν τη δημιουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η αναπτυξιακή μελέτη και η χρήση ειδικών μεταλλαγμάτων (C-2A' και Wt-LHC) υπέδειξε την διαχείριση της συλλεγόμενης φωτονιακής ενέργειας ως τη γενικότερη διαδικασία στην οποία συμμετέχουν οι πολυαμίνες. Επίσης, παρουσιάζεται για πρώτη φορά η φάση λειτουργικής ενεργοποίησης στη φωτοανεξάρτητη βιογένεση του χλωροπλάστη (διάκριση φωτοσυνθετικού μηχανισμού intact-inactive από μηχανισμό intact-active). Πρόκειται για μία ταχύτατη φάση λειτουργικής οργάνωσης, κατά την οποία η φωτοσυλλεκτική κεραία του PSII οργανώνεται (αύξηση βαθμού ολιγομερισμού από 10% σε 90%), η σπερμίνη που βρίσκεται προσδεμένη στην κεραία αυξάνει κατά 50% και η φωτοσυνθετική απόδοση μεγιστοποιείται (αύξηση από 0.31 σε άνω του 0.70). Η φάση μπορεί να διαρκέσει 300 s όταν οι συνθήκες φωτισμού είναι κατάλληλες ($1000 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Η διεξοδική μελέτη (κεφάλαιο 2) της ρύθμισης της φωτοσυνθετικής διαδικασίας έδειξε διακριτούς ρόλους για την πουτρεσίνη σε σχέση με τις άλλες δύο πολυαμίνες, οι οποίοι επιβεβαιώθηκαν από *in vitro* μελέτες. Η χορήγηση πουτρεσίνης αναστέλλει την πρόωμη ενεργοποίηση του NPQ (μηχανισμού ελεγχόμενης μη φωτοχημικής διάχυσης της περίσσειας ενέργειας), ενδεικτικό μη ενεργοποίησης του PsbS και καθυστερεί το ρυθμό αποφόρτισης της μεμβράνης των θυλακοειδών. Επίσης, φάνηκε ότι η Spd και Spm είναι σε θέση να ρυθμίζουν το ποσό της συλλεγόμενης φωτονιακής ενέργειας που θα διαχυθεί ελεγχόμενα σε μορφή θερμότητας και ότι μπορούν να ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς φωτοπροστασίας ακόμη και στο σκοτάδι. Στο κεφάλαιο 3, η ικανότητά τους αυτή αποδείχθηκε -μετά από διαδοχικές βιοχημικές απομονώσεις θυλακοειδών μεμβρανών και τελικά της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του φωτοσυστήματος II- ότι σχετίζεται με μια αλληλεπίδραση απευθείας με τη φωτοσυλλεκτική κεραία. Η μελέτη του μηχανισμού της αλληλεπίδρασης υπέδειξε την ιμινοομάδα των πολυαμινών ως υπεύθυνη ομάδα για την απόσβεση. Επιπλέον, φάνηκε ότι ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασης στηρίζεται σε μια pH εξαρτώμενη απόσβεση του φθορισμού της χλωροφύλλης. Τα χαρακτηριστικά του μηχανισμού (ενεργοποίηση από πρωτονίωση, άμεση αλληλεπίδραση πολυαμινών και πολυπεπτιδίων της φωτοσυλλεκτικής κεραίας) υπερτερούν, σε σύγκριση με το ευρύτερα αποδεκτό μοντέλο μη φωτοχημικής διαχείρισης, που εμπλέκει το κύκλο των ξανθοφυλλών, χωρίς όμως να το απορρίπτουν. Πιο συγκεκριμένα, το μοντέλο που δέχεται ότι αποσβέστης της χλωροφύλλης είναι η ζεαξανθίνη εξαρτάται επίσης από τα δύο παραπάνω χαρακτηριστικά (πρωτονίωση/οξίνιση μικροχώρου και φωτοσυλλεκτική κεραία) όμως απαιτεί δύο επιπρόσθετα βήματα από τα οποία το ένα είναι ενζυμικό, που καθιστά το μηχανισμό πιο αργό, σε σύγκριση με αυτόν, που προτείνει η παρούσα εργασία. Συνεπώς οι πολυαμίνες φαίνεται ότι εμπλέκονται σε μια πρώτη απόκριση στην περίσσεια φωτονιακής

ενέργειας και στη συνέχεια ενδέχεται σε ένα δεύτερο στάδιο να παίρνουν μέρος τα καροτενοειδή, που είναι ήδη γνωστό ότι ενισχύουν τη διάχυση. Σε συμφωνία με τα παραπάνω δείχθηκε ότι σε κατάλληλα μεταλλάγματα χλωροφυκών που δεν διαθέτουν φωτοσυλλεκτική κεραία οι πολυαμίνες δεν μπορούν να συμμετάσχουν στη διαχείριση της συλλεγμένης φωτονιακής ενέργειας. Επιπρόσθετα, φάνηκε ένας ενεργοποιητικός ρόλος της Spm στα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυστήματος II. Στο 4^ο κεφάλαιο επιβεβαιώθηκε το τελευταίο και σε απομονωμένους χλωροπλάστες και φασματοσκοπία χαμηλών θερμοκρασιών (77K) έδειξε ότι πιθανότατα η δράση της Spm συνδέεται με την συναρμολόγηση των κέντρων αντίδρασης με την εσωτερική κεραία του φωτοσυστήματος II. Τέλος, από πειράματα σε απομονωμένους χλωροπλάστες αναδείχθηκαν οι κατιονικές και μη κατιονικές δράσεις των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Οι πολυαμίνες αποδείχθηκαν περισσότερο ικανές, από ανόργανα ιόντα που φυσιολογικά υπάρχουν σε χλωροπλάστες, να διατηρούν τη λειτουργικότητα ή να αυξάνουν την απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (αυξήσεις έως 70%). Η ποσοτικοποίηση των κατιονικών επιδράσεων της πουτρεσίνης, της Spd και της Spm στη γραμμική ροή ηλεκτρονίων, στην ενεργότητα του PSII και στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση επέτρεψε στη συνέχεια τη μελέτη μη-κατιονικών δράσεων. Οι τελευταίες αναδείχθηκαν μέσα από τη μελέτη της διαδικασίας της φωτοφωσφορυλίωσης. Οι πολυαμίνες φάνηκε (σε συνθήκες που προσομοιώνουν τις αντίστοιχες *in vivo*) πως έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τη σύνθεση ATP έως και 80% (περίπτωση Put). Ακόμη αποδείχθηκε ότι, για την ίδια παρεχόμενη φωτονιακή ενέργεια, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός λειτουργώντας παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων πουτρεσίνης μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει τη σύνθεση ενέργειας. Η ικανότητα των πολυαμινών και περισσότερο της Put να αυξάνει τη σύνθεση ATP προτείνεται ως μια κεντρική δράση που ερμηνεύει γιατί οι πολυαμίνες δρουν ως παράγοντες αύξησης των κυττάρων αλλά και αυξάνονται σε συνθήκες καταπόνησης (διαδικασίες με υψηλό ενεργειακό κόστος). Επίσης, η συνεκτίμηση του ρυθμού 'χαλάρωσης' της φόρτισης της μεμβράνης των θυλακοειδών σε περιπτώσεις υψηλής ενδοκυτταρικής πουτρεσίνης, καθώς και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της Put, της μεμβράνης των θυλακοειδών και των συνθηκών pH σε μικροχώρο και στρώμα οδήγησαν στην πρόταση ενός μοντέλου για το μηχανισμό δράσης της Put. Το μοντέλο αυτό εξηγεί ικανοποιητικά τα *in vivo* αποτελέσματα αυτής της εργασίας και επίσης αποτελεί τη βάση για μια νέα βιοενεργητική προσέγγιση του ρόλου των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό.

ABSTRACT

N.E. Ioannidis (2006) A comparative study of light dependent and light independent biogenesis and functional assembly of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines

Doctorate dissertation, Department of Biology, University of Crete

Supervisor: Professor K. Kotzabasis

The photosynthetic apparatus in oxygenic photosynthesis consists of four major complexes (photosystem I, photosystem II, cytochrome b_6f and ATPase). The vectorial integration of these complexes in the thylakoid membrane makes possible the transport of electrons across the membrane and the release of protons in lumen. The thylakoid membrane is energized through proton accumulation and ATP is formed through the pmf-driven ATPase rotation. Hence, steady state photosynthetic electron transport is coupled to ATP synthesis. When light saturates photosynthesis the reaction centers are under excitation pressure (especially PSII) and major photoprotective mechanisms are activated (non photochemical quenching and state transition quenching). Sustainable autoregulation of the photosynthetic apparatus maximizes quantum yield and increases photoprotection. This work has focused on the role of polyamines (putrescine, Put; spermidine, Spd; and spermine, Spm) during biogenesis and functional assembly of the photosynthetic apparatus. They are ubiquitous low molecular weight aliphatic amines with 2, 3 and 4 amino moieties, respectively. Polyamines are considered as hormone-like molecules although the underlying mechanism is not known. Due to their elevated levels during stress, they are correlated with tolerance of cells/organisms. Knowledge concerning the relationship between polyamines and the photosynthetic apparatus is rather fragmentary. During chloroplast biogenesis the plastidal levels of polyamines are reduced within hours to a new set point but the reason is not well understood. The missing underlying molecular mechanism of polyamine action in the photosynthetic apparatus was both the major obstacle and the main subject of this study. In this work a top-down approach through an *in vivo* functional monitoring of the biogenesis of the photosynthetic apparatus, allowed a better understanding of the role of polyamines. Further investigation of photosynthesis regulatory mechanisms, the use of the mutants C-2A' and Wt-LHC of *Scenedesmus obliquus* and *in vitro* experiments allowed the proposal of two

novel molecular mechanisms concerning polyamine actions. Results are presented in four chapters. In the 1st chapter comparative analysis of light dependent and light independent biogenesis of the photosynthetic apparatus revealed why down-regulation of polyamines is a prerequisite of this developmental stage. Namely, a key process like chlorophyll biosynthesis and the subsequent assembly of chlorophyll binding proteins (photosystems and light harvesting complexes) are hindered by high levels of polyamines (>2mM Spm), because both light dependent protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR) and light independent protochlorophyllide oxidoreductase (DPOR) are inhibited. In addition, use of the mutant C-2A' made possible to reveal a novel phase of photosynthetic activation. Namely, the already known light independent chloroplast biogenesis reach a functional threshold of photosynthetic efficiency (unknown stable intermediate phase of suboptimum efficiency, $F_v/F_m=0.31$). Hence, the crucial distinction between intact-active and intact-inactive is suggested. Activation is possible through distinct events that among others include a 50% increase of Spm bound to LHC of PSII, a dramatic increase of oligomerization degree of LHC monomers (from 10% to 90%) and an optimization of photosynthetic efficiency (from 0.31 to more than 0.70). This phase lasts only 300 s when light intensity is high enough ($1000 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Studies with the mutant Wt-LHC demonstrated that polyamines are involved in the regulation of light energy utilization. A detailed study (2nd chapter) of the regulation of photosynthesis indicated that Put has different effects than Spd and Spm. The common action of Spd and Spm in functional terms, distinct from the role of Put was verified by *in vitro* studies (3rd chapter). Put treatment inhibits early NPQ rise, indicating inactivation of PsbS and alters membrane relaxation kinetics (delays membrane de-energization). Interestingly, Spd- and Spm-treatment caused an up-regulation of the energy dissipated non-radiatively as heat by the photosynthetic apparatus (350% and 420% respectively) and also induced a sustainable form of non photochemical quenching. The details of the underlying molecular mechanism were revealed by isolation of the thylakoid membranes and subsequent isolation of the native monomers of light harvesting complex of PSII. Namely, it was found that the iminogroup(s) of Spd and Spm were responsible for the quenching of chlorophyll fluorescence. Furthermore, activation of the quenching mechanism is possible through a pH-dependent step (protonation of a secondary amine group of polyamines). Put was unequivocally excluded as a quencher and Spd and Spm were the first *in vivo* and *in vitro* quenchers of chlorophyll fluorescence. The evaluation of these results allowed the proposal of a novel mechanism of non-photochemical quenching. The traits of the proposed mechanism (activation through protonation, inactivation through deprotonation, direct

interaction between polyamines and light harvesting complex) improve our understanding concerning qE without conflicting with the xanthophyll cycle model, that is already correlated with NPQ. The latter is more slow process due to the enzymatic step that requires, than the proposed protonation of the iminogroup of polyamines and thus it might have a role in stabilizing and enhancing quenching. In line with these results, it was demonstrated that in LHC-lacking mutants (Wt-LHC) polyamines can not participate in energy dissipation. Additionally, a beneficial role of Spm in activation of reaction centers of PSII was shown. In the 4th chapter this was confirmed in isolated chloroplasts (Spm increase 55% Fv, mainly due to activation of PSII α reaction centers) further studied with low temperature (77K) spectroscopy. Activation of reaction centers is probably possible through a functional assembly of CP43 with PSII core. Moreover, experiments under low salt media revealed the cationic effects of polyamines in the photosynthetic apparatus. Polyamines proved more efficient than inorganic cations which are normally found in chloroplast and a detailed study (concerning linear electron flow, PSII activity, overall efficiency to name a few) is illustrated. This study allowed the in-depth analysis of polyamine bionergetic role in photophosphorylation, attributed to non-cationic action. Put was proved as an efficient stimulator of photophosphorylation (provoked up to 80% increase). Furthermore, small increase or decrease of Put levels (in the range of 0-1.5 mM) leads to subsequent up or down regulation of chemiosmotic ATP synthesis, suggesting that for the same light energy input plants have a mechanism to increase profit by fine tuning levels of Put. The effect of Put treatment on relaxation kinetics of thylakoid membrane energization, the simulation of *in vivo* conditions in *in vitro* experiments and Put biochemical properties indicate, that ion trapping could be responsible for the stimulation mechanism. The two proposed mechanisms are in line with the increase of polyamines during stress and they may explain why inability for rise leads to sensitivity.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

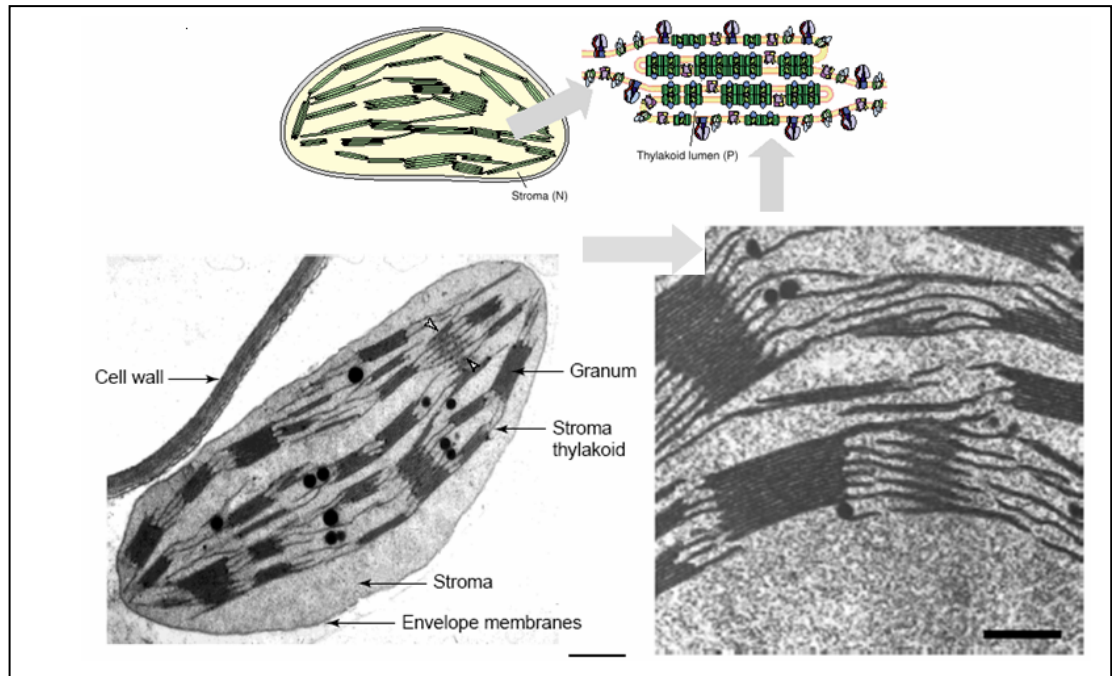
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση (oxygenic photosynthesis) είναι η μοναδική διαδικασία (τουλάχιστον στο ηλιακό σύστημα) με την οποία τα φυτά απορροφούν φωτόνια και αποθηκεύουν την ενέργεια σε τρεις σχετικά σταθερές μορφές χημικής ενέργειας: α) στη μορφή μη-αυτοοξειδωμένων αναγμένων οργανικών ενώσεων (π.χ. υδατάνθρακες), β) στη μορφή ηλεκτροχημικού δυναμικού στις μεμβράνες (π.χ. πρωτονιοκινητική δύναμη) και γ) στη μορφή χημικών δεσμών υψηλής ελεύθερης αρνητικής ενέργειας υδρόλυσης του ATP (Papageorgiou, 2004). Ίχνη της παραπάνω διαδικασίας μπορούν να βρεθούν ακόμη και πριν 3.8 δισεκατομμύρια έτη. Συνέπεια της εξελικτικής διαδικασίας της φωτοσύνθεσης ήταν η αύξηση του οξυγόνου της ατμόσφαιρας σε επίπεδα περίπου 20 % ο/κ.ο., η δημιουργία μιας στιβάδας όζοντος στην ανώτερη ατμόσφαιρα, η οποία αποτρέπει την υπεριώδη ακτινοβολία να φτάσει στη Γη, η οξείδωση πετρωμάτων στην επιφάνεια της Γης και γενικά η δημιουργία του περιβάλλοντος όπως το γνωρίζουμε σήμερα (Papageorgiou, 2004). Το τελευταίο, σε ότι αφορά τους ζωντανούς οργανισμούς γίνεται κατανοητό, αν αναλογιστεί κάποιος ότι κυρίως η φωτοσύνθεση εξασφαλίζει τη συνεχή ροή ενέργειας στους οργανισμούς του πλανήτη και οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί αποτελούν τόσο στα υδατικά, όσο και στα χερσαία οικοσυστήματα, τη βάση της τροφικής πυραμίδας.

Η μελέτη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα έρευνας που απαιτεί συνδυασμό διαφορετικών επιστημονικών κλάδων, όπως η κβαντομηχανική, η βιοφυσική, η βιοχημεία, η μοριακή και η δομική βιολογία, αλλά και η φυσιολογία και η οικολογία. Οι σταθερές αντίδρασης των φωτοσυνθετικών αντιδράσεων ξεκινούν από 10^{-15} s προκειμένου τα ηλεκτρόνια σε ειδικά μόρια να διεγερθούν και φθάνουν έως ημέρες προκειμένου να παγιωθούν οι στοιχειομετρίες των φωτοσυνθετικών υποσυμπλόκων στις περιβαλλοντικές συνθήκες, γεγονός που επίσης υπογραμμίζει τη πολυπλοκότητα του αντικειμένου (Nelson and Ben-Shem, 2004). Η φωτοσύνθεση θεωρείται μία από τις καλύτερα μελετημένες βιολογικές διαδικασίες και ο όγκος της γνώσης για το αντικείμενο δεν επιτρέπει μια λεπτομερή επισκόπηση. Στη συνέχεια παραθέτονται και εξηγούνται οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες έννοιες αυτής της εργασίας ώστε να διευκολυνθεί ακόμη και ο μη εξοικειωμένος με τη φωτοσύνθεση αναγνώστης.

Ο χλωροπλάστης είναι το οργανίδιο στο οποίο λαβαίνει χώρα η φωτοσύνθεση (σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς) και οφείλει το όνομα του, αλλά και κάποιες από τις ιδιότητες του, στις πράσινες χρωστικές (χλωροφύλλες) που συσσωρεύει. Η δομή ενός ώριμου χλωροπλάστη φαίνεται στην εικόνα 1.

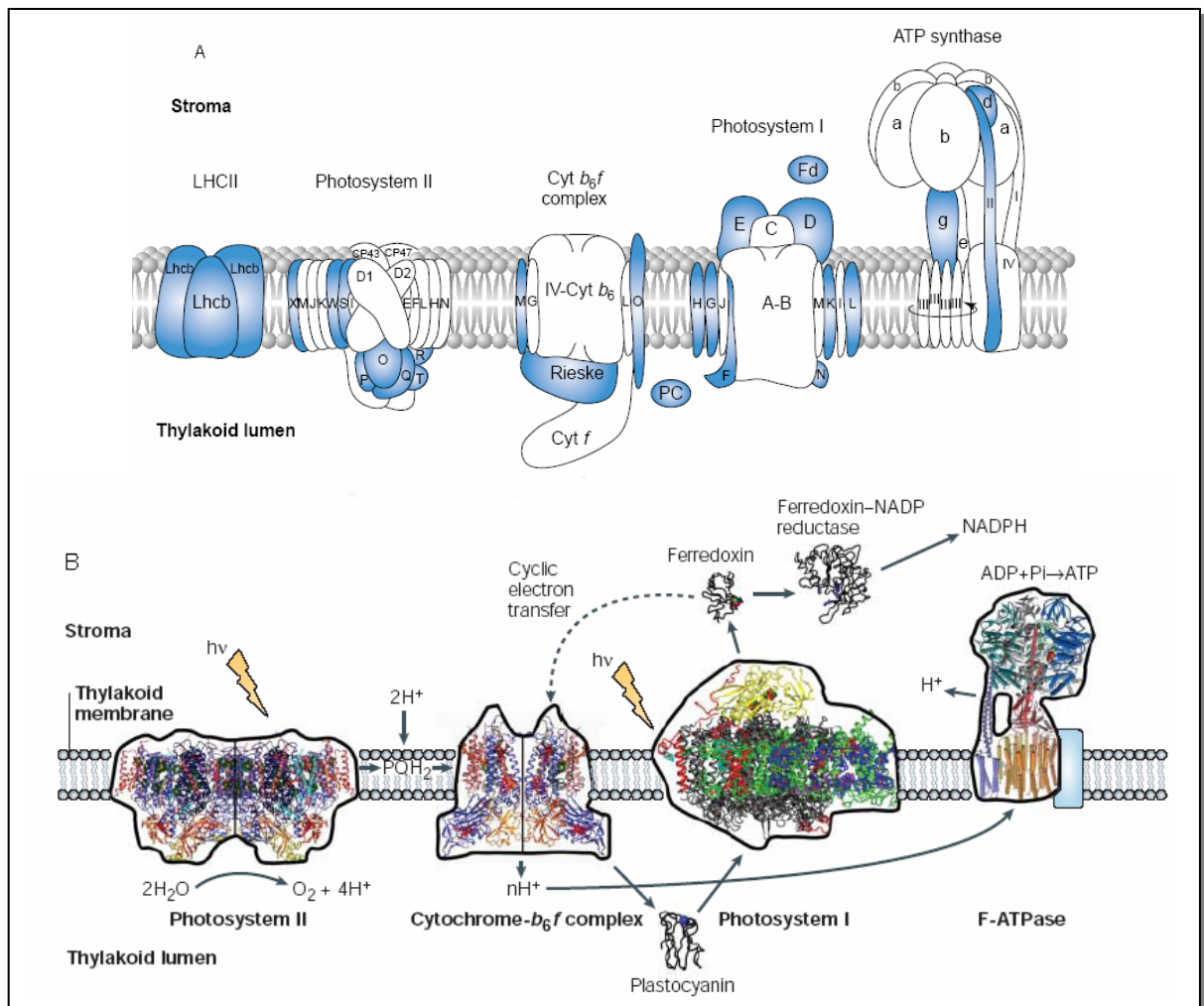


Εικόνα 1. Ο χλωροπλάστης και το εσωτερικό δίκτυο θυλακοειδών μεμβρανών σε σχηματική απεικόνιση και σε φωτογραφίες υψηλής ανάλυσης και μεγέθυνσης (ηλεκτρονική μικροσκοπία). Τροποποιημένο από Mustardy and Garab, 2003.

Το οργανίδιο αυτό, εκτός από το διπλό μεμβρανικό φάκελλο που το περιβάλλει, έχει και ένα άλλο εσωτερικό σύστημα μεμβρανών. Πιο συγκεκριμένα, στο χλωροπλάστη υπάρχει ένα σύστημα μεμβρανών, τα θυλακοειδή, το οποίο περιβάλλεται από το πυκνό στρώμα, ενώ στο εσωτερικό των θυλακοειδών σχηματίζεται ο μικροχώρος (lumen). Οι μεμβράνες των θυλακοειδών σχηματίζουν grana (όταν στοιβάζονται πυκνά) και τις διαχωρίζουμε από τα θυλακοειδή στρώματος που δεν σχηματίζουν πυκνές στοιβάδες. Στο στρώμα αφομοιώνεται το CO_2 (“σκοτεινές” αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης), ενώ στα θυλακοειδή λαβαίνουν χώρα τόσο η φωτόλυση του νερού, όσο και η αναγωγή του NADP^+ , (“φωτεινές” αντιδράσεις).

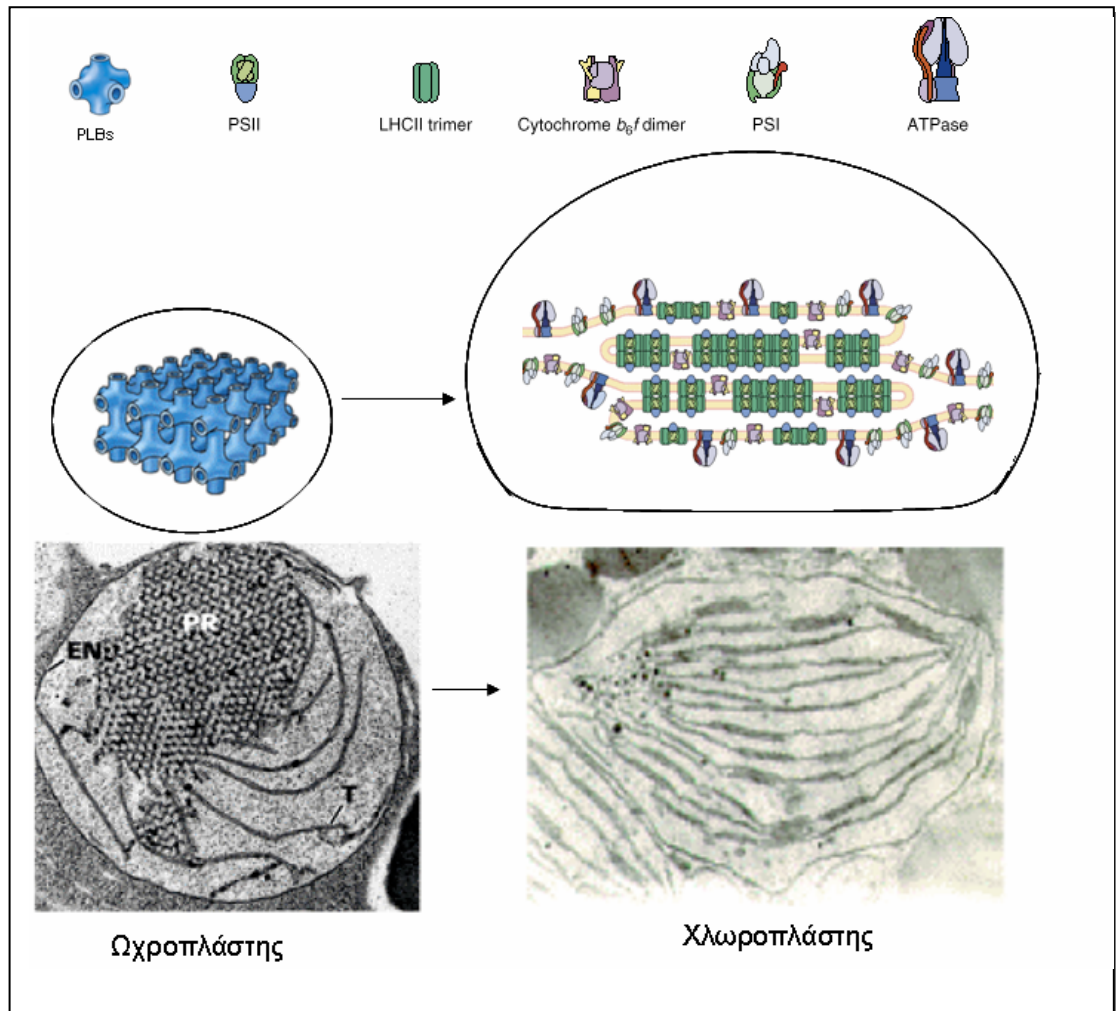
Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός αποτελείται από τέσσερα πολυμερή σύμπλοκα, το φωτοσύστημα II (PS II), το κυτόχρωμα b_6f (Cyt b_6f), το φωτοσύστημα I (PS I) και την συνθάση του ATP (ATPase) (Εικόνα 2).

Τα τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, που αναφέρθηκαν και είναι απαραίτητα για τις φωτοεξαρτώμενες αντιδράσεις στη φωτοσύνθεση, εδράζονται στις θυλακοειδείς μεμβράνες του χλωροπλάστη. Στα ανώτερα φυτά τα θυλακοειδή εμφανίζουν δύο διακριτές περιοχές, α) δομές στιβαγμένων μεμβρανών (grana) και β) μεμβράνες που δεν είναι στιβαγμένες, συνδέουν τα grana και ονομάζονται θυλακοειδή στρώματος (stroma lamellae). Τα τέσσερα σύμπλοκα δεν είναι ομοιογενώς κατανομημένα, με τα PS I (θυλακοειδή στρώματος) να είναι ξεχωριστά από τα PS II τα οποία βρίσκονται κυρίως στα grana. Η ATPase συγκεντρώνεται κυρίως στα θυλακοειδή στρώματος, ενώ το cyt_{b_6f} βρίσκεται στα grana. Πρόσφατες δομικές μελέτες αυτών των συμπλόκων –και στην περίπτωση της ATPase ενός κοντινού ομολόγου από τα μιτοχόνδρια- ολοκληρώνουν την περιγραφή της αρχιτεκτονικής της μεταφοράς ενέργειας στη φωτοσύνθεση που διήρκεσε πάνω από 50 χρόνια (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Α. Σχήμα στο οποίο τα πολυπεπτίδια που κωδικοποιούνται στον πυρήνα εμφανίζονται με μπλε χρώμα, ενώ εκείνα που κωδικοποιούνται στο χλωροπλαστικό DNA εμφανίζονται λευκά. Β. Λεπτή δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (τροποποιημένο από Nelson and Ben-Shem, 2004).

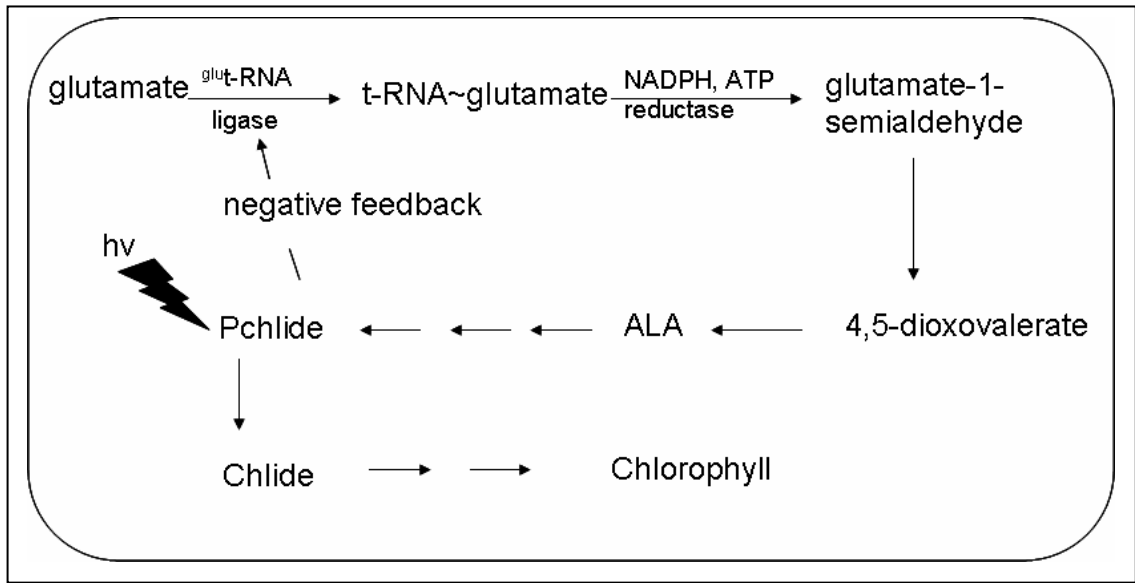
χλωροφύλλη (Senger and Brinkmann, 1986). Γενικά, η βιοσύνθεση των χλωροφυλλών (δηλαδή η αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο) συνδυάζεται με τον μετασχηματισμό των προελασματοειδών σωματίων σε πιο επιμηκυσμένες δομές ώσπου να



Εικόνα 4. Η ανάπτυξη του χλωροπλάστη. Τα προθυλακοειδή και προελασματοειδή κυριαρχούν (PLBs) στον ωχροπλάστη. Με την έκθεση στο φως οι ωχροπλάστες διαφοροποιούνται σε φωτοσυνθετικά οργανίδια και ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός εγκαθίσταται στις θυλακοειδείς μεμβράνες (PSII, PSI, Cyt_{b6/f}, ATPase). Τροποποιημένο από Allen και Forsberg, 2001.

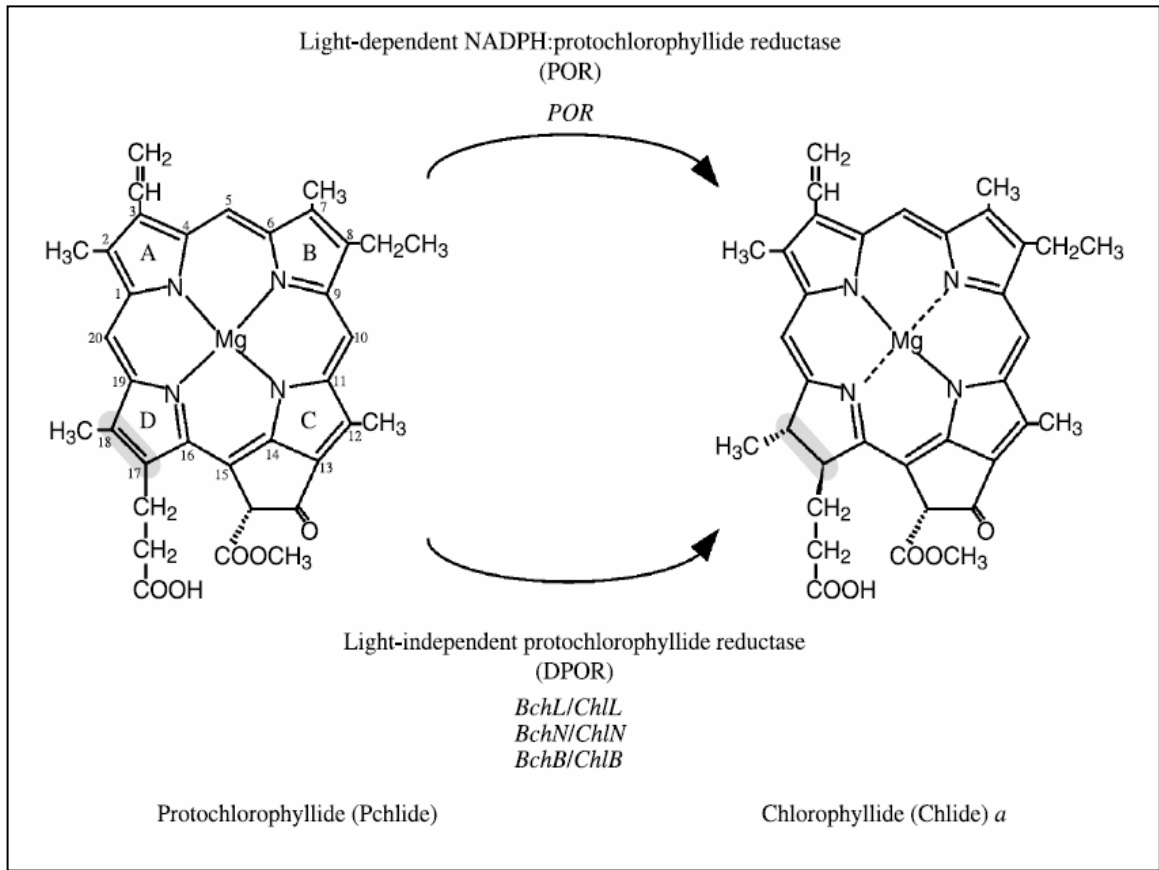
σχηματιστούν τα θυλακοειδή και τα grana. (Wellburn et al., 1980; Wollaman et al., 1999). Τούτη η μετάβαση μπορεί να διεκπεραιωθεί τόσο παρουσία φωτός (φωτοανάπτυξη) όσο και στο σκοτάδι. Τα αγγειόσπερμα στο σκοτάδι και τα μεταλλάγματα *pet 340 Arabidopsis thaliana* (Lebedev et al., 1995), *y-1 Chlamydomonas reinhardtii* (Wang et al., 1977), C-2A' *Scenedesmus obliquus* (Oh-hama and Hase, 1980; Senger and Brinkmann, 1986), *Chlorella pyrenoidosa* g-1 (Galling, 1978) εμφανίζονται χλωρωτικά αφού έχουν ωχροπλάστες, ενώ τα

γυμνόσπερμα και τα πράσινα φύκη είναι πράσινα και στο σκοτάδι αφού έχουν χλωροπλάστες. Η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης ξεκινά από το γλουταμικό, μέσω ενός περίπλοκου μονοπατιού (C₅-pathway), το οποίο αποτελείται τουλάχιστο από δεκαπέντε ενζυμικά βήματα (Wettstein et al., 1995; Reinbothe and Reinbothe, 1996) (εικόνα 5).



Εικόνα 5. Στο σχήμα φαίνεται η πορεία βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης καθώς και ο ρόλος-κλειδί του πρωτοχλωροφυλλιδίου (από Doernemann et al., 1989).

Όλα τα βιοσυνθετικά βήματα του μονοπατιού μέχρι τον σχηματισμό του πρωτοχλωροφυλλιδίου λαμβάνουν χώρα και στο σκοτάδι (Senger and Brinkmann, 1980) με αποτέλεσμα την συσσώρευση του πρωτοχλωροφυλλιδίου στους ωχροπλάστες. Ένα από τα κύρια στάδια στη βιοσύνθεση της χλωροφύλλης αποτελεί η αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου (Pchlida) σε χλωροφυλλίδιο (Chlida) (σχήμα 6). Στο στάδιο αυτό, ένας από τους πυρρολικούς δακτυλίους (D δακτύλιος) του μορίου του Pchlida, ανάγεται με τη βοήθεια του ενζύμου Pchlida oxidoreductase (POR), στις θέσεις 17 και 18, σχηματίζοντας το Chlida. Η αναγωγή αυτή ρυθμίζεται άμεσα από το φως (Griffiths et al., 1978). Ειδικά για το μετάλλαγμα C-2A' έχει βρεθεί ότι μειώνοντας την θερμοκρασία επώασης από τους 33°C στους 15-20°C το πρωτοχλωροφυλλίδιο μπορεί να αναχθεί και στο απόλυτο σκοτάδι. Στους 20°C η διαδικασία είναι περίπου 10 φορές πιο ενεργή απ'ότι στους 33°C αλλά φθάνει μόνο το 13% της φωτοεξαρτώμενης βιοσύνθεσης χλωροφυλλών. Έχει προταθεί ότι η αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου οφείλεται σε μία αλλαγή στερεοδιαμόρφωσης της οξειδοαναγωγής του λόγω της μείωσης της θερμοκρασίας (Oh-Hama et al., 1987).



Εικόνα 6. Αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου (*Pchlide*) σε χλωροφυλλίδιο (*Chlide*). Η αντίδραση καταλύεται από την οξειδοαναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου (από Masuda and Takamiya, 2004)

Η τελική κατάλυση έχει προταθεί ως το ρυθμιστικό στάδιο που θα καθορίσει το πότε θα ωριμάσει το οργανίδιο. Οι Brinkmann και Senger (1980) πρότειναν ότι το ίδιο το πρωτοχλωροφυλλίδιο είναι ο φωτοϋποδοχέας γι' αυτή τη μετατροπή του ωχροπλάστη σε χλωροπλάστη.

Με την έναρξη της βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης (φωτομετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο) συμβαίνει και η μεταγραφή και μετάφραση πυρηνικών και χλωροπλαστικών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Barkan et al., 1995; Morishige, 1995). Ύστερα από μεταφραστικές και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, οι πρωτεΐνες αυτές δεσμεύουν μόρια χλωροφύλλης και αποκτούν κατάλληλη διαμόρφωση ώστε να επιτραπεί η ενσωμάτωσή τους στις μεμβράνες των θυλακοειδών (Paulsen, 1997). Η διαδικασία αυτή είναι στενά συνδεδεμένη με την βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και την ανάπτυξη του χλωροπλάστη (Mullet, 1988; Tanaka et al., 1991; Hachtel and Friedmann, 1993). Για την περίπτωση της φωτοανεξάρτητης αναγωγής του πρωτοχλωροφυλλιδίου οι Oh-Hama et al., (1987) έδειξαν

ότι απομονωμένες μεμβράνες προθυλακοειδών από το μετάλλαγμα C-2A' του *Scenedesmus obliquus* κύτταρα που αναπτύχθηκαν στους 20°C *in vitro* εμφανίζουν ικανότητα αναγωγής του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο.

1.2 Η οξειδοαναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου

Η αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο μπορεί να καταλυθεί φωτοεξαρτώμενα ή φωτοανεξάρτητα. Η φωτοεξαρτώμενη επιτελείται από το ένζυμο LPOR (light dependent protochlorophyllide oxidoreductase: οξειδοαναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου) (Griffiths et al., 1978; Apel et al., 1980). Η LPOR αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα και υπάρχει σε μεγάλα ποσά στους ωχροπλάστες, σαν σύμπλοκο με τα δύο υποστρώματά του, το NADPH και το Pchl_{id} (Masuda and Takamiya, 2004). Το ίδιο το Pchl_{id} που βρίσκεται δεσμευμένο στο ένζυμο λειτουργεί και σαν φωτουποδοχέας για την αντίδραση της αναγωγής του. Με απορρόφηση της φωτονιακής ενέργειας από το Pchl_{id}, το μόριό του διεγείρεται (ενεργό Pchl_{id}) και ο διπλός δεσμός του άνθρακα 18, με τη βοήθεια του ενζύμου, ανάγεται από το NADPH σχηματίζοντας Chl_{id}, το οποίο οδηγείται ανεξαρτήτως φωτισμού σε χλωροφύλλη.

Η φωτοανεξάρτητη κατάλυση επιτελείται από το ένζυμο DPOR (dark protochlorophyllide oxidoreductase). Πολύ λιγότερες πληροφορίες είναι γνωστές σχετικά με την DPOR. Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί τρία χλωροπλαστικά γονίδια (chlL, chlN, chlB) (Fujita, 1996), που είναι βασικά για τη λειτουργία της DPOR, καθώς και έξι πυρηνικοί γενετικοί τόποι (y1, y5, y6, y7, y8, και y10, στην *Chlamydomonas reinhardtii*) (Ford and Wang, 1980), τα οποία επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου. Πάντως, οι λειτουργίες των γενετικών τόπων y είναι ακόμα ασαφείς, αν και μάλλον ενέχονται είτε στη ρύθμιση της έκφρασης των τριών χλωροπλαστικών γονιδίων ή στη βιοσύνθεση κάποιου/ων συμπαραγόντων/συμπαράγοντων, παρά αποτελούν δομικά στοιχεία του ενζύμου.

Οι υπομονάδες της DPOR έχουν ομοιότητες αλληλουχίας με τις νιτρογενάσες. Η ενεργότητα του ενζύμου, σε δύο περιπτώσεις που μελετήθηκε, βρέθηκε να εξαρτάται από το NADPH. Σημαντικό είναι επίσης ότι θετικά φορτισμένα ιόντα (Ca²⁺) αυξάνουν την ενεργότητά του.

Το σύμπλοκο POR-Pchl_{id}: Είναι γενικά γνωστό ότι οι ωχροπλάστες των ανώτερων φυτών περιέχουν τρεις φασματοσκοπικά διαφορετικές μορφές του συμπλόκου του Pchl_{id} (Schulz and Senger, 1993): Pchl_{id}₆₂₈₋₆₃₂, Pchl_{id}₆₃₆₋₆₅₇, και Pchl_{id}₆₅₀₋₆₅₇. Τα δύο τελευταία (Pchl_{id}₆₃₆₋₆₅₇, και Pchl_{id}₆₅₀₋₆₅₇) αποτελούν σύμπλοκο με την POR, και με το φως ανάγονται

εύκολα σε Chlide, ενώ το πρώτο (Pchl_{id}e₆₂₈₋₆₃₂), που είναι και η ελεύθερη χρωστική, δεν ανάγεται. Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του ενζύμου POR έδειξε, ότι υπάρχουν κάποιες συντηρημένες κυστεΐνες, οι οποίες παίζουν ρόλο στη δέσμευση του Pchl_{id}e, καθώς και στην κατάλυση της φωτοεξαρτώμενης αναγωγής του (Begley et al., 1989). Επίσης το μόριο έχει πολλές περιοχές πλούσιες σε υδρόφοβα αμινοξέα, αλλά καμιά απ' αυτές δεν είναι αρκετά μεγάλη σε μήκος ώστε να διαπερνά τη μεμβράνη. Έτσι, πιστεύεται ότι το ένζυμο βρίσκεται στενά συνδεδεμένο με τη μεμβράνη, αλλά δεν είναι διαμεμβρανικό (Birve et al., 1996).

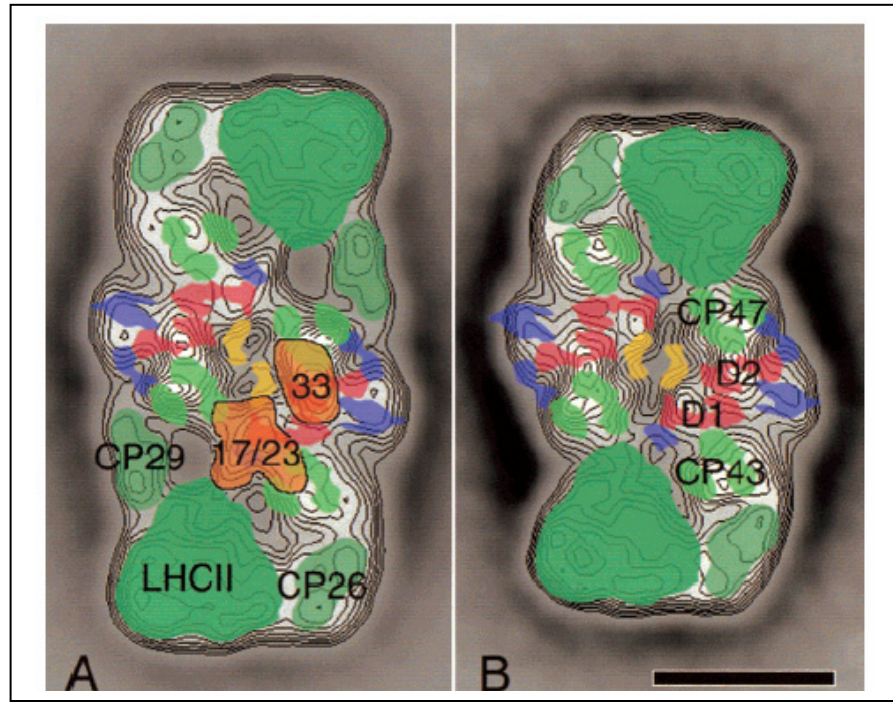
Από τις πρώτες ώρες της βιογένεσης το διαφοροποιούμενο πλαστίδιο εμφανίζει ικανότητα φωτοεξαρτώμενης έκλυσης οξυγόνου απόδειξη της ύπαρξης και λειτουργικότητας φωτοσυστημάτων II (PSII) αλλά και της υπόλοιπης αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Σύμφωνα με τις αντιδράσεις που καταλύουν το PS II μπορεί να θεωρηθεί σαν μια οξειδοαναγωγή νερού-πλαστοκινόνης (Ghanotakis and Yocum, 1990), το Cytb₆f σαν μια οξειδοαναγωγή πλαστοκινόνης-πλαστοκυανίνης και το PS I σαν μια οξειδοαναγωγή πλαστοκυανίνης-φερρεδοξίνης (Nelson and Ben-Shem, 2004). Τέλος η ATPase μπορεί να θεωρηθεί σαν μια pmf-τροφοδοτούμενη ATPase. Το PS I και το PS II περιέχουν χλωροφύλλες και άλλες χρωστικές που συλλέγουν φωτόνια και μεταφέρουν ενέργεια στο κέντρο αντίδρασης. Η ενέργεια που δεσμεύτηκε στο κέντρο αντίδρασης διεγείρει ένα ειδικό ζευγάρι χλωροφυλλών στο PS II (πρωτοταγείς δότες ηλεκτρονίων, primary electron donors) και ξεκινά η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της μεμβράνης μέσω μιας αλυσίδας συμπαραγόντων. Το νερό (ηλεκτρονιοδότης της παραπάνω αντίδρασης) οξειδώνεται από το PS II σε οξυγόνο και 4 πρωτόνια. Τα ηλεκτρόνια διοχετεύονται σε μια δεξαμενή πλαστοκινόνης (PQ) και στη συνέχεια μέσω του Cytb₆f σε μια μικρή διαλυτή πρωτεΐνη με χαλκό, την πλαστοκυανίνη (PC). Ενέργεια που συλλέχθηκε από το PS I προκάλεσε τη μεταφορά ηλεκτρονίου από την πλαστοκυανίνη (εσωτερικό θυλακοειδών, περιοχή μικροχώρου) στη φερρεδοξίνη που βρίσκεται στην απέναντι πλευρά της μεμβράνης (περιοχή στρώματος). Η ανηγμένη φερρεδοξίνη χρησιμεύει στη συνέχεια σε πολλά ρυθμιστικά μονοπάτια όπως αυτά της αφομοίωσης νιτρικών, της αναγωγής λιπαρών οξέων και της σύνθεσης NADPH. Ο διαχωρισμός φορτίου στα φωτοσυστήματα (PS II και PS I) καθώς και η ροή ηλεκτρονίων μέσω του Cytb₆f οδηγεί στο σχηματισμό ενός ηλεκτροχημικού δυναμικού (pmf) το οποίο τροφοδοτεί τη σύνθεση ATP μέσω της ATPάσης. Η αναγωγή CO₂ (διαδικασία που μπορεί να γίνει στο σκοτάδι) στηρίζεται ενεργειακά από το ATP και το NADPH.

Όπως προαναφέρθηκε, τα PS II και PS I περιέχουν πολλές χρωστικές που συλλέγουν φως και μεταφέρουν ενέργεια σε πρωτοταγείς δότες ηλεκτρονίων, οι οποίοι μπορούν να ανάγουν ένα δέκτη ηλεκτρονίων και να δέχονται ηλεκτρόνια από ειδικούς δότες. Ως εκ τούτου τα δύο φωτοσυστήματα λειτουργούν σαν φωτοηλεκτρικές μηχανές Einstein, οι οποίες εξελίχθηκαν να λειτουργούν με υψηλές αποδόσεις απaráμιλλες για τα περισσότερα βιολογικά ή χημικά συστήματα (Nelson and Ben-Shem, 2004). Το PS I λειτουργεί με μια κβαντική απόδοση σχεδόν τέλεια (κοντά στο 1), ενώ το PS II έχει χαμηλότερη απόδοση (περίπου 0.85).

1.3 Φωτοσύστημα II (PS II)

Το κέντρο αντίδρασης του PSII αποτελείται από δύο παρόμοιες πρωτεΐνες περίπου 32kD (D1) και 34kD (Nanba and Satoh, 1987), κάθε μία από τις οποίες έχει 5 διαμεμβρανικές έλικες, και οι δύο μαζί συγκρατούν το σύμπλεγμα του μαγγανίου και όλους τους παράγοντες μεταφοράς ηλεκτρονίων (Barber, 2002). Αξιοσημείωτο είναι ότι η D1 συντίθεται τόσο έντονα που ενώ αποτελεί μόλις το 0.1% της συνολικής πρωτεΐνης του χλωροπλάστη αντιστοιχεί στο 50% της συντιθέμενης πρωτεΐνης. Σημαντικές πληροφορίες για τη δομή του ενεργού κέντρου στο PSII έφερε στο φως η δομή του ενεργού κέντρου των μωβ μη-θειούχων βακτηρίων η οποία έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (Deisenhofer et al., 1985; Tsiotis et al., 1996). Εκατέρωθεν των κέντρων αντίδρασης βρίσκονται οι εσωτερικές φωτοσυλλεκτικές κεραίες (πρωτεΐνες CP43 και CP47), με 6 διαμεμβρανικές έλικες η καθεμιά, 14 χλωροφύλλες *a* (CP43) και 16 χλωροφύλλες *a* (CP47) (Ferreira et al., 2004). Η CP43 είναι πιο χαλαρά συνδεδεμένη στο φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης από ότι η CP47 (Ghanotakis and Yocum, 1990; Ghanotakis et al., 1989). Οι περισσότερες χλωροφύλλες του PS II είναι συνδεδεμένες στην εξωτερική, περιφερειακή φωτοσυλλεκτική κεραία (LHC II). Αυτή δομείται από τριμερή των πρωτεϊνών της κεραίας (προϊόντα των Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3) και σε αυτά επιτρέπονται διαφορετικοί συνδυασμοί των τριών μονομερών. Η δομή των μονομερών είναι παρόμοια, με τρεις διαμεμβρανικές έλικες, 12 έως 14 χλωροφύλλες (*chl a* και *b*) και μέχρι 4 καροτενοειδή (Kuehlbrandt et al., 1994; Liu et al., 2004). Ο αριθμός των τριμερών που συνδέονται στο PSII εξαρτάται από τις συνθήκες φωτισμού. Η μεταφορά ενέργειας από το LHC II στα CP43/CP47 και στις D1/D2 γίνεται μέσω των πεπτιδίων CP29, CP26 και CP24 που μοιάζουν δομικά με τα μονομερή LHC II και κωδικοποιούνται από τα Lhcb4, Lhcb5, Lhcb6 αντίστοιχα. Η οργάνωση των

πρωτεϊνών των γονιδίων Lhcb στο PSII έχουν μελετηθεί εντατικά και με ηλεκτρονική μικροσκοπία και είναι διαθέσιμα αρκετά μοντέλα χαμηλής ανάλυσης (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Α. Θέσεις των υπομονάδων στο C2S2 υπερσύμπλοκο (2 κέντρα αντίδρασης C και 2 ισχυρά προσδεμένα τριμερή LHC II (S)). Οι θέσεις των υπομονάδων 17, 23, και 33 kD είναι χρωματισμένες με πορτοκαλί, οι D1/D2 με κόκκινο, οι CP43 και CP47 με πράσινο, και αταυτοποίητες υπομονάδες με κυανό και κίτρινο. Β. Το C2S2 υπερσύμπλοκο μετά από πλύση με Tris. Υπάρχει μια μετατόπιση των CP29 μονομερών και μια μετατόπιση των τριμερών LHCII. Η κλίμακα είναι 10nm (από Boekema et al., 1999).

Το PSII καταλύει τη οξείδωση του νερού και παρέχει σχεδόν ολόκληρο το οξυγόνο που είναι διαθέσιμο στη Γη. Αν και κάποιες αντιδράσεις ανόργανων ενώσεων κάνουν κάτι παρόμοιο, είναι τόσο βίαιες που θα ήταν δύσκολο στα βιολογικά συστήματα να τις αντέξουν (Nelson and Ben-Shem, 2004). Για αυτό το λόγο η εξέλιξη του PS II ήταν απαραίτητη για την εμφάνιση και συντήρηση των αερόβιων οργανισμών. Ο μηχανισμός της έκλυσης οξυγόνου περιλαμβάνει την οξείδωση δυο μορίων νερού προκειμένου να σχηματιστεί ένα μόριο οξυγόνου και την απορρόφηση 4 φωτονίων από το PSII. Δύο χλωροφύλλες σε ασθενή σύζευξη, γνωστές σαν P680 λειτουργούν σαν πρωτοταγής δότης ηλεκτρονίων (680nm είναι η κορυφή στην χαμηλότερη ζώνη απορρόφησης των P680). Μετά την απορρόφηση του πρώτου φωτονίου ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από το P680 σε ένα μόριο φαιοφυτίνης και τελικά μέσω μιας ακινητοποιημένης κινόνης (Q_A) σε μία ελεύθερη κινόνη (Q_B). Η οξειδωμένη $P680^+$ (το μόριο με το υψηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό ($>1V$) σε βιολογικά συστήματα), οξειδώνει μία γειτονική τυροσίνη (Yz), η οποία αφαιρεί ένα

ηλεκτρόνιο (και πιθανόν ένα πρωτόνιο) από ένα σύμπλεγμα 4 ιόντων μαγγανίου. Το σύμπλεγμα αυτό μπορεί να συγκρατεί δύο μόρια νερού που πρόκειται να οξειδωθούν και έχει ιόντα ασβεστίου, χλωρίου και ανθρακικού για απαραίτητους συμπαράγοντες.

Μετά από έναν ακόμη φωτοχημικό κύκλο, η Q_B είναι διπλά ανηγμένη (Q_B^{2-}) και μπορεί να πάρει έως δυο πρωτόνια από το στρώμα και να σχηματιστεί Q_BH_2 , ενώ ταυτόχρονα ελευθερώνει τη θέση την οποία καταλαμβάνει μια οξειδωμένη κινόνη από την ομώνυμη μεμβρανική δεξαμενή (PQ pool). Η δεξαμενή αυτή αποτελείται από οξειδωμένες (PQ) και ανηγμένες (PQH_2) πλαστοκινόνες (ο όρος πλαστοκινόνη προτιμάται από τον όρο κινόνη όταν είναι η κυριάρχη μορφή). Μετά από δύο ακόμη φωτοχημικούς κύκλους, στο σύμπλεγμα μαγγανίου παρέχονται συνολικά 4 οξειδωτικά γραμμοισοδύναμα που επιτρέπουν την οξείδωση 2 μορίων νερού και την παραγωγή οξυγόνου (Hoganson et al., 1997). Το σύμπλεγμα μαγγανίου επανέρχεται στην ανηγμένη του κατάσταση (S_0) αφού πέρασε από διαδοχικές καταστάσεις (Kok-Joliot πέντε S-States) S_0, S_1, S_2, S_3, S_4 . Αξιοσημείωτο είναι ότι ένα μεγάλο μέρος της πληροφορίας σχετικά με τις ιδιότητες του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου προέρχεται από μελέτες με διάφορες αμίνες που παρεμπόδιζαν την ενεργότητα του (Ghanotakis and Yocum, 1990). Θεωρείται μάλιστα πιθανό ο μηχανισμός δράσης τους να περιλαμβάνει σύνδεση της αμίνης με το μαγγάνιο του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου κοντά στη θέση πρόσδεσης Cl^- .

1.4 Κυτόχρωμα b_6f (Cyt b_6f)

Η απομόνωση του χλωροπλαστικού Cyt b_6f έδειξε την ομοιότητά του με το μιτοχονδριακό κυτόχρωμα Cyt bc_1 (Hurt and Hauska, 1981). Η κλωνοποίηση των κυτοχρωμάτων Cyt bc_1 από θηλαστικά, πτηνά, ζυμομύκητες και βακτήρια έδειξε ότι όλα εξελίχθηκαν από ένα κοινό πρόγονο, στον οποίο το Cyt b_6 και η σιδηροπρωτεΐνη Rieske είχαν κεντρική σημασία. Επιπλέον, ένα κυτόχρωμα τύπου c υπάρχει στα περισσότερα από αυτά τα bc_1 σύμπλοκα ή βρίσκεται κοντά τους σαν ξεχωριστή ομάδα (Baymann et al., 2001). Όλα αυτά τα bc_1 σύμπλοκα ορίζονται σαν οξειδοαναγωγάσες πλαστοκινόνης-πλαστοκυανίνης (ή κυτοχρώματα c) και δημιουργούν πρωτονοκινητική δύναμη (pmf) μέσω ενός μηχανισμού γνωστού ως κύκλου Q (Q-cycle) (Trumpower B.L., 1990). Στο χλωροπλαστικό κυτόχρωμα Cyt b_6f η διπλή οξείδωση μιας ανηγμένης κινόνης που βρίσκεται στην Q_o θέση (περιοχή κοντά στο μικροχώρο των θυλακοειδών), οδηγεί στην απελευθέρωση δύο πρωτονίων στο μικροχώρο. Ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στην πλαστοκυανίνη μέσω μιας αλυσίδας υψηλού δυναμικού (περιλαμβάνει την πρωτεΐνη Rieske και το κυτόχρωμα f), ενώ το δεύτερο

ηλεκτρόνιο μεταφέρεται κατά μήκος της μεμβράνης μέσω δύο ομάδων αίμης (bL και bH) του κυτοχρώματος b_6 και ανάγει μία κινόνη που βρίσκεται στη θέση Q_i (στρώμα). Μετά τη δεύτερη αναγωγή της τελευταίας, δύο πρωτόνια δεσμεύονται από το στρώμα και η PQH₂ απελευθερώνεται στη διλιπιδική στιβαδα και ενσωματώνεται στη δεξαμενή πλαστοκινόνης. Τελικά, η λειτουργία του Q κύκλου οδηγεί στην απελευθέρωση πρωτονίων στο μικροχώρο και άρα στην ενίσχυση της πρωτονιοκινητικής δύναμης κατά μήκος της μεμβράνης (Mitchell, 1976; Berry et al., 2000). Κάθε μονομερές από το διμερές Cytb₆f περιέχει 4 μεγάλες υπομονάδες (18-32 kD), το κυτόχρωμα f, το κυτόχρωμα b, της πρωτεΐνη Rieske σιδήρου-θείου και την υπομονάδα IV, αλλά και 4 μικρές υδρόφοβες υπομονάδες (PetG, PetL, PetM και PetN). Αυτό οδηγεί σε ένα διμερές μεγέθους 217kD (Kurisu et al., 2003; Stroebel et al., 2003).

1.5 Φωτοσύστημα I (PS I)

Το PS I αποτελείται από δύο μέρη, το κέντρο αντίδρασης (RC) και τη φωτοσυλλεκτική κεραία (LHC I) (Ben-Shem et al., 2003). Το κέντρο αντίδρασης περιλαμβάνει 12-14 υπομονάδες που ονομάζονται PsaA-PsaL, PsaN και PsaO. Στο εσωτερικό του PSI βρίσκεται ένα ετεροδιμερές των PsaA-PsaB. Εκεί προσδένεται το ειδικό ζευγάρι χλωροφυλλών P700, όπου συμβαίνει ο πρωτοταγής διαχωρισμός φορτίων και οι πρωτοταγείς δέκτες ηλεκτρονίων A_0 (chl a), A_1 (φυλλοκινόνη) και Fx (σύμπλεγμα σιδήρου-θείου). Επιπρόσθετα στο ετεροδιμερές περιέχει περίπου 80 χλωροφύλλες που λειτουργούν σαν φωτοσυλλεκτική κεραία (Nelson and Ben-Shem, 2002; Jordan et al., 2001). Οι τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων –πρόκειται για δύο ακόμη συμπλέγματα Fe₄-S₄, τα F_A και F_B εντοπίζονται στο PsaC. Οι υπόλοιπες υπομονάδες συμμετέχουν στην πρόσδεση της φερρεδοξίνης (PsaC, PsaE, PsaD) και της πλαστοκυανίνης (PsaF), του LHC I (PsaK, PsaG, PsaJ και PsaF), του LHC II (PsaI, PsaH, PsaL) και γενικότερα στη διατήρηση της πολύπλοκης αυτής δομής καθώς και σε άγνωστες ακόμη λειτουργίες (Scheller et al., 2001).

1.6 Η συνθάση ATP (ATPase)

Η συνθάση του ATP (F-ATPase) είναι πανταχού παρούσα στις μεμβράνες που μεταφέρονται ποσά ενέργειας, όπως οι θυλακοειδείς μεμβράνες του χλωροπλάστη, οι εσωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων και η πλασματική μεμβράνη των βακτηρίων. Στα κυανοβακτήρια, τα φύκη και τα φυτά αυτό το ένζυμο καταλύει τη σύνθεση ATP αξιοποιώντας μια βαθμίδωση πρωτονίων (pmf) που δημιουργήθηκε από την αλυσίδα

μεταφοράς ηλεκτρονίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (McCarty et al., 2000). Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά του ενζύμου είναι συντηρημένα και τόσο η δομή, όσο η λειτουργία του μοιάζουν με τα αντίστοιχα ένζυμα των μιτοχονδρίων και των βακτηρίων (Nelson et al., 2002).

Το ένζυμο είναι ένα σύμπλοκο με πολλές υπομονάδες που σχηματίζουν ένα διαμεμβρανικό κομμάτι (CF_0) και ένα δεύτερο εκτεθειμένο στο στρώμα (CF_1) και λειτουργούν σαν μία μοριακή μηχανή που τροφοδοτείται από την πρωτονιοκινητική δύναμη. Η μετακίνηση πρωτονίων μέσω του CF_0 είναι συζευγμένη με τη σύνθεση/υδρόλυση του ATP σε περιοχές των β -υπομονάδων του CF_1 . Στους χλωροπλάστες ο CF_0 αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες I, II, III και IV με πιθανή στοιχειομετρία 1:1:14:1. Οι 14 υπομονάδες III δημιουργούν ένα δακτύλιο που ισοδυναμεί με το c δακτύλιο άλλων F-ATPases (McCarty et al., 2000). Ολόκληρο το CF_0 - CF_1 σύμπλοκο φάνηκε ότι λειτουργεί σαν πρωτονιοτροφοδοτούμενος περιστρεφόμενος κινητήρας στο οποίον ο ρότορας αποτελείται από τις υπομονάδες III (c), γ και ϵ ενώ το μη περιστρεφόμενο μέρος αποτελείται από τις υπομονάδες I, II, IV, δ , α και β (Boyer, 1997; Stock et al., 1999).

Μια πλήρης περιστροφή του ρότορα επιτρέπει τη σύνθεση 3 ATP. Επειδή ο αριθμός των υπομονάδων c/III δεν διαιρείται ακριβώς με το 3 φαίνεται πως ο αριθμός των πρωτονίων που μεταφέρονται μέσω της μεμβράνης ανά συντιθέμενο ATP δεν είναι ακέραιος και εξαρτάται από το είδος του υπό μελέτη οργανισμού. Στην περίπτωση των φυτών η ανακάλυψη 14 υπομονάδων c/III ίσως αποτελεί τη λύση στη μακροχρόνια διαμάχη σχετικά με τη σημασία της κυκλικής φωσφορυλίωσης και το αν τροφοδοτεί τον κύκλο Calvin-Benson με επιπλέον ATP (Joliot and Joliot, 2002). Η δέσμευση διοξειδίου CO_2 από τον κύκλο του Calvin απαιτεί μια αναλογία ATP:NADPH ίση με 3:2. Μέχρι πρότινος υπολογιζόταν πως 4 ηλεκτρόνια που εξάγονται από το νερό προκαλούν τη σύνθεση 2 μορίων NADPH και την άντληση 12 πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης, τα οποία μέσω ενός πλήρη κύκλου της ATPάσης θα επέτρεπαν τη σύνθεση 3 ATP. Αυτός ο υπολογισμός πλέον δεν ισχύει εφόσον υπάρχουν 14 και όχι 12 υπομονάδες III (Seelert et al., 2000). Πιθανόν η κυκλική φωσφορυλίωση που στηρίζεται στην κυκλική ροή ηλεκτρονίων γύρω από το PS I να παρέχει τα 2 επιπλέον πρωτόνια που απαιτούνται (Joliot and Joliot, 2002). Επίσης το ΔpH λόγω της κυκλικής φωσφορυλίωσης σε περιπτώσεις υψηλής έντασης φωτισμού ίσως παίζει προστατευτικό ρόλο για τα κέντρα αντίδρασης.

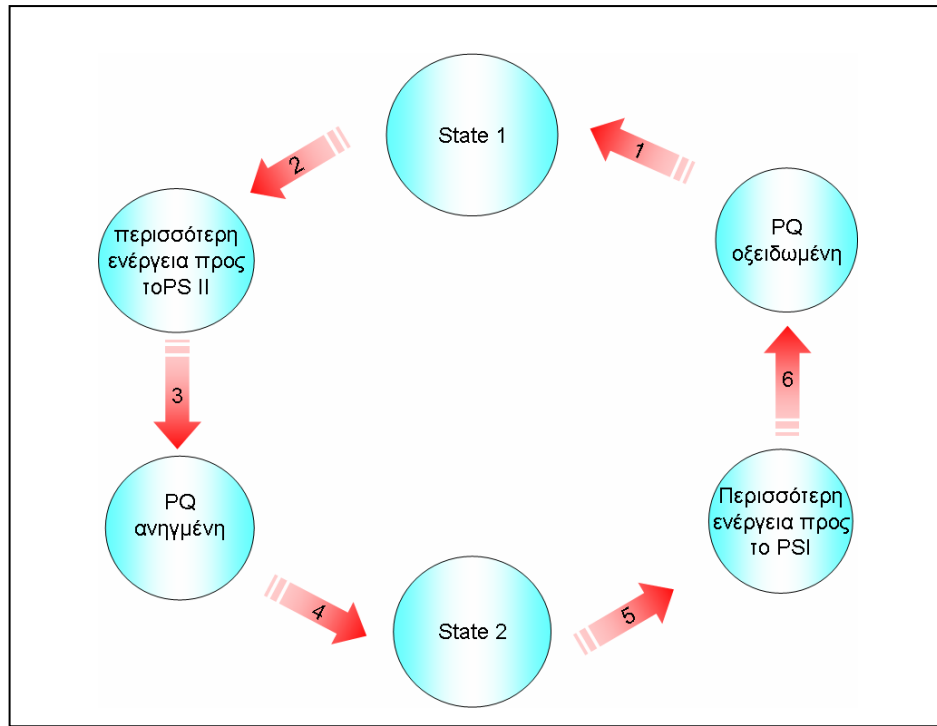
1.7 Μηχανισμοί αυτορρύθμισης της φωτοσύνθεσης

Για κάθε τιμή των αβιοτικών παραγόντων του περιβάλλοντός τους, οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί επιχειρούν να διατηρήσουν μια ισορροπία ανάμεσα στην παροχή ενέργειας μέσω της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων και την κατανάλωση ενέργειας για τις ανάγκες της δέσμευσης διοξειδίου του άνθρακα (Maxwell et al., 1994). Αυτή η ισορροπία είναι τόσο δύσκολο να περιγραφεί που απαιτούνται ειδικές μαθηματικές μοντελοποιήσεις για να προσεγγιστεί όπως πρόσφατες μελέτες των Papadakis et al. (2005). Η ισορροπία είναι απαραίτητη για να προστατευθεί ο οργανισμός από τη ζημιογόνα αποτελέσματα της περίσσειας φωτονιακής ενέργειας αλλά και να διατηρηθούν σε ανεκτά για τη ζωή επίπεδα το ATP και το NADPH. Οι μηχανισμοί μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση το είδος εξάρτησης τους από γενετικό υλικό. Υπάρχουν μηχανισμοί που εμπλέκουν αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης και άλλοι που δεν σχετίζονται με κάποια αλλαγή της γενετικής έκφρασης για να λειτουργήσουν. Οι τελευταίοι αποτελούν την καθεαυτό αυτορρύθμιση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, αφού βρόγχοι προστασίας ενεργοποιούνται και μέσω μιας αλυσίδας μοριακών γεγονότων επιτρέπουν βραχυπρόθεσμη προσαρμογή. Δύο από αυτές που θα αναπτυχθούν στη συνέχεια είναι η μεταφορά τμήματος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας από το PSII στο PSI και αντίστροφα (μηχανισμός state transitions) και η ενεργοποίηση του μηχανισμού απόσβεσης της περίσσειας ενέργειας που περιγράφεται σαν συντελεστής qE. Αξιοσημείωτο είναι πως οι φωτοσυνθετικές αυτές αποκρίσεις θεωρούνται οι πιο πολύπλοκες της φωτοσύνθεσης (MacIntyre et al., 2000).

Μηχανισμός μετακίνησης της κεραίας ‘State transitions’

Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί έπρεπε να αναπτύξουν μηχανισμούς προσαρμογής στις μεταβαλλόμενες συνθήκες φωτισμού. Ένας σημαντικός μηχανισμός που ενεργοποιείται λόγω μεταβολών στις συνθήκες φωτισμού είναι η ανακατανομή ενέργειας μεταξύ των PS II και PS I (μηχανισμός state transition). Όταν το PS II διεγείρεται υπερβολικά τότε ένα μέρος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHC II) απομακρύνεται από το PS II και συνδέεται με το PS I (Allen and Forsberg, 2001). Η μεταφορά αυτή μειώνει τη διέγερση που δέχεται το PSII (προστατεύει το PSII) και επιτρέπει εντατικότερη λειτουργία του PSI. Η απόκριση σχετίζεται με την ενεργοποίηση μιας κινάσης που φωσφορυλιώνει το LHC II, αν και υπάρχει ασυμφωνία ανάμεσα στα *in vitro* και τα *in vivo* ποσοστά φωσφορυλίωσης, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στη συμμετοχή και άλλων παραγόντων ακόμη άγνωστων (Haldrup et al.,

2001). Σε PS I χωρίς την PsaH υπομονάδα δεν λειτουργεί ο παραπάνω μηχανισμός, ενώ από πειράματα με τεχνητές συνδέσεις (crosslinking studies), δείχνουν ότι το LHC II προσδένεται στις υπομονάδες I, L και H.

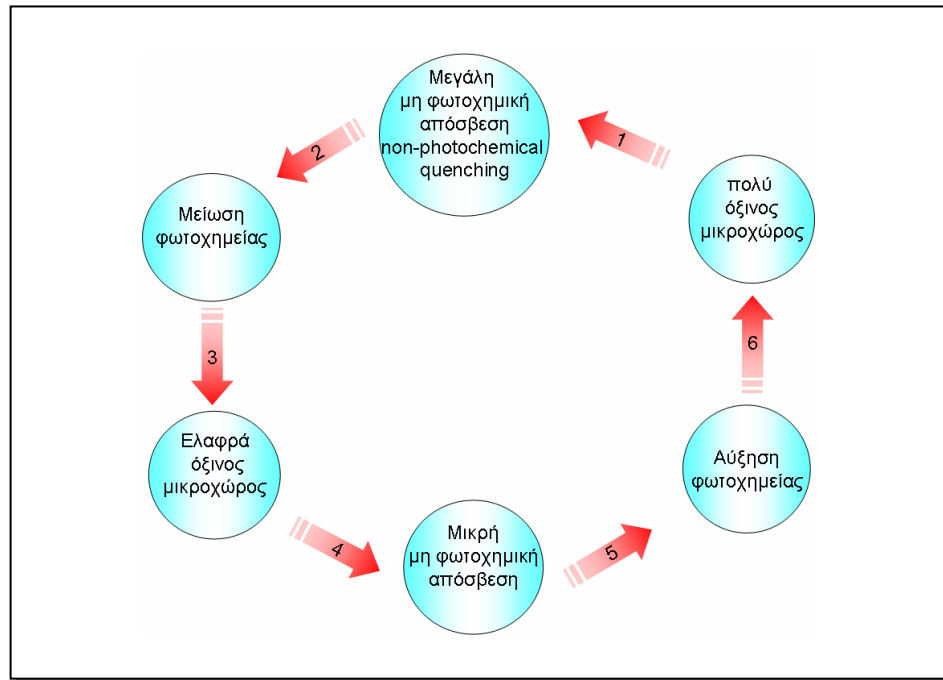


Εικόνα 8. Μηχανισμός βραχυπρόθεσμης ρύθμισης της φωτοσύνθεσης. Βρόγχος προστασίας state transition (τροποποιημένο από Nixon and Mullineaux, 2000).

Μηχανισμοί επαγόμενοι από τη φόρτιση της μεμβράνης των θυλακοειδών

Σε συνθήκες υψηλού φωτισμού η μεμβράνη των θυλακοειδών φορτίζεται (ύπαρξη διαφορών στις συγκεντρώσεις H^+ μεταξύ στρώματος και μικροχώρου, δηλαδή ύπαρξη $\Delta pH/\Delta \psi$) κυρίως λόγω της γραμμικής ροής ηλεκτρονίων και αυτό πυροδοτεί εντός δευτερολέπτων την διαδικασία διάχυσης της ενέργειας. Η τελευταία σχετίζεται με τη μετατροπή πιθανόν της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PS II σε μία μορφή με αυξημένη ικανότητα διάχυσης της απορροφώμενης ενέργειας σαν θερμότητα μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται NPQ (non-photochemical quenching), μη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας και ποσοτικοποιείται συνήθως με το συντελεστή qE. Περίσσεια πίεσης διεγέρσεων στο PSII, σε σχέση με αυτή που το φωτοσύστημα μπορεί να αξιοποιήσει, έχει σαν αποτέλεσμα την υπεροξίνιση αρχικά του μικροχώρου και στη συνέχεια την πρωτονίωση εκτεθιμένων καρβοξυλομάδων καταλείπων και την αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση. Αυτά τα μοριακά γεγονότα προτείνεται ότι πυροδοτούν την μη φωτοχημική διάχυση της ενέργειας

(NPQ). Το πώς συμβαίνει επακριβώς η διάχυση δεν είναι γνωστό. Παρά το ότι η αιτία είναι γνωστή (υπεροξίνιση μικροχώρου από υψηλή ένταση φωτισμού) και το τελικό αποτέλεσμα είναι γνωστό (διάχυση στο LHC), τα ενδιάμεσα στάδια είναι μόνο μερικώς γνωστά (Papageorgiou, 2004).



Εικόνα 9. Μηχανισμός βραχυπρόθεσμης ρύθμισης της φωτοσύνθεσης. Βρόγχος προστασίας qE (τροποποιημένο από Nixon and Mullineaux, 2000).

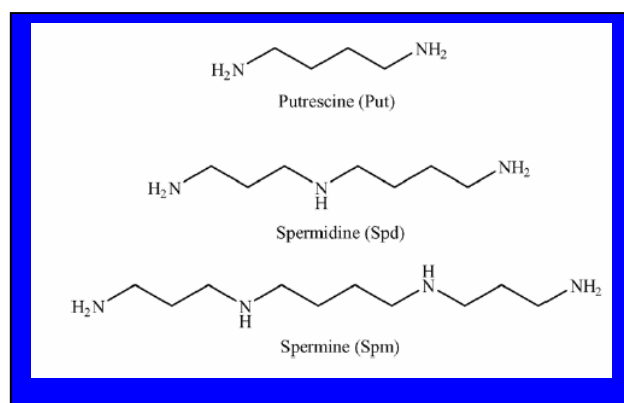
2. Πολυαμίνες

Ο όρος «πολυαμίνες» περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό οργανικών μορίων με περισσότερες της μιας αμινομάδες. Απ' αυτά τα μόρια, κάποια συναντώνται συχνότερα ή βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στα κύτταρα απ' ότι κάποια άλλα. Από τις συνηθέστερα αναφερόμενες είναι οι τρεις κύριες πολυαμίνες, πουτρεσίνη (Put), σπερμιδίνη (Spd) και σπερμίνη (Spm) (εικόνα 10):

Put = 1,4-butanediamine [Put]

Spd=N¹-(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine [Spd]

Spm=N¹,N⁴-bis(3-aminopropyl)-1,4-butane-diamine [Spm]



Εικόνα 10. Οι κυριότερες πολυαμίνες: Put (Put), Spd (Spd) και Spm (Spm). Αποτελούν φυσιολογικά συστατικά των φυτών, των ζώων και των μικροβίων.

Οι πολυαμίνες (Put, Spd, και Spm) είναι μικρές αλειφατικές αμίνες με απλή δομή, αλλά ακόμη και σήμερα, με διαθέσιμες άνω των 67.000 σχετικών εργασιών (λήμμα polyamines στη βάση δεδομένων PubMed), ο ρόλος τους παραμένει άγνωστος. Εμπλέκονται σε τόσες πολλές διαδικασίες των οργανισμών που τελικά καθίσταται δύσκολο να αναφερθεί κάποιος σε έναν κύριο ρόλο των πολυαμινών. Παρ'ολ'αυτά η διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού με τον οποίο δρουν πιστεύεται ότι θα εξηγήσει την σημασία τους. Παρά το ότι οι πολυαμίνες μελετώνται εντατικά εδώ και 4-5 δεκαετίες μόνο κάποια από τα κομμάτια του αινίγματος των πολυαμινών είναι γνωστά. Οι πολυαμίνες προσδένονται σε νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), αποσβένουν ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), επιδρούν στην κυτταρική διαίρεση (proliferation), συνδέονται με την απόπτωση (apoptosis) και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD).

Οι τρεις κύριες πολυαμίνες (Spm, Spd και Put) διαφέρουν τόσο στον αριθμό των θετικών φορτίων που εμφανίζουν σε φυσιολογικές ενδοκυτταρικές τιμές pH (τέσσερα στη Spm, τρία στη Spd και δύο στην Put), όσο και στο μήκος του μορίου (1.46 nm, 1.112 nm και 0.65 nm αντίστοιχα).

Ειδικότερα στα φυτά, ο ρόλος των πολυαμινών, καθ' όσον έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα, εκτείνεται σε ένα επίσης μεγάλο εύρος διαδικασιών, μεταξύ των οποίων αναφέρονται η κυτταρική διαίρεση (Martin-Tanguy, 1997), η μορφογένεση (Masgrau et al., 1997), ο γηρασμός (Rastogi 1991; Borell et al., 1997) η κυτταρική διαίρεση και απόπτωση (Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005; Jaenne et al., 2004) και σε πολλές περιπτώσεις βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Jokela et al., 1997; Kurepa et al., 1998; Perez-Amador et al., 2002; Bouchereau et al., 1999).

Σε κυτταρικό επίπεδο, οι λειτουργίες αυτές μεταφράζονται σε σταθεροποίηση μεμβρανών, παρεμπόδιση της απώλειας χλωροφύλλης σε γηρασμένα κύτταρα, ανίχνευση και καταστροφή των ελεύθερων ριζών (π.χ. υπεροξειδικές ρίζες) (Bors et al., 1989), αύξηση της σύνθεσης πρωτεϊνών, RNA και DNA (Kuehn et al., 1979), καθώς και αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας (Tiburcio et al., 1993; Walden et al., 1997). Επίσης, παρεμποδίζουν την αύξηση της ενεργότητας, καθώς και την *de novo* σύνθεση υδρολυτικών ενζύμων, όπως οι RNάσες και οι πρωτεάσες, και ελέγχουν τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου στο επίπεδο της ACC συνθάσης (Tiburcio et al., 1997).

Οι πολυαμίνες βοηθούν τον πολυμερισμό συστατικών του κυτταροσκελετού, επηρεάζουν τη διαμόρφωση και σταθερότητα του DNA και ενεργοποιούν το ριβόσωμα κατά την πρωτεϊνοσύνθεση (Flink and Pettijohn, 1975; Igarashi and Kashiwagi, 2000). Σε ανώτερα φυτά, εξωκυτταρικές πολυαμίνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αρνητικά φορτισμένα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (Mariani et al., 1989).

Συνοψίζοντας, οι πολυαμίνες εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως αποκρίσεις στην καταπόνηση, έλεγχος της κυτταρικής διαίρεσης, σχηματισμός ρίζας, άνθιση, αναστολή γηρασμού (Evans and Malmberg, 1989; Galston and Sawhney, 1990, Kumar et al., 1997; Walden et al., 1997; Bouchereau et al., 1999). Μελέτες των φυσιολογικών δράσεων των πολυαμινών εστιάζουν κυρίως στο πως μεταβάλλονται τα επίπεδά τους ποιοτικά και ποσοτικά αφήνοντας αναπάντητο το γιατί συμβαίνουν οι αλλαγές.

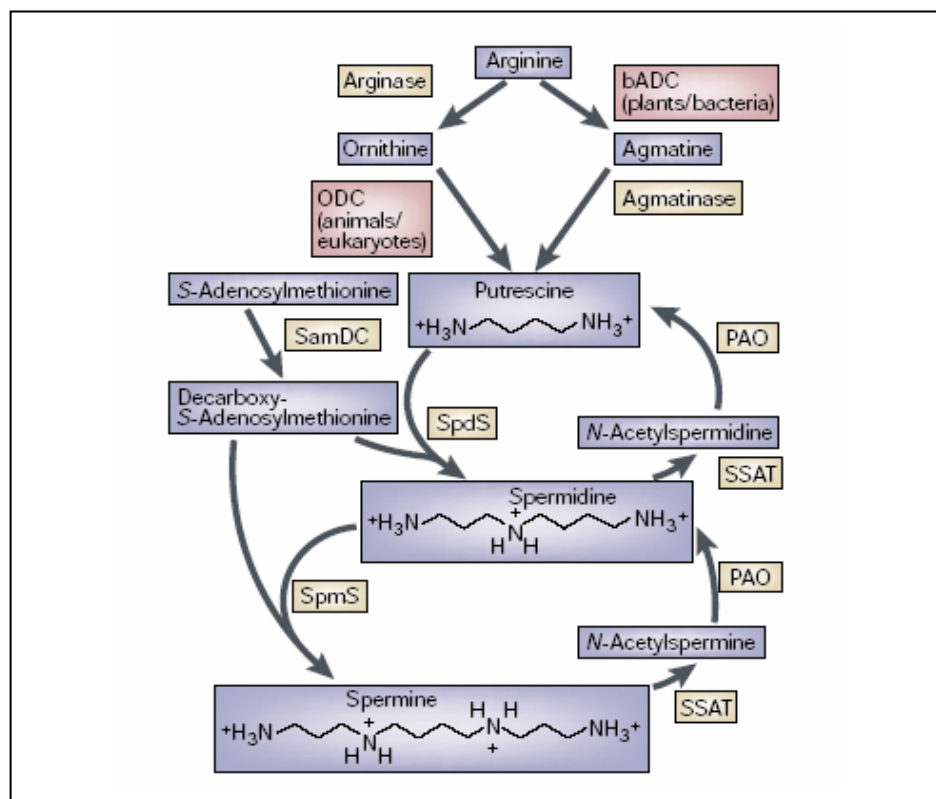
2.1 Μεταβολισμός πολυαμινών

Παρά το γεγονός ότι η βιοσύνθεση των πολυαμινών στους περισσότερους οργανισμούς γίνεται μέσω της αποκαρβοξυλίωσης της ορνιθίνης προκειμένου να σχηματιστεί Put (συμμετοχή ενζύμου ODC: αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, EC 4.1.1.17)), στα φυτά και σε κάποιους μικροοργανισμούς η Put συντίθεται από αργινίνη (μέσω ADC: αποκαρβοξυλάση της αργινίνης, EC 4.1.1.19) (Primikiriou and Roubelakis-Angelakis, 1999)

και ουριοϋδρολάση της αγματίνης ή ιμινοϋδρολάση της αγματίνης (εικόνα 11). Η ύπαρξη δύο μονοπατιών για την σύνθεση της Put δεν είναι πλήρως κατανοητή σε λειτουργική βάση. Μάλιστα στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* δεν φαίνεται να υπάρχει αλληλουχία για την ODC (Hanfrey et al., 2001). Η Put (διαμίνη) μετατρέπεται σε Spd (τριαμίνη), και σε Spm (τετραμίνη) με την προσθήκη κάθε φορά μιας ομάδας αμινοπροπυλίου από την αποκαρβοξυλιωμένη S-αδενοσυλο-μεθειονίνη (SAM). Αυτά τα βήματα πραγματοποιούνται με τη δράση δύο στενά σχετιζόμενων αλλά εξειδικευμένων ενζύμων, της συνθάσης Spd και συνθάσης Spm 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. Παράλληλα επειδή η SAM είναι ο πρόδρομος του αμινοκυκλοπροπανιοκαρβοξυλικού οξέως, σημαντικού ενδιάμεσου της φυτικής ορμόνης γηρασμού αιθυλενίου, η ισορροπία ανάμεσα στα δύο ανταγωνιστικά συστατικά (αιθυλένιο-πολυαμίνες) προτάθηκε σαν κρίσιμος παράγοντας για την ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού (Evans and Malmberg, 1989). Οι πολυαμίνες συντίθενται και οξειδώνονται (διασπώνται) και στους χλωροπλάστες (Torrighiani et al., 1995; Andreadakis and Kotzabasis, 1995; Bernet et al., 1999). Οι πολυαμίνες συνδέονται και με ποικιλία μορίων μέσω αμιδικού δεσμού. Συζευγμένες μορφές πολυαμινών με υδροξυκιναμικό οξύ συσσωρεύονται σε νεαρά φύλλα μετά την άνθηση σε διάφορα φυτά (Hamasaki and Galston, 1990). Από την άλλη μεριά ρύθμιση των ενδογενών επιπέδων πολυαμινών περιλαμβάνει τη διάσπαση Put από οξειδάσες χαλκού των διαμινών και τη διάσπαση Spd και Spm από FAD εξαρτώμενες οξειδάσες των πολυαμινών. Αυτά τα ένζυμα εντοπίζονται κυρίως στον αποπλάστη και πιθανόν να δρουν κατά τη λιγνιτοποίηση του κυτταρικού τοιχώματος και στη κυτταρική άμυνα (Sebela et al., 2001).

Παρόμοιοι μηχανισμοί φαίνεται να δρουν και σε άλλους τύπους φωτοσυνθετικών οργανισμών, αφού αντίστοιχες μελέτες έδειξαν ότι στο καλαμπόκι, το επίπεδο των πολυαμινών είναι αυξημένο στους ωχροπλάστες και μειώνεται σταδιακά κατά την πορεία φωτοανάπτυξής τους σε χλωροπλάστες. Ταυτόχρονα, μειώνεται η ενεργότητα των κύριων βιοσυνθετικών ενζύμων των πολυαμινών, της ADC και της ODC, ενώ αυξάνεται η ενεργότητα του κύριου ενζύμου για τον καταβολισμό, της χαλκούχου οξειδάσης των διαμινών (DAO; EC 1.4.3.6) (Andreadakis and Kotzabasis, 1996). Αυτή η αποδόμηση των πλαστιδιακών πολυαμινών, ίσως θα μπορούσε να εξηγηθεί με την υπόθεση ότι οι πολυαμίνες, κατά τη διάρκεια της φωτομετατροπής του ωχροπλάστη σε χλωροπλάστη, εξυπηρετούν ως πηγή αζώτου για τη βιοσύνθεση της χλωροφύλλης και πρωτεϊνών. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από το γεγονός, ότι οι πολυαμίνες, με τη δράση συγκεκριμένων

τρανσαμιναςών, μπορούν να δώσουν αμινομάδες σε α-κετοοξέα, για τη σύνθεση των αμινοξέων (Tabor and Tabor, 1972), ενώ, ειδικά η Put, με τη δράση μιας αμινοτρανσφεράσης, δίνει μια αμινομάδα στο α-οξογλουταρικό οξύ, σχηματίζοντας έτσι το γλουταμικό οξύ, το οποίο αποτελεί πρόδρομο της βιοσύνθεσης των χλωροφυλλών (Askar and Treptow, 1986).



Εικόνα 11. Μονοπάτι βιοσύνθεσης και καταβολισμού των πολυαμινών. ADC (αποκαρβοξυλάση της αργινίνης), ODC (αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης), SamDC (αποκαρβοξυλάση της S-αδενοσυλ-μεθειονίνης, SpdS (συνθάση της Spd), SpmS (συνθάση της Spm), PAO (οξειδάση των πολυαμινών), SSAT (ακετυλάση Spd/Spm). (Τροποποιημένο από Coffino, 2001).

2.2 Πολυαμίνες και Φωτοσύνθεση

Η γνώση που σχετίζεται με τη σχέση των πολυαμινών και του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι μάλλον αποσπασματική. Η βιοσύνθεση των πολυαμινών φαίνεται ότι ελέγχεται από το φως (Kramer et al., 1992) και κατά τη διάρκεια της φωτοπροσαρμογής ο λόγος Spm/Put επιδρά στην οργάνωση και λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ενώ ο φωτοϋποδοχέας για την προσαρμογή των πολυαμινών και την φωτοπροσαρμογή πιθανόν είναι κοινός (Kotzabasis et al., 1999). Στο σκοτάδι το κριθάρι συσσωρεύει Put, χάνει χλωροφύλλη και γερνά γρήγορα (Legocka and Zajchert, 1999).

Χορήγηση πολυαμινών σε ωσμωτικά στρεσαρισμένη βρώμη μειώνει σημαντικά τη αποδόμηση των πρωτεϊνών και γενικότερα σταθεροποιεί τις μεμβράνες των θυλακοειδών (Besford et al., 1993). Επίσης, η προσθήκη πολυαμινών εξωγενώς καθυστερεί τον γηρασμό σε αποκομμένα φύλλα και πρωτοπλάστες (Galston and Kaur-Sawhney, 1990) καθώς επίσης και σε φυλλικά δισκία κριθαριού (Legocka and Zajchert, 1999).

Αρχικά, μια πρώτη ιδέα για τον πιθανό ρόλο των πολυαμινών στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό, δόθηκε μετά από ανίχνευσή τους στους χλωροπλάστες διαφόρων φωτοσυνθετικών οργανισμών (*Euglena gracilis* (Bagni and Serafini-Fracassini, 1973), *Helianthus tuberosus* (Torrighiani et al., 1986), spinach (Kotzabasis et al., 1993), *Zea mays* (Andreadakis and Kotzabasis, 1995). Λεπτομερέστερη έρευνα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στα θυλακοειδή του σπανακιού έδειξε, όχι μόνο την ύπαρξη και των τριών κύριων πολυαμινών (Put, Spd, Spm) σ' αυτές τις μεμβράνες, αλλά επιπλέον, ότι οι πολυαμίνες βρίσκονται συνδεδεμένες σε υποσύμπλοκα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, όπως το LHC και το PS II. Στο σπανάκι βρέθηκε αποκλειστικά Spm στο εσωτερικό των κέντρων αντίδρασης, ενώ βρέθηκε κυρίως Spd στην πρωτεΐνη 33kD του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου (OEC) (Kotzabasis et al., 1993; Fotinou, 1993). Στο πλαίσιο αυτών των παρατηρήσεων προτάθηκε ότι οι πολυαμίνες ίσως παίζουν σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση των συμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Doernemann et al., 1996).

Η υψηλή ένταση φωτισμού προκαλεί μακροπρόθεσμα μία αύξηση της ελεύθερης Put στη σόγια (*Glycine max*) (Kramer et al., 1992). Γενικότερα σε συνθήκες καταπόνησης παρατηρείται αύξηση της Put κυρίως μέσω του μονοπατιού της ADC (Galston, 2001) και θα αναπτυχθεί σε επόμενη ενότητα. Μάλιστα η ενεργότητα της ADC ελέγχεται από το φυτόχρωμα και η διαδικασία είναι εντονότερη σε κυανή παρά σε ερυθρή ακτινοβολία (Dai and Galston 1981; Borell et al., 1995). Η βιοσύνθεση των πολυαμινών ελέγχεται από την ένταση και την ποιότητα φωτισμού, ενώ στο χλωροπλάστη εκτός από τη βιοσύνθεση μπορεί να λάβει χώρα και η αποδόμηση των πολυαμινών (Torrighiani et al., 1986; Kotzabasis et al., 1993; Del Duca et al., 1995; Andreadakis and Kotzabasis, 1995; Bernet et al., 1999).

Τα επίπεδα πολυαμινών επιδρούν στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και σε άλλες μεταβολικές διαδικασίες του χλωροπλάστη (Beigbeder et al., 1995). Μάλιστα προτάθηκε πως οι πολυαμίνες εν είδει συμπαράγοντα σταθεροποίησης των μεμβρανών, εμπλέκονται σε αποκρίσεις στο φως και αποτρέπουν την αποδόμηση πρωτεϊνών των θυλακοειδών (Cohen et al., 1979; Popovic et al., 1979; Kotzabasis et al., 1993; Besford et al., 1993). Η D₁, η D₂, το Cytf και η μεγάλη υπομονάδα της Rubisco φαίνεται ότι σταθεροποιούνται από τις

πολυαμίνες (Besford et al., 1993). Ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός και οι συγγραφείς πρότειναν πως η πρόσδεση των πολυαμινών αποτρέπει την οξειδωση των λιπιδίων και την πρωτεόλυση.

Πολλά από τα πειράματα, που αφορούν βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού έγιναν με το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* και το μεταλλαγμένο του στέλεχος, C-2A', το οποίο έχει όμοια συμπεριφορά με τα αγγειόσπερμα φυτά και ως εκ τούτου παρέχει ένα μοναδικό σύστημα επιμέρους μελέτης της φωτοεξαρτώμενης και της φωτοανεξάρτητης δράσης του ενζύμου POR. Έτσι, μείωση της Put (με χρήση αναστολέα της σύνθεσης) στο μετάλλαγμα C-2A', παρεμπόδισε τη δράση και των δύο τύπων του ενζύμου POR (LPOR και DPOR) (Beigbeder et al., 1995).

2.3 Γενετικές προσεγγίσεις του ρόλου των πολυαμινών

Γενετικές μελέτες σε ζυμομύκητες έδειξαν ότι το *spe3* μετάλλαγμα, το οποίο δεν εμφανίζει ενεργότητα συνθάσης Spd, έχει απόλυτη εξάρτηση σε Spd ή Spm προκειμένου να αυξηθεί, ενώ το *spe4* μετάλλαγμα, το αντίστοιχο για τη συνθάση Spm, δεν εμφανίζει πρόβλημα στην ανάπτυξη (Hamasaki-Katagiri et al., 1998). Στην *Escherichia coli*, μεταλλάγματα με αδυναμία σύνθεσης Spd συνεχίζουν να αναπτύσσονται σχεδόν με ανεπηρέαστο ρυθμό χωρίς εξωγενώς προστιθέμενες πολυαμίνες (Xie et al., 1993), ενώ σε περιπτώσεις μείωσης της Put η ανάπτυξη μειώνεται έως 70% (Tabor and Tabor, 1999). Σε κυτταροκαλλιέργειες ινοβλαστών ποντικού, απενεργοποίηση του γονιδίου της συνθάσης Spm προκαλεί έλλειψη Spm και συσσώρευση Spd δεν επιδρά σημαντικά στην αύξηση των κυττάρων (Mackintosh and Pegg, 2005), ενώ η απενεργοποίηση της συνθάσης της Spm (*SpmS*) που εδράζεται στο X χρωμόσωμα σε ποντίκια έδειξε ότι η Spm είναι απαραίτητη για την επιβίωση, την ανάπτυξη και τη γονιμότητα (Wang et al., 2004). Σε ανώτερα φυτά απενεργοποίηση του γονιδίου *acl5*, υπεύθυνου για την συνθάση Spm στο *Arabidopsis*, προκάλεσε φαινότυπο νάνου (Hanzawa et al., 2000). Οι γενετικές προσεγγίσεις με την υπερέκφραση βιοσυνθετικών ενζύμων της Spd, οδήγησαν σε δημιουργία υπερανθεκτικών σε παγετό, ψύχος, υψηλή αλατότητα, ωσμωτική καταπόνηση, ξηρασία και στο τοξικό paraquat φυτών αλλά δεν μπορούν να απαντήσουν στο κρίσιμο ερώτημα το πως επιτυγχάνεται η ανθεκτικότητα (Kasukabe et al., 2004). Είναι αξιοσημείωτο ότι η έρευνα των πολυαμινών πέρασε από την περιγραφική φάση στην συνθετική φάση παρά το ότι ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο δρουν ακόμη είναι άγνωστος.

2.4 Πολυαμίνες και Καταπονήσεις (Stress)

Τα τελευταία χρόνια δόθηκε έμφαση στο ρόλο των πολυαμινών στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Galston et al., 1997; Galston, 2001). Πρόσφατα αναφέρθηκε αύξηση των πολυαμινών και σε λειχήνες σε καταπόνηση από χαμηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων (Pirintsos et al., 2004). Πολλές αναφορές συνδέουν την ανθεκτικότητα των φυτών στις καταπονήσεις με την ικανότητα να ενισχύουν τη σύνθεση των πολυαμινών κατά την αντιμετώπιση της καταπόνησης (Bouchereau et al. 1999; He et al., 2002; Navakoudis et al., 2003). Οι Lee et al., (1995) βρήκαν άμεση σχέση μεταξύ της ανθεκτικότητας των φυτών ρυζιού στο ψύχος και του βαθμού συσσώρευσης Put στο βλαστό, στο πλαίσιο απόκρισης στην καταπόνηση. Επίσης, βρέθηκε ότι η ανθεκτική ποικιλία αγγουριού αυξάνει τη σύνθεση Spd στα φύλλα κατά την έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες (3°C στο σκοτάδι), ενώ μια ευαίσθητη ποικιλία δεν την αυξάνει (Shen et al., 2000). Η αυξημένη Spd δείχνει ικανή να καταστέλλει την προερχόμενη από την NADPH οξειδάση συσσώρευση H₂O₂ στα ψυχθέντα φύλλα και έτσι να περιορίζει τη ζημιά από οξειδωτική καταπόνηση στα φύλλα. Η Szala et al., (1997) πρότειναν ότι η αύξηση των πολυαμινών εμποδίζει τη φωτοαναστολή όταν μέτρησαν τα επίπεδα Put και Spd να αυξάνονται στο φως σε φύλλα *Zea mays* λόγω έκθεσης σε 5°C, αλλά να μην συμβαίνει κάτι αντίστοιχο στο σκοτάδι.

Από παλαιότερα προτάθηκε ότι οι πολυαμίνες προστατεύουν τις μεμβράνες και μειώνουν τις ενεργές μορφές οξυγόνου (Roberts et al., 1986, Bors et al., 1989). Στα φύλλα οι πολυαμίνες εντοπίζονται σε μεγάλο ποσοστό στους χλωροπλάστες (Torrighiani et al., 1986). Οι χλωροπλάστες έχουν επίσης υψηλές ενεργότητες βιοσυνθετικών ενζύμων των πολυαμινών και τρανσγλουταμινασών, ενζύμων που προσδένουν ομοιοπολικά πολυαμινές σε πρωτεΐνες (Borrel et al., 1995). Μάλιστα οι παραπάνω ενεργότητες ρυθμίζονται από το φως (Hirasawa et al., 1994; Serafini-Fracassini et al., 1995). Επίσης ανθεκτικά στο ψύχος φυτά δείχνουν μεγαλύτερη αύξηση των ενδογενών πολυαμινών σαν απόκριση στο ψύχος από ότι κάνουν τα ευαίσθητα στο ψύχος φυτά (Guye et al., 1986; Nadeau et al., 1987; Lee et al., 1995). Αν μάλιστα αποτρέψει κάποιος την αύξηση των πολυαμινών κατά την καταπόνηση αυξάνεται η ευαισθησία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (He et al., 2002). Παρόμοια ισχύουν και στις καταπονήσεις από οζον (Navakoudis et al., 2003) και από UVB (Sfichi et al., 2004).

2.5 Τρανσγλουταμινάσες

Λόγω των χημικών τους χαρακτηριστικών, οι πολυαμίνες μπορούν να συνδεθούν σε πολλά μόρια με διαφορετικούς τρόπους όπως με δεσμούς υδρογόνου, με ιοντικούς ή ομοιοπολικούς δεσμούς. Ομοιοπολικά οι πολυαμίνες προσδένονται σε πρωτεΐνες μέσω τρανσγλουταμινάσων (Tgases, R-γλουταμινυλο-πεπτίδιο: αμινο-γ-γλουταμυλοτρανσφεράση EC 2.3.2.13). Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την ομοιοπολική σύνδεση των πολυαμινών με γ-καρβοξυαμιδικές ομάδες των καταλείπων γλουταμίνης (Q) σε πρωτεΐνες (Folk et al., 1980, Griffin et al. 2002; Lorand and Graham, 2003). Η τελική αμινομάδα των πολυαμινών προσδένεται σε ένα κατάλειπο γλουταμίνης σχηματίζοντας μονο-(γ-γλουταμυλο)-πολυαμίνες (mono-PAs), ενώ αν συνδεθεί και η άλλη τελική αμινομάδα της πολυαμίνης με γειτονικό κατάλειπο Q δημιουργούνται δι-γ-γλουταμυλο-πολυαμίνες (bis-PAs). Το επιπλέον θετικό φορτίο των πρωτεϊνών μετά την ομοιοπολική πρόσδεση πολυαμινών μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης. Επίσης οι σχηματιζόμενες bis-PAs μπορεί να λειτουργήσουν ως ενδομοριακοί ή διαμοριακοί σύνδεσμοι (inter- and intra-molecular cross-links). Το μήκος του σκελετού των πολυαμινών καθορίζει την απόσταση ανάμεσα στα συνδεόμενα μέρη. Έτσι η Spd γεφυρώνει μεγαλύτερες αποστάσεις από την Put, αλλά μικρότερες σε σύγκριση με την Spm. Σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται πολλοί σύνδεσμοι είναι δυνατόν να σχηματιστούν υψηλού μοριακού βάρους σύμπλοκα (ανθεκτικά μάλιστα σε συνήθη αποδιατακτικά). Η πρόσδεση είναι πολύ ειδική και πιθανότατα εξαρτάται από τη διαμόρφωση του υποστρώματος (Griffin et al., 2002). Ένα σημαντικό μέρος της ενεργότητας τρανσγλουταμινάσων βρέθηκε σε φωτοσυνθετικούς ιστούς (Signorini et al., 1991; Lilley et al., 1998), αλλά και σε απομονωμένους χλωροπλάστες (Del Duca et al., 1994; Serafini-Fracassini and Del Duca, 2002). Τα τελευταία 20 χρόνια φάνηκε ότι η ομοιοπολική πρόσδεση πολυαμινών σε κατάλοιπα γλουταμίνης -απόδειξη ύπαρξης ενεργότητας τρανσγλουταμινάσης- αφορά πρωτεΐνες του χλωροπλάστη (Cohen et al., 1987; Apelbaum et al., 1988; Del Duca et al., 1995).

Πρόσφατα, ανιχνεύθηκε ενεργότητα τρανσγλουταμινάσης σε χλωροπλαστικά κλάσματα *Helianthus tuberosus* πλούσια σε θυλακοειδείς μεμβράνες και σε άλλα πλούσια σε στρώμα. Δύο ζώνες (58 και 24kD) εντοπίστηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση με τη χρήση αντισωμάτων ειδικών για τρανσγλουταμινάση προστάτη αρουραίου και άλλη μία ζώνη (150kD) εντοπίστηκε στο κλάσμα του στρώματος. Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι το ένζυμο και τα υποστρώματα υπάρχουν και στα δύο διαμερίσματα (στρώμα-θυλακοειδή). Οι πλαστιδικές τρανσγλουταμινάσες εμφανίζουν εξάρτηση σε Ca^{2+} , μέγιστη ενεργότητα σε

βασικό pH και εν δυνάμει εξάρτηση από ένα κατάλειπο κυστεϊνης στο ενεργό κέντρο τους (Del Duca et al., 2000). Η απόκριση στο φως αποτελεί μια νέα πτυχή της ρύθμισης της ενεργότητας των τρανσλουταμινασών. Σε απομονωμένα θυλακοειδή και σε απομονωμένους άθικτους χλωροπλάστες η ενεργότητα τρανσλουταμινάσης φάνηκε να ενισχύεται από το φως φανερώνοντας συνέργειακά φαινόμενα μεταξύ των δύο διαμερισμάτων (Dondini et al., 2003). Στα ζώα, όπου οι τρανσλουταμινάσες έχουν μελετηθεί πιο εκτενώς, η ρύθμισή τους από το φως σε όργανα όπως ο οφθαλμός ή το δέρμα ακόμη μένει αδιευκρίνιστη και υπάρχει μία μόλις αναφορά αύξησης της ενεργότητας τους στον αμφιβληστροειδή μετά από βλάβες λόγω ισχυρού φωτισμού (Zhang et al., 1996).

Οι πολυαμίνες προσδένονται κυρίως σε πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όπως είναι η μεγάλη υπομονάδα της Rubisco και τα πεπτίδια LHC II, CP29, CP26, CP24 της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (Del Duca et al., 1994). Μάλιστα φάνηκε ότι ο φωτισμός ενισχύει αυτήν τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση σε θυλακοειδείς μεμβράνες (Dondini et al., 2003). Η ομοιοπολική πρόσδεση των πολυαμινών σε πρωτεΐνες αποκτά ιδιαίτερη σημασία για το ρόλο που μπορεί να αναλάβει σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις δομικών πρωτεϊνών, ενζύμων ή πρωτεϊνών σινιάλων (ανασκόπησεις Serafini-Fracassini et al., 1995; Serafini-Fracassini and Del Duca, 2002). Η πρόσδεση είναι άκρως εξειδικευμένη και πιθανόν εξαρτάται από τη στερεοδιαμόρφωση του υποστρώματος και όχι από τα αμινοξέα πριν και μετά το κατάλειπο γλουταμίνης (Ballestar et al., 1996).

Η συσσωμάτωση χλωροπλαστικών πρωτεϊνών λόγω της σύνδεσης τους με πολυαμίνες οδηγεί σε υπερδομές που μειώνουν την ωσμωτική πίεση (Lorand and Graham 2003). Σε ότι αφορά το ρόλο της πολυαμινυλίωσης του LHC II έχει προταθεί πρόσφατα ότι οι φωτοεπαγόμενες στερεοδομικές αλλαγές στο LHC II αλλάζουν την απόσταση δύο Q καταλείπων (πιθανόν των Q131, Q197) και επιτρέπουν τη 'γεφύρωσή' τους με ένα μόριο Spm (Della Mea et al., 2004). Η πρόσδεση πολυαμινών από την ανθρώπινη Tgase στην φωσφολιπάση A₂ (παγκρέατος χοίρου) αυξάνει την ενεργότητα της 200-300% (Cordella-Miele et al., 1993). Στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό υπάρχει φωσφολιπάση και όταν διασπάζονται τα λιπίδια που συγκρατούν τα τριμερή LHC II προκαλεί τον μονομερισμό τους.

Σημαντικά υψηλές ενεργότητες τρανσλουταμινάσης ανιχνεύθηκαν σε φύλλα και οφθαλμούς αλλά και σε απομονωμένους χλωροπλάστες και μονοκύτταρα χλωροφύκη, ενώ κάποιιοι παρατήρησαν το ότι ο φωτισμός κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου αύξανε την ενεργότητα (Margosiak et al., 1990; Signorini et al., 1991; Falcone et al., 1993; Del Duca et al., 1994; Lilley et al., 1998; Bernet et al., 1999; Dondini et al., 2000). Επίσης η διαφοροποίηση κάλλου σε φωτοσυνθετικά ικανά κύτταρα αυξάνει την μετρούμενη

ενεργότητα τρανσγλουταμινάσης (Del Duca et al., 1993). Η δημιουργία του λειτουργικού οκταμερούς της Rubisco φαίνεται να προάγεται από την πρόσδεση πολυαμινών (Margosiak et al., 1990). Τελικά η ύπαρξη υποστρωμάτων τρανσγλουταμινάσης τόσο στο στρώμα όσο και στα θυλακοειδή οδηγεί στην πρόταση ότι στο χλωροπλάστη μπορεί να υπάρχει παραπάνω από ένα είδος τρανσγλουταμινάσης ή ότι η τρανσγλουταμινάση είναι στραμμένη προς το εξωτερικό των θυλακοειδών και μπορεί να συνδέσει πολυαμίνες και σε πρωτεΐνες του στρώματος.

ΣΚΟΠΟΣ

Έναν αιώνα πριν ο Thomas Huxley είπε ‘Πόσο μεγάλη θα ήταν η επανάσταση που θα επήρχετο στη βιολογία, εάν η φυσική ή η χημεία μπορούσε να εφοδιάσει το φυσιολόγο με ένα μέσον ώστε να μελετά τη δομή ζωντανών ιστών, όπως αυτό με το οποίο η φασματοσκοπία εφοδίασε τον ερευνητή της φύσης των ουράνιων σωμάτων’. Η τεχνολογική πρόοδος επέτρεψε την ανάπτυξη τεχνικών όπως η φασματοσκοπία NMR, η κρυσταλλογραφία ακτίνων X, η ηλεκτρονική μικροσκοπία ή η γενετική μηχανική, επιβεβαιώνοντας την επανάσταση που ο Huxley προέβλεψε για τη βιολογία αλλά και ταυτόχρονα μας βοήθησε, σε συνδυασμό με βιοχημικές και άλλες αναλύσεις, να κατανοήσουμε σημαντικές βιολογικές διαδικασίες και μοριακούς μηχανισμούς. Παρά την συσσώρευση πληροφορίας (άνω των 67.000 εργασιών) στην περίπτωση των πολυαμινών δεν φαίνεται η υπάρχουσα γνώση να μπορεί να δικαιολογήσει τη σημασία αυτών των μικρομοριακών ενώσεων. Οι πολυαμίνες συνδέονται με πολλές και σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες, όμως οι ερευνητές του χώρου δέχονται κριτική για την έλλειψη ενός συγκεκριμένου μηχανισμού - με έμφαση στην περίπτωση καρκινικών κυττάρων - που να εξηγεί τις δράσεις των πολυαμινών (Gerner and Meyskens, 2004). Ο κύριος όγκος της βιβλιογραφίας αποτελείται από μελέτες που καταγράφουν το πως μεταβάλλονται τα επίπεδα των πολυαμινών σε διαφορετικές συνθήκες (σε νεαρά κύτταρα, σε καρκινικά, σε γηρασμένα, σε τροφοπενίες). Εργασίες που εξετάζουν το πώς επηρεάζεται η λειτουργικότητα συγκεκριμένων διαδικασιών είναι η μειοψηφία, αλλά ήδη έχει φανεί ότι η μείωση των πολυαμινών με γονιδιακή καταστολή των ενζύμων βιοσύνθεσης αναστέλλει την ανάπτυξη προκαρυωτικών π.χ. *E. coli* (Tabor and Tabor, 1989), ή ανώτερων φυτών π.χ. *Arabidopsis* (Imai et al., 2004), ενώ η υπερέκφραση γονιδίων βιοσύνθεσης έχει οδηγήσει σε ανθεκτικότερους οργανισμούς σε αβιοτικές καταπονήσεις π.χ. φυτά ανθεκτικά σε υψηλή αλατότητα, παγετό, καταπονήσεις (Kasukabe et al., 2004). Στην περίπτωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, παρά το ότι οι πολυαμίνες συντίθενται και διασπώνται στο χλωροπλάστη (Andreadakis and Kotzabasis, 1996), επίσης δεν υπάρχει κάποιος μοριακός μηχανισμός που να εξηγεί το ρόλο τους. Στην παρούσα εργασία αναζητήθηκε ο μοριακός μηχανισμός δράσης των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό με το σκεπτικό ότι μια λειτουργική (*in vivo* μελέτη) σε συνδυασμό με μια αναπτυξιακή προσέγγιση θα μπορούσε να κατευθύνει την έρευνα στην ζητούμενη διαδικασία χωρίς να επηρεαστεί από τη ήδη

δημοσιευμένη γνώση, η οποία συχνά περιγράφει δύο αντίθετα αποτελέσματα για την ίδια αιτία, αλλά φυσικά να τη λάβει υπόψη στη τελική σύνθεση.

Η παρούσα διατριβή κατευθύνθηκε κυρίως από τα αποτελέσματα των *in vivo* φασματοσκοπικών κινητικών υπερυψηλών συχνοτήτων συλλογής δεδομένων κατά τη μελέτη λειτουργικών και αναπτυξιακών διαδικασιών που αφορούν στο σύνολο των σταδίων βιογένεσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με σκοπό την ανεύρεση εκείνη της διαδικασίας στην οποία εμπλέκονται οι πολυαμίνες. Χρησιμοποιήθηκαν κλασικές βιοχημικές και φυσικοχημικές μέθοδοι ακολούθησαν προκειμένου να μελετηθούν οι υπεύθυνοι μοριακοί μηχανισμοί. Πολύτιμη ήταν η συνεισφορά ειδικών μεταλλαγμάτων ευκαρυωτικών μονοκύτταρων χλωροφυκών (όπως το χλωρωτικό C-2A' και το χωρίς φωτοσυλλεκτική κεραία, Wt-LHC του *Scenedesmus obliquus*).

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας συνοψίζονται ως εξής:

- A. Μελέτη του ρόλου των πολυαμινών στη φωτοεξαρτώμενη βιογένεση και λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού
- B. Μελέτη του ρόλου των πολυαμινών στη φωτοανεξάρτητη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.
- Γ. Σύγκριση των αποτελεσμάτων των A και B με στόχο την εύρεση κοινών ρόλων ή ακόμη καλύτερα έναν διαφαινόμενο κύριο ρόλο των πολυαμινών.
- Δ. Διεξοδική ανάλυση των πιθανά αναδειχθέντων ρόλων.
- E. Προσπάθεια ερμηνείας του τρόπου δράσης των πολυαμινών, τόσο στο πλαίσιο αυτής της εργασίας, όσο και σε σχέση με τα συσσωρευμένα βιβλιογραφικά δεδομένα.
- Z. Πρόταση ενός μοριακού μηχανισμού που να εξηγεί την ανάγκη ύπαρξής τους.
- H. Απάντηση στο ερώτημα αν έχουν ειδικούς ρόλους η πουτρεσίνη, η σπερμιδίνη και η σπερμίνη ή είναι υποκαταστάτες η μία της/των άλλης/άλλων.

**ΥΛΙΚΑ
&
ΜΕΘΟΔΟΙ**

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Οργανισμοί και συνθήκες καλλιέργειας

A. Μονοκύτταροι οργανισμοί:

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Η φυλογενετική του ταξινόμηση είναι η εξής:

Βασίλειο : Φυτά

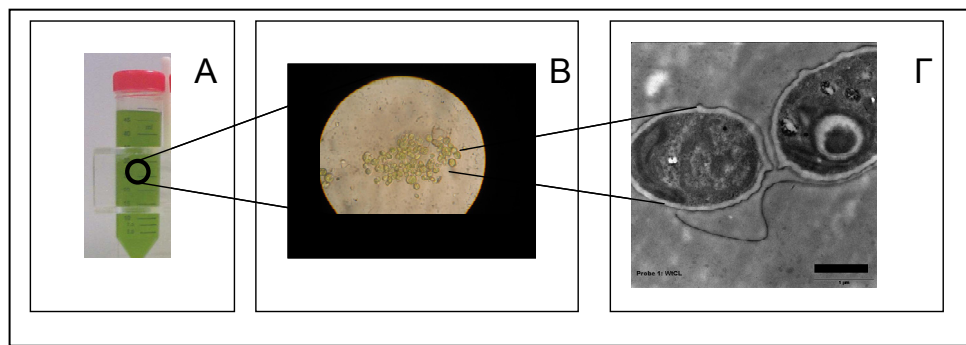
Διαίρεση : Χλωρόφυτα

Κλάση : Χλωροφύκη (Chlorophyceae)

Τάξη : *Chlorococcales*

Γένος : *Scenedesmus*

Είδος : *S. obliquus*



Εικόνα YM1. A. Καλλιέργεια φυκών *Scenedesmus obliquus*. B. Κύτταρα *Scenedesmus obliquus* στο οπτικό μικροσκόπιο. Γ. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σε *Scenedesmus obliquus*. Η κλίμακα είναι 1 μm .

Ο οργανισμός αυτός είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός, με διάμετρο κυττάρου περίπου 2-5 μm . Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 ώρες. Στη διάρκεια αυτή, διαιρείται μία φορά δίνοντας έως 8 θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως, αποκóπτονται μεταξύ τους (δεν σχηματίζουν κοινόβια). Εξελικτικά, βρίσκεται πολύ κοντά στα άλλα δύο γνωστά, στο ερευνητικό πεδίο, φύκη, τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και τη Χλωρέλλα (*Chlorella*).

Πρόκειται για ευκαρυωτικό φωτοσυνθετικό οργανισμό που παράγει οξυγόνο κατά τη φωτοσύνθεσή του. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της φωτοσυνθετικής του δραστηριότητας, μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά: ο άγριος τύπος (Wt), έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και στο σκοτάδι, όπως και στο φως. Δηλαδή, ακόμα και σε

ετερότροφες συνθήκες, έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και άθικτα φωτοσυστήματα I και II (εφ' όσον του παρέχεται κάποια πηγή οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο).

Μεγάλη βοήθεια στην έρευνα της Φωτοσύνθεσης, έχει προσφέρει η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών των φωτοσυνθετικών οργανισμών. Ένα από τα μεταλλαγμένα στελέχη του *Scenedesmus obliquus*, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι το C-2A': Προέκυψε το 1972 μετά από ακτινοβόληση του άγριου τύπου με ακτίνες X (Bishop, 1972) και συμπεριφέρεται όπως και τα αγγείόσπερμα φυτά. Τα πλαστίδια του C-2A' στο σκοτάδι είναι όμοια με τους ωχροπλάστες των ανώτερων φυτών με σχηματισμούς προελασματοειδών σωματίων και προθυλακοειδών. Η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης σταματάει στο επίπεδο του πρωτοχλωροφυλλιδίου, και φυσικά δεν έχει ενεργό φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Με την έκθεση του στο φως μετατρέπεται το πρωτοχλωροφυλλίδιο σε χλωροφυλλίδιο και αρχίζει η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης και η διαμόρφωση του φωτοσυνθετικά ενεργού χλωροπλάστη (Wellburn et al., 1980; Brinkmann and Senger, 1978). Ένα άλλο μετάλλαγμα του *Scenedesmus obliquus* που χρησιμοποιήθηκε στην εν λόγω εργασία είναι το Wt-LHC. Αυτό το μετάλλαγμα δεν συνθέτει χλωροφύλλη b και για αυτό το λόγο δεν μπορεί να σταθεροποιήσει τα πεπτίδια της φωτοσυλλεκτικής κεραίας που περιέχουν φυσιολογικά αυτό το είδος χρωστικής. Τελικά το μετάλλαγμα αυτό έχει φωτοσυστήματα I και II όπως ο άγριος τύπος, αλλά δεν διαθέτει φωτοσυλλεκτική κεραία (LHC II).

Η ανάπτυξη του οργανισμού έγινε σε ετερότροφες καλλιέργειες. Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο του οποίου η σύσταση φαίνεται στον πίνακα I, εμπλουτισμένο με 0.5% (w/v) D⁺-γλυκόζη και 0.25 (w/v) εκχύλισμα μαγιάς (yeast extract) (Bishop and Senger, 1971).

Όλες οι καλλιέργειες έγιναν σε κωνικές φιάλες Erlenmayer των 250 ml. Οι 'σκοτεινές' καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστή (New Brunswick, Innova 4330) και σε σταθερή θερμοκρασία (32°C). Σε όλα τα πειράματα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία προετοιμασίας των καλλιεργειών: Κύτταρα του C-2A', αναπτύχθηκαν για τρεις μέρες στο σκοτάδι, σε κωνική φιάλη Erlenmayer των 250 ml, με 100 ml του υγρού θρεπτικού μέσου. Σε κάθε πείραμα, μετά την ανάλογη μεταχείριση και επώαση των καλλιεργειών, η συγκομιδή των κυττάρων έγινε με φυγοκέντριση σε 1500 g για 5 min, στους 25°C και σε ήπιες συνθήκες (απόλυτο σκοτάδι ή green safe light).

Πίνακας I: Θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (σε g/l)	ΜΟΡΙΑΚΟΤΗΤΑ (M)
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1.50	1x10 ⁻⁴
KNO ₃	80.0	8x10 ⁻³
MgSO ₄ x7H ₂ O	24.6	1x10 ⁻³
NaCl	47.0	8x10 ⁻³
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	17.8	1x10 ⁻³
NaH ₂ PO ₄ x1H ₂ O	40.5	3x10 ⁻³
Na-Citrate x2H ₂ O	16.5	5.5x10 ⁻⁴
Fe ₂ (SO ₄) ₃ x1H ₂ O	0.40	7.5x10 ⁻⁶
<u>Ιχνοστοιχεία</u>		
H ₃ BO ₃	2.86	
MnCl ₂ x4H ₂ O	1.81	
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0.222	
CuSO ₄ x5H ₂ O	0.079	
MoO ₃ (85%-99.5%)	0.0177	
C ₆ H ₅ FeO ₇ x5H ₂ O	18.025	

B. Πολυκύτταρος οργανισμός

Για τις μελέτες σε ανώτερα φυτά χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*) ηλικίας 6-8 εβδομάδων ανεπτυγμένα σε θερμοκήπιο. Οι συνθήκες στο θερμοκήπιο ήταν ελεγχόμενες με θερμοκρασία 25±2°C. Μόνο υγιή φύλλα (Fv/Fm>0.8) χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα YM2. Φυτό καπνού *Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*.

2. Προέλευση αντιδραστηρίων και υλικών

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής προήλθαν κυρίως από τις εταιρείες Sigma Chemicals, Merck, Boehringer Mannheim και Pharmacia.

3. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση χρωστικών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των χλωροφυλλών a, b και πρωτοχλωροφυλλιδίου έγινε φασματοφωτομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο των Brouers και Wolwertz (1983). Σε ιζήματα κυττάρων από 5ml καλλιέργειας, έγινε εκχύλιση των χρωστικών με προσθήκη ζεστής μεθανόλης (70°C). Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε για 5min σε 1400g και το υπερκείμενο συλλέχθηκε. Η ίδια διαδικασία εκχύλισης επαναλήφθηκε άλλες δύο έως τρεις φορές, μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό του ιζήματος. Μέρος του εκχυλίσματος εξατμίστηκε σε υδατόλουτρο και επαναδιαλύθηκε σε 80% (v/v) ακετόνη. Το διάλυμα αυτό φωτομετρήθηκε στα 664, 647 και 626 nm και η ποσοτικοποίηση των χρωστικών έγινε με βάση τις παρακάτω εξισώσεις:

$$Pchl(ide) \text{ [nmole]} = -4.37(E664) - 7.44(E647) + 33.67(E626)$$

$$Chl(ide) \text{ a [nmole]} = 13.16(E664) - 2.63(E647) + 0.23(E626)$$

$$Chl(ide) \text{ b [nmole]} = -4.95(E664) + 25.24(E647) - 2.29(E626)$$

Εναλλακτικά για τον προσδιορισμό της chl a και b χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Holden (1965) που περιλαμβάνει εκχύλιση των χρωστικών σε γνωστό όγκο μεθανόλης και φωτομέτρηση σε δύο μήκη κύματος (665nm και 650nm). Η ποσοτικοποίηση των χρωστικών γίνεται με βάση τις παρακάτω εξισώσεις.

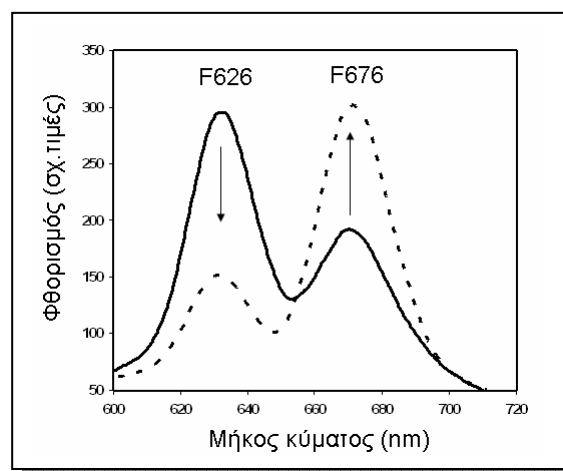
$$Chl \text{ a } (\mu\text{g/ml}) = 16.5(E665) - 8.3(E650)$$

$$Chl \text{ b } (\mu\text{g/ml}) = 33.8(E650) - 12.5(E665)$$

Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις απορρόφησης ήταν τύπου 551S UV/VIS Spectrophotometer (Perkin Elmer).

4. Φωτομετατροπή του Pchl_a σε Chl_a μέσω της οξειδοαναγωγής του πρωτοχλωροφυλλιδίου

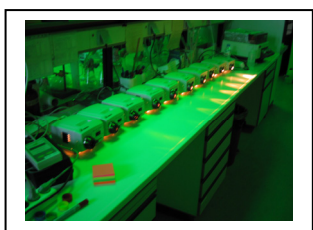
Ο υπολογισμός της ενεργότητας της POR έγινε με επεξεργασία δεδομένων από το φάσμα εκπομπής φθορισμού (580–750 nm) σε υπερευαίσθητο φθοροφωτόμετρο LS 50B (Perkin Elmer) με υψηλό λόγο σήματος προς θόρυβο (500:1) μετά από διέγερση στα 430nm. Με αυτό τον τρόπο καταγράφεται η μετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο μετά από ενεργοποίηση του ενζύμου POR με ακτινικό φως 650 nm (Helium-Neon laser έντασης $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) σε δείγματα τα οποία πριν και μετά από φωτισμό εκχυλίστηκαν σε 2.5 ml ακετόνη. Η ενεργότητα της POR καταγράφεται σαν αύξηση του χλωροφυλλιδίου (κορυφή 676)



Εικόνα YM3. Φάσματα εκπομπής φθορισμού εκχυλισμάτων χρωστικών (95% ακετόνη) από κύτταρα C-2A'. Η διέγερση των χρωστικών έγινε με ακτινοβολία μήκους κύματος 430nm. (συνεχής γραμμή: φάσμα χρωστικών πριν τον παλμό φωτός, διακεκομμένη γραμμή: φάσμα χρωστικών μετά τον παλμό φωτός).

στα 30 s φωτισμού ανά όγκο κυττάρων (PCV, Packed Cell Volume). Στην εικόνα με το βέλος παρουσιάζεται η διαφορά (ΔF_{676}) η οποία χρησιμοποιείται στον υπολογισμό της φωτομετατροπής.

5. Φάσμα δράσης (χρήση πηγών και μονοχρωματικών φίλτρων)

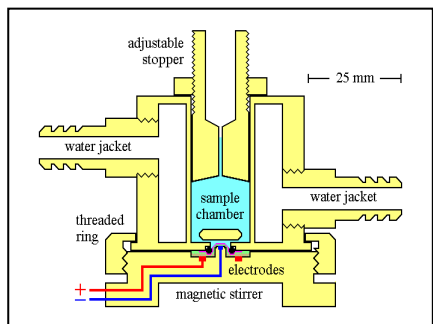


Εικόνα YM4. Πηγές φωτός M100 (Mille Luce).

Το φάσμα δράσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συνδυασμού 20 διαφορετικών φίλτρων double interference (Edmund Optics) που επιτρέπουν απόλυτα μονοχρωματική ακτινοβολία και πηγών ορατού φωτός M100 (Mille Luce). Μεταξύ φίλτρων και πηγής μεσολαβούσε οπτική ίνα διαμέτρου 11 mm (Edmund Optics). Τα δείγματα εκτέθηκαν στις διαφορετικές ποιότητες ακτινοβολίας (400-730 nm) ίδιας έντασης ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) για χρονικό διάστημα 30 min.

φίλτρα	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
nm	410	420	430	442	455	470	492	510	535	550	580	600	620	632	640	650	656	671	690	730

6. Πολαρογραφική μέτρηση φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και κυτταρικής αναπνοής



Εικόνα YM5. Σχηματική απεικόνιση των βασικών μερών του Clark-type ηλεκτροδίου.

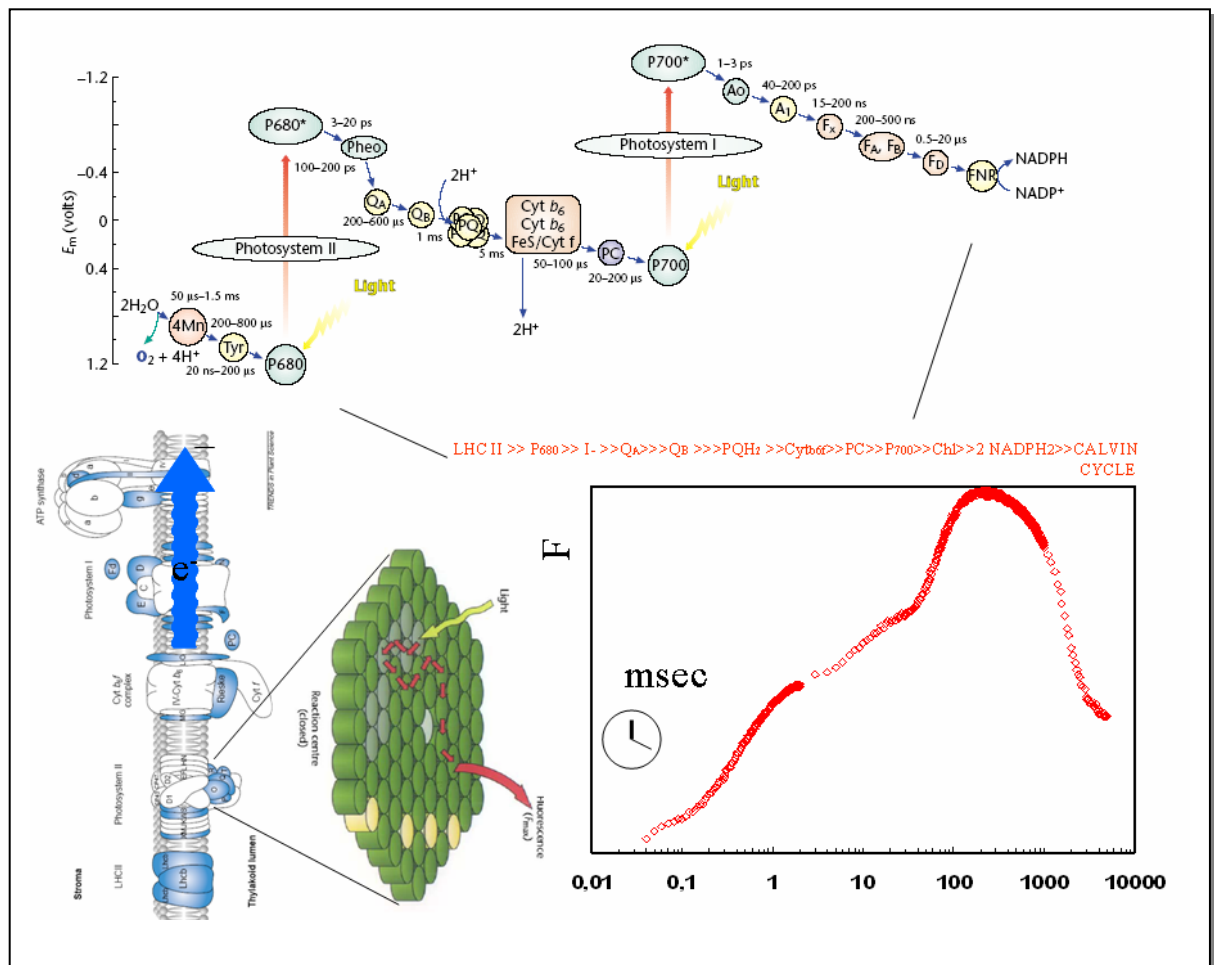
Οι οξυγονομετρήσεις έγιναν πολαρογραφικά με τη χρήση ηλεκτροδίου Clark type (Hansatech UK) με κυψελίδα ρυθμιζόμενου όγκου (0.5 - 2.5 ml) και θερμορρυθμιστικό μανδύα νερού. Μεταξύ ενός ηλεκτροδίου πλατίνας (κάθοδος) και ενός ηλεκτροδίου αργύρου (άνοδος) εφαρμόζεται μικρή τάση (50V) μέσω ενός ηλεκτρολύτη (KCl). Για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου, χρειάζεται οξυγόνο (O_2) το οποίο περνά από μια ημιπερατή μεμβράνη που χωρίζει το δείγμα από τα ηλεκτρόδια. Η καταγραφή της έντασης του ρεύματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του οξυγόνου του δείγματος.

Η διαθεσιμότητα CO_2 εξασφαλιζόταν με τη χρήση διαλύματος 10 mM Tricine pH 7.6, 10 mM $NaHCO_3$ ή με πρόσθηκη διαλύματος ανθρακικού (10 mM) και η περιστροφή ενός μαγνητικού αναδευτήρα κατάλληλης διαμέτρου εξασφάλιζε την ομοιογένεια του δείγματος. Πηγή φωτός (Mille Luce, M100) φώτιζε το δείγμα, ενώ με ροοστάτη καθοριζόταν η επιθυμητή ένταση φωτισμού για ένα εύρος τιμών 0 έως $50.000 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Την υπεριώδη ακτινοβολία φίλτραρε διάλυμα 2% $CuSO_4$ (2 cm).

7. Φασματοσκοπία κινητικών υπερυψηλής ανάλυσης

Οι κινητικές φθορισμού της χλωροφύλλης a του PSII ελήφθησαν με χρήση ενός συστήματος καταγραφής κινητικών OJIP (PEA, Hansatech Instruments, UK) σε δείγματα όγκου 1ml τα οποία προτού διεγερθούν είχαν παραμείνει στο σκοτάδι για 10 min προκειμένου να αδειάσουν τα κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια. Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος F_v/F_m που αποτελεί μέτρο της φωτοσυνθετικής απόδοσης. Επίσης με εφαρμογή της μεθόδου JIP για τιμές φθορισμού που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια (J, I και P) μετρήθηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όπως το σχετικό μέγεθος φωτοσυνθετικής κεραίας (ABS/RC), η απόδοση ($\Psi_o = ETo/TRo$) με την οποία ένα παγιδευμένο φωτόνιο μπορεί να κινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την Q_A^- , η μέγιστη τιμή ενεργειακής διάχυσης που οφείλεται στη δεξαμενή πλαστοκινόνης (q_{PQ}), η κβαντική απόδοση της φωτοχημείας του PS II (ϕ_{PQ}) και οι δείκτες λειτουργικότητας (SFI abs) και επίδοσης (Performance Index). Η

μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με συχνότητα συλλογής δεδομένων έως 100 kHz σε χρονικό διάστημα 1 έως 120 s. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit αναλύση και η διέγερση έγινε από 6 διόδους φωτισμού (LEDs) οι οποίες έχουν ένταση ακτινοβολίας μέχρι $3500 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ερυθρού φωτός (650nm). Πιο συγκεκριμένα η καμπύλη επαγωγικού φθορισμού ονομάζεται και καμπύλη Kautsky της οποίας τα διαφορετικά βήματα σημειώνονται με γράμματα O-J-I-P. Η αύξηση του φθορισμού από το O στο P λαβαίνει χώρα στο πρώτο δευτερόλεπτο της ακτινοβολήσης και ονομάζεται γρήγορη φάση. Η αργή φάση ακολουθεί μετά το P και ίσως χρειαστούν μερικά λεπτά μέχρι την τελική



Εικόνα ΥΜ6. Κινητική επαγωγικού φθορισμού χλωροφύλλης *a* και οι αντίστοιχες αντιδράσεις στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων: O-J-I-P: διακριτές φάσεις φθορισμού, *hν*: φωτόνιο, LHC I & II: σύμπλοκα συλλογής φωτός φωτοσυστημάτων I & II, P₆₈₀ & P₇₀₀: κέντρα αντίδρασης φωτοσυστημάτων I & II, e⁻: ηλεκτρόνιο, H⁺: πρωτόνιο, I: ενδιάμεσος δέκτης, Q_A: πρωτοταγής αποδέκτης ηλεκτρονίων του PS II (πλαστοκινόνη), Q_B: δευτεροταγής αποδέκτης ηλεκτρονίων του PS II, PQH₂: ανηγμένη πλαστοκινόνη, Cytb₆/f: κυτόχρωμα *f/b*₆, PC: πλαστοκυανίνη, Chl: ενδιάμεσος δέκτης ηλεκτρονίων του PS I.

Πίνακας II. Διευκρινίσεις της JIP μεθόδου	
Μεταβλητή OJIP καμπύλης	Ορισμός
Ft	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την ακτινοβολήση
F50μs	ένταση φθορισμού στα 50μs
F300μs	ένταση φθορισμού στα 300μs
FJ≡F2ms	Έντασης φθορισμού στο βήμα J (2ms) της καμπύλης OJIP
FI≡F30ms	Έντασης φθορισμού στο βήμα I (30ms) της καμπύλης OJIP
FP (=Fm)	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο P, της καμπύλης OJIP
tFm	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού Fm
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα στην καμπύλη OJIP και την ευθεία που διέρχεται από το F=Fm
Παράμετροι JIP-test	
Fo	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε 'ανοιχτά' κέντρα (open PSII RCs, t=0)
Fm	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι 'κλειστά' (closed PSII RCs, t=tFm)
Fv	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
Fv=Fm-Fo	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
Vt≡(Ft-Fo)/(Fm-Fo)	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική στιγμή t
VJ=(FJ-Fo)/(Fm-Fo)	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
Mo≡(ΔV/Δt) ₀ ≡4(F300μs-Fo)/(Fm-Fo)	αρχική κλίση σε ms της καμπύλης V=f(t)
Sm≡(Area)/(Fm-Fo)	Συμπληρωματικό εμβαδό της καμπύλης OJIP (Area), ομαλοποιημένο ως προς Fv (αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της Q _A)
Ss=VJ/Mo	Συμπληρωματικό εμβαδό της καμπύλης OJIP που αντιστοιχεί μόνο στη OJ φάση (διάστημα όπου η Q _A των RC ανάγεται μία φορά)
N=Sm/Ss=SmMo(1/VJ)	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της Q _A στο διάστημα tFm
Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει Q _A)	
ABS/RC=Mo(1/VJ)(1/ΦPo)	Μέγεθος φωτοσυλλεκτικής κεραίας
TRo/RC=Mo(1/VJ)	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο αντίδρασης (Trapped energy flux per RC at t=0)
ETo/RC=Mo(1/VJ)Ψo	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (για t=0)
DIo/RC=(ABS/RC)-(TRo/RC)	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης (για t=0)
Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών	
φPo≡TRo/ABS=[1-(Fo/Fm)]	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτοταγούς φωτοχημείας (για t=0)
Ψo≡ETo/TRo=(1-VJ)	Πιθανότητα (για t=0) να προκαλέσει μία διέγερση (exciton) την μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της αλυσίδας πέρα από την Q _A ⁻
φEo≡ETo/ABS=[1-(Fo/Fm)]Ψo	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (για t=0)
φDo≡1-φPo=(Fo/Fm)	Κβαντική απόδοση της διάχυσης της ενέργειας (για t=0)

Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά περιοχή (Phenomenological energy fluxes per excited cross stion –CS)	
ABS/CS ₀	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F ₀
ABS/CS _m	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή διέγερσης με βάση το F _m
TR ₀ /CS ₀ =φP ₀ (ABS/CS ₀)	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη περιοχή της μεμβράνης (για t=0)
ET ₀ /CS ₀ =φE ₀ (ABS/CS ₀)	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή (για t=0)
DI ₀ /CS ₀ =(ABS/CS ₀)-(TR ₀ /CS ₀)	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή (για t=0)
Πυκνότητα κέντρων αντίδρασης	
RC/CS ₀ =φP ₀ (VJ/M ₀) (ABS/CS ₀)	Πυκνότητα ενεργών κέντρων
Δείκτες επίδοσης (Performance indexes, t=0)	
PI _{ABS} ≡(RC/ABS)(φP ₀ /1-φP ₀)(ψ ₀ /1-ψ ₀)	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια
PICS ₀ ≡(RC/CS ₀)(φP ₀ /1-φP ₀)(ψ ₀ /1-ψ ₀)	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t=0)
PICS _m ≡(RC/CS _m)(φP ₀ /1-φP ₀)(ψ ₀ /1-ψ ₀)	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t=tF _m)
SFI _{abs} =(1-φP ₀)(1-ψ ₀)	Δείκτης λειτουργικότητας
Ικανότητα παραγωγής έργου (Driving forces)	
DF _{ABS} ≡log(PI _{ABS})	Εκτιμώμενη παραγωγή έργου ανά απορροφώμενη ενέργεια

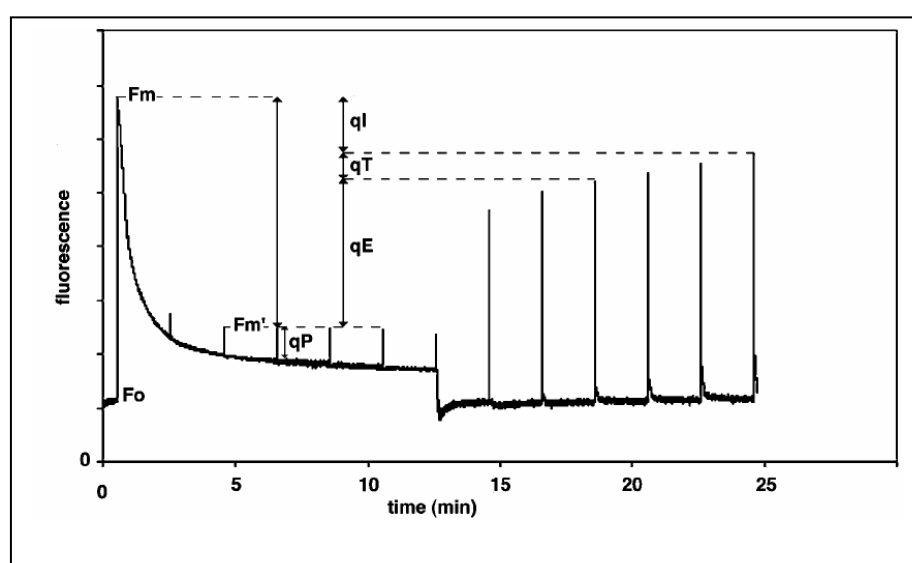
φάση T. Στην εικόνα YM6 φαίνεται που αντιστοιχεί το κάθε βήμα της καμπύλης και με τη χρήση της μεθόδου Strasser και Strasser (1995) για τις τιμές φθορισμού συγκεκριμένων χρόνων προσδιορίζονται τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στον πίνακα II συγκεντρώνονται οι πιο σημαντικές παράμετροι.

8. Εκτίμηση φωτοπροστατευτικών μηχανισμών.

A. Μέτρηση της μη φωτοχημικής μείωσης του φθορισμού της χλωροφύλλης (non-photochemical quenching NPQ)

Η φωτοπροστασία περιλαμβάνει ποικίλους μηχανισμούς που ξεκινούν από τη μετακίνηση των φύλλων στα φυτά και φθάνουν μέχρι την πάχυνση της εφουμενίδας ή την συσσώρευση προστατευτικών χρωστικών (π.χ. ανθοκυάνες). Παρολαυτά η φωτοπροστασία κατά την λειτουργία της φωτοσύνθεσης περιλαμβάνει πολύ εξειδικευμένους μηχανισμούς που μπορούν να ενεργοποιούνται πολύ ταχύτερα από τους παραπάνω (εντός δευτερολέπτων) και σε πολλές περιπτώσεις πρόκειται για αντιστρεπτές διαδικασίες. Αυτοί οι φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί ονομάζονται συλλήβδην NPQ από την μείωση της έντασης του φθορισμού που προκαλούν (non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence).

Η εκτίμησή τους στηρίζεται στην παραδοχή ότι η ενέργεια που συλλέγεται από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε 3 εναλλακτικές οδούς: α) στη φωτοχημεία, β) στο φθορισμό γ) στη διάχυση υπό μορφή θερμότητας. Τελικά για δεδομένη εισαγωγή ενέργειας αν η διάχυση αυξηθεί θα πρέπει η φωτοχημεία ή/και ο φθορισμός να μειωθούν. Συνήθως πειραματικά καταγράφεται η μέγιστη τιμή φθορισμού (F_m) η οποία επιτυγχάνεται με επώαση του δείγματος στο σκοτάδι και εκτιμάται η φωτοχημεία και η παραγόμενη θερμότητα από τις μετρήσεις φθορισμού ως η διαφορά ως προς την τιμή αναφοράς (βλ. εικόνα YM7).



Εικόνα YM7. Επαγωγή και χαλάρωση των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών.

Μετά από ολιγόλεπτη προσαρμογή στο σκοτάδι, το φωτοσυνθετικό δείγμα εμφανίζει μέγιστο φθορισμού F_m . Κατά την έκθεσή του στο φως (10 min) σε τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε 1 min) ισχυροί παλμοί φωτός ($3000 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 0.4 s) επιτρέπουν την εκτίμηση της νέας κάθε φορά μέγιστης τιμής φθορισμού (F_m'). Η μετάβαση στο σκοτάδι οδηγεί σε 'χαλάρωση' του F_m' (αύξηση του F_m') στο διάστημα 10 έως 25 min. Οι μετρήσεις των F_m και F_m' πραγματοποιήθηκαν με το Handy PEA (Hansatech UK) ενώ για τον υπολογισμό του NPQ χρησιμοποιήθηκε η σχέση $\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m'$ (Bilger and Bjorkman, 1994).

B. Ανάλυση του ρυθμού χαλάρωσης των F_m' [$\ln (F_m - F_t) / F_m$]

Ένα φωτοσυνθετικό δείγμα που έχει προσαρμοστεί σε συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού (σταθερό F_s) αν μεταφερθεί στο σκοτάδι και δεχθεί ισχυρούς αλλά βραχείς

παλμούς ($3000 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ διάρκειας 0.2 s) θα εμφανίσει αύξηση της μέγιστης έντασης φθορισμού (F_m') αρχικά απότομα και στη συνέχεια πιο αργά. Ο παράγοντας $\ln[(F_m-F_t)/F_m]$ σύμφωνα με τους Horton και Hague (1988) επιτρέπει την εκτίμηση του ρυθμού χαλάρωσης.

9. Απομονώσεις χλωροπλαστών και θυλακοειδών μεμβρανών

A. Απομόνωση χλωροπλαστών

Για την απομόνωση χλωροπλαστών υγιή φύλλα καπνού ($F_v/F_m > 0.8$) συλλέχθηκαν και πλύθηκαν σε απιονισμένο νερό. Ακτινοβολήθηκαν 30-60min για την ενεργοποίησή τους και στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό 40 mM Tricine, 0.4 M σακχαρόζη pH 7.6 KOH με ομογενοποιητή (Trinitron, USA). Το εκχύλισμα πέρασε από οκταπλή γάζα και φυγοκεντρήθηκε (3000g) για 5min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και η πελέτα με τους χλωροπλάστες καλύφθηκε με 2-3ml διαλύματος ομογενοποίησης (τελική συγκέντρωση χλωροφύλλης έως 2mgml^{-1}) και παρέμεινε στο σκοτάδι μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Όλες οι διαδικασίες έλαβαν χώρα σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας $4^\circ\text{C} \pm 1$, ενώ τα δείγματα φυλάσσονταν στους 0°C .

B. Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών

Μετά τη μηχανική ρήξη των κυτταρικών τοιχωμάτων με γυάλινες σφαίρες (glass beads 0.5mm, Biospec Products Inc Bartlesville, OK 74005) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 0.05M pH=7, τα εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στα 500g σύμφωνα με τη μέθοδο των Kotzabasis et al. (1986) προκειμένου να πέσουν τα άσπαστα κύτταρα. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται το υπερκείμενο στα 10.000g για 45 min (Sorval instruments, RC5C με ρότορα HB-4) στους 4°C και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Με τη βοήθεια ενός πινέλου συλλέχθηκε προσεχτικά η υπερκείμενη στοιβάδα (μεμβράνες θυλακοειδών) και επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 20mM pH=7 ρυθμισμένο με KOH. Όλοι χειρισμοί έγιναν σε απόλυτο σκοτάδι ή πράσινο φως ιδιαίτερα χαμηλής έντασης ($0 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)

Γ. Ποσοτικοποίηση ποσοστού άθικτων χλωροπλαστών

Η εκτίμηση του ποσοστού ακεραιότητας των χλωροπλαστών έγινε με τη χρήση BCPIP και φωτομετρική εκτίμηση της αναγωγής του. Πιο συγκεκριμένα το BCPIP δεν

περνά το φάκελο των χλωροπλαστών και για αυτό το λόγο δεν μπορεί σε συνθήκες φωτισμού να αντιδράσει (αναχθεί) παρά μόνο αν ο φάκελλος αφαιρεθεί. Θεωρητικά λοιπόν, αν έχουμε 100% άθικτους χλωροπλάστες το BCPIP δεν θα αναχθεί. Αντίθετα αν απομακρύνθει ο φάκελλος (π.χ. με ωσμωτικό σοκ) το BCPIP θα ανάγεται με το μέγιστο ρυθμό. Τελικά η εκτίμηση της αναγωγής του BCPIP (καταγραφή μείωσης απορρόφησης στα 600nm) από χλωροπλάστες πριν και μετά από ένα ωσμωτικό σοκ επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του ποσοστού που είναι άθικτοι. Για το ωσμωτικό σοκ οι χλωροπλάστες παρέμεναν για 60 s σε νερό και στη συνέχεια γινόταν προσθήκη διαλύματος αντίδρασης διπλής ισχύος (0.2 M σακχαρόζη, 10 mM Tricine, 2 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂ pH 7.6/KOH).

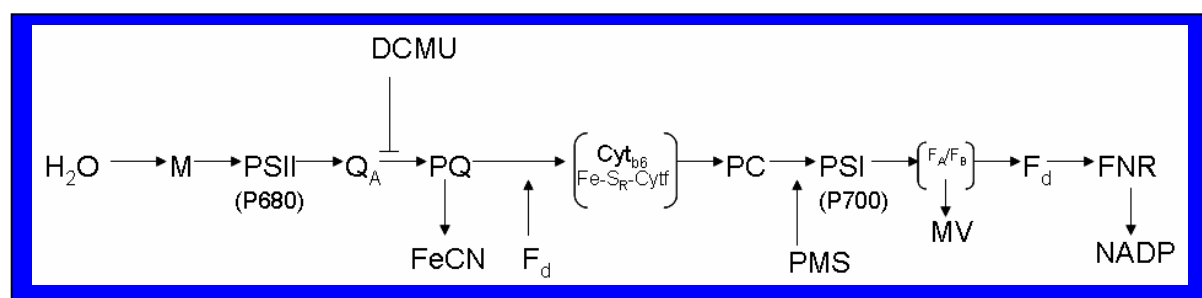
10. Απομόνωση φωτοσυλλεκτικής κεραίας

Η απομόνωση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PS II έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Ακογονογλου και Θιμου (1981) όπως τροποποιήθηκε από τη Navakoudis (2003). Η μέθοδος περιλαμβάνει υπερφυγοκέντριση θυλακοειδών μεμβρανών σε συνεχή κλίση σακχαρόζης (5-22%). Για τη προετοιμασία των βαθμιδώσεων SDS-σακχαρόζης, χρησιμοποιείται διάλυμα 0.05 M Tris, 0.06 M Borate, 0,01% SDS, pH 9.5 (διόρθωση οξύτητας με κορεσμένο διάλυμα βορικού), στο οποίο προστίθενται 0.2% (w/v) deoxycholic acid και 0.2% (w/v) Triton X100. Το διάλυμα που προκύπτει διαχωρίζεται σε δύο μέρη και στο ένα προστίθεται σακχαρόζη 5% (w/v), ενώ στο άλλο 22% (w/v). Με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας σχηματίζεται συνεχής βαθμίδωση, με τη βαθμιαία ανάμιξη 5 ml από το διάλυμα 5% σακχαρόζη μέσα σε 5 ml του διαλύματος 22% σακχαρόζη, σε πλαστικούς σωλήνες χωρητικότητας 14 ml, κατάλληλους για υπερφυγοκέντριση (PA, 14x95mm, Qty Pk, 48EA, Nalgene). Όλοι οι χειρισμοί γίνονται σε θερμοκρασία 4°C. Για την απομόνωση των υποσυμπλόκων του LHC του φωτοσυστήματος II, στο δείγμα των απομονωμένων θυλακοειδών γίνεται ποσοτική εκτίμηση των χλωροφυλλών και προσθήκη συγκεκριμένου όγκου διαλύματος 75mM Tricine-NaOH (pH=7.3) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της χλωροφύλλης στο αιώρημα των θυλακοειδών που θα προκύψει να είναι 600 μgml⁻¹. Χωρίς καθυστέρηση τα διαλυτοποιημένα θυλακοειδή τοποθετούνται στην επιφάνεια της βαθμίδωσης και οι βαθμιδώσεις υποβάλλονται σε υπερφυγοκέντριση σε φυγόκεντρο Beckman (L8-M, ultracentrifuge, class H) και ρότορα τύπου SW-40 (Beckman), σε 170.000g για 18h στους 4°C, σε κενό αέρος. Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρισης, στη βαθμίδωση διακρίνονται κάτω από τις ελεύθερες χρωστικές (καροτενοειδή κυρίως και χλωροφύλλες) οι ζώνες που αντιστοιχούν στα μονομερή και ολιγομερή της φωτοσυλλεκτικής κεραίας. Τα

μονομερή και ολιγομερή της φωτοσυλλεκτικής κεραίας διαχωρίζονται σε δύο διακριτές ζώνες (σκούρο πράσινο) και στη συνέχεια συλλέγονται απευθείας με μηχανική αντλία ή εναλλακτικά κλασμάτωναται ολόκληρη η κλίση και στη συνέχεια επανααναμειγνύονται τα κλάσματα που αντιστοιχούν στην κεραία.

11. Αντιδράσεις Hill

Η ενεργότητα του PSII σε χλωροπλάστες χωρίς φάκελο αλλά με άθικτο δίκτυο θυλακοειδών μεμβρανών μετρήθηκε πολαρογραφικά (Clark-type ηλεκτρόδιο με χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν σε προηγούμενη ενότητα) ως έκλυση οξυγόνου κατά τη διάρκεια ολιγόλεπτου φωτισμού (2-3min). Τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων ήταν το $K_3Fe(CN)_6$ σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0.2 M σορβιτόλη, 10 mM Tricine, 2 mM ADP, 2 mM K_2HPO_4 , pH 7.6/KOH (Walker, 1988). Η γραμμική ροή ηλεκτρονίων εκτιμήθηκε πολαρογραφικά ως κατανάλωση οξυγόνου κατά τη διάρκεια ολιγόλεπτου φωτισμού σε ρυθμιστικό ίδιας σύστασης με το παραπάνω. Τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων ήταν το methylviologen (MV).

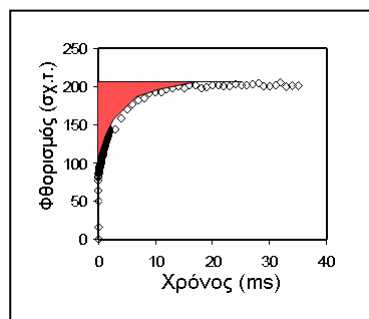


Εικόνα YM8. Φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και δέκτες, δότες και αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

12. Ποσοτική ανάλυση PSIIα και PSIIβ κέντρων

Η μεταχείριση των δειγμάτων με DCMU προκαλεί εκθετική αύξηση του φθορισμού και η μέγιστη τιμή (F_m) σημειώνεται πολύ γρήγορα αφού κάθε PSII κέντρο δεν μπορεί να μεταφέρει ηλεκτρόνια πέρα από την Q_A . Το εμβαδόν ανάμεσα στην καμπύλη φθορισμού και την παράλληλη προς τον άξονα του χρόνου η οποία διέρχεται από το F_m (AREA) αποτελεί μέτρο του ποσού των φωτονίων που αξιοποιήθηκαν. Επίσης ο ρυθμός με τον οποίο αυξάνει το εμβαδόν για στοιχειώδη χρονικά διαστήματα έως να λάβει την τελική τιμή εξαρτάται από

το ρυθμό με το οποίο κλείνουν τα κέντρα αντίδρασης στα PS II. Ο παράγοντας $\ln[(\text{AREA}-\text{AREAt})/\text{AREA}]$ επιτρέπει τη διάκριση δύο διαδικασιών μίας γρήγορης και μίας πιο αργής.



Εικόνα YM9. Καμπύλη OJIP παρουσία DCMU.

Η γρήγορη διαδικασία αφορά κέντρα με μεγάλη φωτοσυλλεκτική ικανότητα (μεγάλη κεραία) τα οποία ονομάζονται PSIIα, ενώ η πιο αργή διαδικασία αφορά κέντρα με μικρότερη κεραία PSIIβ κέντρα. Τα τελευταία βρίσκονται στα θυλακοειδή στρώματος ενώ τα τύπου α θεωρείται ότι βρίσκονται στα grana (Melis, 1989). Με τη χρήση του συστήματος PEA (Hansatech, UK) ελήφθησαν οι κινητικές φθορισμού (6 LED ακτινοβόλησαν το δείγμα με $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ για 1-10 s) σε δείγματα που είχαν επωασθεί για 10 min με DCMU στο απόλυτο σκοτάδι. Οι κινητικές επαγωγικού φθορισμού είναι αρκετά λεπτομερείς (>1000 δια-

κριτά σημεία μετρήσεων ανά δευτερόλεπτο με μεγάλη αντιπροσώπευση στο κρίσιμο διάστημα των πρώτων 1000 μs). Οι σταθερές $K\alpha$ και $K\beta$ για τους δύο πληθυσμούς των PS II εκτιμήθηκε σύμφωνα με την ανάλυση των Melis και Homann (1978).

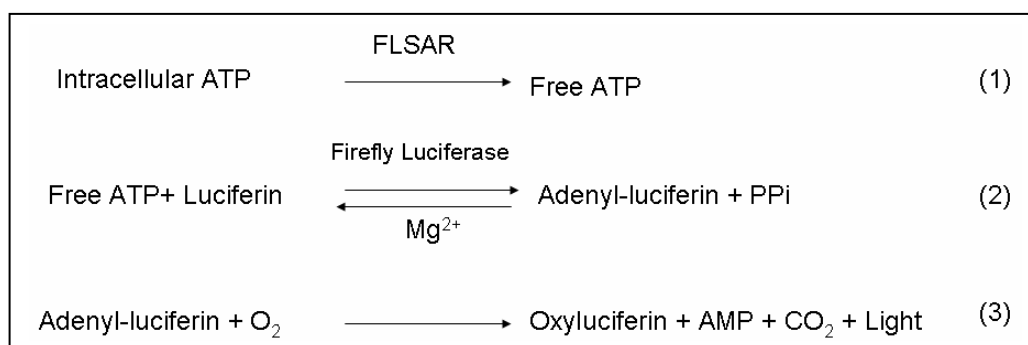
13. Μετρήσεις Φωτοφωσφορυλίωσης

Η επίδραση των πολυαμινών στη φωτοφωσφορυλίωση εκτιμήθηκε σε χλωροπλάστες από δύο είδη φυτικών οργανισμών (*Beta vulgaris* και *Nicotiana tabacum*). Στον καπνό φάνηκε ότι η σύνθεση ATP είχε προέλευση την φωτοφωσφορυλίωση και την αδενυλική κυκλάση. Η τελευταία συνθέτει ATP από ADP, τόσο στο φως, όσο και στο σκοτάδι και επηρεάζει το συνολικό ποσό ATP που συντίθεται σε δεδομένο χρονικό διάστημα. Λόγω του ότι η απομόνωση χλωροπλαστών από φυτά *N. tabacum* εμφάνιζε υψηλή ενεργότητα αδενυλικής κυκλάσης αναζητήθηκε ευνοϊκότερο πειραματικό σύστημα. Χλωροπλάστες από φυτά *Beta vulgaris* χρησιμοποιούνται διεθνώς σε πειράματα φωτοφωσφορυλίωσης και εμφανίζουν σταθερή απόδοση και μηδενική ενεργότητα αδενυλικής κυκλάσης (Avton, 1960). Για τους παραπάνω λόγους προτιμήθηκε να επαναληφθούν τα πειράματα επίδρασης των πολυαμινών στη φωτοφωσφορυλίωση σε χλωροπλάστες φύλλων *Beta vulgaris*. Η ομογενοποίηση του ιστού έγινε σε ρυθμιστικό που περιείχε 0.4 M σακχαρόζη, 40 mM Tricine, 10 mM AscNa (pH 7.8 ρυθμισμένο με KOH). Τα δείγματα μετά από φυγοκέντρηση σε 3000g επαναδιαλύθηκαν σε μικρή ποσότητα διαλύματος ομογενοποίησης. Η φωτοφωσφορυλίωση έλαβε χώρα σε κυψελίδα 2.5 ml με σταθερή ανάδευση και σε

θερμοκρασία 23°C, ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης περιείχε 0.2 M σορβιτόλη, 10 mM Tricine, 12 mM Hepes, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 2 mM K₂HPO₄, 1 mM AscNa, 0.6 mM ADP, 40 μM PMS, 300 nm valinomycin (pH 7.8 KOH). Η ακτινοβολήση διαρκούσε 3 min και την αντίδραση σταματούσε υπερχλωρικό οξύ 10% (τελικό pH<1).

14. Ποσοτικοποίηση ATP

Για την ποσοτικοποίηση του παραγόμενου ATP σε πειράματα φωτοφωσφορλίωσης χρησιμοποιήθηκε ένα υπερευαίσθητο σύστημα χημειοφωταύγειας (FLS CII, Sigma). Η Λουσιφεράση παρουσία ATP ανάγει τη λουσιφερίνη και εκπέμπει φως με μέγιστο στα 562nm σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις. Η χημειοφωταύγεια μετρήθηκε σε φθοροφωτόμετρο LS50B spectrometer luminometer (luminescence mode, Perkin Elmer). Για την ποσοτικοποίηση του σήματος η μέτρηση επαναλήφθηκε με προσθήκη μικρής ποσότητας γνωστής συγκέντρωσης διαλύματος ATP.



Εικόνα YM13. Αντιδράσεις του συστήματος λουσιφερίνης-λουσιφεράσης που έχουν σαν αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός.

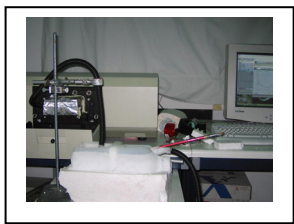
15. Προσδιορισμός φωτονιακής ροής



Εικόνα YM12. Κυψελίδα οξυγονομέτρου Clark-type (αριστερά) που χρησιμοποιήθηκε στις πολαρογραφικές μετρήσεις και μετρητής QRT1 (δεξιά).

Μέτρηση της έντασης φωτονιακής ροής ($\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) σε κυψελίδες, ενυδρεία, θαλάμους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μετρητή QRT1 Quantitherm light meter/thermometer (Hansatech, UK). Η μέτρηση αφορά μήκη κύματος ορατής ακτινοβολίας από 400 έως 700nm με υψηλή ακρίβεια ($0.001\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$)

16. Φασματοσκοπία φθορισμού χαμηλής θερμοκρασίας (77K).



Εικόνα YM10. Φθοροφωτόμετρο LS50B Perkin Elmer και βάση για τη λήψη φασμάτων σε θερμοκρασία υγρού αζώτου.

Φάσματα σε θερμοκρασία 77K ελήφθησαν σε φθοροφωτόμετρο LS50B Perkin Elmer με τη χρήση εργαστηριακά κατασκευασμένης βάσης. Η βάση περιελάμβανε λουτρό υγρού αζώτου, θάλαμο για την ακινητοποίηση του δείγματος, δύο οπτικές ίνες πάχους 10mm σε γωνία 90° (η πρώτη για να δειγνύει την χλωροφύλλη των δειγμάτων με μονοχρωματικό φως 550 nm και η δεύτερη για να μεταφέρει το φθορισμό στον ανιχνευτή του φθορομέτρου) και τέλος καλύπτρες για να εξασφαλίζουν προστασία του αισθητήρα από άλλες πηγές φωτός. Η λήψη των φασμάτων γινόταν σε απόλυτο σκοτάδι ή σε ασφαλές χαμηλής έντασης πράσινο φως (green safe light).

17. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των πολυαμινών

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των κύριων πολυαμινών (Put, Spm και Spd) στα δείγματα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Kotzabasis et al. (1993). Οι πολυαμίνες ανιχνεύτηκαν ως βενζυλιωμένα παράγωγα με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε την προσθήκη 200 μ l 1 N NaOH καλή ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 20 min σε 0°C. Ακολούθησε προσθήκη 200 μ l 36% HCl και τα δείγματα υδρολύθηκαν στους 110°C, για 18 h. Μετά από εξάτμιση των υπερκειμένων στους 80°C, τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 300 μ l 5% (v/v) PCA (perchloric acid) και ακολούθησε η αντίδραση σχηματισμού των βενζυλιωμένων παραγώγων. Σύμφωνα μ' αυτή, στο κάθε δείγμα προστέθηκαν 1ml 2N NaOH και 10 μ l Benzoyl Chloride. Μετά από ισχυρή ανάδευση και επώαση για 20 min στους 25°C, προστέθηκαν 2ml κορεσμένου διαλύματος NaCl και εκχυλίστηκαν οι πολυαμίνες σε 2.5 ml διεθυλαιθέρα, ο οποίος συλλέχθηκε και εξατμίστηκε στους 60°C. Οι βενζυλιωμένες πλέον πολυαμίνες επαναδιαλύθηκαν σε 200 μ l 63% (v/v) μεθανόλης (HPLC grade).

Η ανάλυση σε HPLC, έγινε με τη χρησιμοποίηση στήλης narrow bore C-18 (2.1 mm \times 200 mm, 5 μ m Hypersil, Hewlett Packard) και ένα σύστημα δύο διαλυτών που περιλάμβανε μια διαβάθμιση μεθανόλης (55%-84%, v/v). Ο διαχωρισμός έγινε σε HPLC (Shimadzu, LC-10AD, VP) σύστημα δύο αντλιών με diode array (Shimadzu SPD-M10A). Η ποσοτική ανάλυση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Kotzabasis et al., (1993)

18. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση έγινε μετά από επώαση των δειγμάτων στους 100°C για 5 min με ρυθμιστικό διάλυμα (0.125 M Tris pH 6.8, 20% Glycerol, 4% SDS, 10% mercaptoethanol). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (12%) συμφωνά με τη μέθοδο του Laemmli (1970) με ελάχιστες αλλαγές. Οι πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους (marker) που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των μοριακών βαρών των αγνώστων πρωτεϊνών είχαν μέγεθος σε kD: 97, 66, 45, 30, 20, 14 (μάρτυρας χαμηλών μοριακών βαρών, Pharmacia). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εμβυθίζεται σε διάλυμα χρώσης [0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v) σε 45% μεθανόλη (v/v), 9% οξικό οξύ (v/v)] για μία ώρα, υπό συνεχή ανακίνηση. Η πηκτική αποχρωματίζεται με συνεχείς πλύσεις με διάλυμα αποχρωματισμού [20% μεθανόλη (v/v), 7% οξικό οξύ (v/v), 3% γλυκερόλη], μέχρι το υπόβαθρο να μειωθεί ικανοποιητικά και να γίνουν εμφανείς οι ζώνες των πολυπεπτιδίων.

19. Ηλεκτρονική μικροσκοπία

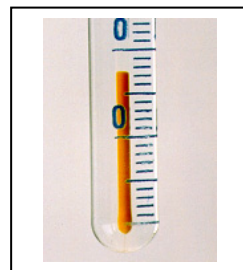
Όλα τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο της Meindl (1983) με 1% γλουραρική αλδεΐδη σε 100 mM cacodylate (pH 7.0) σε θερμοκρασία δωματίου για 1h και ακολούθησαν πλύσεις με ρυθμιστικό χωρίς αλδεΐδη. Η προσθήκη οσμίου έγινε με 2% OsO₄ σε ρυθμιστικό cacodylate στους 4°C (16h). Μετά τη πλύσιμο των δειγμάτων σε 10mM ρυθμιστικό και αφυδάτωση με αιθανόλη έγινε ρητινοποίηση. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε σε ένα σύστημα EM 400 (Philips) στα 80 kV. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Prof. Ursula Luetz-Meindl (Αυστρία).

20. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών

Οι συνολικές πρωτεΐνες στα δείγματα κυττάρων και από θυλακοειδή μετρήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (1976), όπως προτείνεται και από τους Jones et al., (1989). Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη βοείου ορού (BSA).

21. Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης (PCV)

Δείγματα 5 ml από τις καλλιέργειες φυκών φυγοκεντρήθηκαν για 5 min 1500 g προκειμένου να καθιζήσουν σε διαβαθμισμένο υαλοσωλήνα (Senger and Brinkmann, 1986). Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης γίνεται σε $\mu\text{LPCV/ml}$ καλλιέργειας.



Εικόνα ΥΜ11. Όγκος κυτάρων που καθίζησαν μετά από φυγοκέντρωση σε διαβαθμισμένο τριχοειδές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

**Ο ρόλος των πολυαμινών στη φωτοεξαρτώμενη,
στη φωτοανεξάρτητη βιογένεση και στη λειτουργική ενεργοποίηση
του φωτοσυνθετικού μηχανισμού**

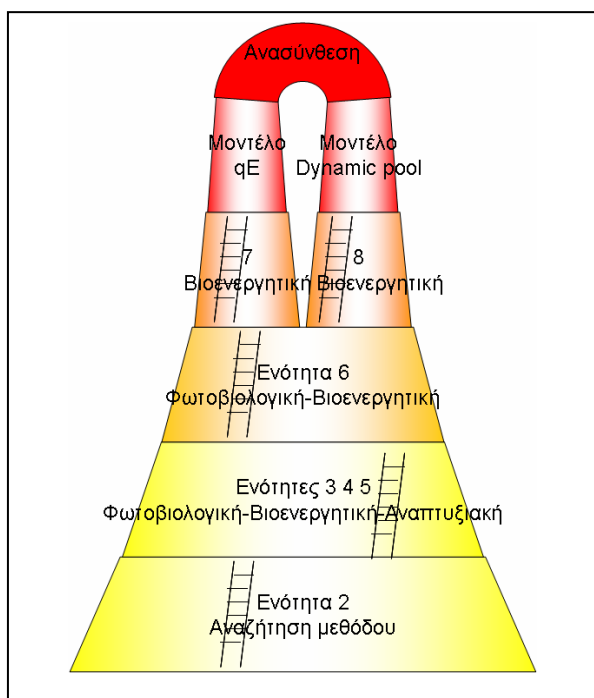
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο - Αποτελέσματα

Ο ρόλος των πολυαμινών στη φωτοεξαρτώμενη και στη φωτοανεξάρτητη βιογένεση καθώς και στη λειτουργική ενεργοποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

1. Πειραματικός Προγραμματισμός- Ιεράρχηση αποτελεσμάτων

Η παρούσα εργασία στηρίζεται στη συγκριτική μελέτη του ρόλου των πολυαμινών στη φωτοεξαρτώμενη και φωτοανεξάρτητη ανάπτυξη και λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (σχήμα 1) σε μία βιοενεργητική προσέγγιση της φωτοσύνθεσης. Η έλλειψη ενός μοριακού μηχανισμού που να ερμηνεύει την αναγκαιότητα της παρουσίας και τον ρόλο των τριών πολυαμινών τόσο στο κύτταρο, όσο και στο χλωροπλάστη ειδικά, αποτέλεσε τη σημαντικότερη τροχοπέδη, αλλά ταυτόχρονα και την ιδιαίτερη ανάγκη δρομολόγησης αυτής της διατριβής. Υιοθετήθηκε μία προσέγγιση από-το-γενικό-στο-ειδικό (top-down approach) με στόχο τη σταδιακή εστίαση στο μηχανισμό που ελέγχουν οι πολυαμίνες. Επειδή το κύτταρο ρυθμίζει πολύ αυστηρά τα επίπεδα των πολυαμινών του και επειδή το φως στην περίπτωση των φωτοσυνθετικών οργανισμών έχει ήδη αποδειχθεί ως ένας από τους ρυθμιστικούς παράγοντες (Kotzabasis et al., 1999), η προσέγγιση του ρόλου των πολυαμινών είναι δύσκολη. Το γεγονός ότι η φωτοσύνθεση στηρίζεται σε πολύπλοκους μηχανισμούς με αυτορρυθμιζόμενα χαρακτηριστικά (π.χ. state transition), δυναμικά μεταβαλλόμενες στοιχειομετρίες υποσυμπλόκων (π.χ. των PS II και PS I) ή και διαφορετικές δυνατές οργανώσεις/διατάξεις σταθερού αριθμού υποσυμπλόκων RCII (π.χ. για τα PSII, $4 \times C2S2 = C8S8$), καθώς και χρόνους στις επιμέρους διαδικασίες που καλύπτουν πάνω από 18 τάξεις μεγέθους (10^{-15} s χρόνος μεταφοράς των διεγέρσεων εντός του PS II έως 1000 s χρόνος επιδιόρθωσης φωτοσυστημάτων), καθιστά τη μείωση της πολυπλοκότητας αναγκαία. Για αυτό το λόγο στα πρώτα πειράματα αποφεύχθηκαν πολυκύτταροι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί (π.χ. ανώτερα φυτά) ώστε να παρακαμφθούν τουλάχιστον οι πολύπλοκες συνέπειες της κυτταρικής διαφοροποίησης και επιλέχθηκαν μονοκύτταροι οργανισμοί (ευκαρυωτικά χλωροφύκη) που διαθέτουν όμοιο φωτοσυνθετικό μηχανισμό και όμοια σύσταση πολυαμινών με τα ανώτερα φυτά. Επιπλέον, ένας σημαντικός λόγος για τον οποίο επελέγει το συγκεκριμένο χλωροφύκος (*Scenedesmus obliquus*) είναι η ύπαρξη πολλών μεταλλαγμάτων του με διαφορετικά ευνοϊκά χαρακτηριστικά (π.χ. το

χλωρωτικό C-2A' ή το χωρίς φωτοσυλλεκτική κεραία Wt-LHC), τα οποία θα αναλυθούν στις επόμενες ενότητες.



Σχήμα 1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε 4 κεφάλαια με 8 επιμέρους ενότητες. Οι οκτώ ενότητες αποτελούν λογική συνέχεια η μία της άλλης με στόχο την προσέγγιση του μηχανισμού δράσης των πολυαμινών. Η κάθε ενότητα χαρακτηρίζεται από τη μελέτη διαφορετικών φαινομένων σε μια προσπάθεια συνεχούς εστίασης σε όλο και πιο ειδικά φαινόμενα. Η αναπτυξιακή μελέτη άνοιξε το δρόμο για την επικέντρωση σε φαινόμενα ρύθμισης της φωτοσύνθεσης (φωτοχημεία - μη φωτοχημεία). Στις ενότητες 7 και 8 ολοκληρώνεται η αναζήτηση με την πρόταση δύο πρωτότυπων μηχανισμών δράσης.

Τα αποτελέσματα που ακολουθούν παραθέτονται με την ακόλουθη λογική σειρά. Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της τεχνητής αύξησης ή μείωσης των ενδοκυτταρικών επιπέδων πολυαμινών σε κρίσιμους φυσικοχημικούς δείκτες μοριακής οργάνωσης και λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (ενότητα 2). Τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε μονοκύτταρα φύκη με τη χρήση πολυαμινών και αναστολέων της βιοσύνθεσης των πολυαμινών. Η τεχνητή αύξηση της τετραμίνης Spm επιλέχθηκε ως ο πιο υποσχόμενος τρόπος προσέγγισης και μελετήθηκε διεξοδικά (ενότητες 3, 4 και 5). Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο ρόλος της σε τρεις διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης και λειτουργικής οργάνωσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Οι φάσεις επιλέχθηκαν με την προοπτική ότι μια λειτουργική/αναπτυξιακή μελέτη για τον χλωροπλάστη θα υποδείκνυε το χρονικό σημείο ή τη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται οι πολυαμίνες (αναλαμβάνουν δράση). Οι φάσεις αυτές είναι α) φάση φωτοανεξάρτητης βιογένεσης, β) φάση φωτοεξαρτώμενης βιογένεσης και γ) φάση λειτουργικής ενεργοποίησης. Οι φάσεις αυτές καλύπτουν όλες τις πιθανές πορείες δημιουργίας και λειτουργικής οργάνωσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η ικανότητα να μελετηθεί η διαδικασία φωτοανεξάρτητης βιογένεσης (πρώτη αναφορά σε ότι έχει σχέση με τη

λειτουργική μελέτη) επέτρεψε να απεξαρτηθεί η πειραματική διαδικασία από τις φωτοεπαγόμενες ρυθμίσεις, τόσο αυτές που υπόκειται ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός προκειμένου να προσαρμοστεί, όσο και αυτές των επιπέδων των ενδοκυτταρικών πολυαμινών που επίσης φωτορυθμίζονται.

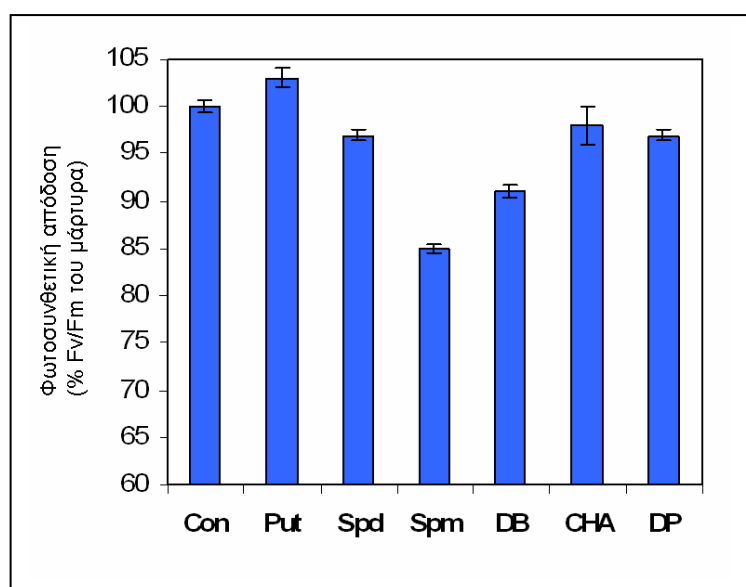
Τα ερωτήματα που γεννήθηκαν από τα παραπάνω πειράματα ομαδοποιήθηκαν σε τρεις κύριες κατηγορίες προκειμένου να σχεδιαστούν οι επόμενες κινήσεις [ρόλος αυξημένης ενδοκυτταρικής Spm α) στη βιοσύνθεση των χλωροφυλλών, β) στην κυτταρική ανάπτυξη και γ) στην διαχείριση της ενέργειας του φωτός -ειδικά στη διάχυση αυτής-]. Η απάντηση στο πρώτο ερώτημα αναζητήθηκε στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των χλωροφυλλών τόσο φωτοεξαρτώμενα -μελέτη LPOR, φωτοεξαρτώμενη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου- όσο και φωτοανεξάρτητα -DPOR, φωτοανεξάρτητη αναγωγή- (ενότητες 3.2 και 4.2 αντίστοιχα). Η ελεγχόμενη από τη Spm αναστολή στην κυτταρική ανάπτυξη ερμηνεύθηκε ως αποτέλεσμα αναστολής του διαχωρισμού των θυγατρικών κυττάρων κατά την κυτταρική διαίρεση (ενότητα 4.3 δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας). Τέλος τα χαρακτηριστικά της υπερβολικής μη φωτοχημικής διάχυσης της ενέργειας του φωτός λόγω αυξημένης Spm μελετήθηκαν σε σχέση με το ρόλο της φωτοσυλλεκτικής κεραίας LHC του PSII (5.5) καθώς και το κύκλο Calvin-Benson (5.4). Τα πειράματα αυτά κρίθηκαν αναγκαία γιατί η απορρόφηση της ενέργειας και στη συνέχεια το μέρος αυτής της ενέργειας που δεν διοχετεύεται στη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης, διαχέεται ελεγχόμενα στη φωτοσυλλεκτική κεραία LHC (πειράματα με επίδραση της Spm στο μετάλλαγμα Wt-LHC του *Scenedesmus obliquus* που δεν διαθέτει φωτοσυλλεκτική κεραία). Τα πειράματα της ενίσχυσης του κύκλου του Calvin-Benson σχεδιάστηκαν στη βάση ότι η φωτοχημεία και η ελεγχόμενη διάχυση είναι ανταγωνιστικές διαδικασίες και θα επέτρεπαν την καλύτερη κατανόηση του ρόλου των πολυαμινών. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά έκαναν πειστική την ανάγκη να μελετηθεί ο ρόλος των πολυαμινών ειδικά στους μηχανισμούς διαχείρισης της φωτονιακής ενέργειας από τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό (ρύθμιση της φωτοσυνθετικής διαδικασίας μέσω φωτοπροστατευτικών/μη φωτοχημικών μηχανισμών).

Η μελέτη της μη φωτοχημικής χρήσης της φωτονιακής ενέργειας έκανε απαραίτητη την μετάβαση σε ανώτερα φυτά τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ικανότητα μη φωτοχημικής διαχείρισης της φωτονιακής ενέργειας, αλλά και επιτρέπουν απομόνωση άθικτων χλωροπλαστών (απομονώσεις τεχνικά αδύνατες σε μικροφύκη). Πειράματα σε φυλλικά δισκία καπνού πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές -προσεκτικά επιλεγμένες- συνθήκες (π.χ. σε μικρότερες, ίσες ή μεγαλύτερες εντάσεις φωτισμού από την ένταση επώασης) προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος των πολυαμινών στη ρύθμιση της φωτοσυνθετικής καθώς

και της μη φωτοχημικής/φωτοπροστατευτικής διαδικασίας (regulation of photosynthesis and of non-photochemical quenching). Με τη χρήση μη παρεμβατικών μεθόδων αναδείχθηκε για πρώτη φορά ένας βιονεργητικός ρόλος των πολυαμινών (ενότητα 6) και στη συνέχεια μελέτες σε απομονωμένους χλωροπλάστες (ενότητα 8) και απομονωμένα λειτουργικά υποσύμπλοκα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (ενότητες 7 και 8) επέτρεψαν την καλύτερη κατανόηση του τρόπου δράσης των πολυαμινών, αλλά και τον ειδικό ρόλο με τον οποίο είναι επιφορτισμένη η κάθε πολυαμίνη. Τελικά, ο συνδυασμός των ήδη γνωστών μοριακών, δομικών και άλλων δεδομένων και των νέων βιοχημικών και φυσικοχημικών δεδομένων αυτής της εργασίας επέτρεψε την πρόταση ενός μοντέλου που να εξηγεί ικανοποιητικά τον ρόλο των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό.

2. Η επίδραση των εξωγενών πολυαμινών στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός μονοκύτταρων ευκαρυωτικών φυκών (*Scenedesmus obliquus*) μελετήθηκε *in vivo* με φασματοσκοπικές (ελάχιστα παρεμβατικές-minimally invasive) μεθόδους υπό την επίδραση αυξημένων ή μειωμένων επιπέδων Put, Spd ή Spm. Για την τεχνητή αύξηση του επιπέδου των ενδοκυτταρικών πολυαμινών ακολουθήθηκε η μέθοδος των Beigbeder και Kotzabasis (1994), η οποία περιλαμβάνει ολιγόωρη (10-20 h) επώαση υγρών καλλιεργειών του φύκους συγκεκριμένης πυκνότητας ($0.5 \mu\text{PCVml}^{-1}$) με τις αντίστοιχες πολυαμίνες (τελική συγκέντρωση 1 mM) η οποία εξασφαλίζει έως και 3 φορές αύξηση των αντίστοιχων ενδοκυτταρικών επιπέδων. Για τη μείωση του επιπέδου των πολυαμινών χρησιμοποιήθηκαν ενώσεις που δομικά μοιάζουν με τις πολυαμίνες και λειτουργούν ως αναστολείς της βιοσύνθεσής τους (1,4 διαμινοβουτανόνη, κυκλοεξυλαμίνη, 1,3 διαμινοπροπάνιο) μειώνοντας έως και 50% τα ενδοκυτταρικά επίπεδα (Beigbeder et al., 1995). Στην εικόνα 2.1 παρουσιάζονται οι τιμές μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης (F_v/F_m) των φυκών για τις 7 διαφορετικές μεταχειρίσεις (Put, Spd, Spm, 1,4DB, CHA, 1,3DP τελικής συγκέντρωσης 1 mM).



Εικόνα 2.1. Επίδραση των τεχνητά αυξημένων ή τεχνητά μειωμένων επιπέδων πολυαμινών στην απόδοση (F_v/F_m) του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μονοκύτταρων ευκαρυωτικών χλωροφυκών (*Scenedesmus obliquus*). Η φωτοσυνθετική απόδοση φαίνεται ευαίσθητη στην αυξομείωση των επιπέδων των πολυαμινών. Η τετραμίνη Spm προκαλεί την μεγαλύτερη % μεταβολή και προτιμήθηκε για την διερεύνηση του ρόλου των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Οι τιμές παρουσιάζονται σαν ποσοστά σε σχέση με την απόδοση του μάρτυρα η οποία ήταν (0.702 ± 0.04) . Οι μπάρες αντιστοιχούν στη σταθερή διακύμανση ($n=5$).

Η φωτοσυνθετική απόδοση φαίνεται ότι μειώθηκε σημαντικά από την αύξηση της Spm, ενώ οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις είχαν μικρότερη επίδραση. Πιο συγκεκριμένα, η επιπλέον Put φάνηκε να βελτιώνει οριακά τη φωτοσυνθετική απόδοση, ενώ η μείωσή της οδήγησε στο αντίθετο αποτέλεσμα (10 % μείωση στην περίπτωση του αναστολέα 1,4DB). Τέλος, τόσο η μείωση, όσο και η αύξηση της Spd είχαν μικρή επίδραση στην φωτοσυνθετική απόδοση (μειώσεις της τάξης του 5%). Με δεδομένο ότι τα ενδογενή επίπεδα Put και Spd είναι πιο αυξημένα σε σχέση με αυτά της Spm (Kotzabasis and Beigbeder, 1994) είναι λογικό να εμφανίζει ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός μικρότερη ευαισθησία στις δύο αυτές πολυαμίνες. Αντίθετα η Spm βρίσκεται υπό φυσιολογικές συνθήκες σε μικρές συγκεντρώσεις περίπου 10 φορές μικρότερες από εκείνες της Put ή της Spd (Doernemann et al., 1996). Η σειρά κατάταξης με κριτήριο τη δραστηριότητα της κάθε μεταχείρισης στη μέγιστη απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι [+Spm]> [+DB]> [+Put]> [+Spd]. Για τη συνέχεια επιλέχθηκε η τεχνητή αύξηση της Spm ως η πιο ελπιδοφόρα προσέγγιση για τη μελέτη των μηχανισμών όπου εμπλέκονται οι πολυαμίνες. Η επίδραση αυξημένων επιπέδων Spm στην οργάνωση και λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μελετήθηκε σε τρεις διαφορετικές περιπτώσεις:

1. Κατά την δημιουργία ενός πλήρως λειτουργικού φωτοσυνθετικού μηχανισμού (περίπτωση φωτοεξαρτώμενης βιογένεσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού).
2. Κατά τη δημιουργία ενός φωτοσυνθετικού μηχανισμού απουσία φωτός (περίπτωση φωτοανεξάρτητης βιογένεσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού).
3. Κατά την φάση λειτουργικής ενεργοποίησης.

Κάθε περίπτωση εμφανίζει ξεχωριστό ενδιαφέρον λόγω των καιρίων διαφορών σε σχέση με τις δύο άλλες. Στον πίνακα I παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των διαφορετικών αυτών φάσεων προκειμένου να γίνουν κατανοητές οι διαφορές τους. Πίσω από το σχεδιασμό των πειραματικών αυτών σειρών κρύβεται η κεντρική ιδέα ότι το φως (ποσότητα/ποιότητα) είναι ένας από τους παράγοντες που ρυθμίζει τόσο το φωτοσυνθετικό μηχανισμό, όσο και τα ενδογενή επίπεδα πολυαμινών (Kotzabasis et al., 1999) ως εκ τούτου θα ήταν κρίσιμο –ει δυνατόν- να μελετηθεί η λειτουργική οργάνωση του μηχανισμού παρουσία διαφορετικών επιπέδων πολυαμινών, αλλά απουσία φωτός. Το να οργανωθεί ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός απουσία φωτός είναι κάτι που συμβαίνει φυσιολογικά στα πράσινα φύκη (Armstrong, 1998). Όμως η διαδικασία πραγματοποιείται αδιάκοπα (συνεχής αναγωγή του

Πίνακας 1. Διαφορετικές διαδικασίες που οδηγούν σε αύξηση της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fm) και επιτρέπουν τη μελέτη των φαινομένων πριν, κατά και μετά την δημιουργία και λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

	Χρονική διάρκεια φαινομένου	Σύνθεση chl & φωτο-συνθετικών συμπλόκων	Αύξηση Fv/Fm	Ανάγκη Φωτισμού	Προσαρμογή σε συνθήκες φωτισμού
Φωτοεξαρτώμενη βιογένεση (χρήση μεταλλάγματος C-2A')	1. ++	2. ++	3. ++	4. +	5. +
Φωτοανεξάρτητη βιογένεση (χρήση μεταλλάγματος C-2A' σε ειδικές συνθήκες επώασης Oh-hama et al., 1987)	6. +++	7. +	8. +	9. -	10. -
Φάση λειτουργικής ενεργοποίησης (Ioannidis and Kotzabasis, 2004)	11. +	12. -	13. +	14. +	15. -

1. έχει διάρκεια από 7 έως 10 h
2. μέσω LPOR
3. εφικτή η μεγιστοποίηση της απόδοσης
4. απαραίτητος ο φωτισμός για να καταλύσει η LPOR τη σύνθεση χλωροφύλλης
5. αναγκαστικά το φως που εξασφαλίζει τη σύνθεση της χλωροφύλλης ταυτόχρονα αναγκάζει το σχηματιζόμενο φωτοσυνθετικό μηχανισμό να προσαρμοστεί
6. έχει διάρκεια από 30 έως 50 h
7. μέσω DPOR
8. εφικτή η μερική αύξηση αλλά ανέφικτη η μεγιστοποίηση της απόδοσης
9. Η πυροδότηση της σύνθεσης της χλωροφύλλης γίνεται με μείωση της θερμοκρασίας επώασης και όχι με φωτισμό
10. τα φωτοσυστήματα δημιουργούνται αλλά στο σκοτάδι συνεπώς δεν στέλνουν οξειδοαναγωγικά ή άλλα σήματα και τελικά δεν υπόκεινται άμεσα ή έμμεσα σε φωτορρύθμιση
11. μπορεί να διαρκέσει 300 s.
12. αμελητέα σύνθεση
13. εφικτή η μεγιστοποίηση της απόδοσης
14. ο φωτισμός είναι απαραίτητος για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης
15. Η μικρή διάρκεια έκθεσης στο φως δεν είναι αρκετή για τη φωτοπροσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

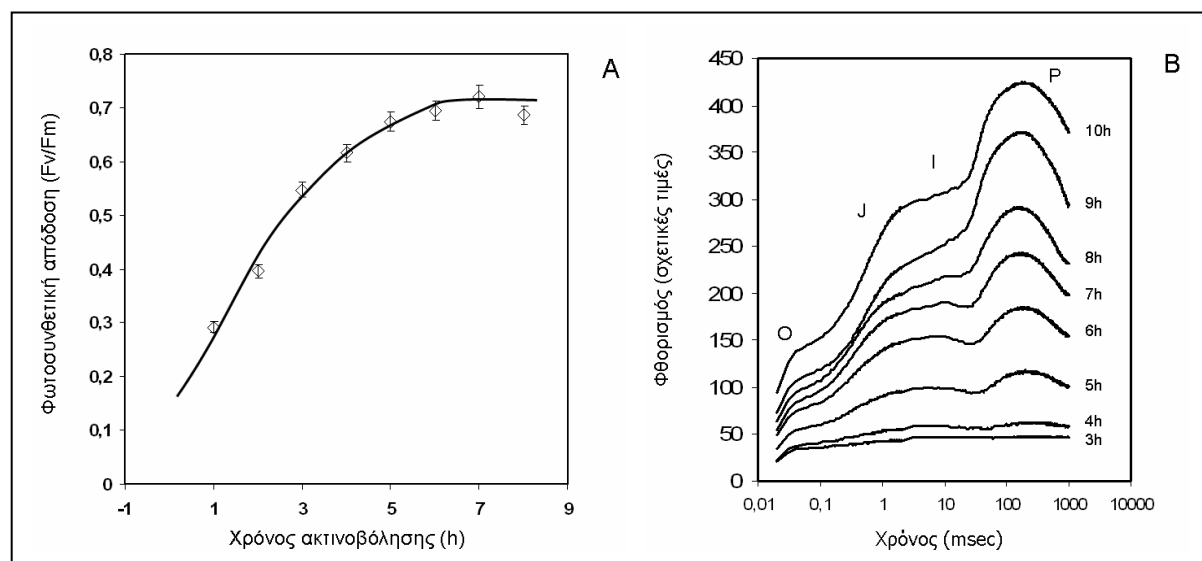
πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο από την DPOR) και για αυτό το λόγο δεν επιτρέπει να παρακολουθήσει κάποιος τα στάδια βιογένεσης του χλωροπλάστη από τη φάση του ωχροπλάστη έως το διαφοροποιημένο, ικανό φωτοσυνθετικά πλαστίδιο (χλωροπλάστης) αφού συνυπάρχουν όλα τα στάδια διαφοροποίησης. Το πρόβλημα λύνεται με τη χρήση χλωρωτικών μεταλλαγμάτων όπως το C-2A' του *Scenedesmus obliquus* το οποίο συμπεριφέρεται όπως και τα ανώτερα φυτά συσσωρεύοντας στο σκοτάδι πρωτοχλωροφυλλίδιο (Pchl_{id}), ενώ τα πλαστίδια του παραμένουν στο στάδιο του ωχροπλάστη. Το Pchl_{id} αποτελεί πρόδρομο της χλωροφύλλης και υπόστρωμα των ενζύμων LPOR και DPOR. Η πρώτη αναγωγή λειτουργεί στο φως και αυτό επιτρέπει την φωτοεξαρτώμενη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Masuda and Takamiya, 2004). Η δεύτερη εμφανίζει μία μοναδική ευαισθησία στην θερμοκρασία και λειτουργεί σε θερμοκρασίες (Oh-hama et al., 1987) χαμηλότερες των 25°C, ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 30°C απενεργοποιείται. Οι ιδιότητες αυτές του συγκεκριμένου μεταλλάγματος επέτρεψαν την μελέτη του ρόλου των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό, α) προτού δημιουργηθεί, β) κατά τη δημιουργία του στο φως και έως την μεγιστοποίηση της απόδοσής του (φωτοεξαρτώμενη) γ) κατά τη δημιουργία του, αλλά χωρίς την προσαρμογή του στο φως (φωτοανεξάρτητη) δ) κατά τη φάση της λειτουργικής του ενεργοποίησης (κατά τη μεταφορά ενός δημιουργούμενου στο σκοτάδι φωτοσυνθετικού μηχανισμού στο φως).

3. Φωτοελεγχόμενη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

3.1. Ο ρόλος των πολυαμινών στη μοριακή οργάνωση και λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

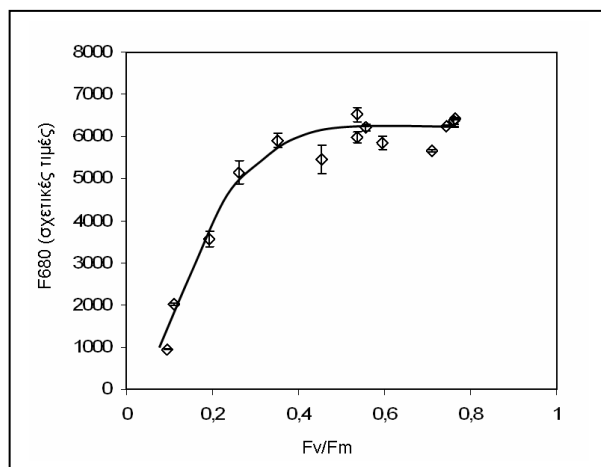
Χλωρωτικά φύκη (μετάλλαγμα C-2A' του *Scenedesmus obliquus*) εκτέθηκαν σε λευκό φως, έντασης $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ προκειμένου να πυροδοτηθεί η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης και να επιτραπεί η βιογένεση του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού. Εξωγενώς είχαν προστέθει διαφορετικές ποσότητες Spm, ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις (σε mM) στο μέσο να είναι 0, 0.25, 0.75, 1.5 και 3. Η πολυπλοκότητα των φαινομένων και της μεθόδου αλλά και ο όγκος της πληροφορίας αναγκάζει τη νοηματική διάσπαση της παράθεσης των αποτελεσμάτων αυτής της ενότητας σε δυο υποσύνολα. Αρχικά θα περιγραφεί η φυσιολογική εξέλιξη του φαινομένου (μάρτυρας) και θα δοθούν στοιχεία για την πληροφορία που φέρει η κινητική (OJIP transient kinetics), ενώ στη συνέχεια θα περιγραφεί η επίδραση των μεταχειρίσεων.

Ο μάρτυρας μεγιστοποίησε την φωτοσυνθετική του απόδοση (λόγος Fv/Fm) εντός των



Εικόνα 3.1. Φωτοεξαρτώμενη βιογένεση του χλωροπλάστη σε C-2A' μετάλλαγμα. A. Η βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όπως καταγράφεται από την ραγδαία βελτίωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fm) η οποία οφείλεται στην δημιουργία και λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. B. Οι λεπτομερείς κινητικές OJIP για διαφορετικές χρονικές στιγμές στην πορεία βιογένεσης. Είναι ορατά τα επιμέρους βήματα OJIP τα οποία αντικατοπτρίζουν τα μοριακά γεγονότα που λαβαίνουν χώρα στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό, όπως ο πρωτοταγής διαχωρισμός των φορτίων, η αναγωγή των κινόνων A και B το κλείσιμο των κέντρων αντίδρασης. Επίσης είναι εφικτή η σύγκριση του χρόνου εμφάνισης κάθε βήματος. Η ανάλυση των δεδομένων από τις κινητικές OJIP μπορεί να περιγράψει την κατάσταση του φωτοσυνθετικού δείγματος αλλά και να επιτρέψει τη σύγκριση με άλλα δείγματα.

πρώτων 7 h φωτισμού (εικόνα 3.1Α). Αξιοσημείωτος είναι ο ρυθμός με τον οποίο αύξανε η απόδοση που ήταν 30%-40% ανά ώρα για τις πρώτες 5 h φωτισμού.



Εικόνα 3.2. Η αύξηση της *in vivo* φωτοσυνθετικής απόδοσης σε συνάρτηση με τον *in vitro* φθορισμό της χλωροφύλλης. Η αύξηση του φθορισμού της χλωροφύλλης (F680) δεν είναι ανάλογη της αύξησης της φωτοσυνθετικής απόδοσης Fv/Fm. Η απόδοση μετρήθηκε σε δείγματα καλλιέργειας, ενώ ο *in vitro* φθορισμός εκπομπής μετρήθηκε σε ακετονικό εκχύλισμα των φυκών. Οι κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στη σταθερή διακύμανση (n=4).

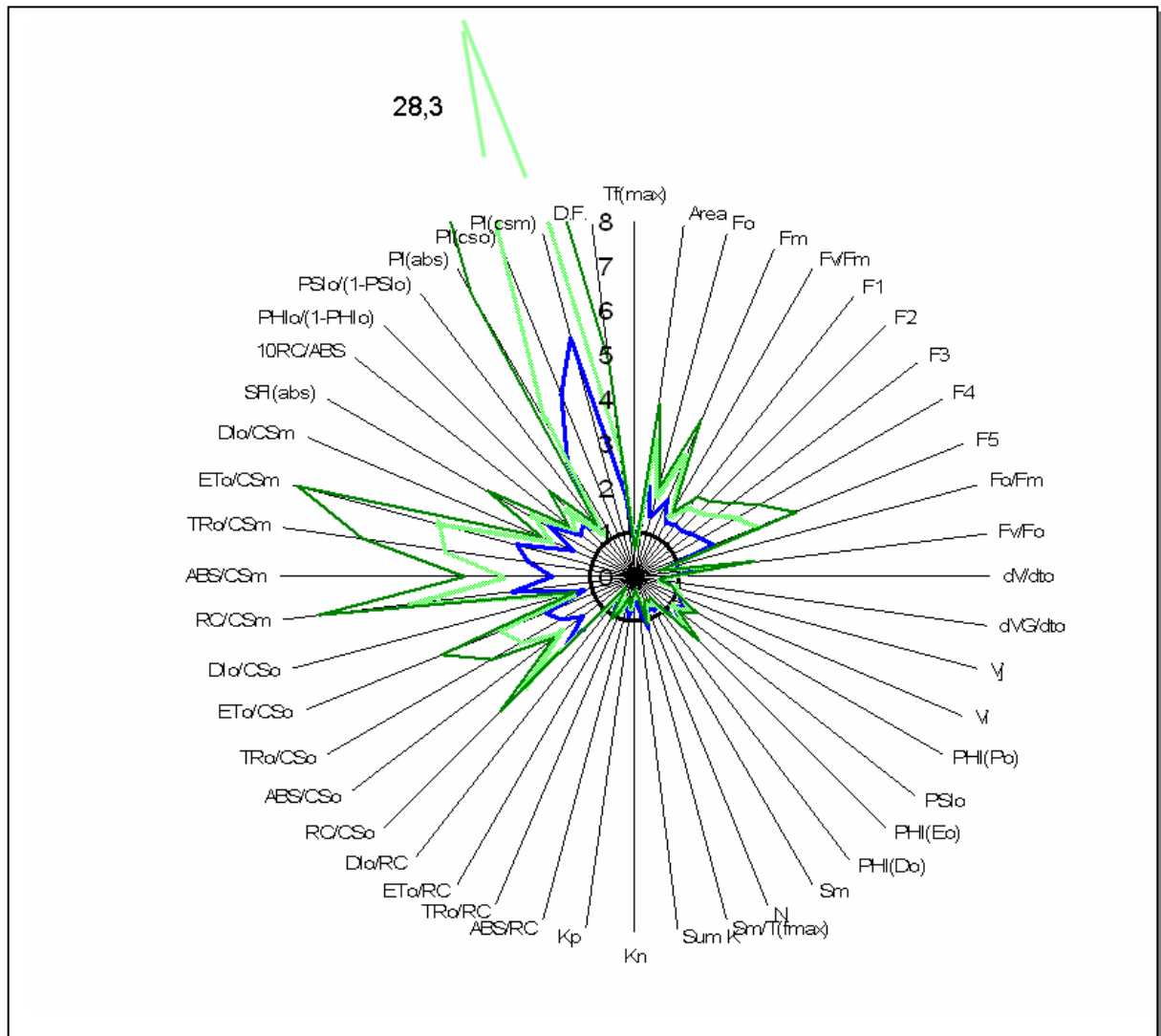
Ο παράγοντας απόδοσης Fv/Fm ($F_v = F_m - F_o$) είναι ίσως ο πιο γνωστός και ταυτόχρονα ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος, ωστόσο περιέχει πληροφορία μόνο για την αρχική (παράμετρος F_o , κέντρα ‘ανοιχτά’ open reaction centers) και την τελική (F_m , κέντρα ‘κλειστά’ closed reaction center) κατάσταση. Η απόδοση λοιπόν, είναι γενικός δείκτης υψηλής σημασίας, αλλά δεν μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για τις επιμέρους διαδικασίες. Πληροφορίες για τις επιμέρους διαδικασίες με κινητικές σταθερές άνω των 30 εκατομμυριοστών του s, κρύβει η καμπύλη OJIP αφού η τιμή του φθορισμού για κάθε χρονική στιγμή είναι απόρροια της φωτοσυνθετικής κατάστασης του δείγματος στη δεδομένη χρονική στιγμή. Ουσιαστικά πρόκειται για μια εκρηκτική, πολυβηματική, Z-εξαρτώμενη, χρονομεταβαλλόμενη επιστροφή κβάντων από το PS II, η οποία αντιστοιχεί στην κατάσταση λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στο σχήμα 3.1B φαίνονται αναλυτικά οι ενδιάμεσες τιμές που πήρε ο φθορισμός μεταξύ του βήματος O και του P σε κάθε μία από τις καμπύλες (transient kinetics). Οι δειγματοληψίες απείχαν χρονικά 1 h και αντιστοιχούν σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης. Κάθε καμπύλη έχει διαφορετικό σχήμα και διαφορετική ένταση μέγιστου φθορισμού (F_m) παρά το ότι είναι όλες ομαλοποιημένες ως προς τον αρχικό φθορισμό τους (τιμή $F_o=1$). Αυτό οφείλεται στο ότι ο

φωτοσυνθετικός μηχανισμός σχηματίζεται και ο ωχροπλάστης διαφοροποιείται σε χλωροπλάστη (Srivastava et al., 1999). Οι διαφορές στη σύσταση (σύνθεση πρωτεϊνών, χλωροφυλλών κ.α) και στη λεπτή δομή του οργανιδίου (σχηματισμός grana) μεταφράζονται και σε νέες λειτουργικές ιδιότητες όπως η φωτοσύνθεση (π.χ φωτόλυση νερού και έκλυση οξυγόνου) (Hermsmeier, 1994). Αυτές οι μοριακές και δομικές μεταβολές αντιστοιχούν σε λειτουργικές μεταβολές που μπορούν να προσεγγιστούν, τόσο με παρεμβατικές (βιοχημική απομόνωση π.χ. PS II), όσο και με ελάχιστα παρεμβατικές (non-destructive) μεθόδους.

Η καταγραφή της καμπύλης OJIP μπορεί να γίνει με ελάχιστα παρεμβατική μέθοδο τόσο σε υγρές καλλιέργειες μονοκύτταρων φωτοσυνθετικών οργανισμών (π.χ. χλωροφύκη), όσο και σε φύλλα ανώτερων φυτών. Ένα από τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου σε σχέση με άλλες μη παρεμβατικές μεθόδους όπως μια πολαρογραφική καταγραφή της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, είναι ότι αυξάνεται ο όγκος της παρεχόμενης πληροφορίας (Maxwell and Johnson, 2000), ενώ σε σχέση με μία βιοχημική προσέγγιση (π.χ. απομόνωση του PS II και *in vitro* μελέτη) είναι ότι η πληροφορία εξακολουθεί να είναι πολύ ειδική (π.χ. ο φθορισμός ολόκληρου φύλλου για το διάστημα 0-100 μs αφορά τον πρωτοταγή διαχωρισμό φορτίου ειδικά στα PS II, Strasser et al., 1998; Dau, 1994; Stirbet et al., 1998) χωρίς να σταματήσει το πείραμα να θεωρείται *in vivo*.

Οι καμπύλες OJIP είναι πλούσιες σε πληροφορία και η έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο είναι πολύ αναβαθμισμένη και απαιτεί συνδυασμό γνώσεων βιοφυσικής, βιοχημείας και μαθηματικών πέρα από τις αυτές της φυσιολογίας και της μοριακής βιολογίας. Υπάρχουν πολλές εργασίες για την ερμηνεία των επιμέρους διαδικασιών και η διεθνής βιβλιογραφία χρησιμοποιεί διαφορετικά σύμβολα για τις ίδιες διαδικασίες κάνοντας την προσέγγιση δύσκολη. Σε αυτή την εργασία ακολουθείται κυρίως η ορολογία που προτείνουν οι Strasser και Govinjee (1992) προκειμένου να ελατωθεί η πολυπλοκότητα και να αποφευχθεί σύγχυση. Η αξιοποίηση των δεδομένων από τις καμπύλες OJIP σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser και Strasser (1995) επιτρέπει μια λεπτομερή 'ακτινογράφιση' του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (εικόνα 3.3). Οι φυσικοχημικοί παράμετροι στη διάρκεια της βιογένεσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού δείχνουν να αλλάζουν δραματικά (αύξηση 2, 5 και 10 φορές αντίστοιχα για τους παράγοντες λειτουργικότητας PI για το διάστημα των 3 h της φωτοεξαρτώμενης βιογένεσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που παρατίθενται δεδομένα). Οι επιμέρους παράγοντες λειτουργικότητας όπως η πρωτοταγής φωτοχημεία των κέντρων αντίδρασης (PSI_o), αλλά και ο αριθμός των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS) αυξάνεται πάνω από 100%. Επίσης το μέγεθος της δεξαμενής της πλαστοκινόνης (qPQ) αυξάνεται, ενώ και οι απόλυτες τιμές φθορισμού (F1, F2, F3, F4, F5) για τα επιμέρους

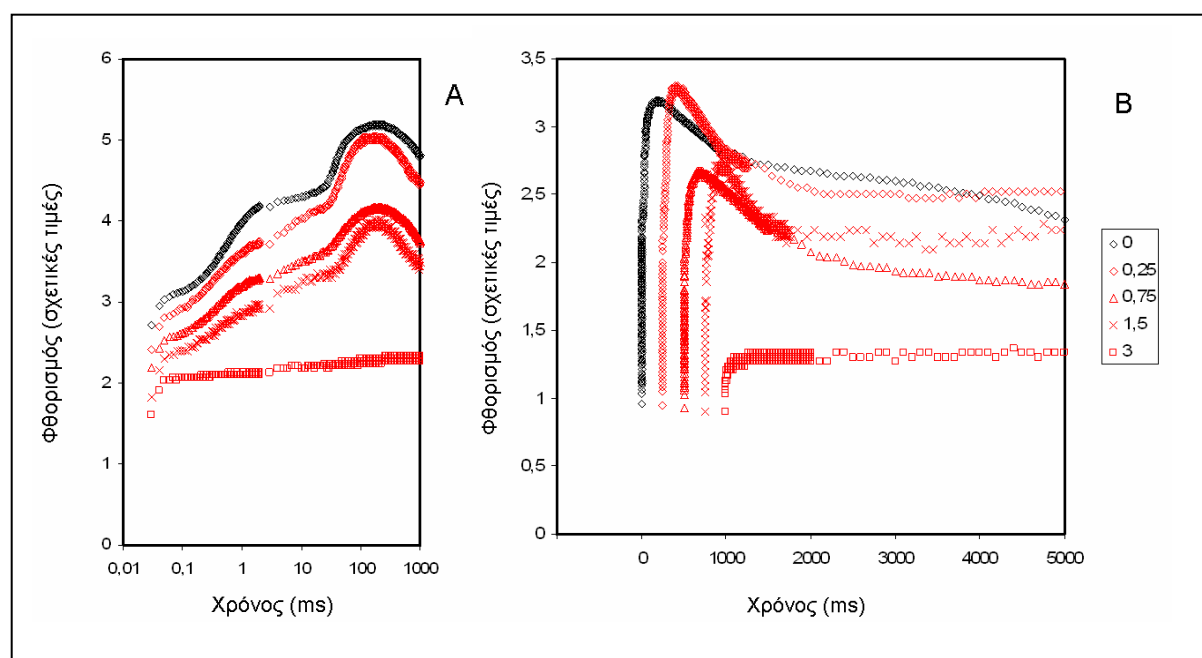
βήματα της καμπύλης δείχνουν αύξηση. Το τελευταίο δεν είναι ο λόγος που βελτιώνεται η λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού καθώς φαίνεται ότι η αύξηση της απόδοσης και σε σχέση με την *in vitro* τιμή της έντασης του φθορισμού της χλωροφύλλης δεν είναι ανάλογες (εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.3. Ιστόγραμμα των παραμέτρων του JIP-test (Strasser and Strasser, 1995) για την 4η, 5η, 6η και 7η ώρα φωτισμού C-2A' καλλιέργειών που αναπτύχθηκαν σε απόλυτο σκοτάδι. Οι τιμές για την τέταρτη ώρα τέθηκαν για τις ανάγκες της σύγκρισης αυθαίρετα ως 1 (μαύρος κύκλος) και οι τιμές των υπόλοιπων παραμέτρων παρουσιάζονται σαν ποσοστά αυτών. Οι μετρήσεις για την 5η, 6η και 7η ώρα αντιπροσωπεύονται αντίστοιχα από την κυανή, πράσινη και σκούρα πράσινη γραμμή. Οι μεταβολές στις τιμές των PI, DF, Fv/Fm, Area, RC/CSm καταδεικνύουν μια μεγάλη αύξηση της λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού καθώς η σύνθεση της χλωροφύλλης επιτρέπει τη δημιουργία νέων φωτοσυστημάτων.

Στην περίπτωση των μεταχειρίσεων με Spm παρατηρείται μια σημαντική αλλαγή της μορφής της καμπύλης επαγωγικού φθορισμού, αλλά και μια μείωση του Fv/Fm ειδικά στις συγκεντρώσεις άνω των 0.25 mM (εικόνα 3.4). OJIP- μετρήσεις έδειξαν μία οριακή αύξηση

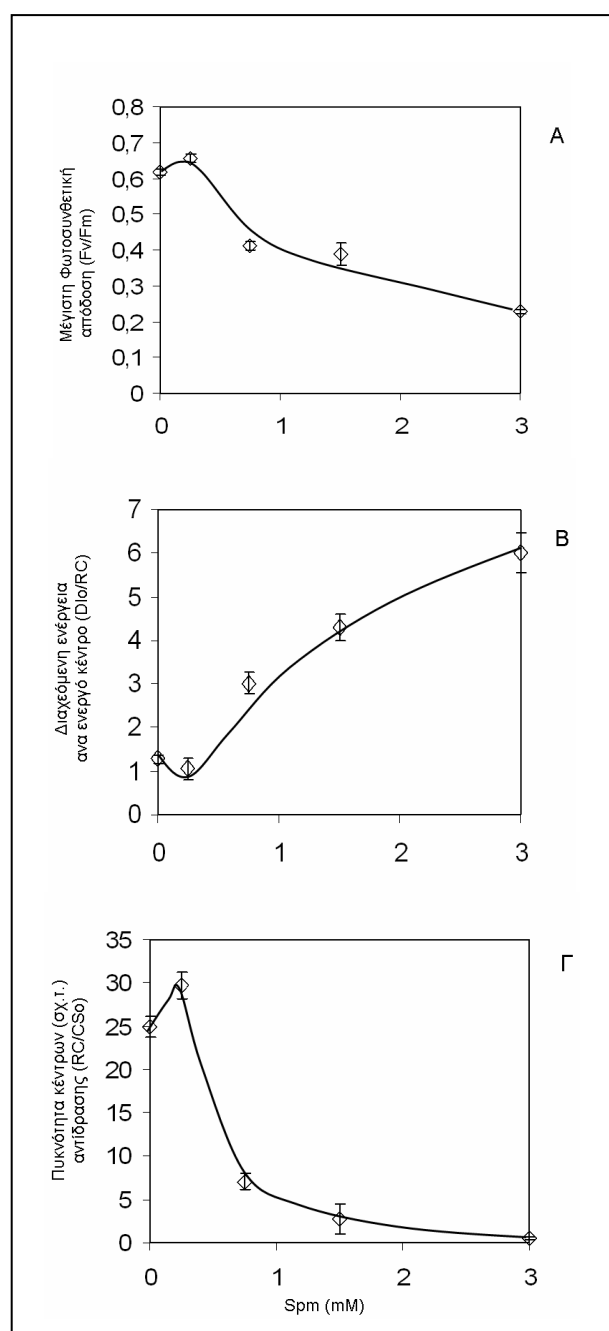
του αριθμού των ενεργών PS II κέντρων (RC/CS₀, εικόνα 3.5A) στις μικρές συγκεντρώσεις Spm και μία απότομη μείωση σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Επίσης, μικρές συγκεντρώσεις Spm (0.25 mM) οδήγησαν σε οριακή μείωση του ποσού της ενέργειας του φωτός που διαχέεται στο PS II (D₁₀/RC), ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είχαν μια ραγδαία αύξηση (εικόνα 3.5B).



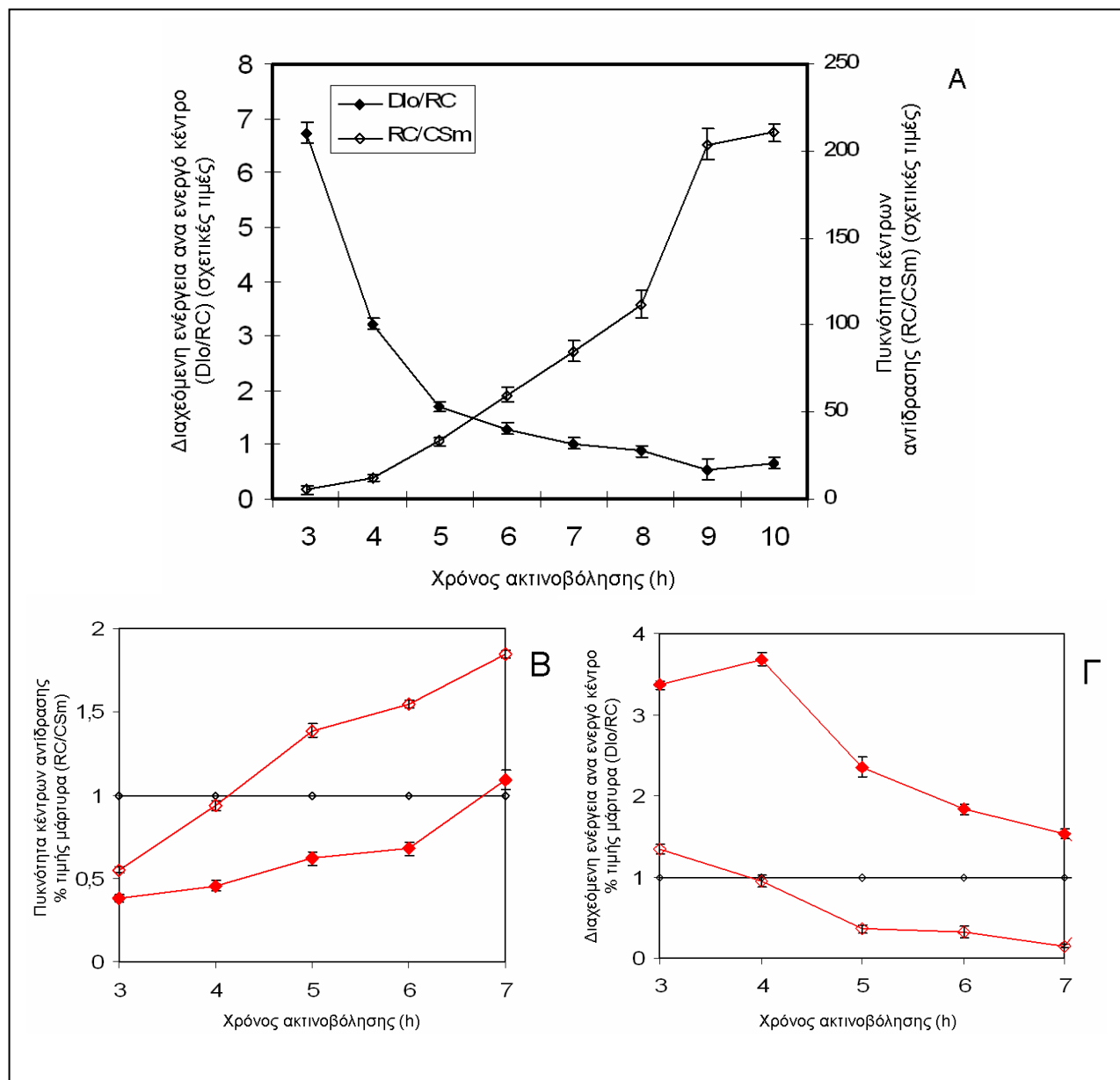
Εικόνα 3.4. Η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων Spm στην **φωτοεξαρθώμενη** βιογένεση και λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όπως εκτιμάται από τις κινητικές OJIP της χλωροφύλλης *a*. Η Spm προστέθηκε εξωγενώς σε καλλιέργειες του χλωρωτικού μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* στο απόλυτο σκοτάδι σε συγκεντρώσεις 0, 0.25, 0.75, 1.5 και 3 mM. Α. Φάση ραγδαίας αύξησης του φθορισμού όπου διακρίνονται τα βήματα OJIP (προσοχή ο άξονας του χρόνου είναι λογαριθμικός). Β. Η φάση αργής μείωσης του φθορισμού ομαλοποιημένη ως προς F₀ όπου φαίνεται η ένταση της μέγιστης τιμής φθορισμού, αλλά και η τιμή F_v μετά από 4000-5000 ms. Η προσθήκη μικρής συγκέντρωσης Spm (0.25 mM) αυξάνει οριακά το P βήμα, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συμβαίνει το αντίθετο. Ειδικά η μεγαλύτερη συγκέντρωση (3 mM) Spm φαίνεται να αναστέλλει τη δημιουργία φωτοσυνθετικού μηχανισμού (εκμηδενίζει τα J, I, P βήματα).

Στην εικόνα 3.6A παρουσιάζεται η αύξηση των κέντρων αντίδρασης (RC/SC_m) και η μείωση της διαχεόμενης ενέργειας ανά κέντρο αντίδρασης που συμβαίνει φυσιολογικά (δεδομένα μάρτυρα) κατά το διάστημα της βιογένεσης. Η διάχυση μειώνεται μέσα σε διάστημα 6 h περίπου 7 φορές, ενώ ο αριθμός των κέντρων αυξάνεται πάνω από 40 φορές. Στην εικόνα 3.6B και 3.6Γ συγκρίνονται οι επιδράσεις των 0.25 mM και 0.75 mM Spm στους προαναφερθέντες παράγοντες. Η χορήγηση χαμηλών συγκεντρώσεων Spm (0.25 mM)

αυξάνει έως και 80% τον αριθμό των διαθέσιμων κέντρων, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (0.75 mM) έχουν ανασταλτική επίδραση. Η διάχυση της φωτεινής ενέργειας είναι πολύ εντονότερη στη μεταχείριση με 0.75 mM Spm (>300% στις πρώτες ώρες), ενώ η μεταχείριση με 0.25 mM μετά τις πρώτες 4 h μειώνει τη διάχυση ακόμη και στο 1/5 αυτής του μάρτυρα. Σε ότι αφορά την κυτταρική ανάπτυξη η προσθήκη 0.25 mM Spm επέτρεψε μεγαλύτερη αύξηση του πληθυσμού των μικροφυκών σε σύγκριση με τον μάρτυρα (εικόνα 3.7A).

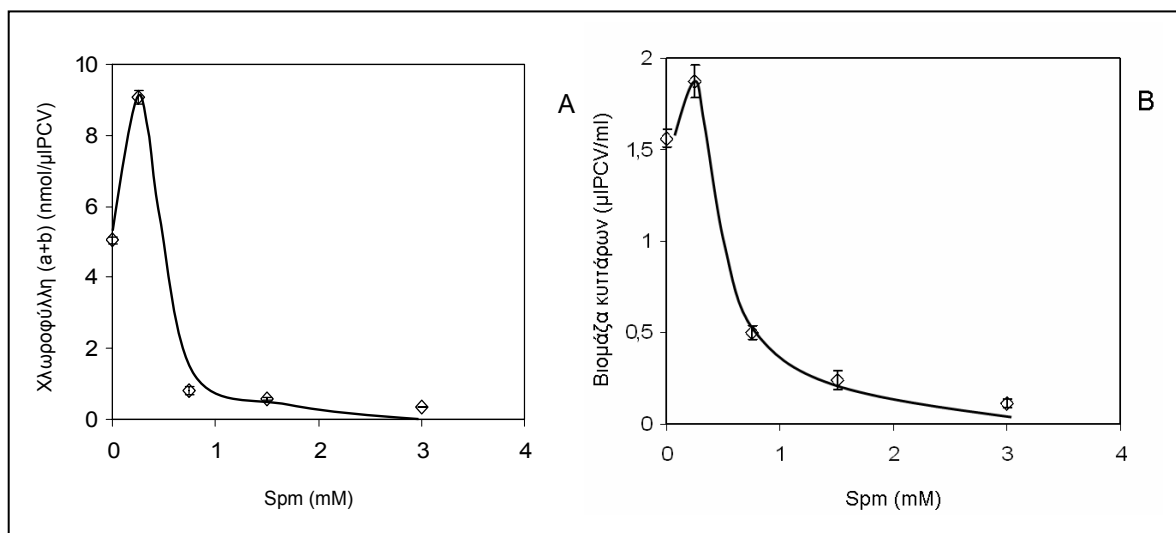


Εικόνα 3.5. Η επίδραση αυξανόμενης συγκέντρωσης Spm στην φωτοσυνθετική απόδοση F_v/F_m (A), στην διάχυση της περίσσειας ενέργειας (energy dissipation) ανά κέντρο D_{lo}/RC (B) στην πυκνότητα των ενεργών PS II κέντρων αντίδρασης RC/CSO (Γ) κατά την φωτοεξαρτώμενη δημιουργία και λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η Spm σε μικρές συγκεντρώσεις (0.25 mM) φαίνεται να αυξάνει οριακά την πυκνότητα των κέντρων αντίδρασης, να μειώνει τις απώλειες σε μορφή θερμότητας ανά κέντρο και συνολικά να βελτιώνει τη φωτοσυνθετική απόδοση. Αντίθετα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμποδίζει τη φωτοεξαρτώμενη ανάπτυξη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.



Εικόνα 3.6. Η μεταβολή στην πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CSm) και στην διάχυση της περίσσειας ενέργειας ανά κέντρο αντίδρασης (Dio/RC) κατά την διαδικασία φωτοεξαρτώμενης δημιουργίας και λειτουργικής οργάνωσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Α. Χλωρωτικά φύκη (μετάλλαγμα C-2A') μεταφέρθηκαν από το απόλυτο σκοτάδι στο φως για περισσότερο από 10 ώρες και εκτιμήθηκε σε τακτά χρονικά διαστήματα η αύξηση της πυκνότητας των κέντρων και η μείωση των απωλειών υπό μορφή θερμότητας. Β. Η επίδραση 0.25 mM (κλειστοί ρόμβοι) και 0.75 mM (ανοιχτοί ρόμβοι) εξωγενώς προστιθέμενης Srm σαν % διαφορές ως προς τον μάρτυρα στην πυκνότητα των κέντρων αντίδρασης για το κυρίως διάστημα της λειτουργικής οργάνωσης (3-7h φωτισμού). Γ. Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Srm στην διάχυση της ενέργειας ανά κέντρο αντίδρασης (συμβολισμός όπως στο Β).

Επίσης, οι μεταχειρίσεις με 0.75 έως 3 mM Srm προκάλεσαν τη μείωση των επιπέδων χλωροφύλλης (chl a και chl b), με εξαίρεση και πάλι τις μικρές συγκεντρώσεις (0.25 mM) (εικόνα 3.7).

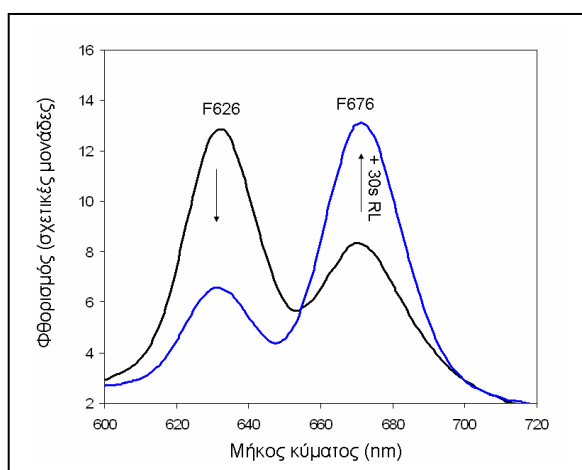


Εικόνα 3.7. Α. Η επίδραση διαφορετικών εξωγενώς προστιθεμένων συγκεντρώσεων *Spm* στην κυτταρική πυκνότητα φυκών (μετάλλαγμα C-2A') κατά την φωτοεξαρτώμενη βιογένεση του χλωροπλάστη. Μικρές ποσότητες *Spm* αυξάνουν τη βιομάζα (PCV, Packed Cell Volume), ενώ μεγαλύτερες μειώνουν δραματικά την αύξηση του PCV. Β. Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων *Spm* στην συνολική συγκέντρωση χλωροφύλλης. Η χλωροφύλλη συντίθεται σε συνθήκες φωτισμού από την LPOR. Η εξωγενώς προστιθέμενη *Spm* δείχνει ικανή να αυξήσει ή να μειώσει τη συνολική χλωροφύλλη ανάλογα με την συγκέντρωση που θα δοκιμαστεί. Μικρές συγκεντρώσεις (0.25 mM) αυξάνουν το επίπεδο χλωροφύλλης, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις το ελατώνουν.

Η σύνθεση της χλωροφύλλης σε συνθήκες φωτισμού όπως αυτές των συγκεκριμένων πειραμάτων καταλύεται από την φωτοεξαρτώμενη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου (LPOR). Συνεπώς γεννάται το ερώτημα αν οι παρατηρούμενες αλλαγές στα επίπεδα χλωροφυλλών σχετίζονται με την παραπάνω κατάλυση.

3.2. Ο ρόλος των πολυαμινών στη φωτομετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο.

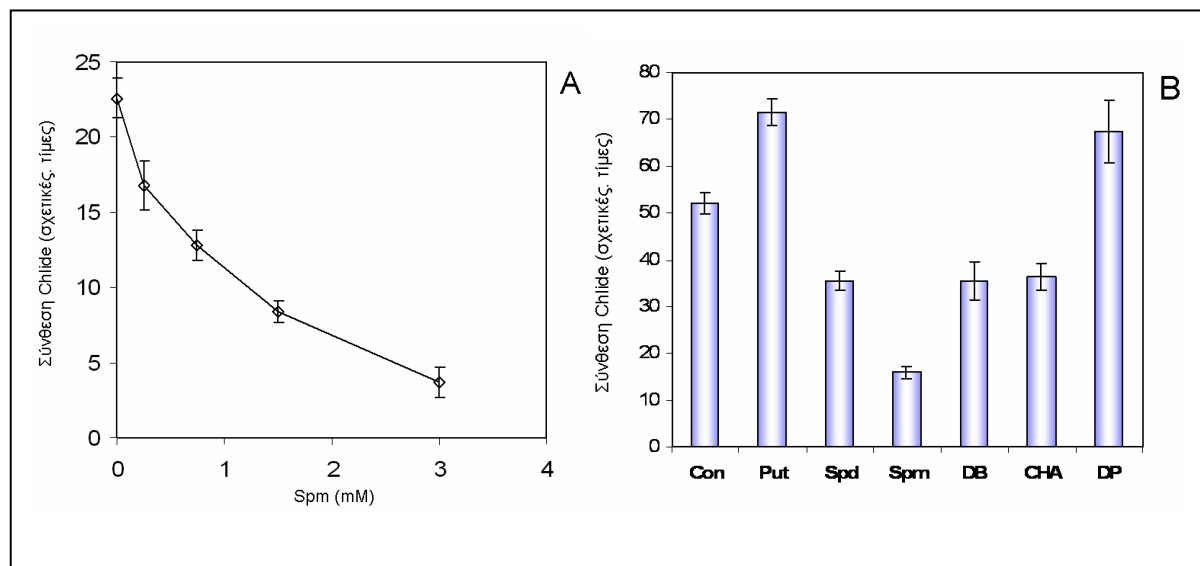
Η μεταχείριση των μικροφυκών με διαφορετικές συγκεντρώσεις Spm έδειξε ότι η ποσότητα χλωροφύλλης ανά κύτταρο μειώθηκε (εικόνα 3.7B). Με δεδομένο ότι τα χλωρωτικά φύκη συσσωρεύουν πρωτοχλωροφυλλίδιο στο σκοτάδι (πρόδρομος χλωροφύλλης) και η αναγωγή του από την LPOR σε χλωροφυλλίδιο επιτρέπει την σύνθεση χλωροφύλλης a και b μελετήσαμε την επίδραση των πολυαμινών στη φάση της φωτομετατροπής του σε χλωροφυλλίδιο. Η χλωροφύλλη στις δεδομένες συνθήκες συντίθεται αποκλειστικά από την φωτοεξαρτώμενη LPOR η οποία ανάγει το πρωτοχλωροφυλλίδιο σε χλωροφυλλίδιο παρουσία NADPH. Η ικανότητα των μικροφυκών να ανάγουν το πρωτοχλωροφυλλίδιο ελέγχθηκε μετά από έκθεση σε ισχυρό φως (650 nm) προκειμένου να ενεργοποιηθεί το σύμπλοκο του ενεργού πρωτοχλωροφυλλιδίου (Pchl_{ide}:LPOR:NADPH). Το αντιδρόν Pchl_{ide} φθορίζει στα 626 nm ενώ το προϊόν (Chl_{ide}) στις ίδιες συνθήκες φθορίζει σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (676 nm) (εικόνα 3.8). Τα αποτελέσματα της φωτομετατροπής του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο παρουσιάζονται στην εικόνα 3.9.



Εικόνα 3.8. Φάσματα εκπομπής φθορισμού σε ακετονικά εκχυλίσματα του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκου *S. obliquus*. Τα δείγματα διεγέρθηκαν με κυανή ακτινοβολία (435nm) και εμφανίζουν δύο κορυφές (F626 και F676). Η πρώτη αντιστοιχεί στο πρωτοχλωροφυλλίδιο (Pchl_{ide}), ενώ η δεύτερη στο προϊόν της αναγωγής του Pchl_{ide}, το χλωροφυλλίδιο (Chl_{ide}). Η συνεχής καμπύλη αντιστοιχεί στον μάρτυρα πριν την ακτινοβολήση και η διακεκομμένη μετά την ακτινοβολήση με ερυθρό μονοχρωματικό φως (RL, 650 nm).

Ο μάρτυρας εμφανίζει φυσιολογική συμπεριφορά δηλαδή μειώνει το υπόστρωμα (Pchl_{ide}) και αυξάνει το προϊόν (Chl_{ide}) (εικόνα 3.8), ενώ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων Spm στο μέσο καλλιέργειας η φωτομετατροπή μειώνεται. Μάλιστα σε μεταχειρίσεις με 3 mM Spm τα κύτταρα σχεδόν δεν εμφανίζουν φωτοεξαρτώμενη σύνθεση χλωροφυλλιδίου, ενώ υπήρχε υπόστρωμα (εικόνα 3.9A).

Για να γίνει πιο κατανοητός ο ρόλος των πολυαμινών στη φωτομετατροπή αυτή, η οποία αποτελεί και το μηχανισμό πυροδότησης της βιογένεσης του χλωροπλάστη καλλιέργειες του μεταλλάγματος C-2A' μεταχειρίστηκαν με Put (1 mM), Spd (1 mM), Spm (1 mM), 1,4 διαμινοβουτανόνη (1 mM) κυκλοεξυλαμίνη (1 mM) και 1,3 διαμινοπροπάνιο (1 mM).



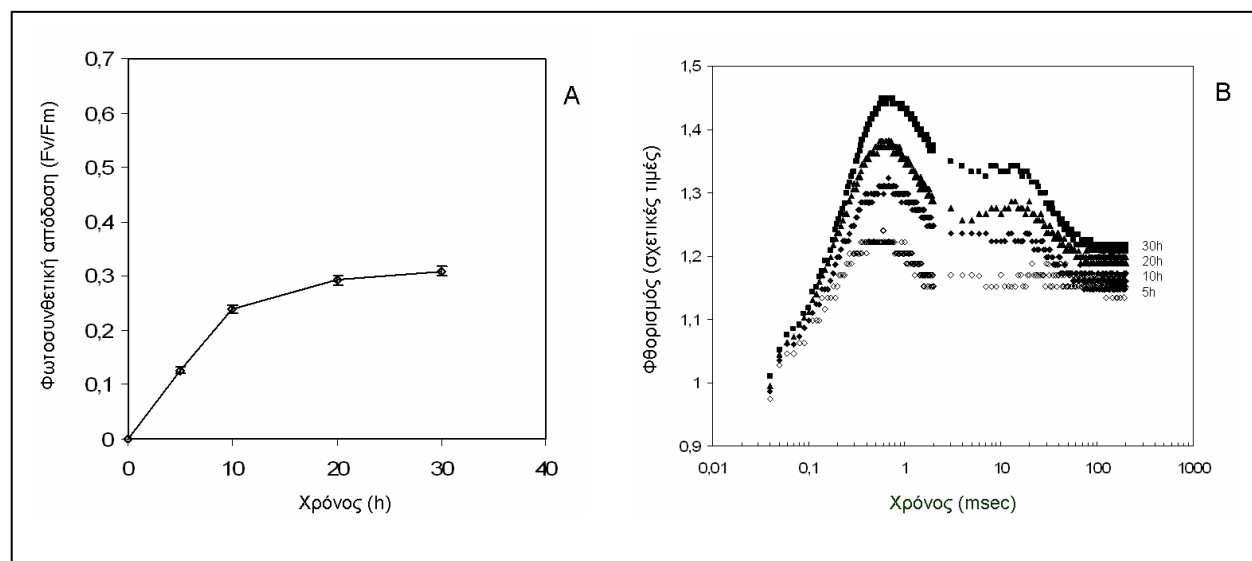
Εικόνα 3.9. Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Spm εξωγενώς προστιθέμενων στην *in vitro* φωτομετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου (Pchlide) σε χλωροφυλλίδιο (Chlide) εκφρασμένη ως σύνθεση νέου πρωτοχλωροφυλλιδίου. B. Η φωτομετατροπή (εκτιμώμενη ως αύξηση του φθορισμού στα 676 nm μετά από 30 s ακτινικό φως (650 nm) σε C-2A' καλλιέργειες που μεταχειρίστηκαν με πολυαμίνες ή αναστολείς της βιοσύνθεσής τους (τελική συγκέντρωση 1 mM). Οι κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στη σταθερή διακύμανση (n=5).

Η ικανότητα φωτομετατροπής του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο εκτιμήθηκε όπως και παραπάνω και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 3.9B. Η χορήγηση Put φαίνεται να αυξάνει το παραγόμενο χλωροφυλλίδιο, ενώ η μείωση της με τη χρήση του αναστολέα (1,4 διαμινοβουτανίου) δείχνει αντίθετο αποτέλεσμα. Η χορήγηση Spd προκαλεί παρόμοιο αποτέλεσμα με τη Spm αν και η τετραμίνη δείχνει πιο δραστική για τη συγκέντρωση των 1 mM. Η μείωση της Spm προκαλεί αύξηση στην ικανότητα φωτομετατροπής (περίπτωση αναστολέα 1,3 διαμινοβουτανίου), ενώ η χορήγηση κυκλοεξυλαμίνης (αναστολέας της Spd) οδήγησε σε μείωση της ικανότητας φωτομετατροπής.

4. Φωτοανεξάρτητη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

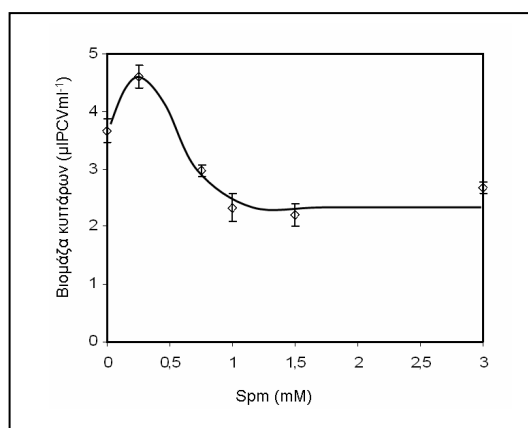
4.1. Ο ρόλος των πολυαμινών στη μοριακή οργάνωση και λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού απουσία φωτός.

Χλωρωτικά φύκη (μετάλλαγμα C-2A' του *Scenedesmus obliquus*) εκτέθηκαν σε χαμηλότερες των 30°C θερμοκρασίες (20°C) προκειμένου να πυροδοτηθεί η φωτοανεξάρτητη βιοσύνθεση της χλωροφύλλης και να επιτραπεί η δημιουργία του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού απουσία φωτός. Εξωγενώς είχαν προστεθεί διαφορετικά ποσά Spm, ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις της στο μέσο να είναι 0, 0.25, 1, 1.5 και 3 (mM). Ο μάρτυρας αύξησε την φωτοσυνθετική του απόδοση εντός των πρώτων 30 h επώασης (εικόνα 4.1A). Οι καμπύλες επαγωγικού φθορισμού (OJIP) δείχνουν την σταδιακή εξέλιξη του φαινομένου (εικόνα 4.1B). Η φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm) αυξάνεται σταδιακά καθώς συντίθεται χλωροφύλλη (πρασίνισμα φυκών στο σκοτάδι), αλλά η τελική τιμή της απόδοσης (0.31) είναι περίπου το 50% αυτής που φυσιολογικά εμφανίζει ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός όταν αναπτύσσεται στο φως.



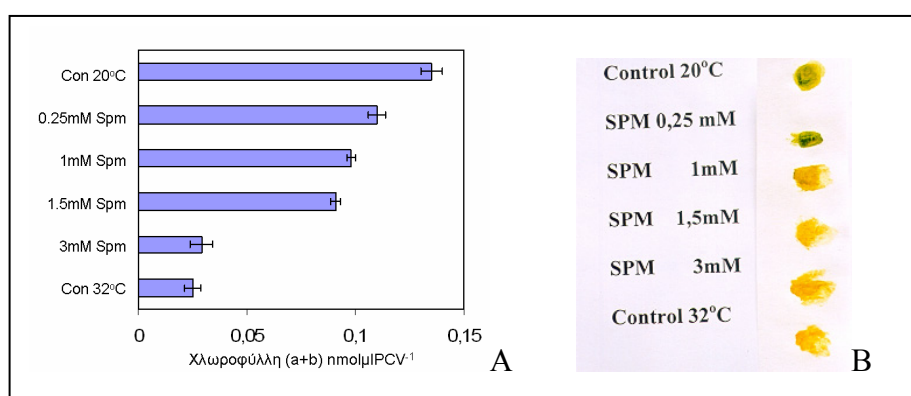
Εικόνα 4.1. Φωτοανεξάρτητη βιογένεση του χλωροπλάστη σε καλλιέργειες του μεταλλάγματος C-2A' που αναπτύχθηκαν στους 20°C σε απόλυτο σκοτάδι. Α. Η βιογένεση όπως καταγράφεται για πρώτη φορά από την βελτίωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fm) η οποία οφείλεται στην δημιουργία και λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η απόδοση δεν κατακτά τιμές πάνω από 0.35 υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Β. Οι λεπτομερείς καμπύλες επαγωγικού φθορισμού για διαφορετικές χρονικές στιγμές στην πορεία της φωτοανεξάρτητης βιογένεσης. Είναι εμφανής η απουσία των χαρακτηριστικών I και P βημάτων οι οποίες υποδηλώνουν ατελή λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Η έννοια της φωτοσυνθετικής απόδοσης σε αυτή την περίπτωση είναι δυσνόητη, εφόσον τα φύκη δεν εκτέθηκαν σε φως κατά την επώαση τους συνεπώς δεν φωτοσυνθέτουν. Εκτέθηκαν όμως μικρά δείγματα καλλιέργειας για τις ανάγκες εκτίμησης του παράγοντα Fv/Fm σε φως μικρής διάρκειας (1 s). Τελικά, οι φυσικοχημικές μετρήσεις (εικόνα 4.1.) δείχνουν την φυσιολογική κατάσταση ενός δείγματος σε μια δεδομένη χρονική στιγμή και επιτρέπουν τη συγκριτική μελέτη με άλλα δείγματα όπως και στην περίπτωση της ενότητας 3.1. Ο πληθυσμός των κυττάρων στο μάρτυρα και στη μεταχείριση με 0.25 mM Spm αυξάνεται, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρουσιάζει μείωση (εικόνα 4.2).

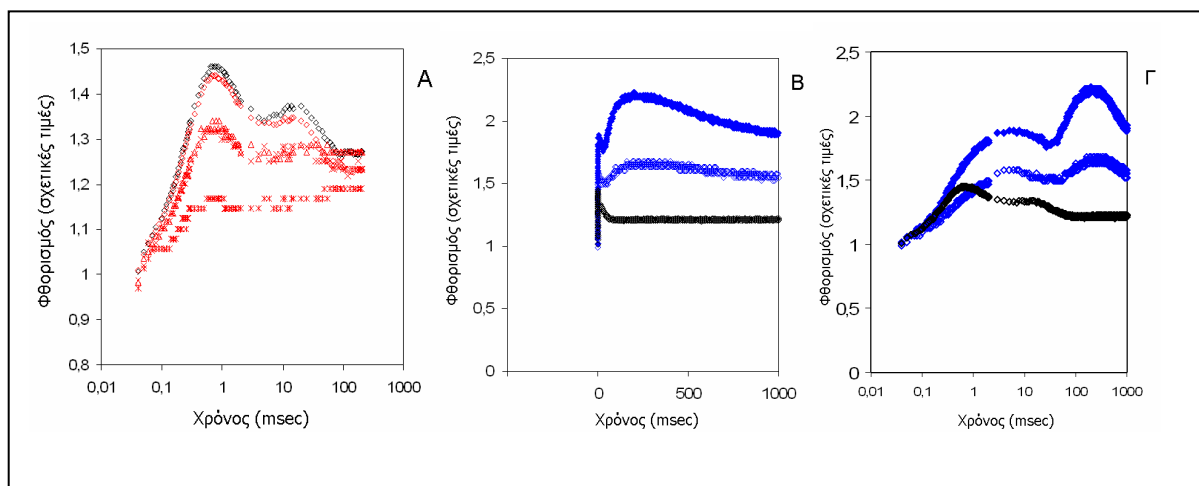


Εικόνα 4.2. Η επίδραση διαφορετικών εξωγενώς προστιθεμένων συγκεντρώσεων Spm στην κυτταρική πυκνότητα κυττάρων του μεταλλάγματος C-2A' κατά την φωτοανεξάρτητη βιογένεση του χλωροπλάστη. Μικρές ποσότητες Spm αυξάνουν τη βιομάζα, ενώ μεγαλύτερες τη μειώνουν.

Οι συνολικές χλωροφύλλες (a και b) των κυττάρων δείχνουν μια σαφή μείωση στις μεταχειρίσεις με Spm (εικόνα 4.3A). Ειδικά στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (περίπτωση 3 mM Spm) ο φαινότυπος των φυκών παραμένει χλωρωτικός (εικόνα 4.3B). Τα φύκη παραμένουν χλωρωτικά όπως ο δεύτερος μάρτυρας (control 32°C) που παρέμεινε σε συνθήκες ακατάλληλες για σύνθεση χλωροφυλλών στο σκοτάδι.

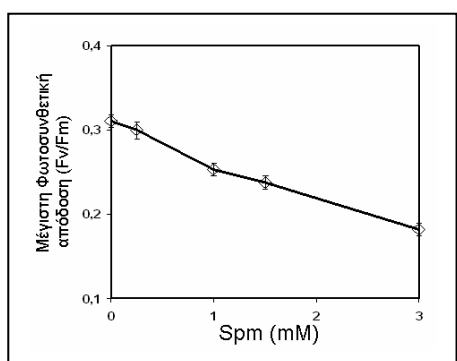


Εικόνα 4.3. Α. Επίπεδα συνολικής χλωροφύλλης (a+b) σε φύκη που επώαστηκαν σε συνθήκες κατάλληλες για φωτοανεξάρτητη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Spm. Κύτταρα που παρέμειναν στο σκοτάδι και σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία (32°C) χρησιμεύουν σαν ένας δεύτερος μάρτυρας (στήλη Con 32°C). Η αυξανόμενη συγκέντρωση Spm φαίνεται να μειώνει το συνολικό ποσό χλωροφύλλης και ως εκ τούτου περιορίζει δραματικά την φωτοανεξάρτητη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Β. Φαινότυπος καλλιεργειών του μεταλλάγματος C-2A' του γένους *Scenedesmus* τα οποία διαφοροποίησαν τα πλαστιδία τους -απουσία φωτός- λόγω επίδρασης χαμηλής θερμοκρασίας (20°C) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Spm.

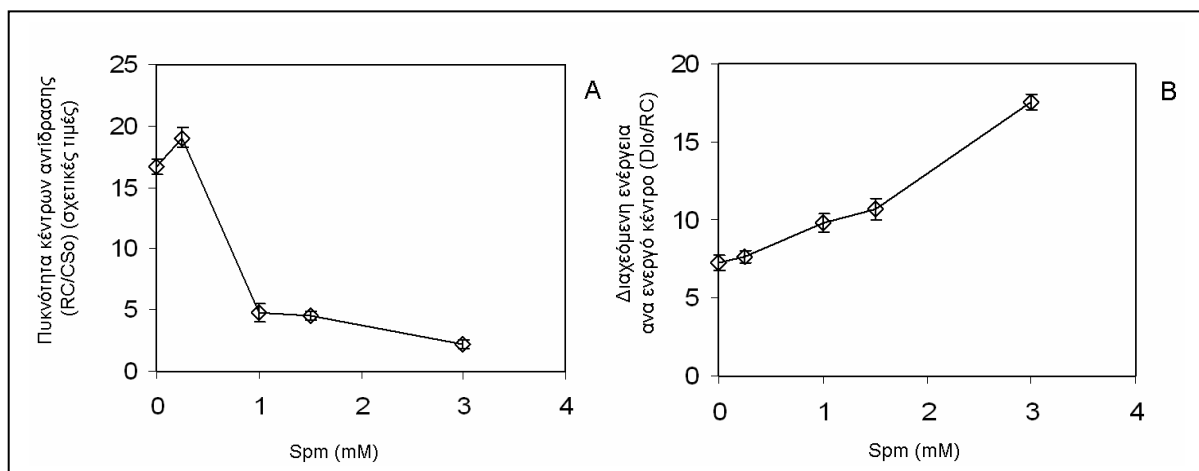


Εικόνα 4.4. Α. Η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων *Srpm* στην **φωτοανεξάρτητη** δημιουργία και λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όπως εκτιμάται από τις κινητικές OJIP της χλωροφύλλης *a*. Η *Srpm* προστέθηκε εξωγενώς σε καλλιέργειες του χλωρωτικού μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* στο απόλυτο σκοτάδι σε συγκεντρώσεις 0, 0.25, 1, 1.5 και 3 mM. Η κάθε καμπύλη είναι ομαλοποιημένη ως προς F_0 και αυτό επιτρέπει ευκολότερα τη σύγκρισή τους. Η *Srpm* σε συγκέντρωση 0.25 mM (κόκκινοι ρόμβοι) μειώνει ελαφρά το P βήμα, σε συγκέντρωση 1 mM (τρίγωνα) και 1.5 mM (σταυροί) μειώνει το J και το P βήμα, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (3 mM αστερίσκοι) αλλοιώνει σημαντικά την καμπύλη επαγωγικού φθορισμού. Β και Γ. Σύγκριση καμπύλων επαγωγικού φθορισμού μεταξύ C-2A' καλλιεργειών που αναπτύσσουν το φωτοσυνθετικό τους μηχανισμό στο σκοτάδι (μαύρο χρώμα) και στο φως (κυανό χρώμα) σε αναλογικό (Β) και λογαριθμικό (Γ) άξονα χρόνου για ευκολότερες συγκρίσεις.

Η επίδραση των αυξανόμενων συγκεντρώσεων *Srpm* στα χαρακτηριστικά των κινητικών OJIP παρουσιάζονται στην εικόνα 4.4Α. Για σύγκριση με τη φωτοεξαρτώμενη βιογένεση παραθέτονται και οι αντίστοιχες κινητικές (εικόνα 4.4ΒΓ). Από τα δεδομένα υπολογίζονται οι παράγοντες F_v/F_m και παρουσιάζονται στην εικόνα 4.5. Φαίνεται ξεκάθαρα ότι η αυξημένη συγκέντρωση *Srpm* οδηγεί σε μείωση της απόδοσης.



Εικόνα 4.5. Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων *Srpm* στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση (F_v/F_m) κατά την διαδικασία φωτοανεξάρτητης δημιουργίας και λειτουργικής οργάνωσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η χορήγηση *Srpm* προκαλεί μείωση στην απόδοση των μικροφυκών. Πιθανότερη αιτία είναι μεγάλες απώλειες στην λειτουργία των κέντρων λόγω διάχυσης, αλλά και η απενεργοποίηση των διαθέσιμων κέντρων (βλ. κείμενο).

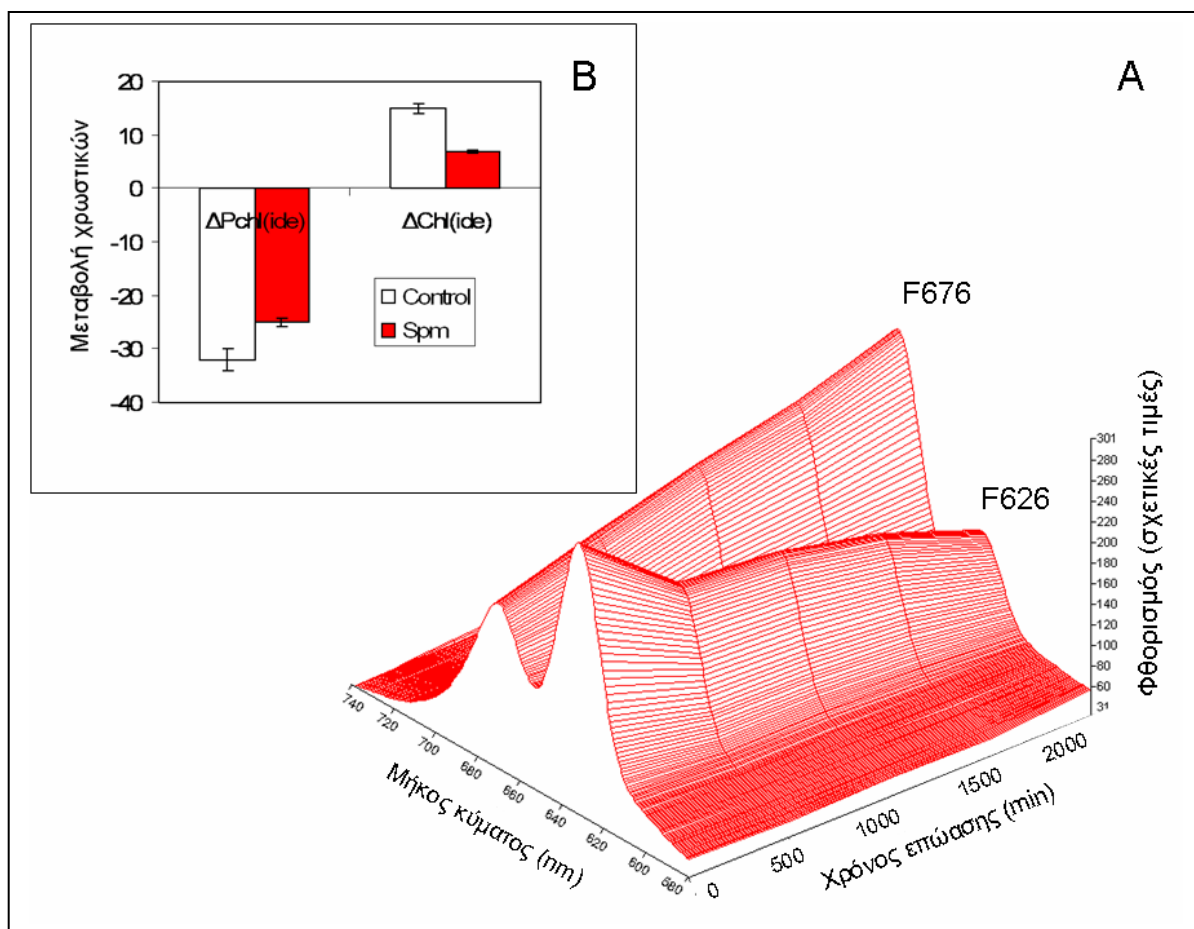


Εικόνα 4.6. Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων *Spm* στην μεταβολή της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης, *RC/CS₀* (A) και στην διάχυση της περίσσειας ενέργειας ανά κέντρο αντίδρασης, *DIO/RC* (B) κατά την διαδικασία **φωτοανεξάρτητης** δημιουργίας και λειτουργικής οργάνωσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η *Spm* αυξάνει οριακά την πυκνότητα των κέντρων σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ σε μεγαλύτερες προκαλεί σαφή μείωσή τους. Σε ότι αφορά το ποσό ενέργειας που διαχέεται ανά κέντρο, αυξάνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης *Spm*.

Τα φύκη παρουσία μικρών συγκεντρώσεων *Spm* οργανώνουν περισσότερα ενεργά κέντρα αντίδρασης (PS II) σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ο αριθμός των κέντρων μειώνεται (εικόνα 4.6A). Σε ότι αφορά τη διάχυση της ενέργειας ανά κέντρο αντίδρασης (*DIO/RC*) παρατηρείται μία αύξηση ανάλογη με την ποσότητα της *Spm* που προστίθεται στην καλλιέργεια (εικόνα 4.6B).

4.2 Επίδραση της Spm στην *in vitro* φωτοανεξάρτητη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου.

Η ικανότητα των φυκών να συνθέτουν χλωροφύλλες απουσία φωτός οφείλεται στην παρουσία DPOR στον ωχροπλάστη. Μετά την απομόνωση προελασματοειδών σωματίων (πλούσιες σε Pchl_{ide} και DPOR) έγινε επώαση σε χαμηλή θερμοκρασία (20°C) παρουσία Spm (2 mM). Η *in vitro* φωτοανεξάρτητη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου παρουσιάζεται για τον μάρτυρα στην εικόνα 4.7Α.



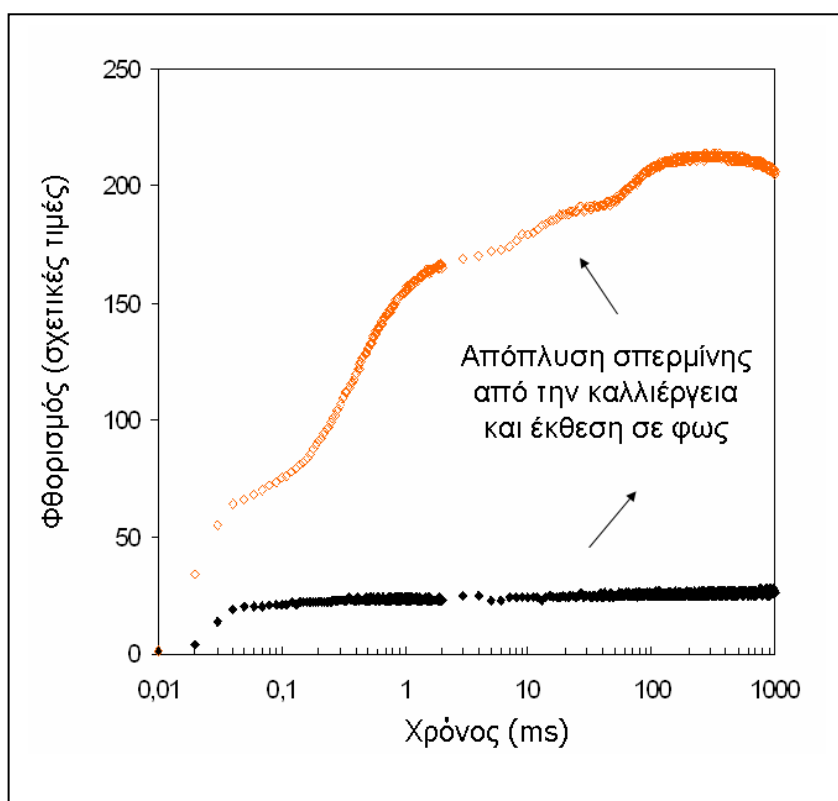
Εικόνα 4.7 Α. Η *in vitro* αναγωγή του Pchl_{ide} σε Chl_{ide} από την DPOR παρουσία NADPH. Προελασματοειδή σωματίδια/προθυλακοειδή (PLB/PT) που απομονώθηκαν από το μετάλλαγμα C-2A' του *S.obliquus* επώαστηκαν στους 20°C σε απόλυτο σκοτάδι για την αναγωγή του Pchl_{ide} η οποία εκτιμήθηκε φασματοσκοπικά σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η κορυφή F626 σε ακετονικό εκχύλισμα των προθυλακοειδών οφείλεται στο Pchl_{ide}, ενώ η κορυφή F676 στις ίδιες συνθήκες αντιστοιχεί στο παραγόμενο Chl_{ide}. Φυσιολογικά η μείωση της κορυφής στα 626 nm συνοδεύεται από την παράλληλη αύξηση της κορυφής στα 676 nm. Β. Η επίδραση της Spm στην ικανότητα των PLB/PT να συνθέτουν χλωροφύλλη στο σκοτάδι (φωτοανεξάρτητο μονοπάτι βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης που στηρίζεται στο σύμπλοκο DPOR:Pchl_{ide}:NADPH).

Οι τιμές μετατροπής του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο παρουσιάζονται στην εικόνα 4.7B ως ποσοστιαία επί τοις εκατό μεταβολή. Παρατηρούμε ότι η Spm σε συγκέντρωση 2 mM να παρεμποδίζει την φωτοανεξάρτητη σύνθεση των χλωροφυλλών.

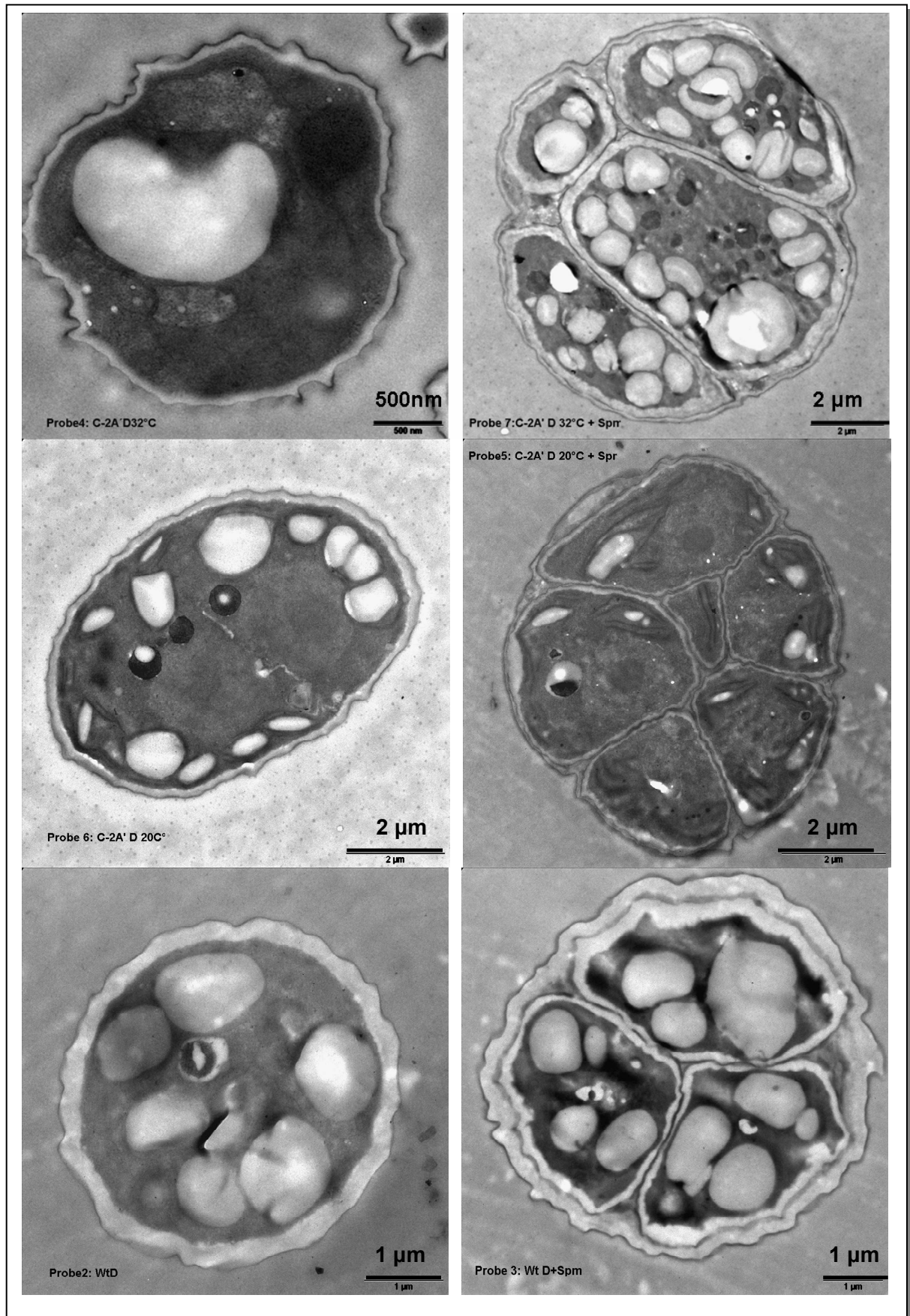
Η Spm φαίνεται να εμποδίζει την καταλυτική δράση της οξειδοαναγωγής του πρωτοχλωροφυλλιδίου και να μειώνει κατά το ήμισυ την συνολική παραγωγή του. Πιθανόν να δεσμεύεται στο σύμπλοκο NADPH:DPOOR:Pchl_a και να εμποδίζει τη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου. Η αναστολή που παρουσιάζεται στο σχήμα 4.7B αφορά τις πρώτες 16 h επώασης αλλά παρόμοια ισχύουν και για τις 24 και 48 h (δεδομένα δεν παρατίθενται). Αυτή η αναστολή από τη θετικά φορτισμένη Spm βρίσκεται σε συμφωνία με αναφορές που τονίζουν τη σημασία της φόρτισης επιφανείας της POR στην καταλυτική ενεργότητα (Dahlin et al., 1999).

4.3 Μελέτη της επίδρασης της μεταχείρισης με Spm στις κυτταρικές και υποκυτταρικές δομές χλωροφυκών.

Η Spm φάνηκε να εμποδίζει την αύξηση της βιομάζας των φυκών (εικόνα 4.2) και αυτό μπορεί να έχει δύο πιθανά αίτια. Είτε τα κύτταρα νεκρώνονται από τη χορήγηση Spm, είτε η επιπρόσθετη Spm εμποδίζει τον κυτταρικό κύκλο των χλωροφυκών. Ο τελευταίος διαρκεί στα χλωροφύκη περίπου 24h και από κάθε ένα μητρικό κύτταρο μετά από μιτωτικές διαιρέσεις προκύπτουν έως 8 θυγατρικά κύτταρα τα οποία φυσιολογικά δεν σχηματίζουν κοινόβια, αλλά αποχωρίζονται. Τα χλωροφύκη σχηματίζουν ομάδες συνήθως σε συνθήκες καταπονήσεων προκειμένου να προστατευθούν ή να μετατοπισθούν σε πιο μεγάλα βάθη. Το σενάριο η Spm να σκοτώνει τα κύτταρα αποκλείστηκε καθώς απόπλυση της Spm από καλλιέργεια που είχε επωαστεί για 24h με 3 mM Spm και επώαση των κυττάρων σε διάλυμα χωρίς Spm επιτρέπει την μεγιστοποίηση της φωτοσυνθετικής τους απόδοσης μέσα σε λίγες ώρες (εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.8. Έλεγχος ζωτικότητας φυκών (C-2A' μετάλλαγμα) που μεταχειρίστηκαν για 24 h με Spm (3 mM). Η συλλογή των κυττάρων (φυγοκέντριση) και η επώασή τους σε μέσο χωρίς Spm επιτρέπει τη φυσιολογική φωτοανάπτυξη του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού και τη μεγιστοποίηση της απόδοσης του εντός λίγων μόλις ωρών.



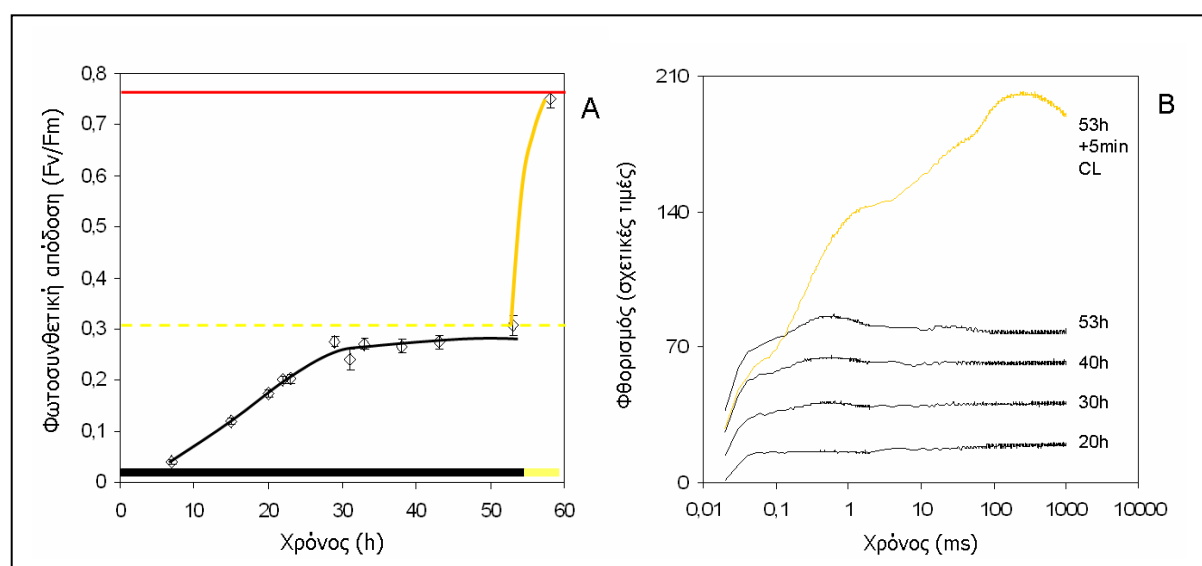
Εικόνα 4.9. Κύτταρα αγρίου τύπου (Wt) και χλωρωτικού μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* όπως φαίνονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αριστερή στήλη

: μάρτυρας, Δεξιά στήλη : + 1 mM Spm. Τα χλωροφύκη υπό φυσιολογικές συνθήκες διαιρούνται μιτωτικά και παράγουν 4-8 θυγατρικά κύτταρα τα οποία διαχωρίζονται και στη συνέχεια αυξάνουν τον όγκο τους μέχρι και αυτά με τη σειρά τους να δώσουν νέα κύτταρα. Η επιπλέον Spm φαίνεται να έχει αιχμαλωτίσει τα κύτταρα στη φάση διαχωρισμού και να μην επιτρέπει την ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου.

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξε ότι η χορήγηση Spm αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που έχουν σχηματίσει ομάδες (εικόνα 4.9). Παρά το μικρό αριθμό κυττάρων σε σχέση με το συνολικό πληθυσμό που εμφανίζουν οι φωτογραφίες οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές της γενικότερης κατάστασης καθώς στη μεταχείριση σχεδόν όλα τα κύτταρα έμοιαζαν (ύπαρξη κοινοβίων), ενώ στο μάρτυρα οι ομάδες ήταν σπάνιες (δεδομένα δεν παρατίθενται). Η παραμονή όμως εξωτερικού τοιχώματος γύρω από τα κύτταρα, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για θυγατρικά κύτταρα τα οποία δεν έχουν αποχωριστεί μετά την κυτταρική διαίρεση. Η κυτταρική ανάπτυξη δεν φαίνεται να έχει επηρεαστεί γιατί το μέγεθος των θυγατρικών κυττάρων είναι αρκετά μεγάλο.

5. Λειτουργική οργάνωση και ενεργοποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κατά τη μετάβαση από το σκοτάδι στο φως.

Τα πράσινα φύκη όπως αναφέρθηκε προηγουμένως μπορούν να συνθέτουν χλωροφύλλες και να δημιουργούν φωτοσυστήματα ακόμη και στο σκοτάδι. Σε αυτή την περίπτωση όμως η φωτοσυνθετική απόδοση δεν κατακτά υψηλές τιμές. Η μεγιστοποίηση της απόδοσης όπως εκτιμάται από την αύξηση του δείκτη F_v/F_m επιτυγχάνεται υποχρεωτικά μετά από έκθεση στο φως (εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1. Α. Η βελτίωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης μπορεί να γίνει και στο σκοτάδι (μαύρη οριζόντια γραμμή) όπως φάνηκε και στα προηγούμενα πειράματα όμως φτάνει σε ένα κατώφλι ($F_v/F_m=0.31$) το οποίο μπορεί να ξεπεράσει μόνο σε συνθήκες φωτισμού (κίτρινη διακεκομμένη γραμμή). Η φάση φωτισμού κατά την οποία το F_v/F_m αυξάνεται απότομα περιγράφεται στο κυρίως κείμενο ως η φάση λειτουργικής ενεργοποίησης. Β. Η φάση αυτή συνοδεύεται από ταχύτατες αλλαγές στην κινητική OJIP με την εμφάνιση των βημάτων I και P. Ενδεικτικά σημειώνεται ότι σε συνθήκες φωτοεξαρτώμενης βιογένεσης για να αυξηθεί ο λόγος F_v/F_m από 0.35 σε 0.70 χρειαζόνταν περίπου 3 h φωτισμού, ενώ η φάση λειτουργικής ενεργοποίησης διαρκεί μόνο μερικά λεπτά (min).

Η ένταση του φωτός παίζει σημαντικό ρόλο στην χρονική διάρκεια του φαινομένου. Η αύξηση της απόδοσης μπορεί να γίνει με ερυθρή (RL, 680 nm), αλλά όχι με υπέρυθρη ακτινοβολία (FRL, 734 nm). Επίσης, η μεγιστοποίηση της απόδοσης μπορεί να πραγματοποιηθεί, είτε ταχύτατα σε συνθήκες υψηλού φωτισμού, είτε πιο αργά σε χαμηλές εντάσεις φωτισμού (Πίνακας II). Η μεγάλη ταχύτητα της λειτουργικής οργάνωσης και

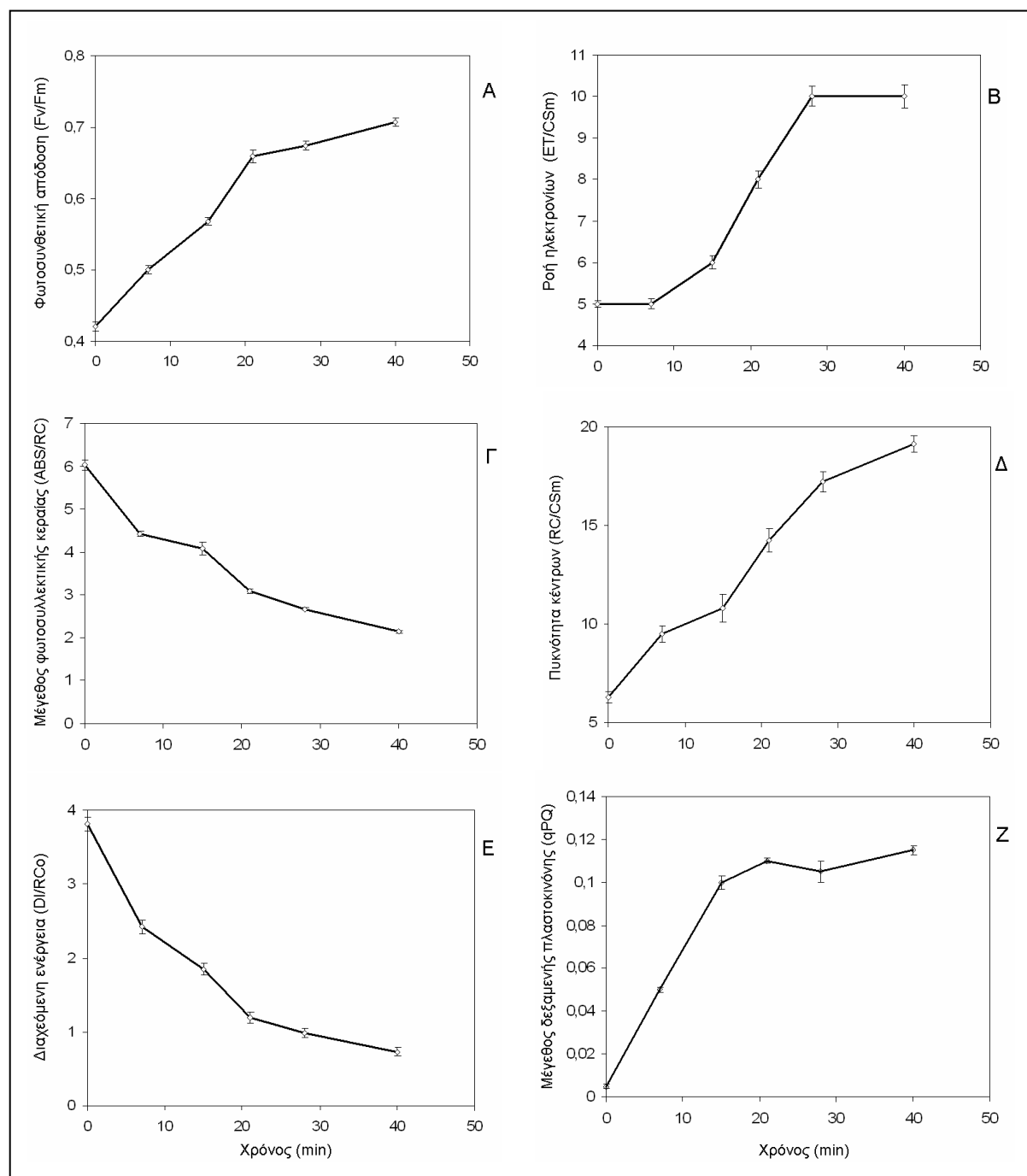
ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού την ξεχωρίζει σε σχέση με πιο βραδείας εξέλιξης φαινόμενα προσαρμογής (όπως η γνωστή φωτοπροσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού). Επίσης, ένα άλλο φαινόμενο που χρειάζεται να διακριθεί από τη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης είναι η επαγωγή της φωτοσύνθεσης. Η σταδιακή ενεργοποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού προκειμένου να αξιοποιήσει όσο το δυνατόν καλύτερα τη διαθέσιμη ακτινοβολία κατά τη μετάβαση από το σκοτάδι στο φως είναι ένα γνωστό φαινόμενο (Edwards and Walker, 1983). Η φάση προσαρμογής διαρκεί περίπου 1 με 5 min και παρατηρήθηκε σαν η περίοδος εκείνη που μεσολαβεί από την έκθεση ενός δείγματος στο φως (φύλλου, φύκους, χλωροπλαστών κλπ) μέχρι τη στιγμή που ο ρυθμός έκλυσης οξυγόνου θα μεγιστοποιηθεί. Η φάση αυτή ονομάστηκε επαγωγή της φωτοσύνθεσης (photosynthetic induction) (Walker, 1988). Σε αυτή τη φάση ο λόγος F_v/F_m δεν μεταβάλλεται (δεδομένα δεν παρατίθενται). Για να διακριθεί λοιπόν η φάση αυτή από το φαινόμενο της εικόνας 5.1 κατά την οποία ο λόγος F_v/F_m αλλάζει, χρησιμοποιήθηκε ο περιγραφικός όρος 'φάση λειτουργικής ενεργοποίησης'. Τελικά η ειδοποιός διαφορά ανάμεσα στα δύο φαινόμενα είναι ότι στη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης παρατηρείται σημαντική βελτίωση (>100%) της φωτοσυνθετικής απόδοσης. Ουσιαστικά πρόκειται για τη φάση όπου τα ήδη δημιουργημένα κέντρα αντίδρασης ενεργοποιούνται.

Πίνακας II. Χρόνος που απαιτείται για την μεγιστοποίηση της φωτοσυνθετικής απόδοσης (αύξηση από την τιμή F_v/F_m : 0.35 στη τιμή 0.70) για φωτοσυνθετικό μηχανισμό που σχηματίστηκε στο απόλυτο σκοτάδι.

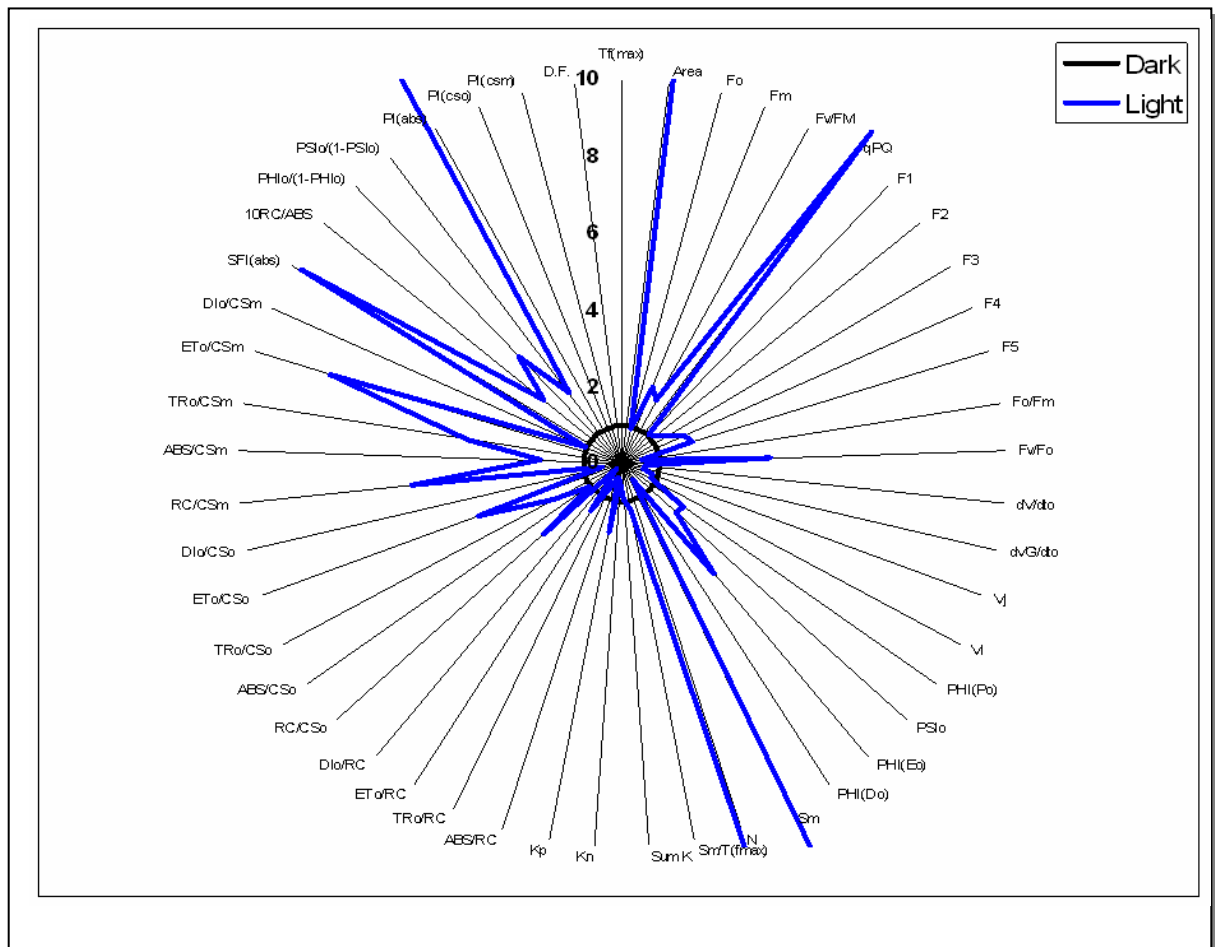
Ένταση ($\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Διάρκεια λειτουργικής ενεργοποίησης (min)
10	60
1000	5

Όπως φαίνεται από τον πίνακα II, ο ελάχιστος χρόνος που μπορεί να διαρκέσει το φαινόμενο είναι μόλις 5 min συνεπώς δεν μπορεί να εμπλέκεται *de novo* σύνθεση πρωτεϊνών. Η βελτίωση πιθανότατα έχει να κάνει με την οργάνωση των ήδη υπάρχοντων συστατικών. Η κινητική χρόνου για τους παράγοντες που αφορούν το μέγεθος της φωτοσυνθετικής κεραίας του PS II ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης ABS/RC, την παγιδευόμενη ενέργεια ανά διεγερόμενο κέντρο αντίδρασης (TRo/RC), την κατάσταση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων ανά διεγερόμενο τομέα (ETo/CSm), την διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης που δεν καταλήγει στη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης (DTo/RC) και τον αριθμό των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CSm) παρουσιάζονται στην εικόνα 5.2, ενώ στο

ιστόγραμμα της εικόνας 5.3 φαίνονται όλοι οι παράγοντες μοριακής δομής και λειτουργικής



Εικόνα 5.2 Α. Κινητικές της μεταβολής της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κατά τη φάση της λειτουργικής του ενεργοποίησης. Χλωροφύκη αγρίου τύπου (*Scenedesmus obliquus*) αναπτύχθηκαν απουσία φωτός και εμφάνισαν χαμηλή φωτοσυνθετική απόδοση ($Fv/Fm \approx 0,4$) και εκτέθηκαν σε σχετικά χαμηλό φωτισμό ($10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ώστε να επιτραπεί η καλύτερη παρακολούθηση του φαινομένου. Α. Η φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm). Β. Η μεταβολή της γραμμικής μεταφοράς ηλεκτρονίων από το PS II στο PS I ανά διεγερόμενο τομέα (ET_0/CSm). Γ. Η μεταβολή του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ABS/RC. Δ. Η μεταβολή στην πυκνότητα των ενεργών κέντρων (RC/CSm). Ε. Η μεταβολή της μη φωτοχημικής διαχεόμενης ενέργειας (Di_0/RC). Ζ. Το μέγεθος της δεξαμενής της πλαστοκινόνης.



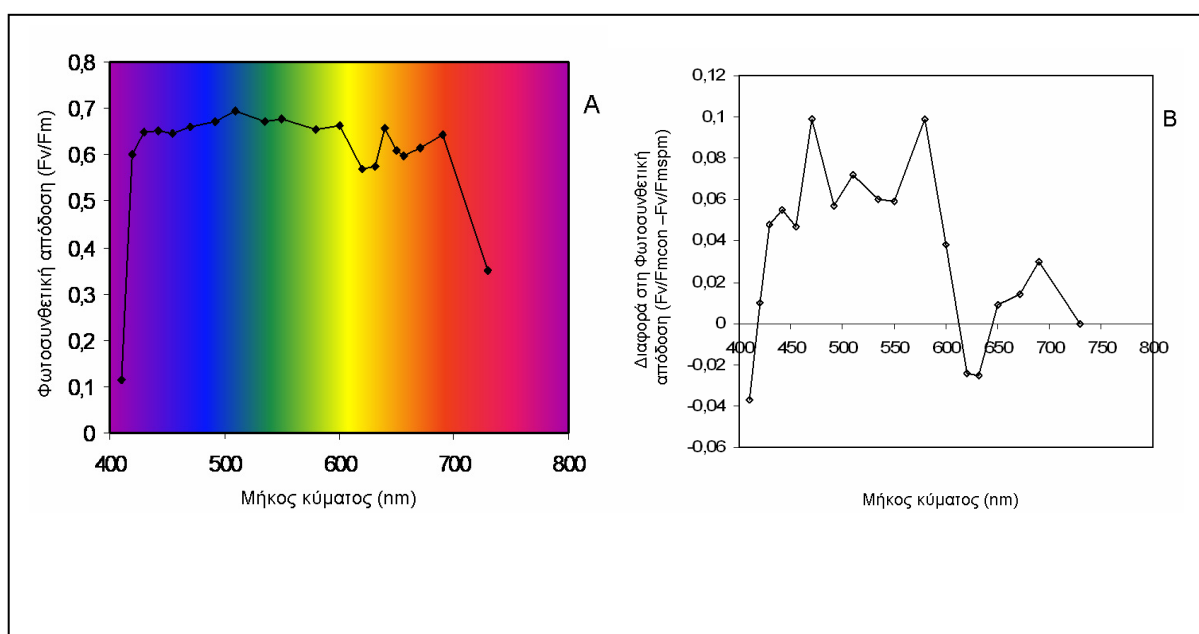
Εικόνα 5.3. Διαφοροποίηση σειράς παραμέτρων της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κατά τη φάση λειτουργικής ενεργοποίησής του. Οι τιμές σε συνθήκες φωτισμού εμφανίζονται σαν ποσοστό των αντίστοιχων τιμών στο σκοτάδι. Για λόγους ευκρίνειας η κλίμακα περιορίστηκε στο 10πλάσιο των τιμών του μάρτυρα, ενώ οι τιμές που δεν φαίνονται λόγω μεγέθους είναι $Tf_{max}=17.9$, $Area=88.57$, $Sm=21.7$, $N=16$, $PI(abs)=23.4$, $PI(cso)=24.6$, $PI(csm)=49.5$ και $DF=38.4$. (Για επεξήγηση των συντομογραφιών βλέπε μεθόδους).

οργάνωσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μετά την ανάλυση του JIP-TEST (Strasser and Strasser, 1995). Το διάγραμμα της εικόνας 5.3 δείχνει ότι εντός 5 min φωτισμού συμβαίνουν δραματικές αλλαγές σε ότι αφορά την λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Άρα, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός δεν είναι οργανωμένος στο σκοτάδι, αλλά ρυθμίζει ανάλογα με τις συνθήκες φωτισμού την οργάνωση του και ως εκ τούτου και την απόδοσή του. Παρατηρούμε, ότι το μέγεθος της κεραίας ανά κέντρο αντίδρασης μειώνεται, πράγμα που δηλώνει ότι πολλά κέντρα αντίδρασης ρυθμίζουν το μέγεθος της κεραίας τους προκειμένου να μεγιστοποιήσουν τη ροή ηλεκτρονίων προς το PS I (αύξηση ETo/CSm) διατηρώντας ταυτόχρονα σε χαμηλά επίπεδα την διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο

αντίδρασης (D1o/RC). Η μείωση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC) μπορεί να οφείλεται σε δύο παράγοντες, είτε στη μείωση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHC II) ανά κέντρο αντίδρασης, είτε στην αύξηση των ενεργών κέντρων αντίδρασης ανά διεγερόμενο τομέα. Τα φυσικοχημικά δεδομένα δείχνουν μία αύξηση των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CSm). Τέλος μία αύξηση του μεγέθους της δεξαμενής της πλαστοκινόνης που συμμετέχει στην μεταφορά των ηλεκτρονίων από την αναγωγική πλευρά του PS II (qPQ) προς το κυτόχρωμα b_6f δείχνει να παίζει κεντρικό ρόλο στο φαινόμενο (εικόνα 5.2). Προκειμένου να μελετηθεί ο πρωτογενής υποδοχέας ο οποίος ευθύνεται για το φαινόμενο, πραγματοποιήθηκε το φάσμα δράσης (ενότητα 5.2).

5.1 Φάσμα δράσης της διαδικασίας λειτουργικής ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

Η φάση λειτουργικής ενεργοποίησης φάνηκε ότι εξαρτάται άμεσα από φως. Μάλιστα η ταχύτητα ολοκλήρωσης του φαινομένου είναι αντιστρόφως ανάλογη της έντασης φωτισμού (πίνακας II και δεδομένα που δεν παρατίθενται). Ποιος είναι όμως ο πρωτογενής φωτοϋποδοχέας που ευθύνεται για την φωτοενεργοποίηση. Χρησιμοποιώντας μονοχρωματικές πηγές φωτός πραγματοποιήθηκε το φάσμα δράσης για το φάση λειτουργικής ενεργοποίησης σε μονοκύτταρα φύκη. Δοκιμάστηκαν 20 διαφορετικές ποιότητες απόλυτα μονοχρωματικής ακτινοβολίας που καλύπτουν όλο το ορατό φάσμα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 5.4A.



Εικόνα 5.4 A. Φάσμα δράσης για την φάση λειτουργικής ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε χλωροφύκη *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν στο απόλυτο σκοτάδι. Χρησιμοποιήθηκαν 20 διαφορετικές εντάσεις φωτισμού (βλ. υλικά και μέθοδοι) σε ένταση $10 \mu\text{mol quantum}^{-2} \text{s}^{-1}$. Η υπέρυθρη ακτινοβολία (730nm) και η κυανή (410nm) αποδείχθηκαν οι πιο ακατάλληλες για την λειτουργική ενεργοποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, ενώ το μεγαλύτερο μέρος από το ορατό φως επιτρέπει την εξέλιξη του φαινομένου. B. Η επίδραση της Spm στο φάσμα δράσης της λειτουργικής ενεργοποίησης. Παρουσιάζεται η διαφορά από το μάρτυρα η οποία αποκαλύπτει τη επίδραση της Spm σε ένα υποδοχέα κυανής κυρίως ακτινοβολίας.

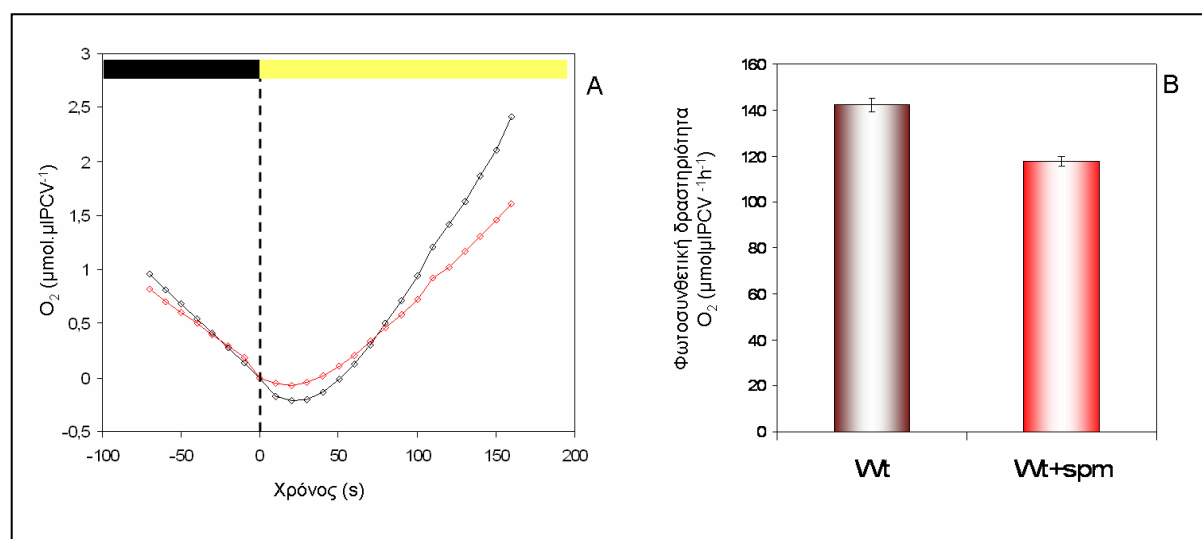
Η διαδικασία της λειτουργικής ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αποκρίθηκε στον ίδιο βαθμό στα περισσότερα από τα μήκη κύματος που δοκιμάστηκαν.

Εξαιρέση αποτελούν τα 410nm και τα 730nm. Το φάσμα δράσης δείχνει ξεκάθαρα ότι ο πρωτογενής φωτοϋποδοχέας είναι το σύνολο του λειτουργικού φωτοσυνθετικού μηχανισμού και είναι όμοιο με το φάσμα δράσης της φωτοσυνθετικής απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Emerson, 1958)

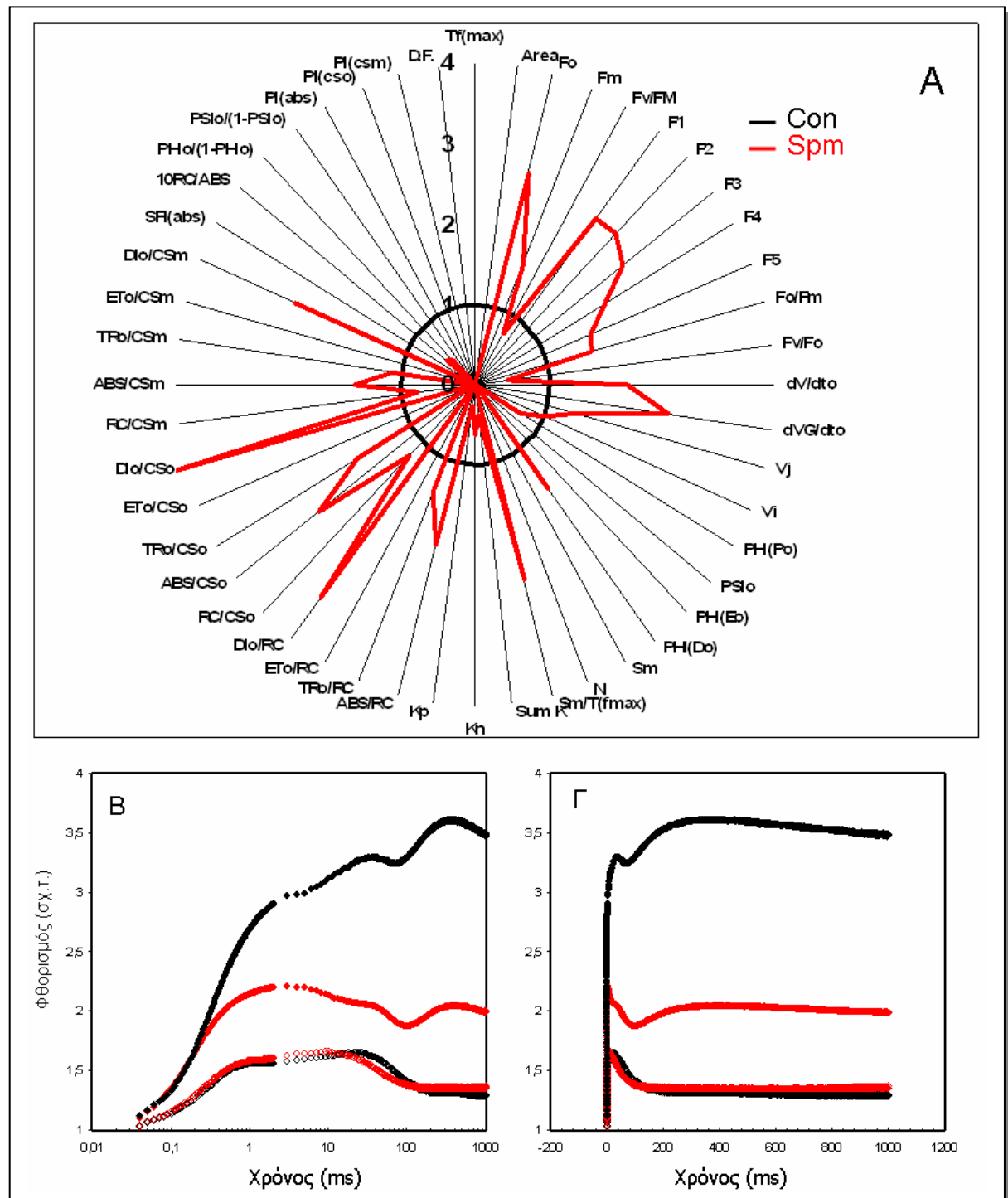
Η επανάληψη του πειράματος με καλλιέργειες στις οποίες έχει προστεθεί Spm και η δημιουργία ενός φάσματος δράσης της διαφοράς $Fv/Fm_{(μάρτυρα)} - Fv/Fm_{(+Spm)}$ (Εικόνα 5.4B) δείχνει ότι η χορηγούμενη Spm εμποδίζει τη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης και φαίνεται ότι εμποδίζει έναν υποδοχέα που απορροφά πιο έντονα στα 400 έως 600nm καθώς και γύρω από τα 675 nm (εικόνα 5.4B). Η ταυτότητα του υποδοχέα δεν είναι σαφής, αλλά μια συνεισφορά στις ζώνες 400-500nm και 650-700 της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII δεν μπορεί να αποκλειστεί. Δηλαδή το φως και ιδίως η συλλογή του ενεργοποιεί το PS II, ενώ η Spm εμποδίζει την ενεργοποίησή του PS II πιθανόν λόγω επίδρασης στην κεραία.

5.2 Η επίδραση της Spm στην φάση λειτουργικής ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Για να μελετηθεί η επίδραση των αυξημένων ενδοκυτταρικά επιπέδων Spm στη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χορηγήθηκε 1 mM Spm σε φύκη στο απόλυτο σκοτάδι. Μια καλλιέργεια με κλασικό θρεπτικό μέσο χωρίς επιπρόσθετη Spm χρησίμευσε ως μάρτυρας (control). Στην εικόνα 5.5 παρουσιάζεται η επίδραση της αυξημένης Spm στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (μέγιστη τιμή και φάση φωτοσυνθετικής επαγωγής), ενώ στην εικόνα 5.6 παρουσιάζεται η επίδραση στην κινητική OJIP. Η τεχνητή αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Spm φαίνεται να εμποδίζει την εξέλιξη της ενεργοποίησης αυτής, τόσο στο μέγιστο ρυθμό έκλυσης οξυγόνου (εικόνα 5.5B), όσο και στις επιμέρους παραμέτρους δομής και οργάνωσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (εικόνα 5.6B).



Εικόνα 5.5 Φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε φύκη που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι κατά τα πρώτα λεπτά φωτισμού. A. Τα φύκη που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι ακτινοβολούνται για 3 min με $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και καταγράφεται η έκλυση οξυγόνου στα φύκη που εξωγενώς είχε προστεθεί 1mM Spm (κόκκινο) ή 0 mM (μάρτυρας: μαύρο). B. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα διορθωμένη για την αναπνοή και αναγμένη ανά μL βιομάζας PCV. Η επιπρόσθετη Spm φαίνεται να μειώνει τη μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα.

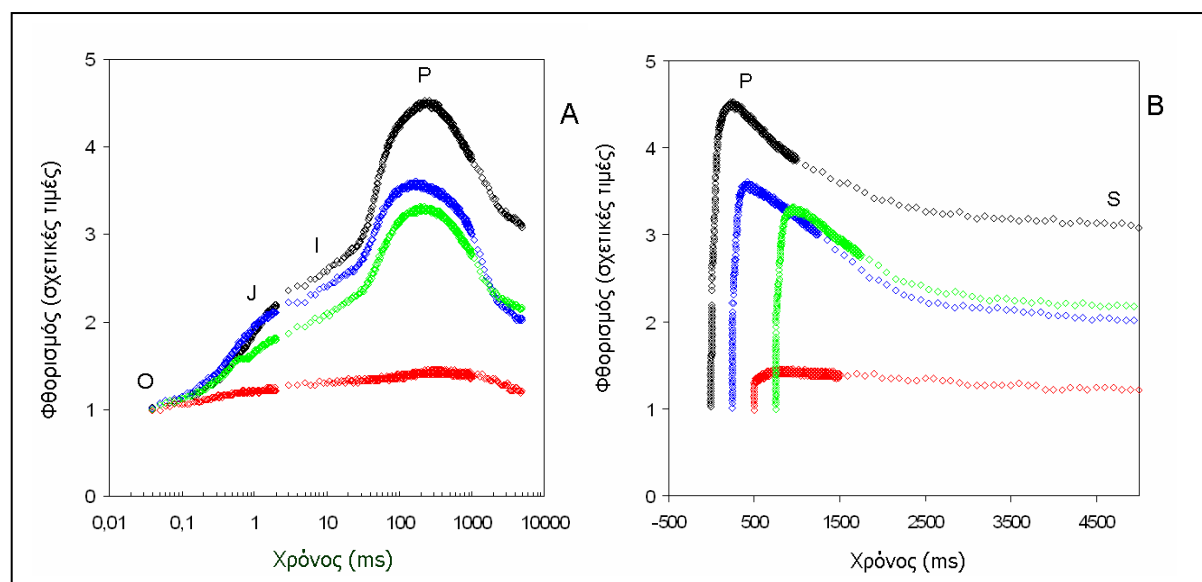


Εικόνα 5.6 Η επίδραση της *Spm* σε χλωροφύκη *Scenedesmus obliquus* κατά τη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης. Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού πριν (ανοιχτοί ρόμβοι) και μετά (κλειστοί ρόμβοι) τη λειτουργική ενεργοποίηση για τη μεταχείριση με 1 mM *Spm* (κόκκινο) και το μάρτυρα (μαύρο) (B, Γ). (A) Ιστόγραμμα των παραμέτρων του JIP-test. Οι τιμές των δεικτών για τη μεταχείριση *Spm* (κόκκινο) παρουσιάζονται σαν ποσοστό των τιμών του μάρτυρα (μαύρο). Οι δείκτες που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ποσοστιαία διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα είναι οι DiO/RC και DiO/CS που αντιστοιχούν στην διάχυση της ενέργειας είτε σε επίπεδο κέντρου αντίδρασης, είτε σε επίπεδο διεγερμένου τομέα.

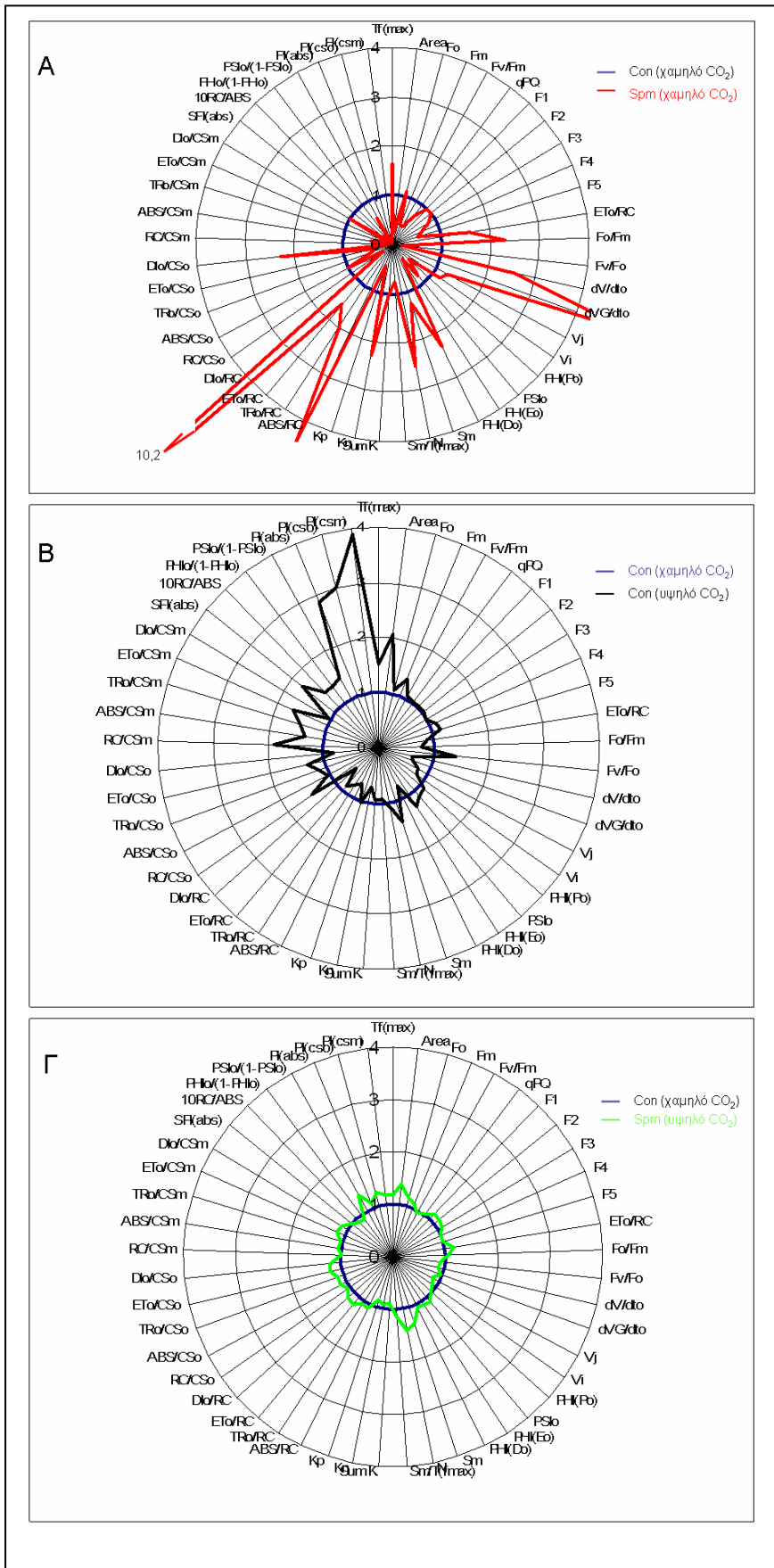
Ιδιαίτερη αύξηση παρατηρείται στους δείκτες διάχυσης της ενέργειας που συλλέγει το φωτοσύστημα II (PS II), τόσο σε επίπεδο κέντρου αντίδρασης (D1o/RC), όσο και σε επίπεδο συνολικού διεγειρομένου τομέα (D1o/CSo). Με δεδομένο ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις CO₂ ενισχύουν τον κύκλο των Calvin-Benson και επιτρέπουν αυξημένη φωτοχημική αξιοποίηση του φωτός και περιορίζουν τη μη φωτοχημική χρήση του (Logothetis et al., 2004), δρομολογήθηκαν πειράματα συνδυασμού Spm και χαμηλής ή υψηλής συγκέντρωσης CO₂.

5.3. Η επίδραση της Spm στη λειτουργική ενεργοποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε συνθήκες υψηλού διοξειδίου του άνθρακα.

Καλλιέργειες μικροφυκών *Scenedesmus obliquus* που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι και εμφάνιζαν φωτοσυνθετική απόδοση $F_v/F_m=0.35$ (δηλαδή την πιο υψηλή τιμή για τις δεδομένες συνθήκες) χωρίστηκαν σε 4 θυγατρικές καλλιέργειες και στις δυο από αυτές χορηγήθηκε Spm. Μετά την χορήγηση Spm οι καλλιέργειες παρέμειναν για 12 h στο σκοτάδι και στη συνέχεια μελετήθηκε η λειτουργική ενεργοποίηση του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού στο φως παρουσία υψηλής ή χαμηλής συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, οι τέσσερις καλλιέργειες περιείχαν α) Spm (1mM και αέριο μίγμα 0.035% CO₂, β) Spm 1 mM και αέριο μίγμα 10% CO₂, ενώ για μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες που εκτέθηκαν σε υψηλό 10% CO₂ (γ) ή σε χαμηλό 0.035% CO₂ (δ) χωρίς εξωγενή Spm (για περισσότερες πληροφορίες βλέπε εικόνα 5.7 και 5.8). Η λειτουργική κατάσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των μικροφυκών μελετήθηκε με τη καταγραφή των κινητικών OJIP ανά τακτά χρονικά διαστήματα για περισσότερο από ότι συνήθως (72 h) επειδή η μεταχείριση με Spm σε χαμηλό διοξείδιο εμφάνιζε μεγάλη καθυστέρηση στη λειτουργική ενεργοποίηση. Στην εικόνα 5.7 παρουσιάζονται οι κινητικές OJIP που καταγράφηκαν 48 h μετά από τη στιγμή που οι καλλιέργειες εκτέθηκαν στο φως. Η παρουσία με τη μορφή ιστογράμματος



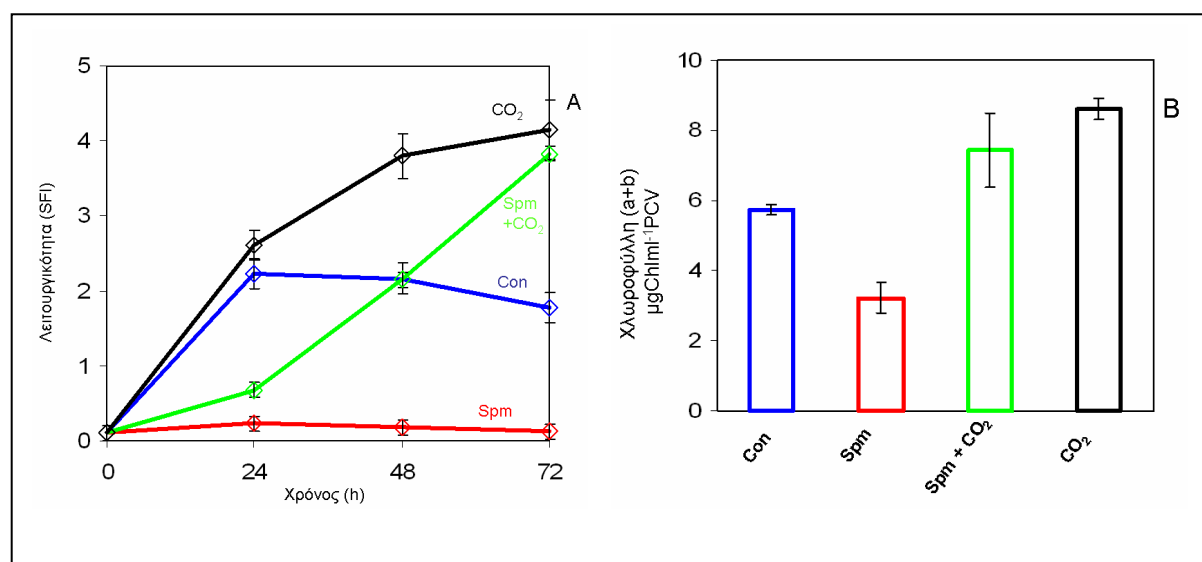
Εικόνα 5.7. Η επίδραση της εξωγενώς χορηγούμενης Spm στις κινητικές OJIP σε συνθήκες χαμηλής ή υψηλής συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα. Α. Η επίδραση των μεταχειρίσεων στην κινητική OJIP μετά από 48h επώαση. Β. Η επίδραση στη φάση αργής μείωσης του φθορισμού (P-S). Συμβολισμοί 1mM Spm + αέρας χαμηλής περιεκτικότητας (0.035%) σε CO₂: κόκκινο, μάρτυρας σε αέρα χαμηλής περιεκτικότητας (0.035%) σε CO₂: κυανό, 1mM Spm + αέρας υψηλής περιεκτικότητας σε διοξείδιο (10%): πράσινο, μάρτυρας σε αέρα υψηλής περιεκτικότητας (10%) σε CO₂: μαύρο.



Εικόνα 5.8. Ιστογράμματα των παραγόντων του JIP-test σαν ποσοστά του μάρτυρα που επώαστηκε σε φυσικό μείγμα διοξειδίου (0.035% CO₂). A. Επίδραση της μεταχείρισης με Spm (1 mM) σε χαμηλό διοξείδιο (0.035% CO₂) στην λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Παρατηρούνται πολύ μεγάλες αυξήσεις στο D10/RC που φανερώνουν αυξημένες απώλειες της απορροφώμενης ενέργειας. B. Επίδραση του αυξημένου διοξειδίου (10% CO₂) στη λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με πρόσφατη εργασία της ερευνητικής μας ομάδας όπου φάνηκε ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις διοξειδίου βοηθούν την λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και συσχετίστηκαν με τη αύξηση του λόγου Put/Spm στις θυλακοειδείς μεμβράνες (Logothetis et al., 2004). Γ. Επίδραση της μεταχείρισης με Spm σε συνθήκες υψηλού διοξειδίου (1mM Spm + 10% CO₂). Χρησιμοποιείται η ίδια κλίμακα με τα δύο προηγούμενα ιστογράμματα για ευκολότερη σύγκριση. Είναι φανερό ότι ο συνδυασμός επιπλέον Spm και επιπλέον διοξειδίου αλληλοαντίρρεσε μετά από 48 h τα αντίθετα αποτελέσματα και οι διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα ελαχιστοποιήθηκαν. (Παρατηρούμε ότι η πράσινη τεθλασμένη γραμμή τείνει να συμπίσει με τον κύκλο για τους δεκάδες παράγοντες που μελετήθηκαν).

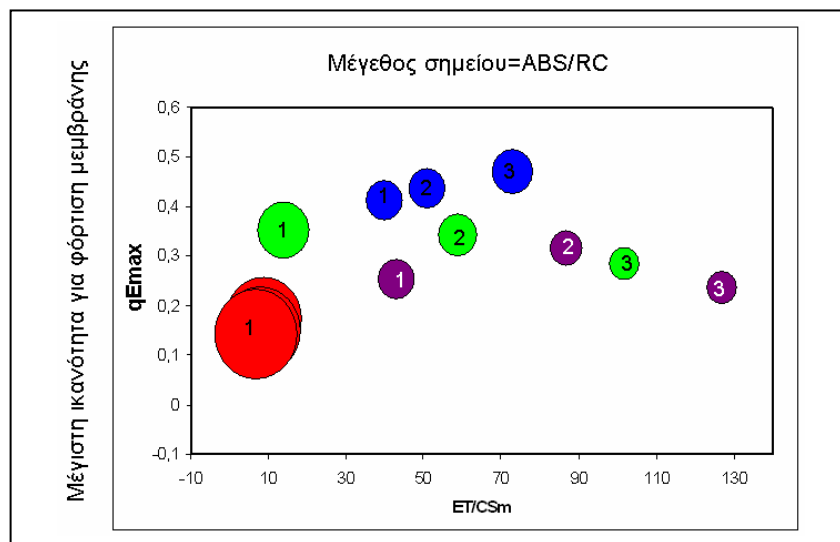
όλων των φυσικοχημικών παραμέτρων που αφορούν στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (εικόνα 5.8) επιτρέπει την ευκολότερη σύγκριση μεταξύ των μεταχειρίσεων αλλά και ως προς τον μάρτυρα (κύκλος). Από την εποπτική μελέτη διακρίνεται με ευκολία ότι η μεταχείριση με Spm (εικόνα 5.8A) προκάλεσε κυρίως αύξηση του παράγοντα DIO/RC, ενώ η προσθήκη επιπλέον CO₂ (εικόνα 5.8B) μείωσε την διάχυση της ενέργειας στα PS II και αύξησε τους δείκτες λειτουργικότητας PI.

Τέλος, ο συνδυασμός Spm και υψηλού CO₂ (εικόνα 5.8Γ) οδήγησε σε ενδιάμεσες τιμές και πλησίασε το μάρτυρα (το ιστόγραμμα σχεδόν ταυτίζεται με τον κύκλο που συνδέει τις τιμές του μάρτυρα). Πιο συγκεκριμένα η αυξημένη Spm φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PS II και να επιβάλλει προσαρμογές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού οι οποίες συνηθίζονται σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού. Αυτό συμφωνεί με προηγούμενες αναφορές όπου οι συνθήκες χαμηλού φωτισμού αυξάνουν το ποσό Spm ή το λόγο Spm/Put (Kotzabasis et al., 1999). Αντίθετα το αυξημένο διοξείδιο του άνθρακα επιβάλλει αλλαγές στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό ανάλογες με εκείνες των συνθηκών του υψηλού φωτισμού (Logothetis et al., 2004). Τελικά έχουμε δυο αλληλοσυγκρουόμενες τάσεις στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό όπου η μεταχείριση με συνδυασμό Spm και 10% CO₂ οδηγεί τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ανάμεσα στις δύο ακραίες καταστάσεις (+Spm) και (+10% CO₂) (βλ. εικόνα 5.9A).



Εικόνα 5.9. Α. Η επίδραση της αυξημένης ενδοκυτταρικής Spm στη λειτουργικότητα (SFII) του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε συνθήκες χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης CO₂ (συμβολισμός όπως στη εικόνα 5.6) για 72 h μετά την έκθεση στο φως. Η Spm (1mM, κόκκινο χρώμα) φαίνεται ότι μειώνει τη λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης διοξειδίου, ενώ η αύξηση του διαθέσιμου CO₂ ακυρώνει την παρεμπόδιση από τη Spm (1mM Spm + 10% CO₂, πράσινο χρώμα) Β. Η επίδραση της Spm στα επίπεδα χλωροφύλλης (a+b) σε χλωροφύκη *Scenedesmus obliquus* που επωάστηκαν για 72 h μετά την έκθεση στο φως σε συνθήκες υψηλής Spm χαμηλού CO₂ και υψηλής Spm υψηλού CO₂ καθώς και στους αντίστοιχους μάρτυρες.

Δηλαδή αρχικά παρατηρείται μια μεγαλύτερη κεραία ανά κέντρο αντίδρασης από ότι απαιτούν οι συνθήκες φωτισμού (λόγω της επίδρασης της Spm βλ. εικόνα 5.9 μέγεθος κόκκινου κύκλου με αριθμό 1 και πράσινου 1) και στην πορεία του χρόνου μειώνεται η κεραία (λόγω επίδρασης του αυξημένου διοξειδίου βλ. εικόνα 5.9 μέγεθος πράσινου κύκλου 1, 2, 3) που επιτρέπει την προσαρμογή στις συγκεκριμένες συνθήκες. Όταν δεν υπάρχει αυτή



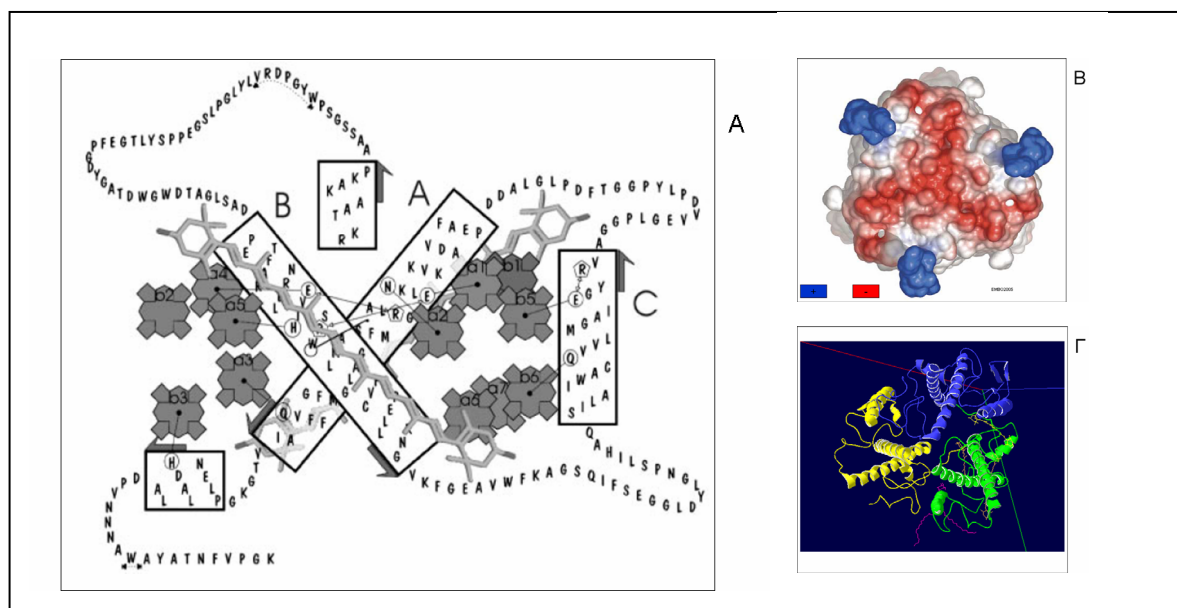
Εικόνα 5.10. Επίδραση της Spm και υψηλού CO₂ σε μονοκύτταρα χλωροφύκη κατά τη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης. Το μέγεθος των σημείων αντιστοιχεί στο μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (παράγοντας ABS/RC), ο κατακόρυφος άξονας ποσοτικοποιεί την φόρτιση της μεμβράνης των θυλακοειδών [παράγοντας $qEmax=(Fm-F_{68})/Fm$, Strasser et al., 1999] και ο οριζόντιος άξονας ποσοτικοποιεί τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων (παράγοντας ET/CSm). Οι αριθμοί εντός των κύκλων αντιπροσωπεύουν την ημέρα που έγινε η μέτρηση. Κόκκινο (+Spm, 0.035% CO₂), πράσινο (+Spm, 10% CO₂), κυανό (0.035% CO₂) και μαύρο (10% CO₂)

η επιπλέον πίεση από την υψηλή συγκέντρωση διοξειδίου, τότε δεν θα έχουμε προσαρμογή (περίπτωση 1 mM Spm, κόκκινοι κύκλοι). Άρα αν το φύκος δεν προσαρμόσει την κεραία του φωτοσυνθετικού του μηχανισμού φαίνεται πως η διάχυση της διαθέσιμης ενέργειας μεγιστοποιείται εις βάρος της φωτοχημείας και οδηγούμαστε σε μειωμένη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων ET/CSm Εικόνα 5.10 κόκκινοι κύκλοι).

Δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης συνδέουν την δράση της Spm με τη φωτοσυλλεκτική κεραία. Ο ένας είναι το φάσμα δράσης παρουσία περίσσειας Spm (εικόνα 5.4B) και ο δεύτερος η αυξημένη διάχυση (δείκτες DI) που είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται στην κεραία (ενότητες 3, 4 και 5.4). Από τα παραπάνω ανακύπτει η ανάγκη να μελετηθεί ο ρόλος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας κατά τη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης, αλλά και να μελετηθεί η επίδραση των αυξημένων ενδοκυτταρικών επιπέδων Spm.

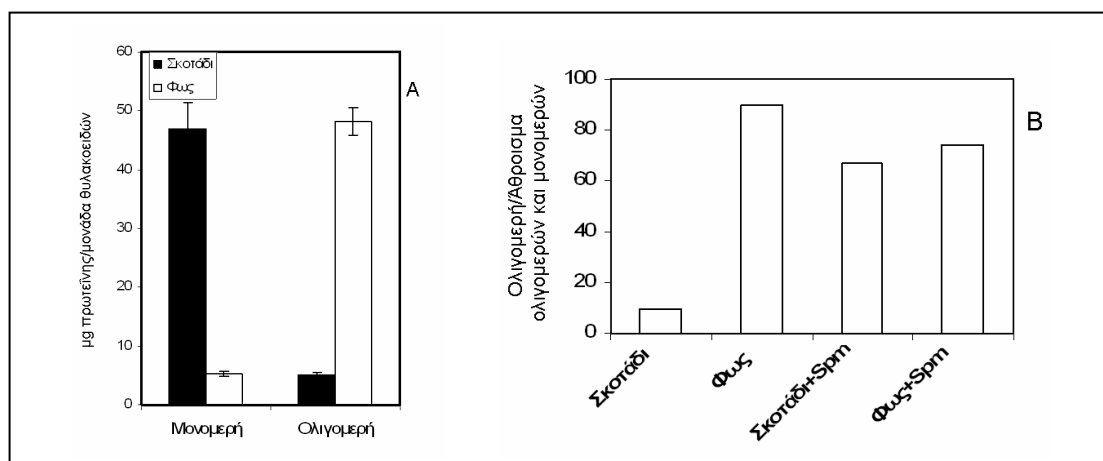
5.4. Η συμμετοχή της φωτοσυλλεκτικής κεραίας κατά τη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης και ο ρόλος των πολυαμινών.

Η φωτοσυλλεκτική κεραία (σε χλωροφύκη και σε ανώτερα φυτά) αποτελείται από διαφορετικά πεπτίδια τα οποία όμως εμφανίζουν μεγάλη ομολογία. Κοινό χαρακτηριστικό τους –εκτός του ότι φέρουν chl a, chl b και καροτενοειδή- είναι οι τρεις διαμεμβρανικές α έλικες (εικόνα 5.10), ενώ το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ 24 και 30kD.



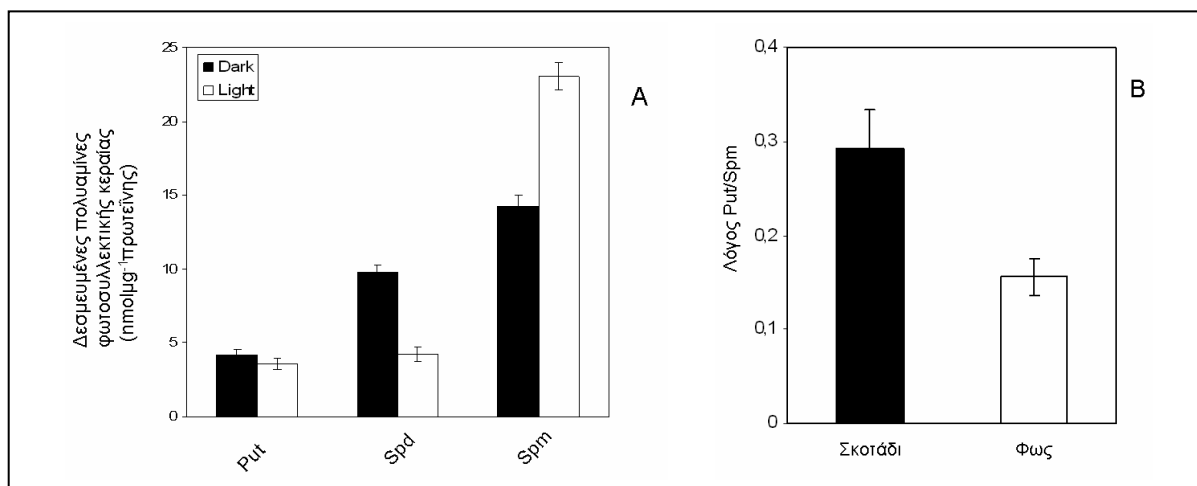
Εικόνα 5.11. Μοντέλο της οργάνωσης του LHCII όπως εκτιμάται από δομικά δεδομένα (τροποποιημένο από Remelli et al., 2004). Είναι ορατές πέντε α έλικες (ορθογώνια πλαίσια) από τις οποίες οι τρεις μεγαλύτερες (A, B, C) είναι διαμεμβρανικές. Αξιοσημείωτη είναι η διάταξη των χλωροφυλλών (έντονο γκριζο) σε δύο στιβάδες παράλληλες προς τη λιπιδική διπλοστιβάδα. B. Το τριμερές LHC II και τα φορτία επιφανείας (από Standfuss et al., 2005). Γ. Η οργάνωση των τριμερών LHC II σε σπανάκι. Με κίτρινο, κυανό και πράσινο χρώμα είναι ορατά τα μονομερή. Η εικόνα δημιουργήθηκε με δεδομένα των Liu et al., 2004 στο πρόγραμμα Swiss-Pdb view 3.7V.

Η φωτοσυλλεκτική κεραία μπορεί να αποκτήσει διάφορα μεγέθη, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις για να αυξηθεί το μέγεθος είναι απαιτούμενος ο ολιγομερισμός των πρωτεϊνών που την αποτελούν (κυρίως τριμερή LHC II, αλλά και ετεροδιμερή LHC II με CP26 ή με CP29, ή με CP24). Συνήθως σε PS II με μεγάλη κεραία τα πολυπεπτίδια της κεραίας (LHC II, CP29, CP26, CP24) εμφανίζουν μεγάλο βαθμό ολιγομερισμού, ενώ σε PS II με μικρή κεραία τα πολυπεπτίδια εμφανίζουν μικρότερο βαθμό ολιγομερισμού (Logothetis et al., 2004, Theodoridou et al., 2003). Στα φύκη που αναπτύσσονται στο σκοτάδι η κεραία φαίνεται να αποτελείται κυρίως από μονομερή (εικόνα 5.12).



Εικόνα 5.12. Μεταβολές στα μονομερή και ολιγομερή του LHC που συμμετέχουν στο σχηματισμό της φωτοσυλλεκτικής κεραίας σε μονοκύτταρα χλωροφύκη *Scenedesmus obliquus* κατά τη λειτουργική ενεργοποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. A. Τα μονομερή που υπάρχουν στο σκοτάδι οργανώνονται (διμερίζονται ή τριμερίζονται) συνεπώς από τη μία μειώνεται το ποσό (μg πρωτεΐνης/600 μg Chls θυλακοειδών) των μονομερών (σύγκριση μαύρης με λευκή στήλη με υπότιτλο Μονομερή) και από την άλλη αυξάνεται το ποσό των ολιγομερών (στήλες με υπότιτλο Ολιγομερή). B. Επίδραση της Spm στο βαθμό ολιγομερισμού των CPs, σε χλωροφύκη που μεταχειρίστηκαν με 1 mM Spm πριν (Σκοτάδι) και μετά (Φως) τη λειτουργική ενεργοποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η βιοχημική απομόνωση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHC) έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των *Argyroudi-Akoyonoglou και Thomou (1981)*.

Πολύ γρήγορα όμως (εντός 10 min φωτισμού, $500 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) τα μονομερή οργανώνονται σε τριμερή (εικόνα 5.12). Οι συνολικές πολυαμίνες που βρίσκονται προσδεμένες στο LHC αυξάνονται στη διάρκεια αυτής της φάσης (εικόνα 5.13A). Η αύξηση οφείλεται κυρίως στην πρόσδεση Spm. Συγκεκριμένα η Srd μειώνεται 50%, η Spm αυξάνεται 50% και η Put μένει περίπου σταθερή. Αυτό συμφωνεί με πρόσφατα αποτελέσματα των *Dela Mea et al. (2004)* όπου δείχνουν ότι ειδική χλωροπλαστική τρανσγλουταμινάση προσδένει κατά προτίμηση Spm στα πεπτίδια του συμπλόκου συλλογής φωτός και μάλιστα με φωτοεξαρθώμενο τρόπο. Η τεχνητή αύξηση της Spm στο σκοτάδι προκαλεί αύξηση του βαθμού ολιγομερισμού ο οποίος δεν μεταβάλλεται παρουσία φωτός (εικόνα 5.12B).



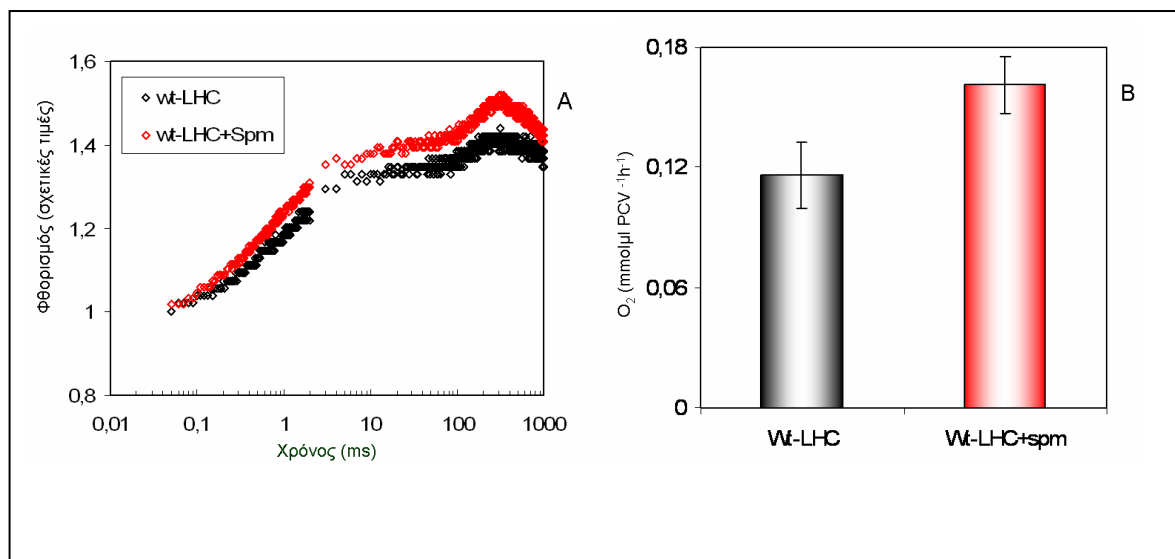
Εικόνα 5.13. Α. Πολυαμίνες (*Put*, *Spd* και *Spm*) δεσμευμένες στη απομονωμένη φωτοσυλλεκτική κεραία (LHC του PSII) που απομονώθηκε πριν (σκοτάδι) και μετά (φως, 500 $\mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) την λειτουργική ενεργοποίηση χλωροφυκών διάρκειας 10 min. Β. Η μεταβολή του λόγου *Put* προς *Spm* (*Put/Spm*) κατά τη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης.

Αν η κεραία συμμετέχει στη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και μάλιστα οι πολυαμίνες (*Spm*) παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση μέσω της δράσης τους στην κεραία θα πρέπει σε φωτοσυνθετικό μηχανισμό χωρίς φωτοσυλλεκτική κεραία να ακυρώνεται η δράση των πολυαμινών.

Εφόσον η αύξηση της διάχυσης (ενότητα 5.1. και 5.2) και η διατήρηση χαμηλής φωτοσυνθετικής απόδοσης (ενότητα 5.1) συνδυάστηκε με αυξημένο μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανά κέντρο αντίδρασης σχεδιάστηκαν πειράματα με μεταλλάγματα χωρίς φωτοσυλλεκτική κεραία. Το μετάλλαγμα Wt-LHC του *S. obliquus* δεν συνθέτει χλωροφύλλη b και ως εκ τούτου δεν μπορεί να συνθέσει τα LHC πολυπεπτίδια που δομούν την φωτοσυλλεκτική κεραία του PSII (Hermsmeier et al., 1994). Αυτό το μετάλλαγμα αποτέλεσε ένα πολύτιμο πειραματικό μοντέλο για την κατανόηση του τρόπου δράσης της *Spm*. Ακολουθώντας παρόμοιο πρωτόκολλο εργασίας με τα πειράματα στον άγριο τύπο αυξήσαμε τα ενδοκυτταρικά επίπεδα *Spm* και παρακολουθήσαμε την φάση λειτουργικής προσαρμογής του μεταλλαγμένου φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το μετάλλαγμα αυξάνει την φωτοσυνθετική του απόδοση (F_v/F_m) κατά την μετάβαση από το σκοτάδι στο φως στον ίδιο βαθμό παρουσία ή απουσία εξωγενούς *Spm* (εικόνα 5.14AB).

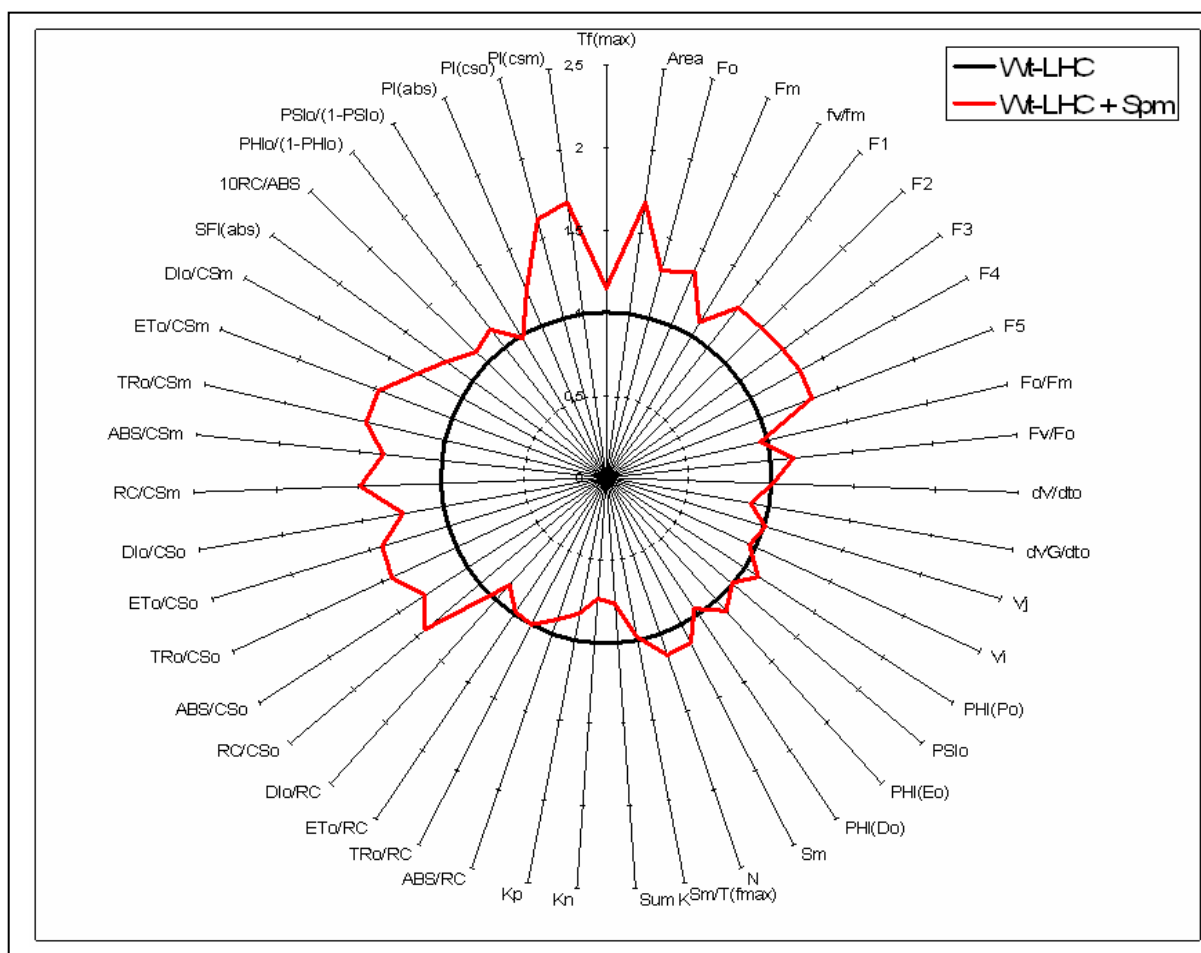
Επίσης, είναι φανερό ότι οι μετρήσεις σειράς φυσικοχημικών παραγόντων που εκτιμούν τη λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μετά από την σύντομη έκθεση στο φως δείχνουν ότι η *Spm* δεν προκαλεί αναστολή της λειτουργικής ενεργοποίησης

του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όταν απουσιάζει η φωτοσυλλεκτική κεραία. Μάλιστα όχι μόνο δεν φαίνεται να υπάρχει παρεμπόδιση, αλλά υπάρχει και ενεργοποίηση των κέντρων αντίδρασης και αυξημένη έκλυση οξυγόνου σε σύγκριση με τον μάρτυρα (εικόνα 5.14B).



Εικόνα 5.14. Η επίδραση της *Spm* στην φάση λειτουργικής ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε μεταλλάγματα *Wt-LHC* του *Scenedesmus obliquus* τα οποία δεν έχουν φωτοσυλλεκτική κεραία. Η επίδραση της *Spm* μελετήθηκε με δυο τρόπους, από τη μία φασματοσκοπικά με τη λήψη καμπύλων επαγωγικού φθορισμού (A) και από την άλλη πολαρογραφικά με την εκτίμηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας (B). Τα φύκη εκτέθηκαν για 5 min σε $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A. Επίδραση της *Spm* (1 mM) στην καμπύλη επαγωγικού φθορισμού του μεταλλάγματος *Wt-LHC* κατά τη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης (μαύροι ρόμβοι: μάρτυρας, κόκκινοι ρόμβοι: μεταχείριση με 1 mM *Spm*). B. Η τιμή μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας κατά τη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης σε μεταλλάγματα (*Wt-LHC*) που μεταχειρίστηκαν (κόκκινο) ή όχι (μαύρο) με 1 mM *Spm*. Η *Spm* φαίνεται να αυξάνει την έκλυση οξυγόνου όταν απουσιάζει η φωτοσυλλεκτική κεραία.

Η ενεργοποίηση των κέντρων από τη *Spm* συμφωνεί με αποτελέσματα των ενοτήτων 3.1 και 4.1 για την επίδραση των 0.25 mM *Spm* στον παράγοντα RC/CS και συνδυάζεται καλά με προηγούμενες αναφορές που δείχνουν ότι η μοναδική πολυαμίνη που βρίσκεται φυσιολογικά στο εσωτερικό απομονωμένων κέντρων αντίδρασης είναι αυτή η τετραμίνη (Kotzabasis et al., 1993). Συνολικά από τα πειράματα των ενοτήτων 3-5 η *Spm* φαίνεται να εμπλέκεται στη διαχείριση του ποσού της φωτονιακής ενέργειας που θα συλλεχθεί από την κεραία του φωτοσυστήματος II και θα οδηγηθεί στο κέντρο αντίδρασης. Σε μικρές συγκεντρώσεις η *Spm* ενεργοποιεί τα κέντρα και λειτουργεί ευεργετικά, ενώ από μία κρίσιμη συγκέντρωση και άνω προκαλεί αναστολή, μείωση της φωτοχημείας και αντίστοιχα αύξηση της μη φωτοχημικής διαδικασίας. Ο ακριβής μηχανισμός της ενεργοποίησης της μη φωτοχημικής



Εικόνα 5.15. Η επίδραση της *Spm* στην φάση λειτουργικής ενεργοποίησης σε μεταλλάγματα *Wt-LHC* του *Scenedesmus obliquus* τα οποία δεν έχουν φωτοσυλλεκτική κεραία. Ιστόγραμμα των παραμέτρων του *JIP-test*. Οι τιμές των παραμέτρων για το *Wt-LHC+Spm* (κόκκινο) παρουσιάζονται σαν ποσοστό των τιμών του μάρτυρα (μαύρο). Τα φύκια εκτέθηκαν για 5 min σε $500 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

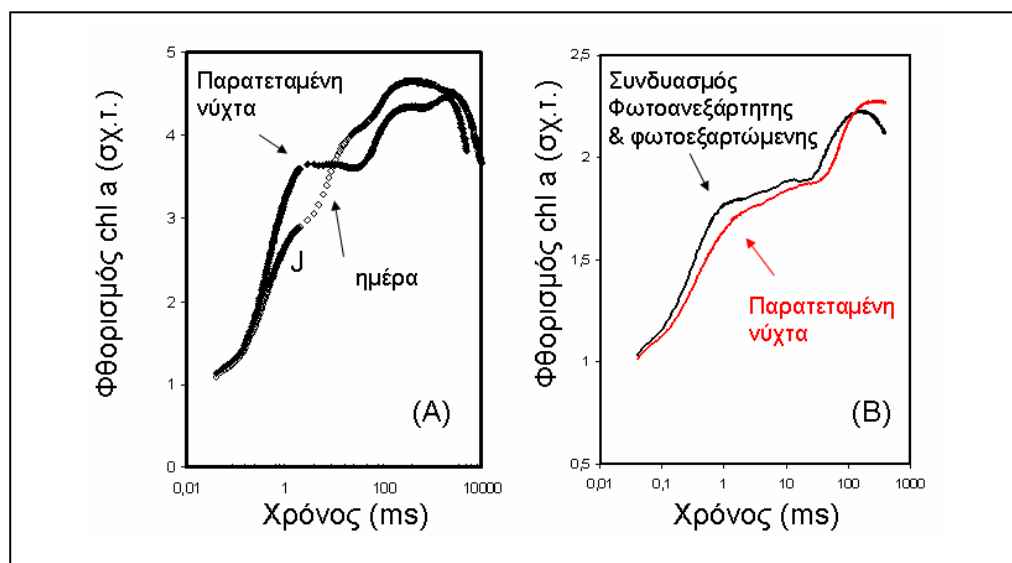
διαδικασίας είναι άγνωστος (Holt et al., 2004). Η *Spm* φαίνεται να μπορεί να αυξάνει την διάχυση της απορροφώμενης ενέργειας και συνεπώς εμπλέκεται σε κάποιο στάδιο της ενεργοποίησης ή της ρύθμισης της μη φωτοχημικής διαδικασίας. Η τελευταία συγκεντρώνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς προστασίας των φυτών από το φως (Horton, 1996). Προκειμένου να διασαφηνιστεί ο ρόλος της *Spm* στην φωτοχημική/ μη φωτοχημική διαχείριση της ενέργειας του φωτός δρομολογήθηκαν πειράματα με ανώτερα φυτά στα οποία είναι εντονότερα και ταχύτερα τα φαινόμενα αυτά σε σύγκριση με τα χλωροφύκη που αντιδρούν αργά και λιγότερο έντονα (Mueller et al., 2001; Li et al., 2004).

Παράρτημα Αποτελεσμάτων 1ου Κεφαλαίου

Η φωτοσυνθετική απόδοση (F_v/F_m) είναι ίσως ο πιο γνωστός και ευρέως χρησιμοποιούμενος παράγοντας για την εκτίμηση της φωτοσύνθεσης. Συνήθως η τιμή του είναι μεταξύ 0.70 και 0.85 και εμφανίζει χαμηλότερες τιμές σε συνθήκες καταπονήσεων (π.χ. φωτοαναστολή). Στη διεθνή βιβλιογραφία η μοναδική περίπτωση που η φωτοσυνθετική απόδοση είναι χαμηλή χωρίς να υπάρχει εμφανής μορφή καταπόνησης είναι σε περιπτώσεις φυτών που μελετώνται πριν ξημερώσει (Adams, 2004). Σε μια προσπάθεια να ερμηνεύσουμε με δεδομένα της παρούσας εργασίας αυτό το γνωστό φαινόμενο άγνωστης αιτιολογίας διατηρήσαμε φυτά σε παρατεταμένο σκοτάδι. Η καταγραφή των κινητικών OJIP σε φυτά που επώαστηκαν σε παρατεταμένο σκοτάδι δείχνει μια δραστική αύξηση στο βήμα J (εικόνα Π1Α). Αυτό το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αποκαλύπτει την ύπαρξη κέντρων που πιθανόν να είναι στην κατάσταση πριν την λειτουργική ενεργοποίηση. Αυτή η κατάσταση είναι άγνωστη στη διεθνή βιβλιογραφία και ανακαλύφθηκε στη διάρκεια των πειραμάτων αυτής της εργασίας κατά τη φωτοανεξάρτητη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (βλ. αποτελέσματα κεφαλαίου 1, ενότητα 5). Αν υπάρχουν κέντρα αντίδρασης που είναι ενεργά και κέντρα αντίδρασης που πρόκειται να ενεργοποιηθούν μόλις εκτεθούν στο φως τότε η καμπύλη OJIP θα περιέχει πληροφορία και για τα δύο είδη κέντρων. Επομένως σε περίπτωση που έχουμε μια καμπύλη η οποία αντιστοιχεί στο πρώτο είδος κέντρων (κέντρα ενεργά) και μία άλλη καμπύλη η οποία αντιστοιχεί στο δεύτερο είδος κέντρων (κέντρα μη ενεργοποιημένα) τότε ο συνδυασμός τους *in silico* θα πρέπει να δίνει μια τρίτη καμπύλη με τα χαρακτηριστικά αυτής των φυτών σε παρατεταμένο σκοτάδι. Για την πρώτη περίπτωση δηλαδή κινητική OJIP που αντιστοιχεί σε ενεργά κέντρα αντίδρασης επιλέχθηκαν δείγματα από τη φωτοεξαρτώμενη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε άριστες συνθήκες ανάπτυξης (30°C , $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Για τη δεύτερη περίπτωση δηλαδή κινητική OJIP που αντιστοιχεί σε μη ενεργοποιημένα κέντρα αντίδρασης επιλέχθηκαν δείγματα από τη φωτοανεξάρτητη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Πράγματι, η μαθηματική πρόσθεση μίας καμπύλης OJIP από φωτοσυνθετικό μηχανισμό πριν ενεργοποιηθεί με μία καμπύλη από φωτοσυνθετικό μηχανισμό που είναι ενεργός οδηγεί στη δημιουργία μιας νέας καμπύλης που σχεδόν ταυτίζεται με την ιδιαίτερη μορφή OJIP καμπύλης που δίνει ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός από ανώτερα φυτά στο τέλος της νύχτας (εικόνα Π1Β). Η αιτία της ύπαρξης κέντρων αντίδρασης που δεν έχουν ακόμη ενεργοποιηθεί δεν είναι σαφής. Σε κάθε περίπτωση κέντρα που συναρμολογούνται στο

απόλυτο σκοτάδι θα μπορούσαν να βρίσκονται σε αυτήν την κατάσταση. Προαπαιτούμενο για να δημιουργηθούν νέα κέντρα είναι η διαθεσιμότητα χλωροφυλλών. Η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης στα φυτά φυσιολογικά γίνεται στο φως (μονοπάτι LPOR) όμως υπάρχουν πολλές αναφορές που αποδεικνύουν ότι ακόμη και τα αγγείοσπερμα μπορούν να συνθέτουν χλωροφύλλες στο σκοτάδι (επισκόπηση Armstrong, 1998). Τελικά αν κατά τη διάρκεια της νύχτας τα φυτά συμπεριφέρονται όπως οι λιγότερο εξελιγμένοι συγγενείς τους (χλωροφύκη) και κάνουν φωτοανεξάρτητη δημιουργία φωτοσυστημάτων τότε μπορεί να δικαιολογηθεί η εξαίρεση αυτή στην περίπτωση του Fv/Fm.



Εικόνα Π11Α. Η μείωση του Fv/Fm στο τέλος της νύχτας (πρωινές ώρες προτού αυξηθεί το φως) θεωρείται stress (όπως κάθε μορφή μείωσης του λόγου Fv/Fm) με ανεξήγητη αιτιολογία (Adams, 2004). Σε μια προσπάθεια να μελετήσουμε την επίδραση της διάρκειας της νύχτας στην καμπύλη OJIP επώασαμε φυτά στο απόλυτο σκοτάδι (κλειστοί ρόμβοι) και συγκρίνουμε με αυτά που παρέμειναν στο φως (ανοιχτοί ρόμβοι: μάρτυρας). Είναι εμφανής μία αύξηση του J βήματος. Β. Μία καμπύλη μοντέλο (μαύρο χρώμα) που προκύπτει από το μαθηματικό συνδυασμό δύο δειγμάτων εκ των οποίων ο ένας αντιστοιχεί σε κέντρα λειτουργικά και ο άλλος σε κέντρα πριν τη λειτουργική ενεργοποίηση. Η καμπύλη που προκύπτει *in silico* προσομοιώνει την καμπύλη που καταγράφηκε από φυτά σε παρατεταμένο σκοτάδι. Η ύπαρξη τέτοιων 'ιδανικών' δειγμάτων είναι δυνατή χάρη στην ικανότητα των χλωροφυκών να δημιουργούν με δύο πορείες τον φωτοσυνθετικό τους μηχανισμό (φωτοανεξάρτητα και φωτοεξαρτώμενα). Τελικά η πτώση του Fv/Fm στο τέλος της νύχτας δεν οφείλεται σε καταπόνηση, αλλά στην ύπαρξη κέντρων που δεν έχουν ακόμη ενεργοποιηθεί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο – Συζήτηση

Μια συνηθισμένη τακτική για τη μελέτη ενός βιολογικού μορίου περιλαμβάνει την εύρεση της δομής του, τον υποκυτταρικό εντοπισμό του, το χρονικό σημείο εκκίνησης της σύνθεσής του, τις συνθήκες καταστολής ή ενίσχυσης της βιοσύνθεσής του και την αλληλεπίδρασή του με άλλα μόρια. Στην περίπτωση καλά μελετημένων μορίων όλα τα παραπάνω είναι γνωστά και τελικά είναι με σαφήνεια προσδιορισμένος ο ρόλος του μορίου. Στην περίπτωση των πολυαμινών είναι γνωστή η δομή (Cohen, 1998), είναι γνωστά τα μονοπάτια βιοσύνθεσης (Primikiriou and Roubelakis-Angelakis, 2001; Alabadi and Carbonell, 1998, Bagni and Tassoni, 2001), καταβολισμού (Tavladoraki et al., 1998) και μεταφοράς (Pistochi et al., 1990; Kakkar et al., 1998). Ακόμη είναι γνωστές οι συνθήκες που αυξάνονται (Navakoudis et al., 2005; Sfichi et al., 2004) ή μειώνονται (Adiga and Prasad, 1985; Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005a,b). Υπάρχει όμως ασάφεια για το που εντοπίζονται υποκυτταρικά και το ποιος είναι ο ρόλος τους. Ο χώρος της έρευνας των πολυαμινών δέχεται κριτική ακριβώς επειδή δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμη ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο δρουν. Η καθυστέρηση αυτή μεταξύ άλλων εμποδίζει την έρευνα σε πολλούς τομείς που ξεκινούν από τη φυσιολογία φυτών και φθάνουν έως την ανθρώπινη ογκολογία. Σε ότι αφορά τα φυτά ο χλωροπλάστης φαίνεται να περιέχει μεγάλο μέρος των πολυαμινών του κυττάρου (Torrighiani et al., 1986). Επίσης, με δεδομένο ότι η βιοσύνθεση τους και ο καταβολισμός τους μπορεί να γίνει στο χλωροπλάστη (Andreadakis and Kotzabasis, 1995), ότι προσδένονται μέσω ειδικών ενζύμων σε καθορισμένες μόνο χλωροπλαστικές πρωτεΐνες (Del Duca et al., 1994) και το ότι τα επίπεδα τους φωτορυθμίζονται (Doernemann and Kotzabasis, 1998) εξάγεται το συμπέρασμα ότι πρέπει να έχουν συγκεκριμένους ρόλους στο οργανίδιο αυτό. Παλαιότερες έρευνες έδειξαν ότι οι πολυαμίνες στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό είναι σε υψηλότερα επίπεδα στο σκοτάδι από ότι στο φως (Doernemann et al., 1996; Navakoudis, 2003). Επίσης η βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού οδηγεί σε μείωση των προσδεμένων στα θυλακοειδή πολυαμινών (Doernemann et al., 1996), ενώ συνθήκες καταπονήσεων (ψύχος, UVB, όζον) αυξάνουν τα επίπεδα πολυαμινών (He et al., 2002; Sfichi et al., 2004; Navakoudis et al., 2003, αντίστοιχα). Η τεχνητή αύξηση της Put φαίνεται να αναγκάζει οργανισμούς ανεπτυγμένους σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού να εμφανίζουν φαινότυπο φωτοσυνθετικού μηχανισμού παρόμοιο με αντίστοιχο προσαρμοσμένο σε υψηλής έντασης φωτισμό (Logothetis et al., 2004; Kotzabasis et al., 1999), ενώ μείωση της Put ή αύξηση της Spm δείχνει να οδηγεί σε αντίθετο αποτέλεσμα (Kotzabasis et al., 1999; Sfichi et al. 2004).

Αν οι πολυαμίνες επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού θα πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός ή μια σειρά γεγονότων που να περιγράφει τον τρόπο δράσης τους. Αυτός ο μηχανισμός ή η αλληλουχία των γεγονότων αναζητήθηκε με την μελέτη του ρόλου των πολυαμινών πριν τη δημιουργία (ενότητα 3), κατά τη φωτοεξαρτώμενη δημιουργία (ενότητες 3 και 5) και τέλος κατά τη φωτοανεξάρτητη δημιουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (ενότητα 4).

Σε πρώτη φάση μέσα από την αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων (ενότητες 3 και 4) ερμηνεύθηκε η ανάγκη της ρύθμισης των ενδοκυτταρικών επιπέδων των πολυαμινών κατά τη διαφοροποίηση του χλωροπλάστη. Η μείωση των πολυαμινών που συμβαίνει φυσιολογικά κατά την βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Doernemann et al., 1996) φαίνεται σύμφωνα με την παρούσα εργασία, ότι είναι απαραίτητη για δύο τουλάχιστον λόγους. Από τη μία μεριά υψηλά επίπεδα Spd και Spm φαίνεται ότι εμποδίζουν την φωτοεξαρτώμενη (εικόνα 3.7 και 3.9) και φωτοανεξάρτητη (εικόνα 4.3 και 4.7) βιοσύνθεση των χλωροφυλλών και από την άλλη αυξάνουν τις ενεργειακές απώλειες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αυξάνοντας την διαχεόμενη ενέργεια (εικόνα 3.5 και 4.6B). Δηλαδή αν δεν υπήρχε μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων πολυαμινών θα μειωνόταν η λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, αλλά και θα παρεμποδιζόταν η δημιουργία νέων φωτοσυνθετικών μονάδων (φωτοσυστημάτων PSII και PSI). Η μείωση αυτή εξασφαλίζεται με την αύξηση της ενεργότητας των καταβολικών ενζύμων των πολυαμινών όπως η DAO κατά τη διαφοροποίηση του ωχροπλάστη σε χλωροπλάστη (Andreadakis and Kotzabasis, 1995).

Ουσιαστικά ο καταβολισμός των πολυαμινών αποτελεί παροχέα αζώτου για διαδικασίες με υψηλές απαιτήσεις σε άζωτο, όπως είναι η πρωτεϊνοσύνθεση και η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης (Tabor and Tabor, 1972; Askar and Treptow, 1986). Άρα το φυτικό κύτταρο συντονίζει τη μείωση των αποθεμάτων αζώτου υπό μορφή πολυαμινών με την σύνθεση απαραίτητων συστατικών για τη δημιουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Τα επίπεδα των πολυαμινών μειώνονται κατά τη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, αλλά εξακολουθούν να υπάρχουν σημαντικές ποσότητες Put, Spd και μικρότερες Spm περίπου $5-7 \mu\text{MmlPCV}^{-1}$ στο σύνολο (Doernemann et al., 1996). Ο φυσιολογικός ρόλος αυτών των ποσοτήτων πολυαμινών δεν είναι σαφής. Η τεχνητή αύξηση της Spm οδηγεί σε δραστική μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης (εικόνες 3.5A, 4.5 και 5.5) και για να ερμηνευθεί αυτό το αποτέλεσμα απαιτείται μια ανάλυση του Fv/Fm. Η φωτοσυνθετική απόδοση Fv/Fm είναι κοινώς αποδεκτό ότι μειώνεται σε συνθήκες στρες (Adams and Demmig-Adams, 2004). Η μοναδική περίπτωση στη βιβλιογραφία που ο λόγος

Fv/Fm μειώνεται αλλά δεν είναι σαφής η εξήγηση (Adams and Demmig-Adams, 2004) είναι σε φυτά, που μελετώνται πριν ξημερώσει. Τα αποτελέσματα των ενοτήτων 3 και 4 πιθανόν να κρύβουν την απάντηση. Πιο συγκεκριμένα, η χαμηλή απόδοση φυτών μετά από παρατεταμένο σκοτάδι φαίνεται ότι οφείλεται στην ύπαρξη κέντρων αντίδρασης που έχουν παραμείνει πριν τη φάση λειτουργικής ενεργοποίησης (βλ. παράρτημα αποτελεσμάτων σελ. 97 για περισσότερες πληροφορίες).

Πρέπει να γίνει διάκριση της περίπτωσης όπου η τιμή Fv/Fm είναι μεν χαμηλή, αλλά σύντομα με την έκθεση στο φως θα μεγιστοποιηθεί από την περίπτωση όπου η τιμή Fv/Fm πάλι είναι χαμηλή, αλλά με την έκθεση στο φως δεν θα μεγιστοποιηθεί. Η χορήγηση Spm φαίνεται να μειώνει την φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm) στο πλαίσιο της δεύτερης περίπτωσης. Η μείωση οφείλεται σε δύο αιτίες κοινές τόσο στη φωτοεξαρτώμενη, όσο και στη φωτοανεξάρτητη βιογένεση. Η πρώτη είναι ότι δεν υπάρχουν αρκετές χλωροφύλλες και άρα εμποδίζεται η συναρμολόγηση φωτοσυνθετικών συμπλόκων που απαιτούν χλωροφύλλη όπως το PSII, το PSI, το LHC. Η δεύτερη αιτία είναι ότι η αυξημένη Spm εμποδίζει τη λειτουργία των υπάρχοντων φωτοσυστημάτων (κυρίως των PSII). Ο πιο πιθανός λόγος για να μειώνεται η λειτουργικότητα με βάση τα αποτελέσματα των εικόνων 3.5B, 4.6B και 5.8A είναι η αυξημένη διάχυση της απορροφώμενης ενέργειας. Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα αυξημένη διάχυση υπό συνθήκες αυξημένης ενδοκυτταρικά Spm αναφέρθηκε πρόσφατα σε χλωροφύκη (Sfichi et al., 2004). Επίσης δεν πρέπει να παραγνωριστεί η ευεργετική επίδραση μικρών συγκεντρώσεων Spm (0.25 mM) στη δημιουργία και λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που σταθερά συνέβαινε στα πειράματα αυτά (εικόνα 3.5A) και συμφωνεί και με προηγούμενες αναφορές (Beigbeder and Kotzabasis, 1995).

Η αιτία για την θετική αυτή δράση της Spm φαίνεται να είναι η αύξηση της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης των PSII (εικόνες 3.5Γ και 4.6A). Η ενεργοποίηση των κέντρων από τη Spm υποστηρίζεται με εργασίες που ανίχνευσαν μόνο τη συγκεκριμένη πολυαμίνη στο εσωτερικό (RC core) των PS II κέντρων (Kotzabasis et al., 1993). Ο τρόπος με τον οποίο η χορήγηση Spm αυξάνει τη διάχυση της ενέργειας σε γενικές γραμμές μπορεί να σχετίζεται με αλλαγές στη γενετική έκφραση συστατικών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ή με αλλαγές στην ενεργότητα ήδη υπάρχοντων ενζύμων. Επειδή είναι δύσκολο να απαντηθεί το ερώτημα σε αυτή τη φάση, στόχος ήταν η μείωση της συνεισφοράς της γονιδιακής ρύθμισης στη μελέτη του ρόλου της Spm. Κάτι τέτοιο δεν ήταν δυνατό στην περίπτωση της φωτοανεξάρτητης βιογένεσης που διαρκεί πολλές ώρες, αλλά ούτε και στην περίπτωση της πιο σύντομης αλλά ολιγόωρης φωτοεξαρτώμενης βιογένεσης

του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Για την ασφαλή απόρριψη της συμμετοχής γενετικών ρυθμίσεων στο μηχανισμό δράσης της Spm θα έπρεπε η μελέτη να γίνεται σε λεπτά ή ακόμη σε δευτερόλεπτα. Η φάση ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού επιτρέπει -όταν οι συνθήκες φωτισμού είναι κατάλληλες- τη μελέτη οποιασδήποτε μεταχείρισης μέσα σε 200-300 s (εικόνα 5.1). Αν η χορήγηση Spm προκαλεί αύξηση της διάχυσης σε τόσο σύντομο χρόνο σημαίνει πως δεν υπάρχει γονιδιακή συμμετοχή, ενώ αν δεν προκαλεί όλα τα ενδεχόμενα μένουν ανοιχτά. Στις εικόνες 5.6B και 5.8A φαίνεται καθαρά ότι η χορήγηση Spm αυξάνει την διάχυση όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις συνεπώς αποκλείεται να επιδρά μέσω μεταγραφικών ή μεταφραστικών μηχανισμών. Η συμμετοχή της δε, στην φάση της λειτουργικής ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με την πρόσδεσή της στη φωτοσυλλεκτική κεραία LHC II (εικόνα 5.3A) δείχνει ότι σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (εντός 10 min) ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός μπορεί υπό συνθήκες φωτισμού να προσδέσει πολυαμίνες πάνω σε πρωτεΐνες. Αυτό συμφωνεί με πρόσφατα αποτελέσματα των Dela Mea et al., (2004) που αναφέρουν ότι η πλαστιδιακή τρανσγλουταμινάση συνδέει Spm στα πεπτίδια της κεραίας (LHC II, CP29, CP26, CP24) ενεργοποιείται από το φως. Ο ρόλος της πρόσδεσης δεν είναι σαφής, αλλά φαίνεται να αποτελεί μέρος ενός συγκεκριμένου 'προγράμματος' μοριακών γεγονότων στην μετάβαση από την κατάσταση χαμηλής απόδοσης στην κατάσταση υψηλής απόδοσης. Η ύπαρξη μονομερών της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (εικόνα 5.12A), με την έναρξη ακτινοβόλησης προκαλεί αλλαγή στο πρότυπο προσδεμένων πολυαμιμών (εικόνα 5.13A) και αλλαγή στο βαθμό ολιγομερισμού, από 10% πριν την ενεργοποίηση σε 90% ολιγομερισμό μετά την ενεργοποίηση (εικόνα 5.12B). Τα παραπάνω είναι σε συμφωνία με αποτελέσματα των Srivastava et al., (1999) που μελέτησαν φωτοσυνθετικό μηχανισμό που αναπτύχθηκε σε βραχείς παλμούς φωτός. Αν το 'πρόγραμμα' αλλάξει τότε δεν είναι εφικτή η μεγιστοποίηση της απόδοσης. Έτσι αν η πρόσδεση γίνει πριν την έκθεση στο φως τότε προκαλείται πρόωρος ολιγομερισμός των LHC (εικόνα 5.12B στήλη σκοτάδι + Spm) και παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (εικόνες 5.6 και 5.8). Η φωτοσυλλεκτική κεραία δείχνει να παραμένει σε αυτή την κατάσταση ολιγομερισμού και μετά την έκθεση στο φως (εικόνα 5.12B φως + Spm και εικόνα 5.10 κόκκινο χρώμα). Η κατάσταση αυτή οδηγεί σε σταθερά χαμηλές τιμές φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων (εικόνα 5.10B παράγοντας ET/CSm).

Αν η απορροφώμενη φωτονιακή ενέργεια καταλήγει σε μεγαλύτερο βαθμό στη διάχυση και σε μικρότερο στη φωτοχημική αξιοποίηση τότε η ενίσχυση του κύκλου Calvin-Benson θα επέτρεπε αύξηση της φωτοχημείας. Σε αντίθετη περίπτωση θα σήμαινε ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός έχει πάθει βλάβη. Η χορήγηση αυξημένης συγκέντρωσης CO₂

αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο ενίσχυσης του κύκλου Calvin-Benson (Logothetis et al., 2004). Πράγματι η ενίσχυση του κύκλου αυτού αναιρεί την επίδραση της αυξημένης Spm (εικόνα 5.10 πράσινο χρώμα) και αποκλείει την περίπτωση να έχει υποστεί βλάβη ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός από την αυξημένη Spm. Η επίδραση της αυξημένης Spm φαίνεται να συνδέεται με τη φωτοσυλλεκτική κεραία (αύξηση βαθμού ολιγομερισμού πολυπεπτιδίων κεραίας εικόνα 5.11B και αύξηση παραμέτρων DI που σχετίζονται με την κεραία εικόνες 3.5B, 4.6B και 5.5B). Αν η φωτοσυλλεκτική κεραία έχει σημαντικό ρόλο στη λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, τότε απουσία κεραίας θα πρέπει να μην μπορεί η αυξημένη Spm να προκαλεί παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των PSII. Η χορήγηση Spm σε χλωροφύκη χωρίς φωτοσυλλεκτική κεραία (μετάλλαγμα Wt-LHC) δείχνει να μην εμποδίζει την λειτουργική ενεργοποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (εικόνα 5.14A). Άρα η παρεμπόδιση είναι εφικτή μέσω της αλληλεπίδρασης της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII και Spm. Μάλιστα φαίνεται ότι η αυξημένη Spm αυξάνει τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα στο μετάλλαγμα (εικόνα 5.14B) και αυτό πιθανότατα οφείλεται στην αύξηση των ενεργών κέντρων αντίδρασης (5.15 παράγοντες RC/CS).

Αν η χορήγηση Spm μεταβάλλει το ποσό της ενέργειας που διαχέεται από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό στα χλωροφύκη τότε θα πρέπει να επηρεάζει την ικανότητα φωτοπροστασίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η τελευταία στηρίζεται σε σημαντικό βαθμό στην ελεγχόμενη διάχυση της φωτονιακής ενέργειας από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό (Horton and Ruban, 2004; Niyogi, 2000). Η φωτοσυλλεκτική κεραία θεωρείται ως ο πιο πιθανός ρυθμιστής αυτής της διαδικασίας (Ma et al., 2003) αλλά υπάρχουν και εναλλακτικές απόψεις που εντάσσουν και τα κέντρα αντίδρασης στο ρόλο αυτό (Finazzi et al., 2004). Με δεδομένο ότι τα ανώτερα φυτά έχουν πιο ταχείς και πιο έντονους μηχανισμούς φωτοπροστασίας από ότι τα χλωροφύκη κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί ο ρόλος των πολυαμινών σε *Nicotiana tabacum* L.. Στην επόμενη ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών.

Συνοψίζοντας, τα κυριότερα συμπεράσματα είναι τα εξής:

A. Η μείωση των ενδοπλαστιδιακών επιπέδων πολυαμινών που λαβαίνει χώρα φυσιολογικά κατά τη διαφοροποίηση του ωχροπλάστη σε χλωροπλάστη είναι απόλυτα αναγκαία για τη δημιουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αποδείχθηκε ότι αν τα επίπεδα πολυαμινών παραμείνουν υψηλά η βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού δεν λαβαίνει χώρα.

B. Η προαναφερθείσα μείωση των πολυαμινών αναδεικνύεται σε διαδικασία-κλειδί ελέγχοντας την αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο [τόσο από την φωτοεξαρτώμενη, όσο και από τη φωτοανεξάρτητη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου (LPOR και DPOR αντίστοιχα)], που θεωρείται ότι πυροδοτεί όχι μόνο την βιοσύνθεση των χλωροφυλλών, αλλά και τη διαφοροποίηση του ωχροπλάστη σε χλωροπλάστη.

Γ. Η παρεμπόδιση της βιογένεσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ιδιαίτερα από αυξημένη συγκέντρωση Spm ($>2\text{mM}$) αναδεικνύεται ως κεντρικός μηχανισμός, που καλύπτει όλες τις δυνατές αναπτυξιακές δυνατότητες (τόσο τη φωτοεξαρτώμενη όσο και τη φωτοανεξάρτητη) του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Δ. Τα αυξημένα επίπεδα Spm επιδρούν και σε κεντρικές διαδικασίες της φωτοσύνθεσης αυξάνοντας τη μη φωτοχημική διάχυση της συλλεγόμενης ενέργειας και καταστέλλοντας τη φωτοχημεία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

E. Σε μεταλλάγματα μικροφυκών χωρίς φωτοσυλλεκτική κεραία ακυρώνονται οι παραπάνω επιδράσεις των αυξημένων επιπέδων Spm, υποδεικνύοντας ότι η καταστολή της φωτοχημείας από τη Spm προϋποθέτει την ύπαρξη της φωτοσυλλεκτικής κεραίας των PSII.

Z. Η χρήση ειδικών μεταλλαγμάτων (Wt-LHC) έδειξε ότι τα αυξημένα επίπεδα Spm λειτουργούν προστατευτικά στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό αυξάνοντας των αριθμό των ενεργών κέντρων κατά την γρήγορη φάση της λειτουργικής ενεργοποίησης.

H. Η γνωστή φωτοανεξάρτητη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού φάνηκε για πρώτη φορά ότι σταματά σε ένα λειτουργικό επίπεδο πέρα από το οποίο η λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού δεν μπορεί να συνεχιστεί. Η φάση λειτουργικής ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που αναπτύχθηκε φωτοανεξάρτητα είναι απόλυτα εξαρτώμενη από το φως. Καθοριστική αποδείχθηκε ότι είναι η ένταση ακτινοβολίας σε σχέση με τον χρόνο έκθεσης (s-min) και δευτερεύουσα η ποιότητα σε ότι αφορά το ορατό φάσμα (φωτοελεγχόμενη διαδικασία δόσης / απόδοσης).

Η ανακαλυφθείσα φάση λειτουργικής ενεργοποίησης αποτελεί ένα σημαντικό πειραματικό εργαλείο λόγω των πολλών και σημαντικών ευνοϊκών χαρακτηριστικών της (*σταθερότητα σε συνθήκες απόλυτου σκοταδιού, γρήγορη απόκριση σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού,*

δυνατότητα επακριβούς ρύθμισης της εξέλιξης του φαινομένου από την επιλογή των πειραματικών συνθηκών, in vivo διαδικασία με πλεονεκτήματα in vitro συστήματος).

Θ. Κατά τη διάρκεια της λειτουργικής ενεργοποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού τα μονομερή της φωτοσυλλεκτικής κεραίας LHC του PSII οργανώνονται σε λειτουργική κεραία. Ο βαθμός ολιγομερισμού του LHC, μέσα σε λίγα λεπτά, αλλάζει δραματικά από 10% πριν την ενεργοποίηση σε 90% μετά την ενεργοποίηση.

Λ. Στη διάρκεια της φωτοεπαγόμενης οργάνωσης της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHC) αλλάζει η σύσταση των προσδεμένων σε αυτήν πολυαμινών. Ειδικά η προσδεμένη Spm αυξάνει 50%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

**Η επίδραση των πολυαμινών στη διαχείριση της φωτονιακής
ενέργειας από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο - Αποτελέσματα

Η επίδραση των πολυαμινών στη διαχείριση της φωτονιακής ενέργειας από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό

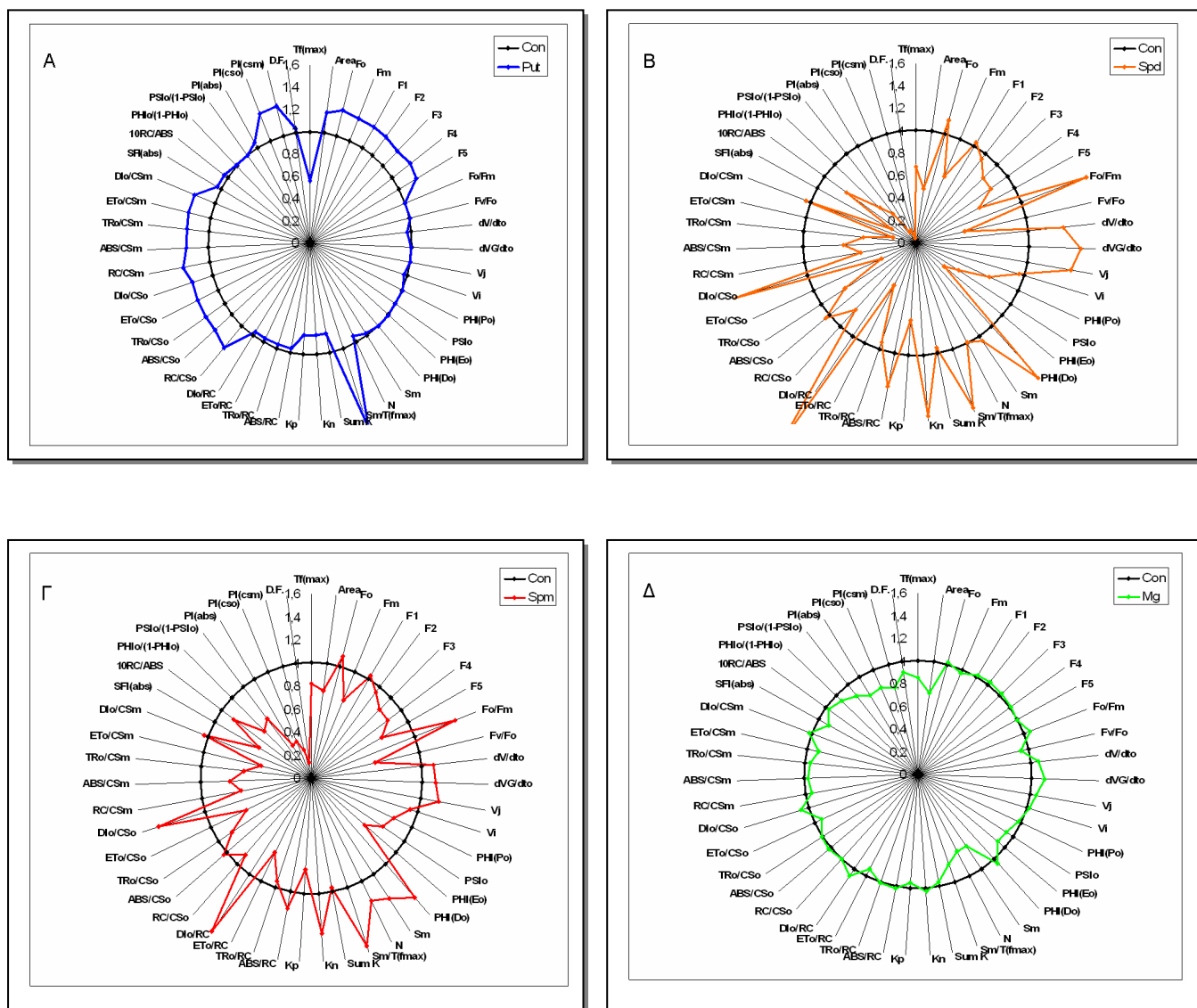
6.1. Πολυαμίνες και μη φωτοχημική απόσβεση της απορροφηθείσας φωτονιακής ενέργειας.

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός συλλέγει φωτονιακή ενέργεια και τη μετατρέπει σε χημική ενέργεια (φωτοχημεία), σε φθορισμό και σε θερμότητα (μη φωτοχημεία). Σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού η φωτοχημεία έχει μεγαλύτερη απόδοση σε σύγκριση με συνθήκες υψηλού φωτισμού, ενώ οι μη φωτοχημικές διαδικασίες ενεργοποιούνται όσο η ένταση φωτισμού αυξάνει. Αυτή η μη φωτοχημική χρήση της ενέργειας που συνέλλεξε ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός έχει ιδιαίτερη σημασία και συνδέεται με την ικανότητα του φωτοσυνθετικού δείγματος να προστατεύεται από το έντονο φως (Horton and Ruban, 2004). Αυτό γίνεται κατανοητό αν ληφθεί υπόψη ότι σε συνθήκες υψηλού φωτισμού η απευθείας μεταφορά της ενέργειας στο κέντρο αντίδρασης θα προκαλούσε περίσσεια φωτονίων (υψηλή πίεση διέγερσης, high excitation pressure) στο κέντρο αντίδρασης και τελικά θα οδηγούσε σε φωτοαναστολή (photoinhibition). Όμως μέρος της απορροφώμενης φωτονιακής ενέργειας μετατρέπεται ελεγχόμενα σε θερμότητα και τελικά φθάνουν στο κέντρο αντίδρασης σημαντικά λιγότερα φωτόνια από αυτά που απορροφήθηκαν. Στις περισσότερες περιπτώσεις στη σύγχρονη διεθνή βιβλιογραφία τα παραπάνω φαινόμενα (φωτοπροστασία, φωτοχημική απόδοση, διαχείριση ενέργειας) μελετώνται ακόμη και *in vivo** με τη βοήθεια ανιχνευτών φθορισμού της χλωροφύλλης *a* και τη χρήση δύο πηγών φωτισμού. Η πρώτη πηγή φωτός (ακτινικό φως) προσαρμόζει το φωτοσυνθετικό δείγμα σε μία συγκεκριμένη ένταση φωτισμού, ενώ σε προκαθορισμένα χρονικά σημεία το δείγμα δέχεται έναν βραχύ ισχυρό παλμό φωτός οπότε στιγμιαία σταματά η φωτοχημεία και ο φθορισμός παίρνει τη μέγιστη τιμή του. Τελικά καθώς το δείγμα προσαρμόζεται στις επιλεγμένες συνθήκες ο φθορισμός του σταδιακά μειώνεται μέχρι να επιτευχθεί προσαρμογή και τελικά να σταθεροποιηθεί ο φθορισμός (F_s , steady state fluorescence και F_m' , μέγιστο σε συνθήκες φωτισμού). Αυτή η μείωση του φθορισμού (F_m') ως προς την αρχική τιμή F_m ονομάζεται μη φωτοχημική

(* η προσέγγιση *in vivo* διαδικασιών είναι πολύπλοκη και απαιτητική. Ειδικά στη φωτοσύνθεση όπου 4 υπερσύμπλοκα λειτουργούν και ταυτόχρονα αυτοελέγχονται ταχύτατα η προσέγγιση είναι δύσκολη.)

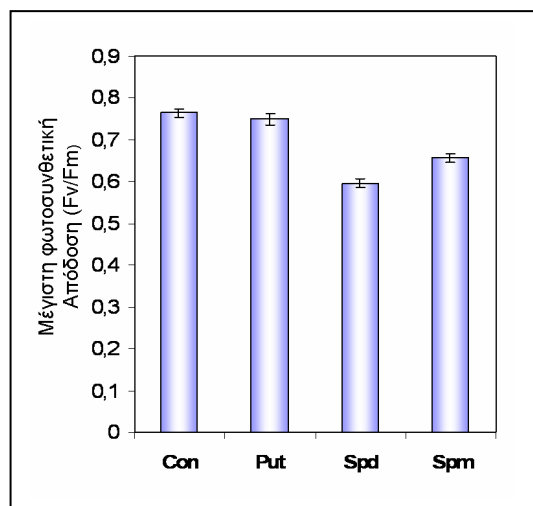
μείωση του φθορισμού ή για συντομία NPQ (non-photochemical quenching). Ουσιαστικά το NPQ [$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$] ποσοτικοποιεί τη θερμότητα που παράγεται εντός του PS II αξιοποιώντας τη διαφορά ανάμεσα στην κατάσταση όπου δεν έχει ακόμη ενεργοποιηθεί η φωτοπροστασία (F_m , σε dark adapted state) και σε οποιαδήποτε κατάσταση η φωτοπροστασία έχει ενεργοποιηθεί (F_m' , light adapted state). Όπως φάνηκε από την προηγούμενη ενότητα η Spm σχετίζεται με την αύξηση του ποσού ενέργειας που διαχέεται και δεν αξιοποιείται από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό χλωροφυκών. Στην παρούσα ενότητα εξετάζεται πως οι πολυαμίνες (Spm, Spd, Put) επιδρούν στη ρύθμιση της φωτοσύνθεσης στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό ανώτερων φυτών (*Nicotiana*). Η φωτοσυνθετική διαδικασία διακόπηκε στα δείγματα μέσω επώασης στο σκοτάδι για 15 min και στη συνέχεια καταγράφηκαν σε σταθερές συνθήκες ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25°C) 10 min συνεχούς λειτουργίας με ανάλυση που έφτανε τα 10 μs . Τα αποτελέσματα χωρίζονται με χρονικά κριτήρια σε δύο υποενότητες. Η πρώτη αφορά στις μέγιστες επιδόσεις του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (διάστημα από F_0 έως F_m , διάρκειας tF_{max}). Η δεύτερη αφορά στις επιδόσεις σε συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) για το διάστημα F_m έως F_s διάρκειας 10 min. Για την ανάλυση των δεδομένων της καμπύλης OJIP χρησιμοποιήθηκε το JIP-test (Strasser and Strasser, 1995), ενώ για το υπόλοιπο διάστημα η ανάλυση NPQ (Bilger and Bjoerkman, 1994). Το γεγονός ότι τα δεδομένα χωρίζονται με όριο το F_m έχει ιδιαίτερη αξία. Ο χρόνος για να σημειωθεί το F_m είναι φυσιολογικά μικρότερος από 0.5 s. Αυτός ο σύντομος σχετικά χρόνος από τη μία απαλλάσσει την καμπύλη OJIP από οποιαδήποτε πληροφορία σχετίζεται με την αυτορρύθμιση της φωτοσύνθεσης και από την άλλη επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων για τη μοριακή δομή και λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Πληροφορία για τα φαινόμενα αυτορρύθμισης της φωτοσύνθεσης (ουσιαστικά πρόκειται για φαινόμενα βραχυπρόθεσμης προσαρμογής) μπορούμε να πάρουμε από τη μελέτη του τμήματος F_m έως F_s που διαρκεί πολύ περισσότερο (10 min).

Σε πρώτη φάση μελετήθηκε η επίδραση των πολυαμινών και ανόργανων ιόντων (Mg^{2+}) στα χαρακτηριστικά της καμπύλης OJIP (διάστημα F_0 έως F_m) και αναλύθηκαν οι φυσικοχημικοί παράγοντες του JIP-test (εικόνα 6.1). Επίσης η επίδραση των πολυαμινών στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση F_v/F_m παρουσιάζεται στην εικόνα 6.2. Η μεταχείριση με πολυαμίνες επηρεάζει την μοριακή δομή και λειτουργική οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του καπνού, (εικόνα 6.3ΒΓΔ). Η Spd και η Spm φαίνεται να δρουν με παρόμοιο τρόπο, ενώ η χορήγηση Put εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο ιστογράμματος των παραγόντων του JIP-test (Strasser and Strasser, 1995). Η Spd και η Spm ελλατώνουν την



Εικόνα 6.1. Μελέτη της μοριακής οργάνωσης και λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με την ανάλυση OJIP. Ιστογράμματα των παραγόντων δομικής και λειτουργικής οργάνωσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μετά από μεταχείριση φυλλικών δισκίων καπνού με Put (A), με Spd (B), με Spt (Γ), με μαγνήσιο (Δ). Οι τιμές των παραγόντων για τη μεταχείριση εμφανίζονται ως ποσοστό μεταβολής του μάρτυρα. Η μεταχείριση με Put φαίνεται να έχει μικρή θετική επίδραση στην λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού βελτιώνοντας τους παράγοντες PI κατά 26% κυρίως λόγω της αυξημένης πυκνότητας των ενεργών κέντρων RC/CS ή Spd και η Spt προκαλούν αύξηση της διάχυσης της περίσσειας ενέργειας (δείκτες Dlo) και μείωση της λειτουργικότητας (PI). Οι επιδράσεις των ανόργανων κατιόντων είναι μικρότερης έντασης και χρησιμεύουν κυρίως σαν μέτρο σύγκρισης. Η τελική συγκέντρωση των πολυαμινών και των αλάτων ήταν 1 mM. Παρατηρούμε ότι όπως στα μονοκύτταρα χλωροφύκη ομοίως και στα ανώτερα φυτά οι πολυαμίνες και κυρίως η μεταχείριση με Spt αυξάνει τη διάχυση της απορροφώμενης ενέργειας και τελικά μειώνει την λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

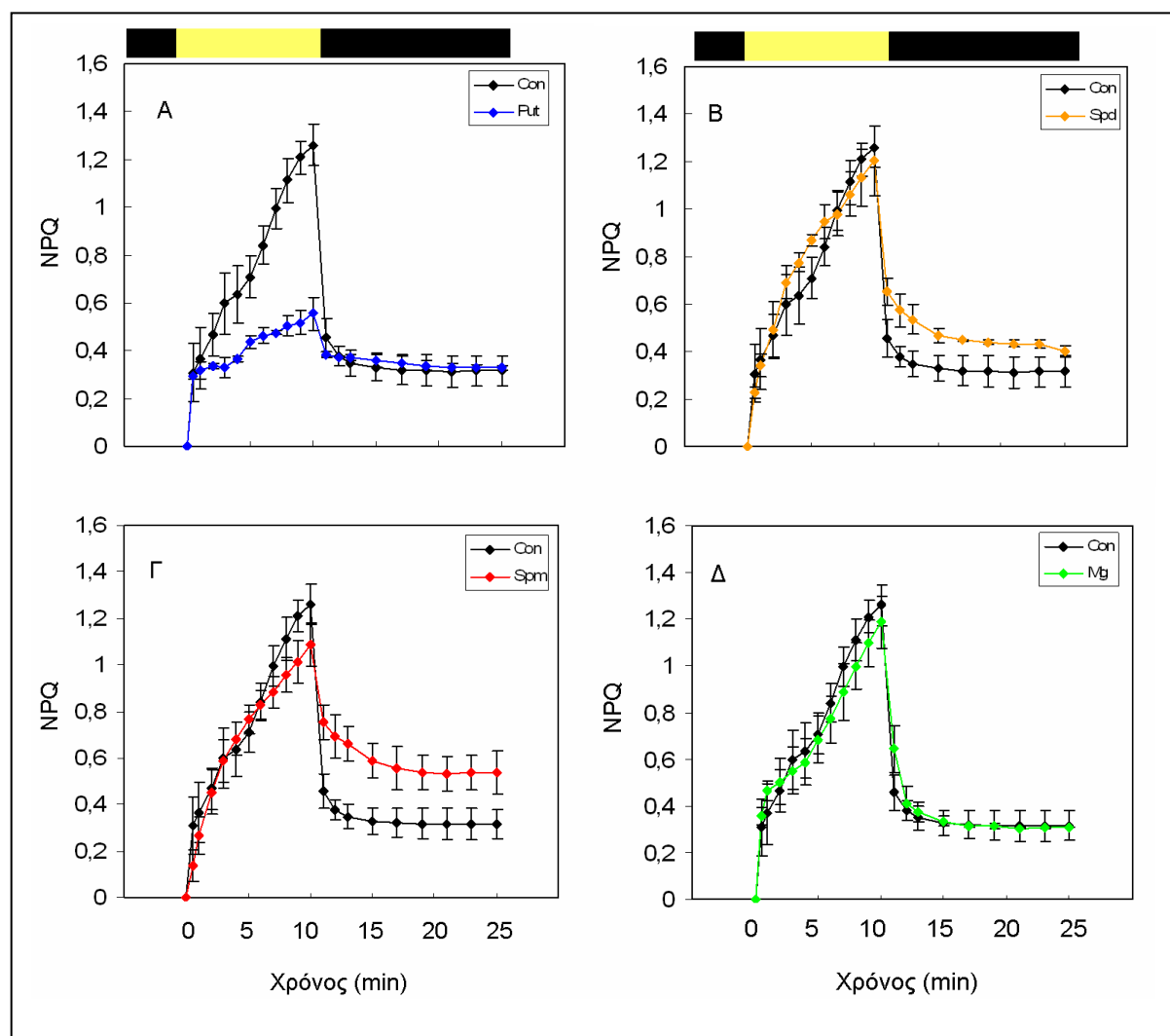
ικανότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού να παράγει έργο (μείωση δεικτών λειτουργίας SFI, PI, DF, Fv/Fm), ενώ η Put δεν φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τους παραπάνω δείκτες. Η μείωση της αποδοτικότητας συνδυάζεται με αύξηση των ποσών ενέργειας που διαχέονται (αύξηση των δεικτών DI, Kn, Fo/Fm) και μείωση στην πρωτοταγή φωτοχημεία (μείωση PSIIo).



Εικόνα 6.2 Επίδραση της χορήγησης πολυαμινών (1 mM Put, σπερμι-δίνης ή Spm) στη μέγιστη φωτοσυνθετική απόδοση *Nicotiana tabacum*. Η αυξημένη Spd και η Spm ελατώνουν σημαντικά την μέγιστη απόδοση της φωτοσύνθεσης ενώ η Put τη μειώνει οριακά. Οι κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στη σταθερή διακύμανση (n=4).

Αντίθετα η μεταχείριση με Put προστατεύει την φωτοσύνθεση και επιτρέπει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κάτω από τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες (παράμετροι PI 26% μεγαλύτεροι από τους αντίστοιχους του μάρτυρα). Αξιοσημείωτο είναι ότι υπάρχει καθολική ομοιότητα στην επίδραση της αυξημένης Spm με αυτήν της Spd και ειδικά στη διάχυση της ενέργειας, ενώ δεν συμβαίνει κάτι αντίστοιχο με την Put. Από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ο ρόλος της Spm στη διάχυση της ενέργειας και γενικότερα στη διαχείριση της απορροφώμενης ενέργειας και είναι φανερή η ομοιότητα μεταξύ των επιδράσεων των πολυαμινών στα φυτά και στα χλωροφύκη.

Στην εικόνα 6.3 παρουσιάζονται αποτελέσματα που αφορούν στην επίδραση της Spm, της Spd, της Put και ανόργανων ιόντων (Mg^{2+}) στους φωτοπροστατευτικούς μηχανισμούς του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (NPQ). Το είδος των ανόργανων ιόντων επιλέχθηκε και με κριτήριο την παρουσία του -υπό φυσιολογικές συνθήκες- σε ελεύθερη μορφή στους χλωροπλάστες. Η μεταχείριση με Spm προκάλεσε μία αλλαγή στη φάση χαλάρωσης του NPQ (παύση ακτινικού φωτός, διάστημα 10-25 min),



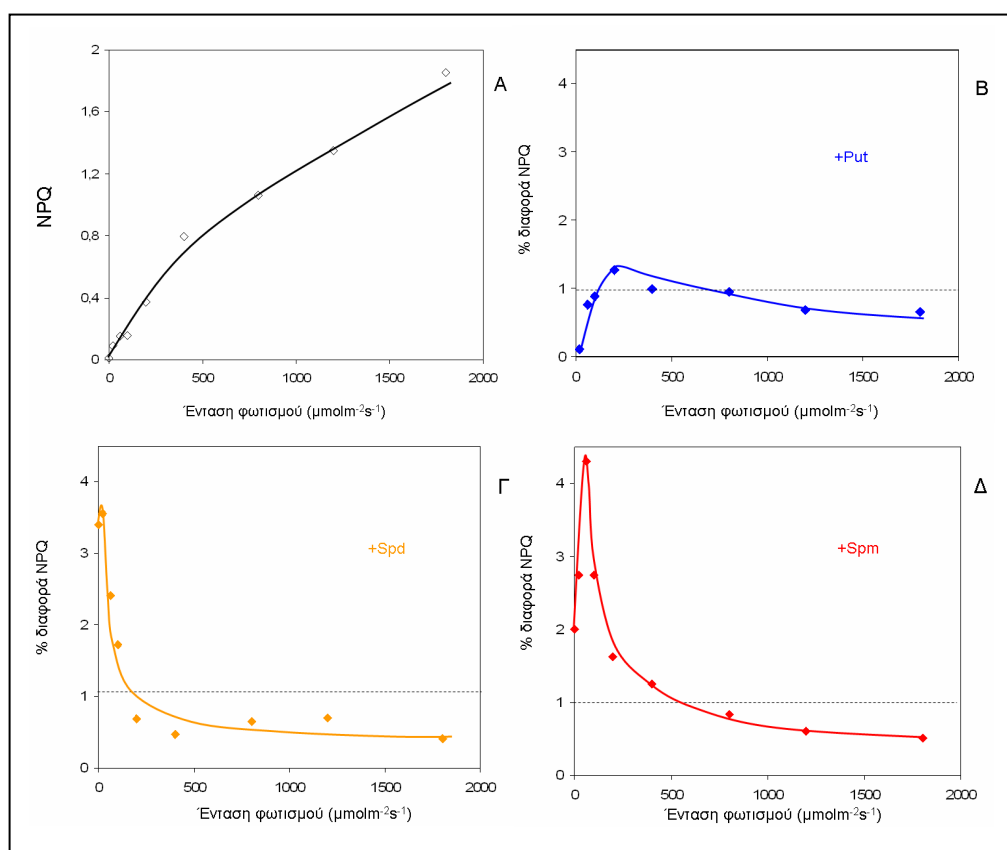
Εικόνα 6.3. Ενεργοποίηση και χαλάρωση του NPQ σε φυλλικά δισκία καπνού. Α. Η επίδραση της μεταχείρισης φυλλικών δισκίων με 1mM Put στη επαγωγή και χαλάρωση των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών της φωτοσύνθεσης. Τα φυλλικά δισκία επωάστηκαν στο σκοτάδι για 15min και στη συνέχεια ακτινοβολήθηκαν για 10 min με $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Η μεταχείριση με Put φαίνεται να μειώνει το NPQ, ενώ μετά την περίοδο φωτισμού το NPQ χαλαρώνει στο ίδιο βαθμό με το μάρτυρα. Β. Η μεταχείριση με 1mM Spd κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες επιτρέπει τη φυσιολογική ενεργοποίηση του NPQ, αλλά το διατηρεί ενεργοποιημένο σε μεγαλύτερο βαθμό από το μάρτυρα μετά την διακοπή της ακτινοβολήσης. Γ. Η μεταχείριση με 1mM Spm επιτρέπει την ενεργοποίηση του NPQ και παρόμοια με τη Spd δεν επιτρέπει την ολοκληρωτική χαλάρωσή του στο Δ. Η μεταχείριση φυλλικών δισκίων με 1mM Mg^{2+} δεν φάνηκε να επιδρά στην ενεργοποίηση ή τη χαλάρωση των μηχανισμών φωτοπροστασίας. Οι κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στη σταθ. διακύμανση ($n=3$).

η μεταχείριση με Put επηρέασε τη φάση ενεργοποίησης (διάστημα 0-10 min) του NPQ, ενώ στις μεταχειρίσεις με Spd ή Mg^{2+} οι επιδράσεις στο NPQ ήταν λιγότερο έντονες.

Πιο αναλυτικά η μεταχείριση με Spm επέτρεψε την ενεργοποίηση των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών σχεδόν στον ίδιο βαθμό με το μάρτυρα ($NPQ_{10min, Spm} = 1.1$, $NPQ_{10min, Con} = 1.25$). Στη φάση χαλάρωσης όμως, ενώ ο μάρτυρας απενεργοποίησε φυσιολογικά τους φωτοπροστατευτικούς του μηχανισμούς ($NPQ_{25min, Con} = 0.31$) στη μεταχείριση με Spm είχαμε πολύ μικρότερη απενεργοποίηση ($NPQ_{25min, Spm} = 0.54$). Η μεταχείριση με Put προκάλεσε μείωση της ενεργοποίησης της φωτοπροστασίας σε σχέση με τον μάρτυρα ($NPQ_{10min, Put} = 0.55$), ενώ η χαλάρωση έγινε στον ίδιο βαθμό με το μάρτυρα ($NPQ_{25min, Put} = 0.35$). Τέλος, η προσθήκη μαγνησίου δεν φάνηκε να επηρεάζει τους φωτοπροστατευτικούς μηχανισμούς, ενώ η επιπλέον Spd είχε παρόμοια αποτελέσματα με την επιπλέον Spm, μικρότερης όμως έντασης. Η ειδικότητα στη δράση της κάθε πολυαμίνης, αλλά και οι διαφορές σε σχέση με τα δισθενή ανόργανα κατιόντα αύξησαν το ενδιαφέρον για την περαιτέρω μελέτη αυτών των φαινομένων. Αξιοσημείωτο, είναι το γεγονός ότι ενώ ο ρόλος στη φωτοσύνθεση για ανόργανα ιόντα όπως το ασβέστιο (Debus, 1992; Dilley, 2004) και το μαγνήσιο (Hind et al., 1974) έχουν μελετηθεί έντονα τα τελευταία 40 χρόνια για τις πολυαμίνες δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες. Εφόσον διαφάνηκε από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα ότι οι φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί επηρεάζονται από την εξωγενή προσθήκη πολυαμινών αναζητήθηκαν τα νέα όρια στην ενεργοποίηση και απενεργοποίηση (χαλάρωση) τους. Για αυτό το σκοπό κρίθηκαν απαραίτητες οι μελέτες σε πολλές διαφορετικές συνθήκες φωτισμού τόσο μικρότερης, όσο και μεγαλύτερης έντασης συγκριτικά με αυτήν στην οποία ήταν προσαρμοσμένα.

6.2. Η επίδραση των πολυαμινών στην ενεργοποίηση του μηχανισμού μη φωτοχημικής απόσβεσης ενέργειας (NPQ) σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού.

Φυλλικά δισκία καπνού μεταχειρίστηκαν με 1 mM Spm, Spd ή Put κάτω από φωτισμό $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ σε θερμοκρασία 25°C . Στη συνέχεια προσαρμόστηκαν για 10 min σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και εκτιμήθηκε ο παράγοντας NPQ για κάθε μία από τις περιπτώσεις. Οι τιμές της έντασης του φωτός επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτονται τα φυσικά όρια της ηλιακής ακτινοβολίας (περίπου $1800 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Ο μάρτυρας (φυλλικά δισκία χωρίς εξωγενή προσθήκη Spm) αυξάνει τις τιμές του NPQ καθώς αυξάνει η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας (εικόνα 6.4A). Αυτό είναι μια φυσιολογική αντίδραση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού εφόσον η περίσσεια των φωτονίων πρέπει να διαχειριστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος φωτοκαταστροφής.



Εικόνα 6.4. Η ενεργοποίηση των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών (NPQ) σε φυλλικά δισκία σε συνάρτηση με την ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας (A) και η επίδραση της Put (B), της Spd (Γ) και της Spm (Δ) [1mM]. Η Put φαίνεται να μειώνει το NPQ σε τιμές φωτισμού παρόμοιες με εκείνες των συνθηκών επώασης ($50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), ενώ σε υψηλότερες εντάσεις φαίνεται να έχει μικρότερη επίδραση. Η Spd αυξάνει έως 350% σε σχέση με το μάρτυρα το NPQ σε χαμηλό φωτισμό, ενώ σε μεγαλύτερες τιμές έντασης φωτισμό η % διαφορά ελαχιστοποιείται. Η μεταχείριση φυλλικών δισκίων με Spm αυξάνει πάνω από 400% την τιμή του NPQ σε χαμηλό φωτισμό ενώ σε υψηλές εντάσεις η % διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα μειώνεται. Γενικά, η φωτοπροστασία υπό φυσιολογικές συνθήκες ενεργοποιείται όταν υπάρχει περίσσεια φωτονίων (δηλαδή φαινόμενα που παρατηρούνται σε υψηλό φωτισμό (A)). Στις μεταχειρίσεις με πολυαμίνες όμως ισχύει κάτι διαφορετικό αφού φαίνεται να υπάρχει μεγάλο NPQ ακόμη και σε χαμηλό (ακίνδυνο) φωτισμό.

Η μεταχείριση με Spm αυξάνει το NPQ σε σχέση με το μάρτυρα στο μεγαλύτερο μέρος του συνολικού εύρους των εντάσεων που εξετάστηκαν, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση φτάνει 4 φορές παραπάνω της τιμής NPQ του μάρτυρα (εικόνα 6.4Δ). Αυτή η μεγάλη αύξηση παρατηρείται σε εντάσεις φωτισμού παραπλήσιες με την επιλεγμένη ένταση επώασης. Η αυξημένη Spm αυξάνει το ποσό εκείνο της φωτεινής ακτινοβολίας που καταλήγει σε μη φωτοχημεία (non-radiative dissipation), τόσο σε ανώτερα φυτά (αυτή η ενότητα), όσο και σε ευκαρυωτικά μονοκύτταρα φύκη (ενότητες 3, 4 και 5).

Η μεταχείριση με Spd αυξάνει το NPQ σε σχέση με το μάρτυρα όπως και η Spm (εικόνα 6.4Γ). Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται και πάλι σε εντάσεις φωτισμού παραπλήσιες με την επιλεγμένη ένταση επώασης. Τελικά και η αυξημένη Spd (τριαμίνη) αυξάνει εκείνο το ποσό της φωτεινής ακτινοβολίας που καταλήγει σε μη φωτοχημεία (non-radiative dissipation).

Η μεταχείριση με Put μειώνει το NPQ σε σχέση με το μάρτυρα στις χαμηλές εντάσεις φωτισμού (2 έως 100 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Στις ενδιάμεσες εντάσεις (100-500 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) παρατηρείται μικρή αύξηση ενώ στις υψηλές εντάσεις (500-1800 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) έχουμε και πάλι μια μικρή μείωση. Τελικά και η αυξημένη Put (διαμίνη) επηρεάζει μεν τους φωτοπροστατευτικούς μηχανισμούς, αλλά με διαφορετικό πρότυπο σε σύγκριση με τις μεγαλύτερες σε μέγεθος και φορτίο (Spd και Spm). Μια γενική τάση είναι η αυξημένη Put να αποτρέπει μερικώς την ενεργοποίηση των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών, ενώ η Spm και η Spd φαίνεται να εντείνουν την ενεργοποίηση της φωτοπροστασίας.

6.3. Η επίδραση της αυξημένης Put στο χρόνο ενεργοποίησης, στο βαθμό ενεργοποίησης και στη χαλάρωση των φωτοπροστατευτικών διαδικασιών.

Οι φωτοπροστατευτικές διαδικασίες πρέπει να ενεργοποιούνται και να απενεργοποιούνται μόνο σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Στον πίνακα III φαίνονται ποιες είναι οι συνθήκες που καθορίζουν το πότε και πως θα ενεργοποιηθούν/απενεργοποιηθούν, ενώ εξηγούνται και οι λόγοι που καθιστούν σημαντική αυτή τη ρύθμιση.

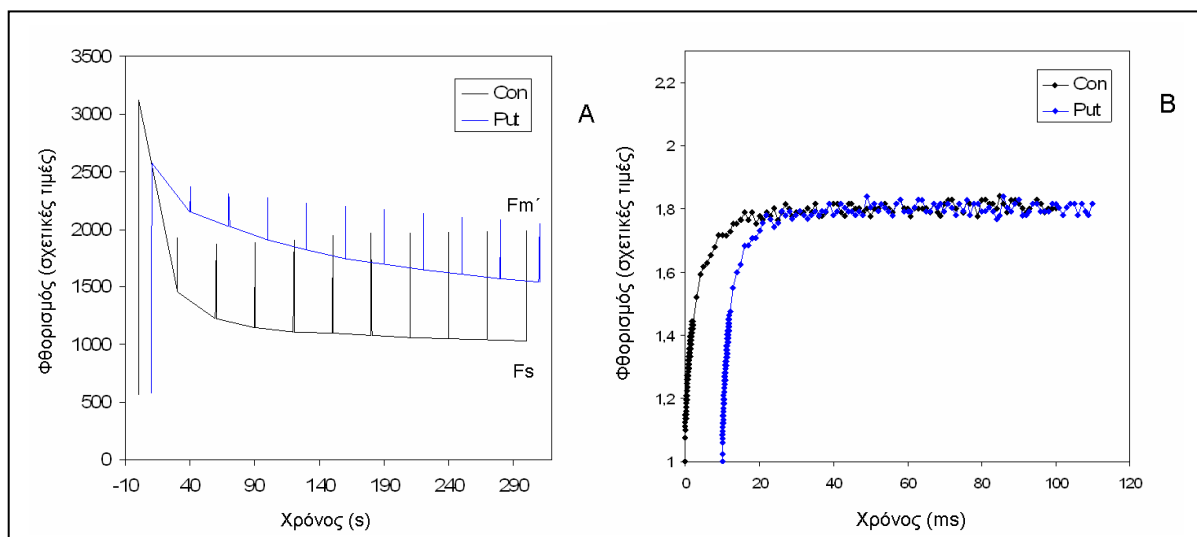
Πίνακας III. Φυσιολογικές συνθήκες ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών οι οποίοι μετατρέπουν σε θερμότητα την περίσσεια ενέργειας που συνέλλεξε ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, καθώς και οι συνέπειες της μη σωστής ρύθμισής τους.

	Μικρό NPQ (low dissipation)	Μεγάλο NPQ (high dissipation)
LL (χαμηλός φωτισμός)	Φυσιολογική αντίδραση ¹	Απώλειες ενέργειας ²
HL (υψηλός φωτισμός)	Κίνδυνος ³	Φυσιολογική αντίδραση ⁴

1. μεγιστοποίηση φωτοσυνθετικής απόδοσης
2. χαμηλή φωτοσυνθετική απόδοση
3. φωτοαναστολή/φωτοκαταστροφή
4. φωτοπροστασία

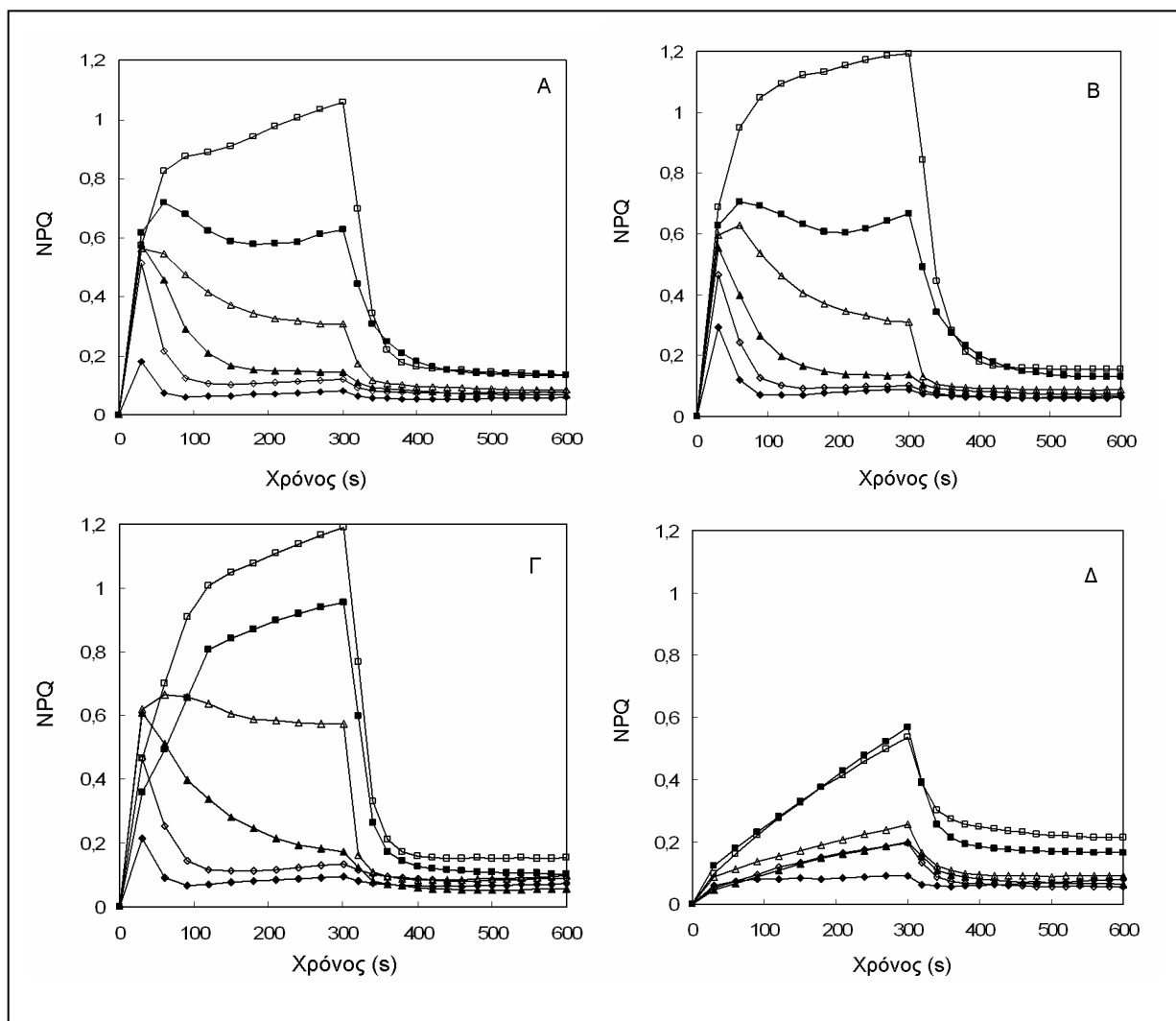
Για τη μελέτη της επίδρασης της Put στη διαδικασία διαχείρισης της φωτονιακής ενέργειας χορηγήθηκε 1 mM Put και επώαστηκαν φυλλικά δισκία σε 6 διαφορετικές εντάσεις φωτισμού 10, 30, 60, 100, 350, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Στην εικόνα 6.5A παρουσιάζεται η επίδραση της χορήγησης Put στο Fm και στο Fm' κατά την προσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε φως 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ και στην 6.5.B παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες OJIP παρουσία του αναστολέα της ροής των ηλεκτρονίων στο επίπεδο του Q_B (DCMU) για δείγματα προσαρμοσμένα στο σκοτάδι.



Εικόνα 6.5. Προσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού φυλλικών δισκίων μεταχειρισμένων (κυανό) και μη (μαύρο) με 1mM Put σε $100\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ φως. Κάθε $30\ \text{s}$ ένας βραχύς και ισχυρός παλμός ($3000\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, $0.2\ \text{s}$) διέκοπτε στιγμιαία τη φωτοχημεία και ο φθορισμός λάμβανε τη μέγιστη τιμή του. Ο φθορισμός σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή t (F_t) στη μεταχείριση είχε μεγαλύτερη τιμή από ότι στο μάρτυρα, ενώ και η τελική τιμή F_s για τη μεταχείριση είναι φανερά μεγαλύτερη από αυτή του μάρτυρα. Β. ΟJIP καμπύλη παρουσία του αναστολέα της ροής των ηλεκτρονίων DCMU. Η καμπύλη που αντιστοιχεί στη μεταχείριση με $1\ \text{mM Put}$ είναι μετατοπισμένη κατά $10\ \text{ms}$ σε σχέση με το μάρτυρα για να επιτρέπεται η σύγκριση. Εφόσον το F_v και το συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης (Area) παραμένει ίδιο με το μάρτυρα, τα ενεργά κέντρα στις δύο περιπτώσεις είναι ίσα.

Στην εικόνα 6.6 παρουσιάζονται οι κινητικές NPQ για δύο διαφορετικά χρονικά σημεία ($8\ \text{h}$ και $24\ \text{h}$ επώασης με Put). Η μεταχείριση φυλλικών δισκίων καπνού με Put είχε δύο σημαντικές επιδράσεις στην κινητική ενεργοποίησης των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών. Το NPQ στο μάρτυρα ενεργοποιείται άμεσα με την έκθεση στο φως, και όταν η ένταση φωτισμού είναι χαμηλή (ακίνδυνη) τότε μειώνεται στα 2-3 πρώτα min και σταθεροποιείται σε χαμηλές τιμές (εικόνα 6.6ΑΓ). Η μεταχείριση με Put αναστέλλει την άμεση αυτή απόκριση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στην ξαφνική έκθεση στο φως (εικόνα 6.6Δ). Επίσης, η Put μειώνει την τιμή του NPQ στο τέλος της περιόδου ακτινοβολήσης ακόμη και για τις υψηλότερες εντάσεις φωτισμού ($\text{NPQ}_{5\text{min,Put } 500\text{PAR}} < \text{NPQ}_{5\text{min,Con } 500\text{PAR}}$). Σε ότι αφορά τη 'χαλάρωση' του NPQ λαμβάνει χώρα κατά τη μετάβαση στο σκοτάδι τόσο στο μάρτυρα όσο και στη μεταχείριση.

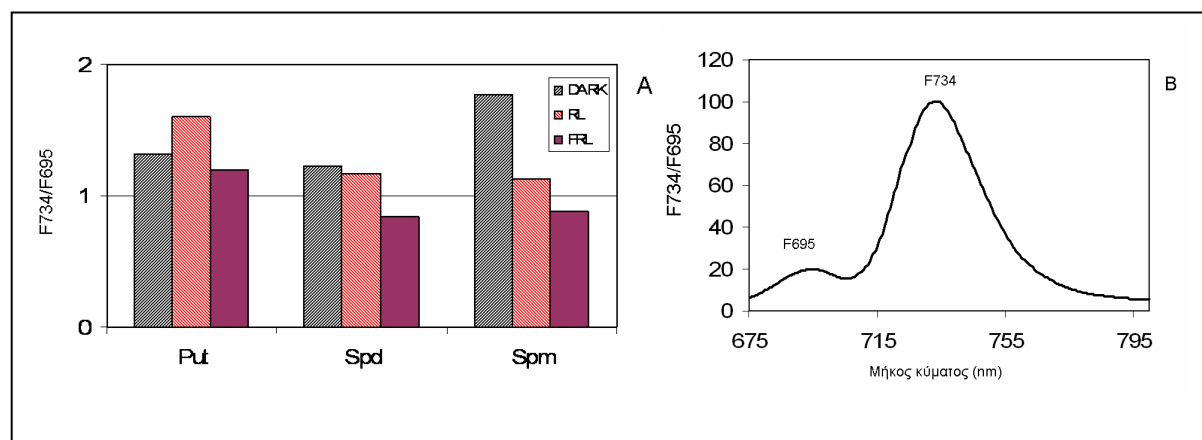


Εικόνα 6.6. Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των φωτοπροστατευτικών μηχανισμών (NPQ) σε φυλλικά δισκία μεταχειρισμένα με Put (1 mM). Το NPQ μελετήθηκε σε 6 διαφορετικές εντάσεις φωτισμού και η φάση ενεργοποίησης διήρκησε 300 s και η φάση απενεργοποίησης επιπλέον 300 s. Οι μετρήσεις έγιναν στις 8h (A, B) και στις 24 h (Γ, Δ) επώασης. Η μεταχείριση με Put δεν φαίνεται να επιδρά σημαντικά τις πρώτες 8 h στο NPQ. Στις 24 h υπάρχει μείωση της μέγιστης τιμής NPQ καθώς και αλλαγή στην μορφή της καμπύλης ενεργοποίησης (λεπτομέρειες στο κείμενο). Σύμβολα για τις 6 διαφορετικές εντάσεις 10, 30, 60, 100, 350, 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$: κλειστός ρόμβος, ανοιχτός ρόμβος, κλειστό τρίγωνο, ανοιχτό τρίγωνο, κλειστό τετράγωνο, ανοιχτό τετράγωνο αντίστοιχα.

6.4. Η επίδραση των πολυαμινών στις επιμέρους διαδικασίες μη φωτοχημικής απόσβεσης ενέργειας (NPQ).

Η φωτοπροστασία εκτιμώμενη ως μη φωτοχημική μείωση του φθορισμού (NPQ) οφείλεται σε τρεις τουλάχιστον διαφορετικές διαδικασίες. Αυτές οι τρεις διαδικασίες σχετίζονται α) με την ενεργοποίηση της μεμβράνης και τη δημιουργία περιοχών όπου αποσβένεται ο φθορισμός (energization quenching, qE), β) με τη μεταφορά μέρους της κεραίας του PS II στο PS I (state transitions, qT) και γ) με την φωτοαναστολή (photoinhibition, qI). Η πρώτη έχει χρόνο επαγωγής και χαλάρωσης μερικά δευτερόλεπτα. Η δεύτερη είναι πιο βραδεία και μπορεί να διαρκέσει μερικά λεπτά, ενώ η τελευταία συμβαίνει στο φως, αλλά δεν επιδιορθώνεται στο σκοτάδι.

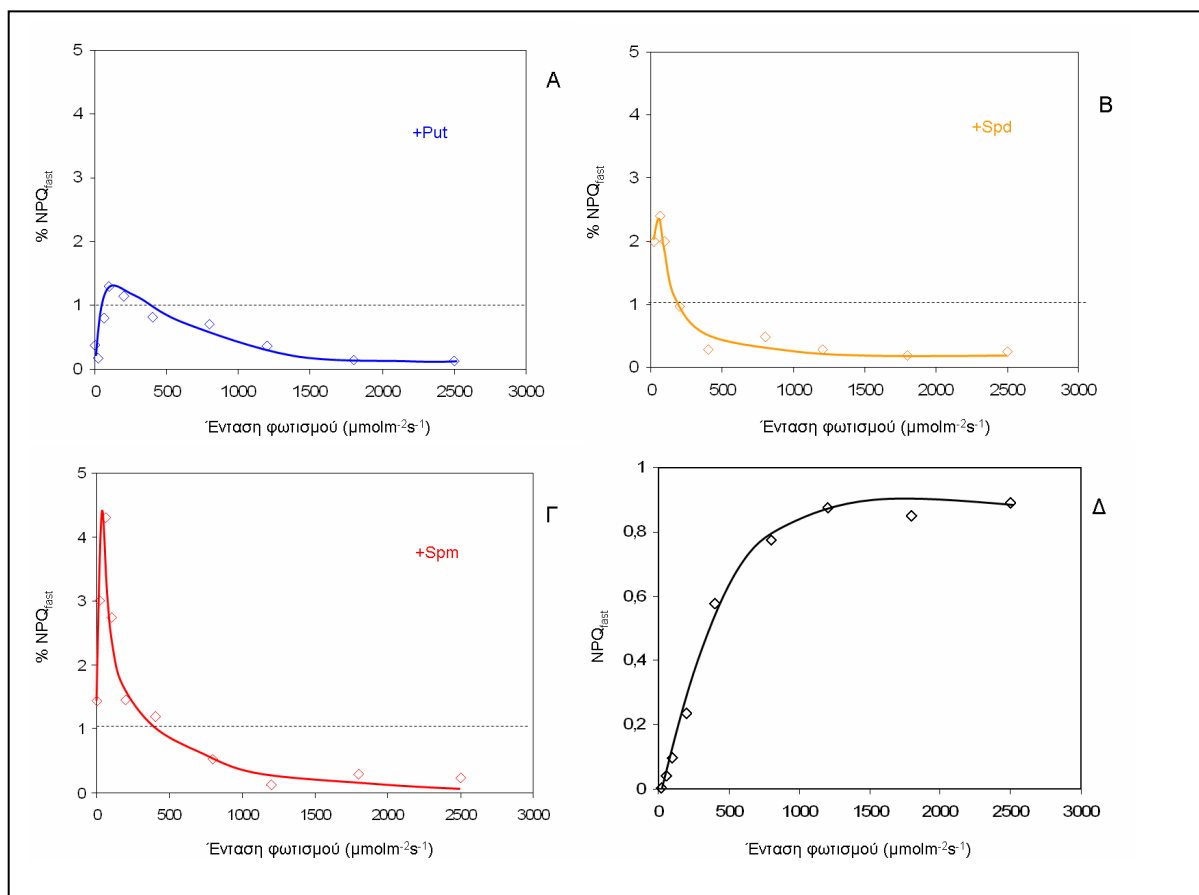
Η επίδραση των πολυαμινών στο μηχανισμό των state transition μελετήθηκε με φασματοσκοπία χαμηλής θερμοκρασίας (77K). Στους 77K τα φυλλικά δισκία όταν διεγερθούν εμφανίζουν δύο κύρια μέγιστα φθορισμού 695nm και 734nm (εικόνα 6.7B).



Εικόνα 6.7. Επίδραση των πολυαμινών στο state transition σε φυλλικά δισκία καπνού. Η μεταφορά τμήματος της κεραίας από το PS II στο PS I (state transitions) προκαλεί μείωση της κορυφής στα 695 nm και αύξηση της κορυφής στα 734 nm. Η μεταχείριση των δισκίων με πολυαμίνες σε σκοτάδι, σε φως που διεγείρει κυρίως το PS II (κόκκινο φως, RL) και σε φως που διεγείρει το PS I (υπέρυθρο φως, FRL) παρουσιάζεται σαν η ποσοστιαία διαφορά ως προς το μάρτυρα. Η μεταχείριση με Put σε όλες τις συνθήκες ευνοεί την μετακίνηση της κεραίας προς το PS I (αύξηση λόγου F734/F695). Η μεταχείριση με Spd ευνοεί την επιστροφή της κεραίας στο PS II παρουσία FRL (μείωση λόγου ως F734/F695). Τέλος, η Spm προκαλεί αύξηση του λόγου στο σκοτάδι (77%) και μικρή μείωση στο υπέρυθρο σε σχέση με το μάρτυρα. Τα φάσματα όπως του μάρτυρα (B) ελήφθησαν στους 77K όπως περιγράφεται στις μεθόδους.

Η πρώτη κορυφή (F695) προέρχεται από το PSII η δεύτερη από το PSI (Govindjee, 2004). Οι τιμές αυτές μεταβάλλονται ανάλογα με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας των φωτοσυστημάτων. Η ακτινοβολή με ερυθρό φως διεγείρει κυρίως το PSII και αν διαρκέσει μερικά λεπτά τότε τμήμα της κεραίας αποσυνδέεται (κατόπιν φωσφορυλίωσης) από το PSII και μεταφέρεται στο PSI. Αν το δείγμα ακτινοβοληθεί με υπέρυθρο φως η κεραία επιστρέφει στο PSII (αποφωσφορυλίωση του LHCI-P). Μετά τη χορήγηση 1 mM Put, Spd ή Spm και επώασης σε τρεις διαφορετικές συνθήκες (σκοτάδι, ερυθρό φως, υπέρυθρο) μελετήθηκε η επίδραση των μεταχειρίσεων στο λόγο FI/FII (εικόνα 6.4.1A) Ο λόγος αυτός αποτελεί μέτρο του ισοζυγίου διέγερσης μεταξύ των PSI και PSII αντίστοιχα. Η Put φαίνεται να αυξάνει σε όλες τις συνθήκες τη διέγερση υπέρ του PSI από 20 έως 60% περισσότερο από το μάρτυρα. Η Spd και η Spm φάνηκαν να έχουν παρόμοια επίδραση στο λόγο FI/FII για όλες τις διαφορετικές συνθήκες. Μεταξύ των δύο η Spm έδειξε μεγαλύτερες ποσοστιαίες διαφορές με 77% αύξηση για το FI/FII που μετρήθηκε σε δείγματα προσαρμοσμένα στο σκοτάδι, ενώ στις συνθήκες ακτινοβολήσης (ερυθρό, υπέρυθρο) διαφέρουν ελαφρά από το μάρτυρα (διαφορές μεταξύ 12-17 ποσοστιαίων μονάδων).

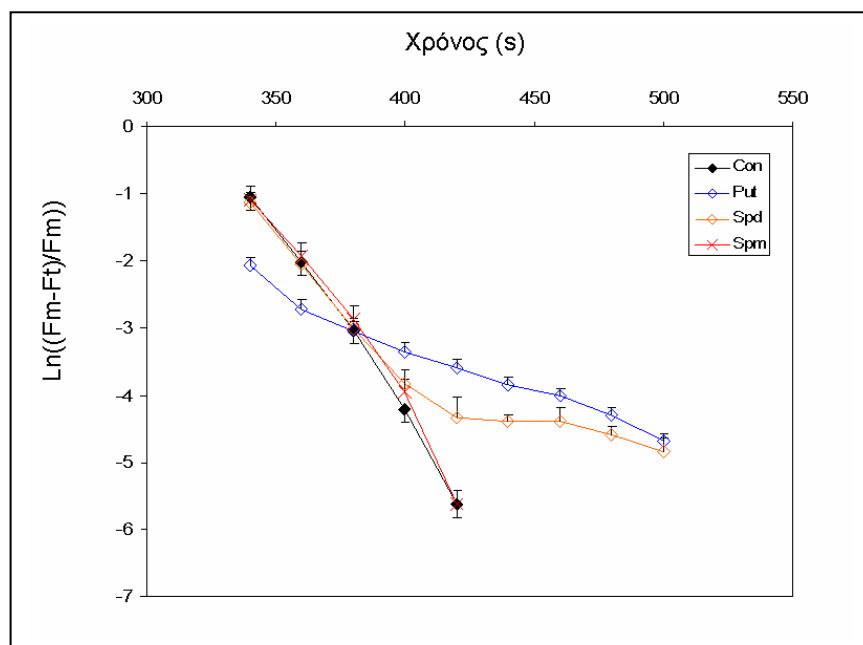
Η ακτινοβολή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού εκτός από την ενεργοποίηση των state transitions φορτίζει τη μεμβράνη των θυλακοειδών μέσω της δημιουργίας κλίσεων συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ στρώματος και μικροχώρου. Σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού το $\Delta pH/\Delta \psi$ είναι μικρό, αλλά καθώς η ένταση φωτισμού αυξάνεται, μεγαλώνουν αντίστοιχα και οι διαφορές $\Delta pH/\Delta \psi$. Με δεδομένο ότι το qE στα φυτά (μη φωτοχημική απόσβεση που οφείλεται στη ενεργοποίηση/φόρτιση της μεμβράνης) είναι εντονότερο από το qT (αντίστοιχη απόσβεση που οφείλεται στα state transitions) έχει ιδιαίτερη αξία η μελέτη της επίδρασης των πολυαμινών στη φόρτιση της μεμβράνης. Μάλιστα έχει αναφερθεί ότι στα φυτά η συνεισφορά του qE στο συνολικό NPQ φθάνει το 80%. Με χορήγηση 1 mM Put, Spd ή Spm και επώαση σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού, όμοιες με της προηγούμενης ενότητας εκτιμήθηκε ο παράγοντας NPQ_{fast} ($NPQ_{fast} = (Fm/Fm') - (Fm/Fm'_r)$) σύμφωνα με τους Maxwell and Johnson (2000). Ο παράγοντας αυτός ποσοτικοποιεί τις ταχύτερες διαδικασίες του συνολικού NPQ δηλαδή επηρεάζεται κυρίως από το qE και πολύ λιγότερο από το qT. Η Put δείχνει να επηρεάζει σε μικρότερο βαθμό από τη Spd και τη Spm το NPQ_{fast} (εικόνα 6.8). Πιο δραστική στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες ήταν η Spm που ξεπέρασε πάνω από 4 φορές τον μάρτυρα.



Εικόνα 6.8. Επίδραση της Put (A), της Spd (B) και της Spm (Γ) στους επιμέρους συντελεστές του NPQ (NPQ_{fast}). Η Spm και η Spd προκαλούν τις μεγαλύτερες % διαφορές ως προς το μάρτυρα και μάλιστα η Spm προκαλεί έως και 400% αύξηση σε σχετικά χαμηλές εντάσεις φωτισμού. Η Spd σε χαμηλό φως αυξάνει το qET, ενώ σε υψηλές εντάσεις το μειώνει. Τέλος, η Put σε χαμηλές εντάσεις αυξάνει (περίπου 30%) το qET και σε μεγαλύτερες προκαλεί μια μείωση της τάξης του 10%. Ο μάρτυρας εμφανίζει φυσιολογική ενεργοποίηση (Δ).

Πιο αναλυτικά η Put για 0-500 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ αύξησε το NPQ_{fast} έως 27% ενώ σε μεγαλύτερη ένταση το μείωσε ελαφρά, έως 30% (εικόνα 6.8B). Η Spd αύξησε έως 240% σε χαμηλές εντάσεις φωτισμού, ενώ σε μεγαλύτερες από 200 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ το φαινόμενο αντιστράφηκε (εικόνα 6.8Γ). Τέλος η χορήγηση Spm είχε παρόμοια επίδραση με τη Spd, αλλά αρκετά εντονότερη αφού στην περιοχή 0-500 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ εμφάνισε τιμές NPQ_{fast} έως 430% παραπάνω σε σχέση με το μάρτυρα (εικόνα 6.8Δ). Σε μια προσπάθεια να αναλυθεί περισσότερο η επίδραση των πολυαμινών στη φόρτιση της μεμβράνης εκτιμήθηκε ο ρυθμός αποφόρτισης σύμφωνα με τους Horton και Hague (1988). Στην εικόνα 6.9 παρουσιάζεται ο παράγοντας $\ln[(Fm' - Ft)/Fm']$ που εκτιμήθηκε σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω για μία επιλεγμένη ένταση φωτισμού. Η επιλογή της έντασης έγινε έτσι ώστε η μεμβράνη να έχει φορτιστεί ικανοποιητικά (μάρτυρας) και να είναι δυνατή η

μελέτη χαλάρωσης της φόρτισης. Ο μάρτυρας χαλαρώνει το F_m με γρήγορο ρυθμό (απότομη κλίση). Αυτό είναι φυσιολογικό δεδομένου ότι σε αυτό το διάστημα συμβαίνει η αποφόρτιση του μικροχώρου. Ο χρόνος ημιαποφόρτισης είναι περίπου 45 s (Horton and Hague, 1988).



Εικόνα 6.9. Επίδραση της μεταχείρισης φυλλικών δισκίων με πολυαμίνες στο ρυθμό χαλάρωσης της φόρτισης της μεμβράνης των θυλακειδών. Ο παράγοντας $\text{Ln}[(F_m - F_t)/F_m]$ αποτελεί μέτρο του ρυθμού χαλάρωσης που οφείλεται στην μείωση του Δp_H μεταξύ στρώματος και μικροχώρου (lumen) και της επιστροφής μέρους της κεραίας (LHC II) από το PS I στο PS II (state transition) (Horton and Hague, 1988). Η φωτεινή πηγή ($500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) που έδωσε την απαραίτητη ενέργεια για τη φόρτιση της μεμβράνης έκλεισε στα 320 s και η πρώτη τιμή F_t λήφθηκε μετά από 20 s από βραχείς ισχυρούς παλμούς ($3000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 0.2 s). Η Put (κυανό) φαίνεται να καθυστερεί την αποφόρτιση όπως και η Spd (πορτοκαλί). Η Spm δεν φαίνεται να διαφέρει από το μάρτυρα ($n=5$).

Η χορήγηση Spm δείχνει να μην επιδρά στο ρυθμό χαλάρωσης. Η χορήγηση Put δείχνει να μειώνει την κλίση της καμπύλης για τα πρώτα 60 s της χαλάρωσης, ενώ η Spd δείχνει να μειώνει την κλίση όχι αρχικά αλλά μετά το πρώτο λεπτό χαλάρωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο – Συζήτηση

Σε οποιοσδήποτε περιβαλλοντικές συνθήκες οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί επιχειρούν να διατηρήσουν μία ισορροπία μεταξύ της παροχής ενέργειας μέσω της ροής ηλεκτρονίων και της κατανάλωσης ενέργειας λόγω αφομοίωσης διοξειδίου του άνθρακα. Αυτό το ισοζύγιο απαιτείται ώστε να προστατέψει τον οργανισμό από τα επικίνδυνα αποτελέσματα της περίσσειας φωτονίων και ταυτόχρονα να διατηρήσει ικανές δεξαμενές ATP και NADPH για τον μεταβολισμό του κυττάρου (Maxwell et al., 1994). Ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς που επηρεάζει την παροχή ενέργειας σχετίζεται με τη διαχείριση της ενέργειας των φωτονίων και αποτελεί χώρο αιχμής στη σύγχρονη φωτοσύνθεση.

Η ενέργεια των φωτονίων που απορροφάται από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό μπορεί να αξιοποιηθεί στη φωτοχημεία, να προκαλέσει εκπομπή φωτονίων μεγαλύτερου μήκους κύματος (φθορισμός) και να μετατραπεί σε θερμότητα. Η τελευταία μπορεί να θεωρηθεί το άθροισμα του ποσού της ενέργειας που οφείλεται σε απώλειες (ποσό που δεν μπορεί να εκμηδενισθεί καθώς το απαγορεύουν οι νόμοι της θερμοδυναμικής) και του ποσού που οφείλεται στην ελεγχόμενη διάχυση μέσω ειδικών μηχανισμών. Το δεύτερο ποσό λόγω του ότι μπορεί να αυξομειώνεται ελεγχόμενα ανάλογα με τις ανάγκες προστασίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από το φως έχει ιδιαίτερη σημασία. Ο προαναφερθείς έλεγχος σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την ενεργοποίηση της μεμβράνης των θυλακοειδών και ποσοτικοποιείται συνήθως από το συντελεστή qE του NPQ. Μεγάλες τιμές φόρτισης της μεμβράνης (λόγω μεγάλων $\Delta\psi/\Delta pH$) οδηγούν σε άμεση ενεργοποίηση του μηχανισμού προστασίας και άρα αύξησης του συντελεστή qE . Στα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας φαίνεται η επίδραση των πολυαμινών στους μηχανισμούς φωτοπροστασίας. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά πάνω στην επίδραση των πολυαμινών στο NPQ.

Επειδή οι πολυαμίνες και συγκεκριμένα η Spm φάνηκε να μειώνουν το μέγιστο του φθορισμού (F_m) θα πρέπει η διαφορά στην ενέργεια να έχει μετατραπεί σε φωτοχημεία ή θερμότητα. Συνεπώς η εκτίμηση των παραγόντων φωτοχημείας και μη φωτοχημείας θα απαντήσει στο ερώτημα. Η χορήγηση πολυαμινών σε φυλλικά δισκία καπνού φάνηκε να μειώνει τη φωτοχημεία (παράγοντες F_v/F_m και $PSI\alpha$ εικόνες 6.1 και 6.2). Άρα κάποια ή όλες οι μη φωτοχημικές διαδικασίες θα πρέπει να ενισχύονται από την χορήγηση πολυαμινών. Το συνολικό NPQ είναι άθροισμα της δράσης τριών τουλάχιστον διαφορετικών διαδικασιών (Mueller et al., 2001). Αυτές περιλαμβάνουν τη φόρτιση της μεμβράνης και τη θερμική

διάχυση της απορροφηθείσας φωτονιακής ενέργειας που προαναφέρθηκε, τη μεταβολή ισοζυγίου διέγερσης των δύο φωτοσυστημάτων υπέρ του PSI και τέλος τη φωτοαναστολή των PS II κέντρων.

Αν η επίδραση οφείλεται σε κατιοντικές δράσεις θα έπρεπε προσθήκη άλλων κατιόντων να οδηγήσει σε παρόμοιο αποτέλεσμα με τις πολυαμίνες. Αντίθετα αν η επίδραση ήταν μη κατιοντικής προέλευσης θα είχαμε διαφορές. Η χορήγηση κατιόντων μαγνησίου δεν είχε επίδραση στο NPQ συνεπώς απομακρύνεται το πρώτο σενάριο (εικόνα 6.3). Ένα γεγονός που συμφωνεί με την ανάληψη ειδικών ρόλων είναι και το ότι η Put λειτούργησε με διαφορετικό τρόπο από ότι οι Spd και Spm. Πιο συγκεκριμένα ελλάτωσε το συνολικό NPQ τόσο σε συνάρτηση με το χρόνο που χρειάζεται για να ενεργοποιηθεί (εικόνα 6.3A), όσο και σε συνάρτηση με την ένταση φωτισμού (εικόνα 6.8A). Η μείωση του NPQ μπορεί να οφείλεται είτε στην αδυναμία να ενεργοποιηθεί ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός την φωτοπροστασία, είτε στην μη αναγκαιότητα να ενεργοποιηθεί αυτή. Αν η φωτοπροστασία μπορεί να ενεργοποιηθεί, αλλά στις δεδομένες συνθήκες δεν συμβαίνει τότε σε άλλες συνθήκες (εννοείται συνθήκες πιο έντονου φωτισμού) θα πρέπει να ενεργοποιηθεί. Σε περίπτωση που η ένταση φωτισμού αυξηθεί αλλά η φωτοπροστασία δεν ενεργοποιηθεί τότε πρόκειται για ενδεικτικό βλάβης στη λειτουργικότητα της φωτοπροστασίας (βλ. πίνακα II). Στις εικόνες 6.4 και 6.6 είναι φανερό ότι η αύξηση της έντασης φωτισμού επιτρέπει την αύξηση της τιμής του NPQ. Άρα βλάβη αποκλείεται να υπάρχει και τα δεδομένα ταιριάζουν στην εναλλακτική υπόθεση. Δηλαδή η φωτοπροστασία συνεχίζει να λειτουργεί αλλά ενεργοποιείται σε πιο μικρό βαθμό από ότι στο μάρτυρα (εικόνα 6.4).

Ανάλυση της κινητικής ενεργοποίησης του NPQ (εικ 6.6) δείχνει ότι η απότομη απόκριση (κορυφή NPQ στα 30 s) που παρατηρείται συνήθως, αναστέλλεται εντελώς με τη χορήγηση Put. Αυτό το φαινόμενο εμφανίζεται σε ειδικές περιπτώσεις στη βιβλιογραφία και δεν παρατηρήθηκε στην πορεία των πειραμάτων με τη χορήγηση Spm, Spd ή ανόργανων κατιόντων (δεδομένα δεν παρατίθενται). Παρόμοιος λειτουργικά φαινότυπος παρουσιάζεται στην περίπτωση φωτοσυνθετικού μηχανισμού χωρίς το πολυπεπίδιο CP22 (Li et al., 2000). Το PsbS (CP22) είναι διαμεμβρανικό (τέσσερις α έλικες) και βρίσκεται μεταξύ της φωτοσυλλεκτικής κεραίας LHC και του RCII αλλά είναι άγνωστη η ακριβής του θέση. Το PsbS ενεργοποιείται από το pH του μικροχώρου, μέσω της πρωτονίωσης δυο καρβοξυτελικών ομάδων και λειτουργεί σαν αισθητήρας αυξημένης πρωτονιακής συγκέντρωσης (Li et al., 2004). Συνεπώς η χορήγηση Put φαίνεται να απέτρεψε την ενεργοποίηση του PsbS δηλαδή μοιάζει να απέτρεψε την οξίνιση του μικροχώρου. Οι πολυαμίνες έχουν προταθεί στο παρελθόν ότι μπορεί να λειτουργούν σαν ρυθμιστές του

κυτταροπλασματικού pH (Slocum et al., 1984), αλλά δεν υπάρχει κάτι σχετικό με το χλωροπλάστη. Επίσης, η μη οξίνιση θα μπορούσε να οφείλεται στην μειωμένη απελευθέρωση πρωτονίων στο μικροχώρο σαν αποτέλεσμα φωτοαναστολής των φωτοσυστημάτων PSII.

Ελέγχος της πυκνότητας και λειτουργικής κατάστασης των κέντρων αντίδρασης έδειξε ότι η χορήγηση Put δεν παρεμπόδιζε τα PS II κέντρα (εικόνα 6.5B). Συνεπώς, η πιο πιθανή εξήγηση για την επίδραση της Put στους μηχανισμούς φωτοπροστασίας είναι ότι με κάποιο τρόπο αναστέλλει την οξίνιση του μικροχώρου. Λεπτομέρειες για το πώς γίνεται κάτι τέτοιο δεν μπορούν να δοθούν με βεβαιότητα χωρίς τη διενέργεια υποκυτταρικών μελετών και κυρίως την απομόνωση χλωροπλαστών και την απευθείας χορήγηση Put. Αυτές οι μελέτες καθώς και ένα προτεινόμενο μοντέλο που ερμηνεύει ικανοποιητικά τις παρατηρούμενες επιδράσεις της Put παρουσιάζονται στην ενότητα 8 (Κεφάλαιο 4).

Στις περιπτώσεις της χορήγησης Spd και Spm η μελέτη της διαχείρισης της φωτονιακής ενέργειας (εικόνα 6.1B Γ. και 6.4 Γ, Δ) έδειξε ότι υπάρχει διαφορετικός τρόπος δράσης σε σχέση με την Put. Δύο είναι οι κύριες διαφορές όπως φαίνονται στη εικόνα 6.1: α) υπάρχει φυσιολογική ενεργοποίηση του NPQ και β) υπάρχει μειωμένη χαλάρωση του NPQ στο σκοτάδι. Το τελευταίο σημαίνει ότι οι Spd-Spm προκαλούν ενεργοποίηση των μηχανισμών φωτοπροστασίας ακόμη και σε συνθήκες που δεν είναι απαραίτητοι (σε σκοτάδι). Μελέτη σε χαμηλότερες και υψηλότερες εντάσεις φωτισμού από τις συνθήκες προσαρμογής των φυλλικών δισκίων (εικ 6.4) δείχνει ότι η ενεργοποίηση που μπορούν να προκαλέσουν οι Spd και Spm ξεπερνάει σε ορισμένες περιπτώσεις το 350% της τιμής του μάρτυρα κάνοντας φανερή μια σημαντική επίδραση των πολυαμινών. Τα φαινόμενα είναι εντονότερα σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού και εξασθενούν ή αντιστρέφονται μερικώς σε υψηλότερες εντάσεις. Αυτό είναι λογικό εφόσον στις χαμηλές εντάσεις ο μάρτυρας έχει χαμηλές τιμές NPQ, άρα κάποιο δείγμα υπερευαίσθητο στο να ενεργοποιεί τους μηχανισμούς του ξεχωρίζει εύκολα, ενώ σε υψηλότερες εντάσεις ακόμη και ο μάρτυρας ενεργοποιεί τους διαθέσιμους μηχανισμούς φωτοπροστασίας, το NPQ μεγιστοποιείται και οι όποιες διαφορές μειώνονται (εικ 6.4A). Τελικά ο λειτουργικός φαινότυπος του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μετά από μεταχείριση με τη Spd ή με τη Spm δείχνει ότι η φωτοπροστασία αναλαμβάνει δράση και μειώνει τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης (πτώση Fv/Fm). Πώς όμως οι πολυαμίνες ενεργοποιούν το NPQ και μάλιστα σε μεγάλο βαθμό;

Η ενεργοποίηση του NPQ στα ανώτερα φυτά οφείλεται κατά 80% στην ενεργοποίηση της μεμβράνης qE (Kramer et al., 2003). Οι επικρατούσες θεωρίες δέχονται ότι φυσιολογικά η έντονη ακτινοβολία ενεργοποιεί ένα βρόγχο προστασίας (Nixon and

Mullineaux, 2000) και τελικά ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός μειώνει την πιθανότητα να καταστραφεί, με κόστος τη μείωση της απόδοσης που λειτουργεί. Ο 'βρόγχος' προστασίας φαίνεται να ξεκινά με την υπεροξίνιση του μικροχώρου λόγω της έντονης φωτοχημείας (Krause et al., 1988). Η οξίνιση προκαλεί πρωτονίωση στις θέσεις COO- συγκεκριμένων καταλείπων των CP29 (Pesaressi et al., 1997), CP 26, (Horton and Ruban, 1992) και PsbS (Li et al., 2002). Η πρωτονίωση αυτή οδηγεί σε αλλαγές της στερεοδιαμόρφωσης των πρωτεϊνών της φωτοσυλλεκτικής κεραίας και σε συνδυασμό με την νεοεμφανισθείσα ζεαξανθίνη προκαλεί ελεγχόμενη θερμική διάχυση της φωτονιακής ενέργειας (Demmig-Adams and Adams, 2000). Επειδή δε το ένζυμο που συνθέτει ζεαξανθίνη (VDE) από τη διαθέσιμη βιολαξανθίνη μέσω ανθεραξανθίνης ενεργοποιείται από την οξίνιση του μικροχώρου (Pfuendel and Dilley, 1993) ο μηχανισμός φαίνεται να συγχρονίζει την στερεοδομική αλλαγή των πεπτιδίων της κεραίας (Havaux and Niyogi, 1999) με την διαθεσιμότητα ενός καροτενοειδούς κατάλληλου σχήματος που θα επιτρέψει την κατάλληλη διαμόρφωση στο LHCII (η 'επίπεδη' ζεαξανθίνη αντικαθιστά στο LHC II την ογκοδέστερη βιολαξανθίνη) (Caffari et al., 2001). Τελικά η ελεγχόμενη διάχυση γίνεται με έναν μηχανισμό απόσβεσης της ενέργειας που δεν είναι κατανοητός πλήρως αφού δεν είναι σαφές το πώς οι διεγερμένες χλωροφύλλες μειώνουν την ενέργεια που μέχρι τότε διοχέτευαν στα κέντρα αντίδρασης και ξαφνικά αντ' αυτού την μετατρέπουν σε θερμότητα.

Αν οι πολυαμίνες Spd και Spm μπορούν να ενεργοποιούν αυτό το βρόγχο προστασίας θα πρέπει να εμπλέκονται σε κάποιο από τα στάδια που προαναφέρθηκαν. Αν δεν εμπλέκονται στο qE τότε θα πρέπει να εμπλέκονται στην μετακίνηση μέρους του LHC II από το PS II στο PSI (state transition). Για να ελεγχθεί το τελευταίο μελετήθηκε η ισορροπία στην κατανομή ενέργειας μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων (εικόνα 6.7). Επειδή η μέθοδος της φασματοσκοπίας σε θερμοκρασία υγρού αζώτου έγινε χωρίς τη χρήση εσωτερικού μάρτυρα (λόγω τεχνικών δυσκολιών) δεν μπορεί να υπάρξει κατηγορηματική απάντηση σε ποιο βαθμό οι πολυαμίνες επηρεάζουν τα state transition. Ειδικά η Put που έδειξε σε όλες τις συνθήκες (σκοτάδι, συνθήκες φωτισμού που ευνοούν το PSII και σε αυτές που ευνοούν το PS I) μια ενίσχυση του λόγου FI/FII υπέρ του PSI φαίνεται πολλά υποσχόμενη. Αντίθετα η Spd και Spm μάλλον επιδρούν μέσω του qE στο NPQ. Σε αυτό συνηγορούν η ικανότητα τους να ενεργοποιούν το NPQ ακόμη και σε χαμηλή ένταση φωτισμού, ο υψηλός βαθμός που ενεργοποιούν το NPQ (έως και 430% παραπάνω του φυσιολογικού) και κυρίως ότι προκαλούν αντίστοιχη αύξηση του παράγοντα NPQ_{fast}. Ο NPQ_{fast} αποτελεί συνισταμένη των qE και qT. Οι Spd και Spm επιδρούν μόλις 15% στους μηχανισμούς που ποσοτικοποιεί το qT (εικόνα 6.7), ενώ επιδρούν έως και 400% στο NPQ_{fast}. Άρα φαίνεται πιθανό να

εμπλέκονται σε κάποιο στάδιο της ενεργοποίησης των κέντρων διάχυσης. Στο παρελθόν ο μηχανισμός ενεργοποίησης του NPQ (qE) είχε φανεί ευαίσθητος στην ενεργοποίηση από αμίνες (Horton, 1996), αλλά σε καμία από τις μελέτες που ακολούθησαν δεν δοκιμάστηκαν αμίνες όπως οι Spd και Spm.

Η ενεργοποίηση του qE περιλαμβάνει διαδικασίες στη μεμβράνη των θυλακοειδών και διαδικασίες στο μικροχώρο. Πληροφορία για το μικροχώρο παρέχει ο ρυθμός χαλάρωσης $\ln[(Fm' - Ft)/Fm']$. Η ανάλυση έδειξε ότι η χορήγηση Put και Spd καθυστερούν την αποφόρτιση της μεμβράνης, ενώ η Spm δεν φάνηκε να διαφέρει από το μάρτυρα. Τελικά ανακεφαλαιώνοντας το σύνολο των αποτελεσμάτων από αυτή την ενότητα αξίζει να τονιστούν δύο νέα στοιχεία. Πρώτον ότι μας υποδεικνύεται ο μικροχώρος σαν τόπο δραστηριοποίησης της Put και της Spd (μείωση του NPQ_{30s} από Put και επιδρούν στο $\ln[Fm - Ft/Fm]$ και για τις δύο). Δεύτερον ότι η Spd και η Spm αυξάνουν την ενεργοποίηση του βρόγχου qE και σε μεγάλο βαθμό (300-400% αύξηση NPQ και NPQ_{fast}) και με τρόπο ανεξάρτητο από την ύπαρξη ΔpH στις θυλακοειδείς μεμβράνες (δεν χαλαρώνει το Fm' στο σκοτάδι οπότε χαλαρώνει η οξίνιση του μικροχώρου).

Αν οι πολυαμίνες εμπλέκονται στη φόρτιση της μεμβράνης των θυλακοειδών όπως υποδεικνύουν τα παραπάνω δεδομένα τότε έχει ιδιαίτερη σημασία η μελέτη της επίδρασής τους σε διαδικασίες που εκμεταλλεύονται αυτή τη φόρτιση προκειμένου να πραγματοποιηθούν. Η πιο σημαντική διαδικασία που έχει συνδεθεί με τη φόρτιση της μεμβράνης των θυλακοειδών είναι η χημειοσμοτική σύνθεση του ATP. Η σύνθεση του ATP αξιοποιεί σύμφωνα με τη χημειοσμοτική θεωρία το $\Delta pH/\Delta \psi$ της μεμβράνης προκειμένου να συντεθεί ATP (Mitchell, 1979).

Επιπρόσθετα αν οι πολυαμίνες συμμετέχουν στους φωτοπροστατευτικούς μηχανισμούς των χλωροφυκών (ενότητες 3, 4, 5) και των ανώτερων φυτών (ενότητα 6) τότε είναι απαραίτητη η μελέτη της επίδρασης τους απευθείας στη φωτοσυλλεκτική κεραία. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι από το σύνολο των εκατοντάδων χλωροπλαστικών πρωτεϊνών μόνο οι πρωτεΐνες της φωτοσυλλεκτικής κεραίας και η Rubisco προσδένονται με ομοιοπολικό τρόπο με πολυαμίνες (Del Duca et al., 1994).

Στις δύο ενότητες που ακολουθούν παραθέτονται στοιχεία που αφορούν τις επιδράσεις των πολυαμινών σε δύο από τις πιο σημαντικές διαδικασίες που λαβαίνουν χώρα στους φυτικούς οργανισμούς, την παραγωγή ενέργειας (ενότητα 8) και την λειτουργία της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ενότητα 7). Η προσωμοίωση των *in vivo* συνθηκών στις *in vitro* μελέτες και η λογική ανασύσταση των μοριακών γεγονότων επέτρεψαν την πρόταση δύο μοντέλων για το ρόλο των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό.

Συνοψίζοντας, τα κυριότερα συμπεράσματα είναι τα εξής:

A. Η χορήγηση Put αναστέλλει την πρόωμη ενεργοποίηση της ελεγχόμενης μη φωτοχημικής διάχυσης της περίσσειας ενέργειας, NPQ (ενδεικτικό μη ενεργοποίησης του PsbS) και καθυστερεί το ρυθμό αποφόρτισης της μεμβράνης των θυλακοειδών από τα πρωτόνια (ενδεικτικό επίδρασης της Put στην εκροή των πρωτονίων από τον μικροχώρο των θυλακοειδών στο στρώμα).

B. Η χορήγηση τόσο Spd, όσο και Spm έχει παρόμοια αποτελέσματα στην ενεργοποίηση των μηχανισμών φωτοπροστασίας (NPQ), ενώ η χορήγηση Put έχει διαφορετικές συνέπειες (ενδεικτικό ανάληψης διακριτών ρόλων από Put και πολυαμίνες που επιβεβαιώθηκε στα επόμενα κεφάλαια).

Γ. Στις μεταχειρίσεις με Spd και Spm επιτρέπεται η ενεργοποίηση της φωτοπροστασίας στο φως, αλλά δεν συμβαίνει ολική απενεργοποίησή τους στο σκοτάδι.

Δ. Στις μεταχειρίσεις με Spd και Spm υπάρχει έντονη ενεργοποίηση (240% και 430% αντίστοιχα) του NPQ_{fast} υποδεικνύοντας το qE (διαδικασία μη φωτοχημικής ελεγχόμενης διάχυσης της απορροφηθείσας ενέργειας) ως υπεύθυνο της παρατεταμένης ενεργοποίησης.

E. Η χορήγηση πολυαμινών τόσο στα χλωροφύκη, όσο και στα φυτά επιδρά στην διαχείριση της φωτονιακής ενέργειας που συνέλλεξε ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός και συγκεκριμένα ενισχύει τη θερμική διάχυση αυτής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

In vitro μελέτη του μηχανισμού
μη φωτοχημικής απόσβεσης ενέργειας

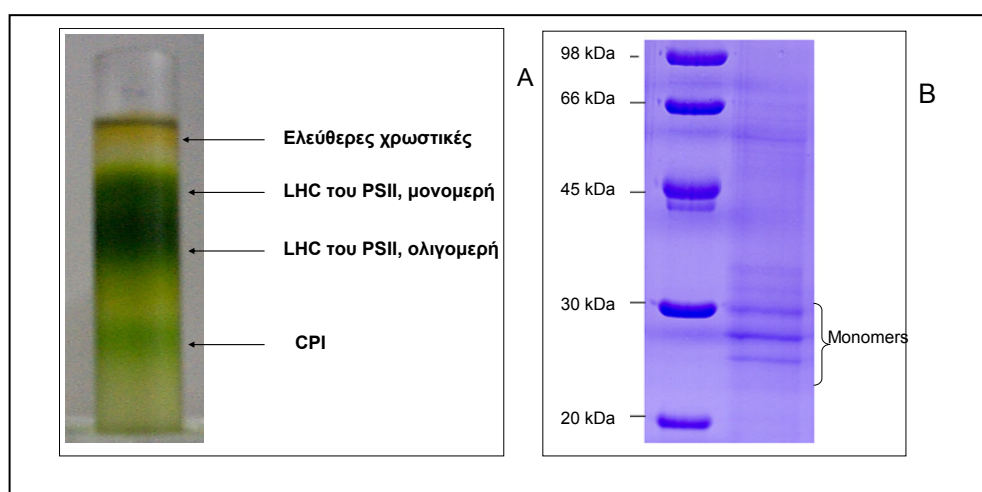
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο - Αποτελέσματα***In vitro* μελέτη του μηχανισμού μη φωτοχημικής απόσβεσης ενέργειας
7. Αναζήτηση των 'κέντρων' διάχυσης της απορροφηθείσας φωτονιακής ενέργειας.**

Οι πολυαμίνες Spd και Spm φάνηκε από τις προηγηθείσες ενότητες ότι συσχετίζονται με την αυξημένη διάχυση της απορροφώμενης ενέργειας από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Η απορρόφηση της ενέργειας (η συλλογή φωτονίων) γίνεται κυρίως με τις κεραίες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (LHC πρωτεΐνες). Ο μηχανισμός διάχυσης της ενέργειας με μορφή θερμότητας δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Δεν είναι ακόμη σαφές αν η μείωση του φθορισμού της χλωροφύλλης και αντίστοιχα αύξηση της θερμότητας που παράγεται στο PS II οφείλεται σε αλληλεπίδραση κάποιων χλωροφυλλών με κάποιες ξανθοφύλλες ή με άλλες γειτονικές χλωροφύλλες ή με κάτι διαφορετικό ικανό όμως να προκαλέσει τη μετατροπή ενός συστατικού με χρόνο ζωής φθορισμού τα 2 nsec σε συστατικό με χρόνο ζωής φθορισμού τα 0.6 ns (Gilmore et al., 1995). Επίσης δεν είναι σαφές το αν οι περιοχές απόσβεσης βρίσκονται στην κεραία ή στο κέντρο αντίδρασης του PS II (Finazzi et al., 2004). Τέλος, δεν είναι σαφές το αν η συσσωμάτωση του LHC II παίζει ρόλο στη δημιουργία της μορφής εκείνης που οδηγεί στην αυξημένη διάχυση (dissipative conformation of LHC II) (Horton et al., 1991, Horton et al., 2005). Ακόμη και η ανάγκη συμμετοχής της ζεαξανθίνης έχει αμφισβητηθεί (Finazzi et al., 2004). Πρόσφατα αποτελέσματα περιπλέκουν ακόμη περισσότερο την κατάσταση αφού δείχνουν απομονωμένο και σε κρυσταλλική κατάσταση το LHC II να είναι σε στερεοδιαμόρφωση διάχυσης χωρίς να υπάρχει ζεαξανθίνη (Pascal et al., 2005).

7.1 Η επίδραση των πολυαμινών *in vitro* στα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHC).

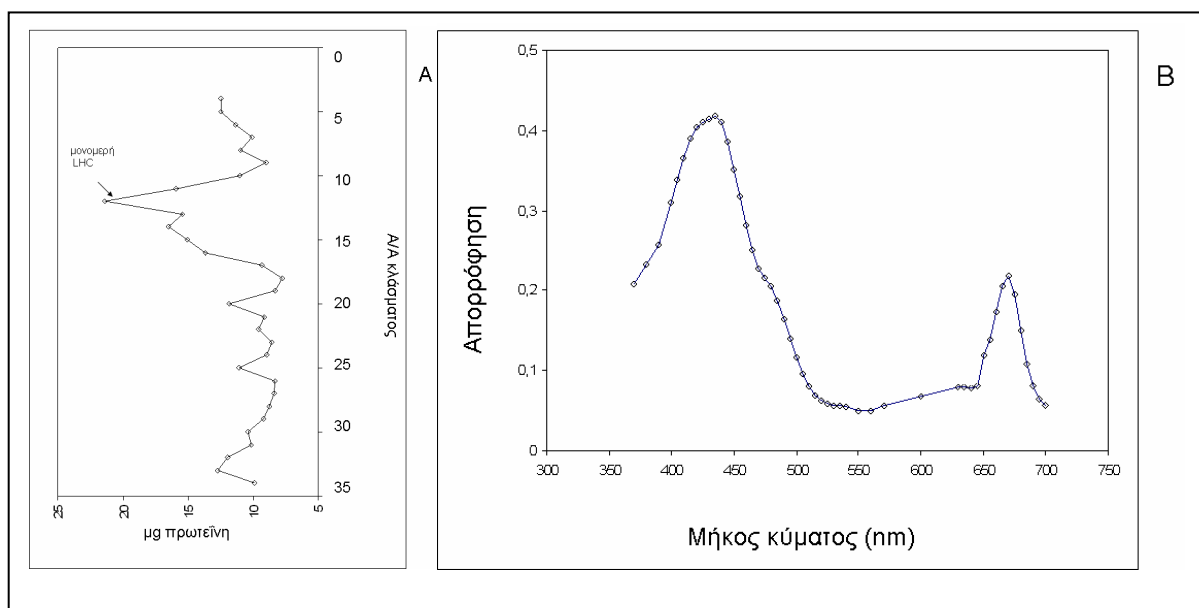
Τα πράσινα φύκη και τα ανώτερα φυτά παρουσιάζουν παρόμοια σύσταση στην φωτοσυλλεκτική τους κεραία (Bassi and Wollman, 1991). Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των πολυαμινών απευθείας στην φωτοσυλλεκτική κεραία κρίθηκε απαραίτητο να γίνει βιοχημική απομόνωση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από μικροφύκη *Scenedesmus obliquus*. Στη συνέχεια οι θυλακοειδείς μεμβράνες φορτώθηκαν σε συνεχή κλίση σακχαρόζης (5 έως 22%) και μετά από υπερφυγοκέντρωση για 20 ώρες στα 170.000g η

φωτοσυλλεκτική κεραία (εικόνα 7.1) διαχωρίστηκε από τα κέντρα αντίδρασης και απομονώθηκε είτε απευθείας με μηχανική αντλία ή με διαχωρισμό της κλίσης σε κλάσματα των 0.3ml (εικόνα 7.2). Με τη μέθοδο αυτή των Argyroudi-Akoynoglou και Thomou όπως τροποποιήθηκε από την Navakoudis (2003), απομονώνονται τα μονομερή της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII (LHC) και τα ολιγομερή (διμερή ή τριμερή) αυτών. Με βάση τα μεγέθη των πρωτεϊνών (εικόνα 7.1B) μετά από αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και το φάσμα απορρόφησης έγινε η επιβεβαίωση της απομόνωσης της κεραίας, ενώ ο λόγος chl a / chl b ήταν 1.45 ± 0.03 .

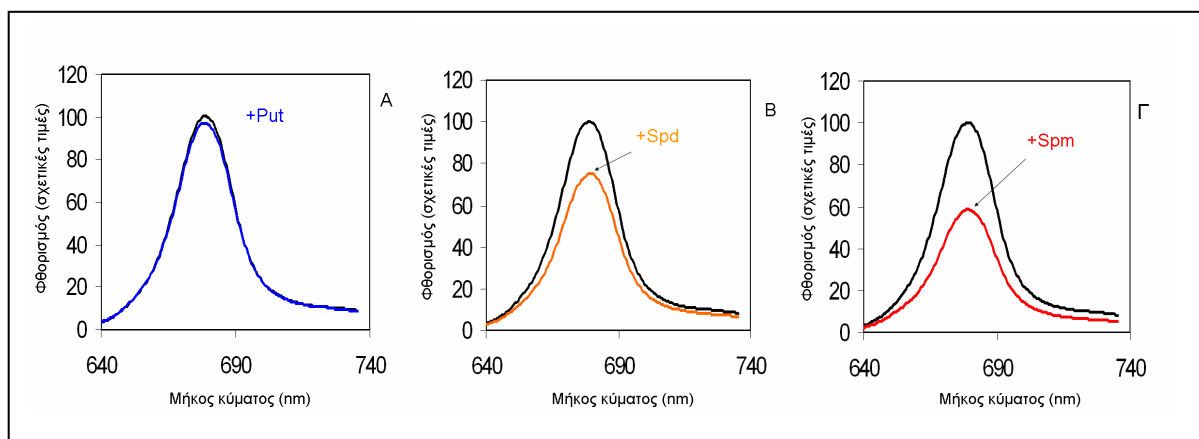


Εικόνα 7.1. Α. Απομόνωση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII από χλωροφύκη *Scenedesmus obliquus* μετά από υπερφυγοκέντριση (170.000 g) θυλακοειδών μεμβρανών σύμφωνα με τη μέθοδο απομόνωσης υποσυμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των Thomou και Akoynoglou (1981). Β. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) στο κλάσμα που αντιστοιχεί στη φωτοσυλλεκτική κεραία (το οποίο περιέχει κυρίως πρωτεΐνες μεγέθους 24-30kD).

Φασματοσκοπική μελέτη της απομονωμένης φωτοσυλλεκτικής κεραίας πραγματοποιήθηκε παρουσία των τριών διαφορετικών πολυαμινών (ίδιας τελικής συγκέντρωσης 50 μM) και παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού (εικόνα 7.3 ΑΒΓΔ). Η σπερμίδινη και η Spm φαίνεται να επιδρούν στην εκπομπή φθορισμού της φωτοσυλλεκτικής κεραίας, ενώ η Put δεν φαίνεται να έχει κάποια επίδραση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Η μείωση στην εκπομπή φθορισμού της κεραίας από την Srd και τη Spm είναι ομοιόμορφη και δεν οφείλεται σε μετατόπιση του μέγιστου.

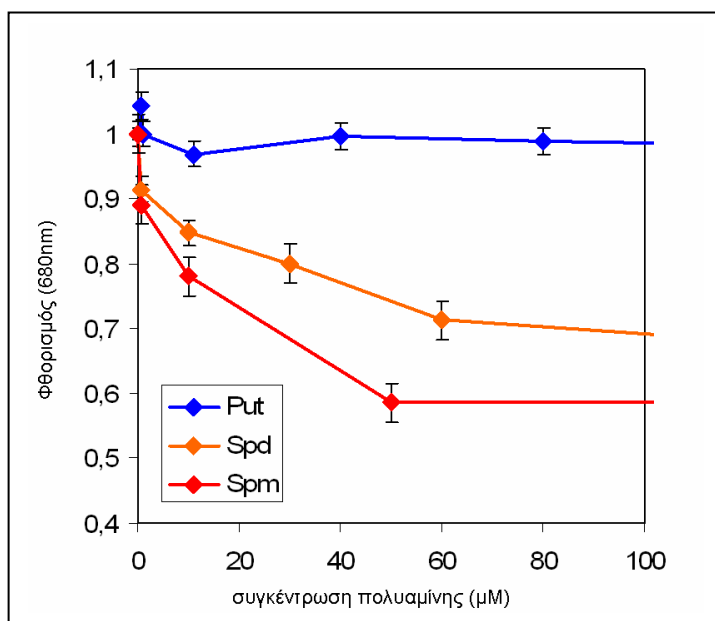


Εικόνα 7.2. Απομόνωση φωτοσυλλεκτικής κεραίας από χλωροφύκη (*Scenedesmus obliquus*). Α. Πρωτεϊνικό περιεχόμενο (σε μg) κλασμάτων κλίσης σακχαρόζης (5-22%) μετά από υπερφυγοκέντριση (170.000g) θυλακοειδών μεμβρανών σύμφωνα με τη μέθοδο απομόνωσης υποσυμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των *Argyroudi-Akoynoglou* και *Thomou*, (1981). Β. Φάσμα απορρόφησης των κλασμάτων που αντιστοιχούν στη φωτοσυλλεκτική κεραία.



Εικόνα 7.3. Φασματοσκοπική μελέτη της αλληλεπίδρασης των πολυαμινών (*Put*, *Spd* και *Spm*) με την απομονωμένη φωτοσυλλεκτική κεραία από *Scenedesmus obliquus*. Α. Η *Put* δεν φαίνεται να επιδρά στην εκπομπή φθορισμού της φωτοσυλλεκτικής κεραίας. Β. Η *Spd* μειώνει τον φθορισμό της φωτοσυλλεκτικής κεραίας πάνω από 20%. Γ. Η *Spm* μειώνει τον φθορισμό της φωτοσυλλεκτικής κεραίας πάνω από 40%. Οι πολυαμίνες δοκιμάστηκαν στην ίδια συγκέντρωση (50 μM) σε pH 7 και οι τιμές εμφανίζονται ομαλοποιημένες ως προς τη μέγιστη τιμή του αντίστοιχου μάρτυρα (100%). Το μήκος κύματος δέσμης διέγερσης ήταν 435 nm, το παράθυρο διέγερσης ήταν 10 nm, το παράθυρο εκπομπής ήταν 5 nm και η σάρωση του φάσματος είχε ταχύτητα 500 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

Η επίδραση στην εκπομπή φθορισμού της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των πολυαμινών παρουσιάζεται στην εικόνα 7.4. Οι Spd και Spm φαίνεται να προκαλούν 30% και 40% αντίστοιχα απόσβεση (μείωση) του φθορισμού της φωτοσυλλεκτικής κεραίας *in vitro* σε συγκεντρώσεις 50 μM , ενώ η Put ακόμη και σε διπλάσια συγκέντρωση δεν φαίνεται έχει κάποια επίδραση. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι η

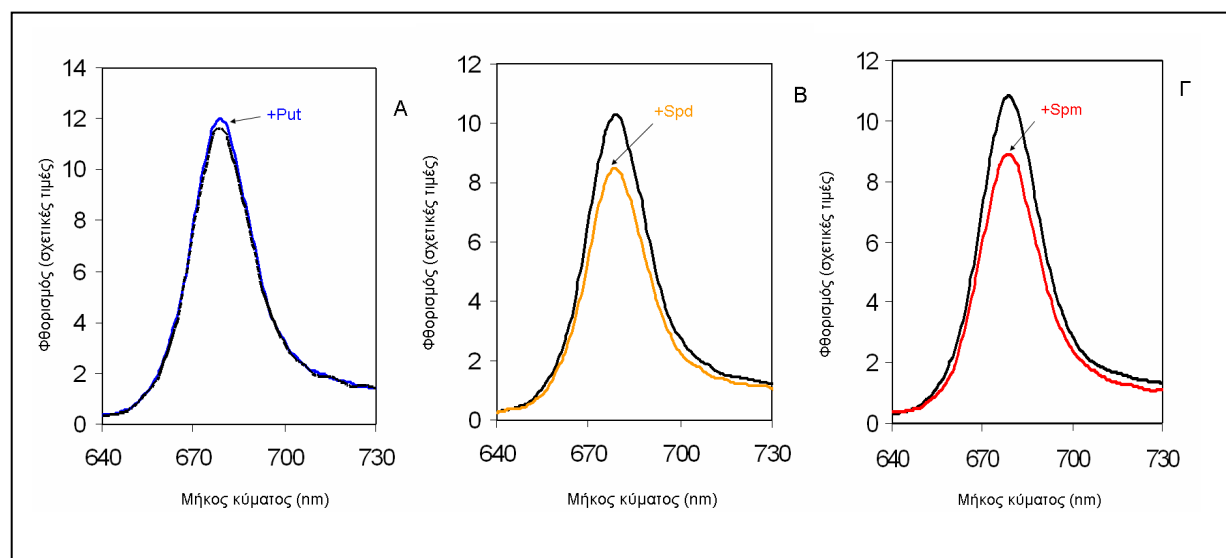


Εικόνα 7.4. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Put, Spd και Spm στην εκπομπή φθορισμού της φωτοσυλλεκτικής κεραίας. Η Put (κυανό χρώμα) δεν φαίνεται να μεταβάλλει το μέγιστο εκπομπής τόσο στις συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται όσο και σε 10 φορές μεγαλύτερες (δεδομένα δεν παρατίθενται). Η αυξανόμενη συγκέντρωση Spd προκαλεί αντίστοιχα μείωση της εκπομπής φθορισμού και τα 50 μM μειώνουν το φθορισμό κατά 30% της αρχικής του τιμής. Η Spm είναι πιο αποτελεσματικός αποσβέστης της εκπομπής φθορισμού της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (quencher) και προκαλεί αισθητή μείωση του φθορισμού (40%). (Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης στο διάλυμα ήταν $10 \mu\text{gml}^{-1}$, το μήκος κύματος δέσμης διέγερσης ήταν 435 nm, το παράθυρο διέγερσης ήταν 10 nm, το παράθυρο εκπομπής ήταν 5 nm και η σάρωση του φάσματος είχε ταχύτητα $500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$)

μείωση του φθορισμού της κεραίας για τις Spd και Spm ξεκινά ακόμη και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από εκείνη της συνολικής χλωροφύλλης. Δύο είναι οι πιθανές αιτίες αυτής της αλληλεπίδρασης. Πρώτον, οι πολυαμίνες να επιδρούν στις πρωτεΐνες του LHC και να αλλάζουν τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά έμμεσα λόγω κάποιας συσσωμάτωσης ή αντίστοιχων φαινομένων. Δεύτερον η μείωση του φθορισμού να σχετίζεται με μια αλληλεπίδραση πιο άμεση και πιο ειδική ανάμεσα στις πολυαμίνες και στη χλωροφύλλη. Αν υπάρχει μια ειδική σχέση όπως αυτή του δεύτερου σεναρίου θα πρέπει η αλληλεπίδραση να υφίσταται και απουσία των αποπρωτεϊνών του LHC.

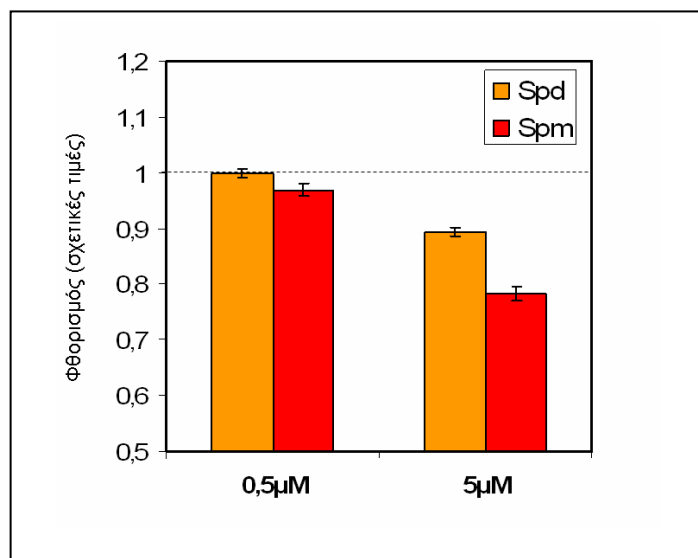
7.2 Η επίδραση των πολυαμινών στα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά απομονωμένων χρωστικών των θυλακοειδών.

Η απομόνωση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας έδειξε ότι οι πολυαμίνες επιδρούν άμεσα στον φθορισμό της. Επειδή η φωτοσυλλεκτική κεραία αποτελείται από χρωστικές και αποπρωτεΐνες κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση των πολυαμινών (Spd και Spm) χωρίς τη παρεμβολή των τελευταίων. Για αυτό το σκοπό απομονώθηκαν ολικές χρωστικές από θυλακοειδείς μεμβράνες του *S. obliquus* και πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική μελέτη. Στην εικόνα 7.5 παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού των απομονωμένων χρωστικών και η επίδραση της Put, της Spd και της Spm. Η επίδραση των πολυαμινών στο φθορισμό των χλωροφυλλών φαίνεται ότι παραμένει και μετά την απομάκρυνση των αποπρωτεϊνών στις οποίες είναι δεσμευμένες.



Εικόνα 7.5. Φασματοσκοπική μελέτη αλληλεπίδρασης της Put (A), Spd (B) και της Spm (Γ) με απομονωμένες χλωροφύλλες από θυλακοειδείς μεμβράνες του *Scenedesmus obliquus*. Η Spm φαίνεται να μειώνει το φθορισμό στα 676 nm (χαρακτηριστικό μέγιστο χλωροφύλλης) σε ρυθμιστικό διάλυμα 15 mM Tricine pH 7 με 0.15 M σακχαρόζη. Η (τριαμίνη) Spd στις ίδιες συνθήκες προκαλεί επίσης μείωση του φθορισμού. Η συγκέντρωση των πολυαμινών ήταν 5 μ M, το μήκος κύματος δέσμης διέγερσης ήταν 435 nm, το παράθυρο διέγερσης ήταν 10 nm, το παράθυρο της εκπομπής ήταν 5nm και η σάρωση του φάσματος είχε ταχύτητα 500 nm.min⁻¹

Στη εικόνα 7.6 παρουσιάζεται τόσο η επίδραση υποστοιχειομετρικών ποσοτήτων πολυαμινών όσο και της περίσσειας πολυαμινών σε σχέση με τη συγκέντρωση χλωροφύλλης στο φθορισμό της τελευταίας. Πιο συγκεκριμένα η Spd φαίνεται να ελλατώνει το φθορισμό περίπου 10%, ενώ η Spm περίπου 20% για 5 μ M τελική συγκέντρωση πολυαμινών.

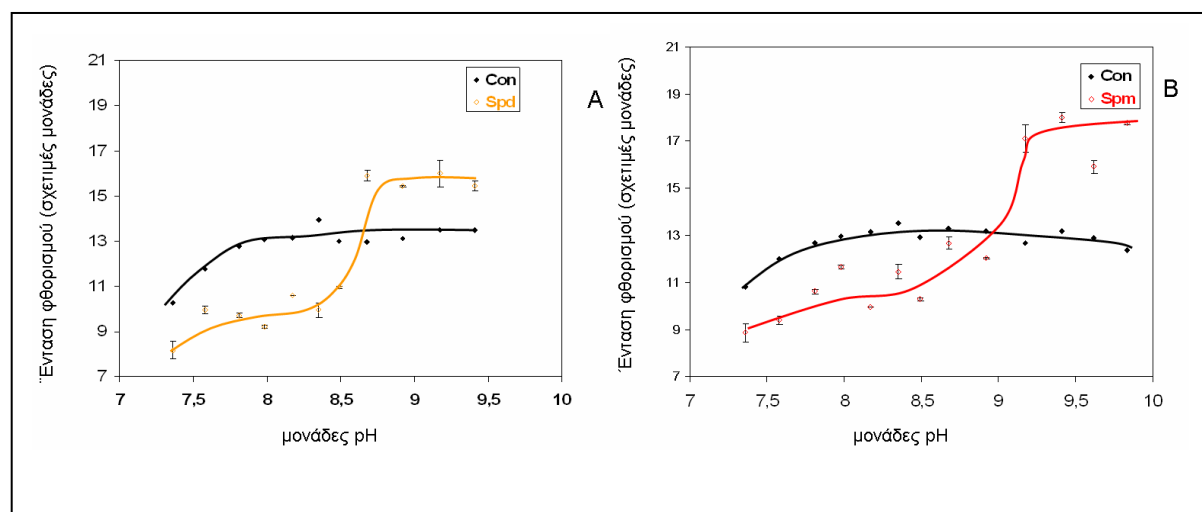


Εικόνα 7.6. Επίδραση της διαφορετικής συγκέντρωσης Spd και Spm στην μέγιστη εκπομπή φθορισμού απομονωμένων χλωροφυλλών. Οι χρωστικές απομονώθηκαν από θυλακοειδείς μεμβράνες του *Scenedesmus obliquus* και προστέθηκαν σε διάλυμα 15 mM Tricine (pH 7) με 0.15M σακχαρόζη, σαν μεθανολικό εκχύλισμα (τελική συγκέντρωση μεθανόλης <0.5%). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν ποσοστά των τιμών του μάρτυρα (0.5 % μεθανόλη, 1 μg Chl, χωρίς πολυαμίνες). Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στην τιμή του μάρτυρα. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τη σταθερή διακύμανση (n=4).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι απουσία των αποπρωτεϊνών η απόσβεση -λόγω των πολυαμινών- παραμένει αλλά όχι στον ίδιο βαθμό.

7.3. Η επίδραση του pH στην ενεργοποίηση/απενεργοποίηση της απόσβεσης φθορισμού από τη Spd και Spm

Η συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων $[H^+]$ καθορίζει και το βαθμό διάστασης και άρα το φορτίο των πολυαμινών σε δεδομένες συνθήκες θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος. Με δεδομένο ότι οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμινομάδες των πολυαμινών φορτίζονται/αποφορτίζονται με συγκεκριμένη σειρά καθώς μεταβάλλεται το pH κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η ομάδα ή οι ομάδες που πιθανόν συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις της ενότητας 7.4. Στην εικόνα 7.7 παρουσιάζεται η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων υδρογονοκατιόντων στα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της χλωροφύλλης παρουσία 5 μM πολυαμινών (Spd ή Spm). Δύο περιοχές με ενδιαφέρον εμφανίζονται τόσο στην περίπτωση μεταχείρισης με Spd όσο και στην αντίστοιχη με Spm. Πιο αναλυτικά, σε σχετικά χαμηλές τιμές pH (από 7 έως 8.5) η παρουσία Spd μειώνει το φθορισμό της χλωροφύλλης, ενώ σε υψηλότερες τιμές το φαινόμενο αναστέλλεται. Παρόμοια ισχύουν και για την περίπτωση της Spm. Ο φθορισμός της χλωροφύλλης μειώνεται στην περιοχή pH κάτω από 8.7 ενώ η απόσβεση αναστέλλεται σε υψηλότερες τιμές (πιο αλκαλικό διάλυμα). Αξιοσημείωτο είναι ότι διαδοχική προσθήκη οξέος και βάσης παρουσία Spm μπορεί να αυξομειώσει το φθορισμό στα 676 nm υποδηλώνοντας αντιστρεπτή διαδικασία.

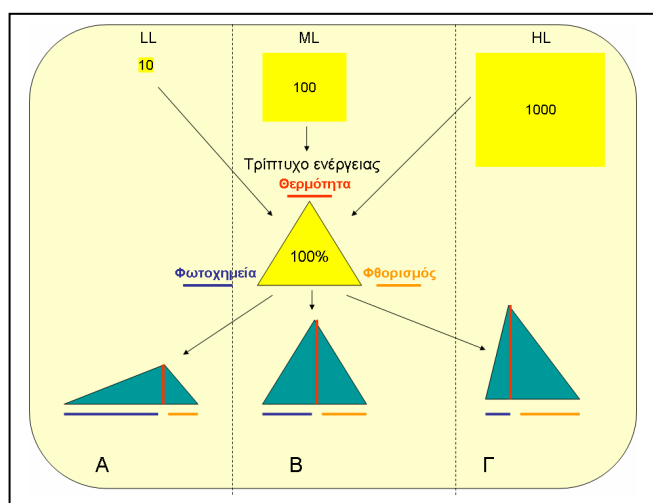


Εικόνα 7.7 Η επίδραση του pH στην μείωση του φθορισμού της χλωροφύλλης (fluorescence quenching) που προκαλείται από την Spd και τη Spm. A. Η Spd (5 μM) προκαλεί μείωση του φθορισμού (F676) έως και λίγο πάνω από pH 8, ενώ σε πιο βασικά pH το φαινόμενο αντιστρέφεται. B. Η Spm (0.5 μM) προκαλεί μείωση του φθορισμού έως το pH 8.5, ενώ σε πιο βασικά pH το φαινόμενο αντιστρέφεται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο – Συζήτηση

Η φωτοσύνθεση είναι μία από τις καλύτερα μελετημένες βιολογικές διαδικασίες και το σχήμα Z που περιγράφει τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων κλείνει κοντά μισό αιώνα από την πρώτη αναφορά (Hill and Bendal, 1960). Αυτό το σχήμα όμως δεν περιγράφει το πώς η φωτοσύνθεση ρυθμίζεται προκειμένου ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός να είναι λειτουργικός σε μεταβαλλόμενες συνθήκες φωτισμού (π.χ απότομη και μεγάλη αύξηση) οι οποίες αποτελούν και τον κανόνα στο φυσικό περιβάλλον των οργανισμών. Η διαχείριση της απορροφώμενης από την κεραία ενέργειας αποτελεί την ουσία της φωτοπροστασίας και τελικά καθορίζει την ικανότητα του φωτοσυνθετικού οργανισμού να επιβιώνει σε ένα διαρκώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον (Horton, 2000).

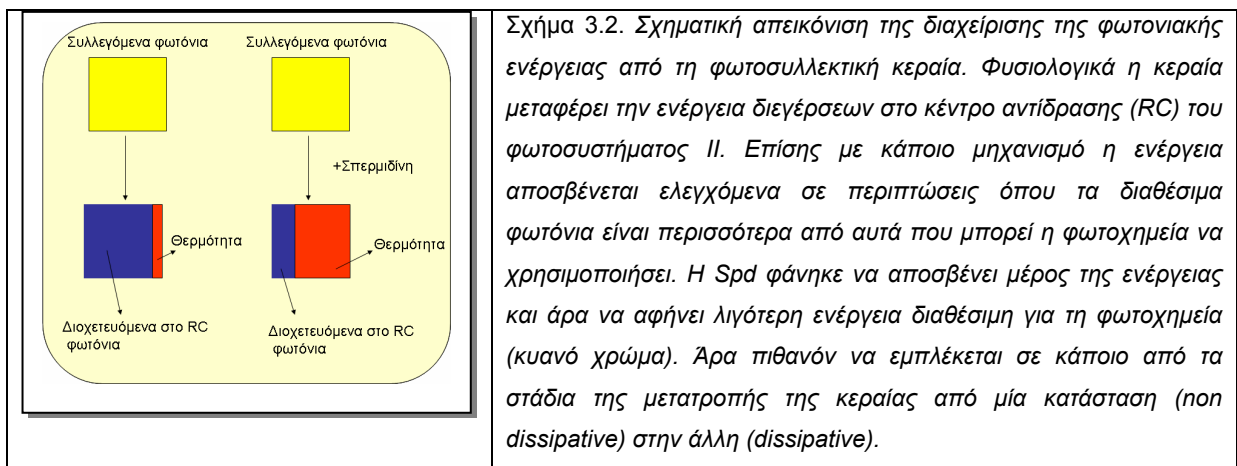
Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός επιδεικνύει αξιοσημείωτη προσαρμοστικότητα. Από τη μία επιτυγχάνει μεγάλη απόδοση (μεγάλο λόγο ηλεκτρονίων που μετακινήθηκαν από το PS II στο PSI προς φωτόνια που απορροφήθηκαν) όταν η ένταση φωτισμού είναι χαμηλή και από την άλλη να ελαχιστοποιεί τις ζημιές (χάρη στην υψηλή μη φωτοχημική διαχείριση της φωτονιακής ενέργειας) όταν η ένταση φωτισμού αυξάνεται (Gilmore, 1997 και εικόνα NPQ 6.4A). Δηλαδή το ποσοστό της ενέργειας που φθάνει στα κέντρα αντίδρασης δεν είναι σταθερό αυξανόμενης της έντασης φωτισμού, αλλά ρυθμίζεται με κάποιους μηχανισμούς ώστε να μειώνεται ο κίνδυνος φωτοαναστολής (σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1. Σχηματική απεικόνιση της διαχείρισης της φωτονιακής ενέργειας από το φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Α. Σε χαμηλό φως η φωτοχημεία έχει μεγάλη απόδοση (μήκος μπλε ευθύγραμμου τμήματος), ενώ η θερμότητα και ο φθορισμός είναι ασήμαντα. Β. Σε μέτρια ένταση φωτισμού η απόδοση μειώνεται, ενώ η θερμότητα αυξάνεται (μήκος κόκκινου τμήματος). Γ. Σε υψηλό φωτισμό η απόδοση ελαχιστοποιείται, ενώ η θερμότητα (μη φωτοχημικές διαδικασίες) μεγιστοποιείται. Παρατηρείστε πως μεταβάλλεται η διαχείριση της ενέργειας, ενώ η ενέργεια του συστήματος παραμένει σταθερή. Τα τετράγωνα δηλώνουν την ένταση φωτισμού και τα νούμερα στο εσωτερικό δηλώνουν τις σχετικές τιμές εντάσεων (π.χ. σε $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Πιο αναλυτικά, σε χαμηλές εντάσεις φωτισμού ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός έχει μέγιστη απόδοση (σύγκριση μήκους μπλέ γραμμής σχήματος 1Α με αντίστοιχη 1Β και 1Γ) και ελάχιστες απώλειες με μορφή θερμότητας (σύγκριση κόκκινης γραμμής σχήματος 1Α με 1Β και 1Γ). Σε υψηλότερες εντάσεις φωτισμού αυξάνεται το ποσοστό της ενέργειας που καταλήγει σε θερμότητα, ενώ παράλληλα μειώνεται η απόδοση της φωτοσύνθεσης (το τρίγωνο ενέργειας εμφανίζει αυξημένες κορυφές στο φθορισμό (πορτοκαλί χρώμα) και στη θερμότητα (κόκκινο χρώμα). Αν δεν συνέβαινε κάτι τέτοιο η μη διαθεσιμότητα οξειδωμένων κινονών (μεταφορείς ηλεκτρονίων) θα διατηρούσε διεγερμένο το P680 στα RC και θα αύξανε η πιθανότητα για σχηματισμό P680triplet. Οι μορφές αυτές είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες και θα υπήρχε κίνδυνος για τη λειτουργία των φωτοσυστημάτων (φαινόμενα φωτοαναστολής). Άρα πρέπει με κάποιο τρόπο να διασφαλιστεί η λειτουργία των κέντρων αντίδρασης ακόμη και σε ταχύτατα μεταβαλλόμενες συνθήκες φωτισμού (εντός δευτερολέπτων) που μπορεί να ξεπερνούν ακόμη και τις 3 τάξεις μεγέθους στην αύξηση της έντασης του φωτός (π.χ. φύλλο από τη σκιά παρασύρεται στο φως του ήλιου).

Η σύγχρονη έρευνα έχει επικεντρωθεί στο ρόλο της φωτοσυλλεκτικής κεραίας στην παραπάνω διαδικασία και κυρίως στα πεπτίδια LHC II, CP29, CP26, CP24, CP22 προκειμένου να ερμηνεύσει τα παρατηρούμενα φαινόμενα. Συγκεκριμένα η ικανότητα μη φωτοχημικής διαχείρισης της ενέργειας του φωτός έχει συνδεθεί με τη μετατροπή ενός συστατικού με χρόνο ζωής φθορισμού $\tau=2\text{ns}$ σε ένα συστατικό μικρότερου χρόνου $\tau(=0.4\text{ns})$ (Gilmore et al., 1998). Οι πολυαμίνες μειώνουν το Fm (εικόνα 6.1ΒΓ, κεφάλαιο 2) το οποίο είναι ανάλογο του τ (Gilmore, 2004). Ουσιαστικά η ενέργεια των φωτονίων μετατρέπεται σε θερμότητα σε ένα κέντρο διάχυσης (quenching center) προκειμένου λιγότερη ενέργεια από αυτή που συλλέχθηκε στην κεραία να διοχετευθεί τελικά στα κέντρα αντίδρασης (βλ. επεξηγηματικό σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.2. Σχηματική απεικόνιση της διαχείρισης της φωτονιακής ενέργειας από τη φωτοσυλλεκτική κεραία. Φυσιολογικά η κεραία μεταφέρει την ενέργεια διεγέρσεων στο κέντρο αντίδρασης (RC) του φωτοσυστήματος II. Επίσης με κάποιο μηχανισμό η ενέργεια αποσβένεται ελεγχόμενα σε περιπτώσεις όπου τα διαθέσιμα φωτόνια είναι περισσότερα από αυτά που μπορεί η φωτοχημεία να χρησιμοποιήσει. Η Spd φάνηκε να αποσβένει μέρος της ενέργειας και άρα να αφήνει λιγότερη ενέργεια διαθέσιμη για τη φωτοχημεία (κυανό χρώμα). Άρα πιθανόν να εμπλέκεται σε κάποιο από τα στάδια της μετατροπής της κεραίας από μία κατάσταση (non dissipative) στην άλλη (dissipative).

Ο μηχανισμός που επιτρέπει την απόσβεση του φθορισμού και επιτρέπει την ελεγχόμενη μετατροπή της επιπλέον ενέργειας σε θερμότητα δεν είναι πλήρως κατανοητός (Holt et al., 2004). Η πλειοψηφία των αναφορών κάνουν λόγο για αλληλεπίδραση κάποιας χλωροφύλλης με κάποιο καροτενοειδές (πιθανότατα ζεαξανθίνη) προκειμένου να δημιουργηθεί το κέντρο διάχυσης (Demmig-Adams B, 1990; Gradinaru et al., 2003; Pieperet et al., 1999; Bassi and Caffari, 2000; Holt et al., 2005). Η πιθανότητα να δημιουργείται διμερές χλωροφυλλών που οδηγεί στην απόσβεση έχει επίσης αρκετούς υποστηρικτές (Crofts and Yerkes, 1994). Επιπλέον, την τελευταία πενταετία δόθηκε βάρος στο πολυπεπτίδιο PsbS το οποίο συνδέθηκε με την ικανότητα μη φωτοχημικής διαχείρισης (Liu et al., 2000) όμως από τη μία δεν είναι γνωστό το που ακριβώς προσδένεται στο PS II, ενώ δεν φαίνεται να περιέχει τις απαραίτητες για τη διάχυση τις θερμότητας χλωροφύλλες (Dominici et al., 2002). Τέλος, προτάθηκε ότι η απόσβεση του φθορισμού και η αύξηση της θερμότητας στην κεραία σχετίζεται με τη στερεοδιαμόρφωση του LHC II (Horton et al., 1991). Η συσσωμάτωση του LHC II (LHC aggregation) και η συστολή του LHC II οδηγούν σε μείωση του φθορισμού και ουσιαστικά αποτελούν μια μορφή του LHC II που ευνοεί την μετατροπή της ενέργειας των συλλεγόμενων φωτονίων σε θερμότητα (Pascal et al., 2005). Σε κάθε περίπτωση το πώς θα μπορούσε να λειτουργεί σε πραγματικές συνθήκες ένας τέτοιος μηχανισμός είναι λιγότερο κατανοητό. Τελικά παρά την ιδιαίτερη σημασία των μηχανισμών φωτοπροστασίας και την εντατική έρευνα στο χώρο δεν υπάρχει σαφής απάντηση στο πώς συμβαίνει η διάχυση σε μοριακό επίπεδο. Η ανάγκη συμμετοχής ζεαξανθίνης έχει αμφισβητηθεί (Finazzi et al., 2004), ενώ οι *in vitro* μελέτες απέχουν από την αποτελεσματικότητα του μηχανισμού που λειτουργεί *in vivo*. Συγκεκριμένα τα φυτά φαίνεται να πετυχαίνουν 80% μείωση του φθορισμού τους *in vivo* όταν η προσθήκη ζεαξανθίνης σε LHC II προκαλεί το πολύ 40% μείωση του φθορισμού. Το γεγονός δε, ότι δεν ελέγχθηκε το σενάριο να οφείλεται αυτή η μείωση κατά ένα μέρος σε μετατόπιση της κορυφής φθορισμού αφήνει ανοιχτό το ερώτημα (Wentworth et al., 2000).

Η χορήγηση πολυαμινών σε χλωροφύκη και καπνό (Spm και Spd) φάνηκε ότι ενισχύει την ελεγχόμενη διάχυση της θερμότητας (ενότητες 3-6). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε ενεργοποίηση του κύκλου των ξανθοφυλλών (η μετατροπή βιολαξανθίνης σε ζεαξανθίνη αυξάνει τη διάχυση). Ο κύκλος όμως αυτός λειτουργεί στο φως και όχι στο σκοτάδι (Pfuendel and Dilley, 1993; Masojidek et al., 1999) συνεπώς δεν μπορεί να δικαιολογήσει τα αποτελέσματα των πειραμάτων φωτοανεξάρτητης βιογένεσης στα χλωροφύκη (ενότητα 4). Επίσης αν οι δράσεις των πολυαμινών σχετίζονταν με τον κύκλο των ξανθοφυλλών ή οποιαδήποτε άλλη *de novo* σύνθεση θα έπρεπε να μην έχουν ισχύ σε

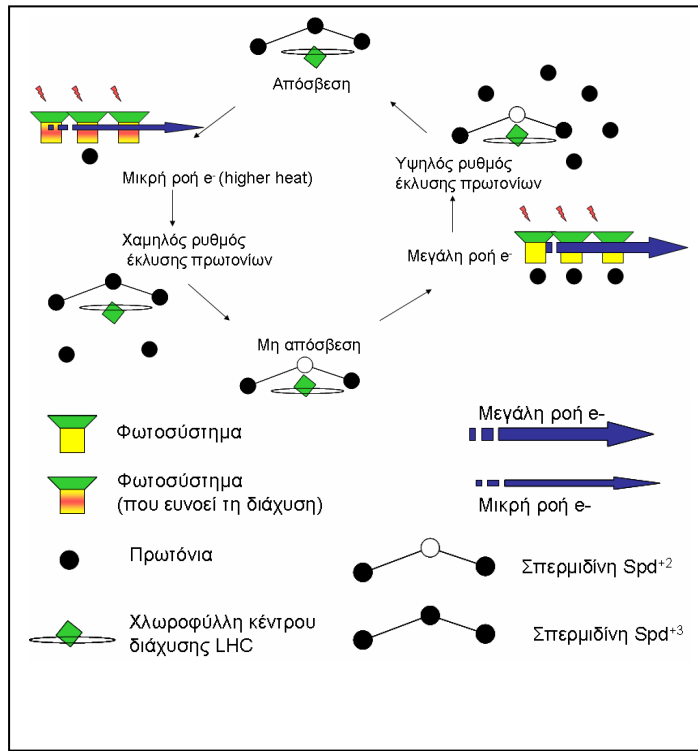
απομονωμένη φωτοσυλλεκτική κεραία όπου αυτές οι διαδικασίες δεν είναι ενεργές. Η άμεση ικανότητα της Spd και της Spm να ελλατώνουν το φθορισμό της κεραίας *in vitro* (εικ 7.2) επίσης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο κύκλος των ξανθοφυλλών δεν σχετίζεται με το μηχανισμό δράσης των πολυαμινών. Αξιοσημείωτη είναι η ομοιόμορφη μείωση που δεν οφείλεται σε μετατόπιση της χαρακτηριστικής κορυφής στα 680nm. Η απόσβεση μπορεί να οφείλεται είτε στην συσσωμάτωση των πρωτεϊνών της φωτοσυλλεκτικής κεραίας, είτε στη απευθείας αλληλεπίδραση των πολυαμινών με τις χρωστικές. Στην πρώτη περίπτωση η απομάκρυνση των αποπρωτεϊνών από το σύστημα μελέτης θα έπρεπε να οδηγεί σε αδυναμία των πολυαμινών να προκαλούν απόσβεση. Σε αντίθετη περίπτωση το σενάριο για πιθανή συσσωμάτωση των LHC II πρωτεϊνών δεν θα ήταν βάσιμο. Πράγματι η απομόνωση των χλωροφυλλών από τη φωτοσυλλεκτική κεραία και η μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με τη Spm και τη Spd οδήγησε στην απόρριψη του πρώτου σεναρίου.

Η Spd απουσία των αποπρωτεϊνών προκαλεί 12% απόσβεση, ενώ παρουσία τους 30%. Αντίστοιχα η Spm προκαλεί 22% και 40% απόσβεση. Και στις δύο περιπτώσεις οι πρωτεΐνες της κεραίας δείχνουν να λειτουργούν ενισχυτικά στην ικανότητα των πολυαμινών να προκαλούν απόσβεση. Ταυτόχρονα γεννιέται το ερώτημα πως οι εν λόγω πολυαμίνες (Spd και Spm) είναι ικανές να οδηγούν σε απόσβεση του φθορισμού εφόσον οι υπάρχουσες θεωρίες δεν καλύπτουν το μηχανισμό δράσης των πολυαμινών. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά πάνω στην επίδραση των πολυαμινών στις φασματοσκοπικές ιδιότητες της κεραίας. Οι πολυαμίνες έχουν σχετικά απλή δομή που περιλαμβάνουν έναν εύκαμπτο σκελετό μικρού όγκου (ύπαρξη μεθυλίων), ενώ στα άκρα υπάρχουν δύο πρωτοταγείς αμινομάδες και στο εσωτερικό μία (Spd) ή δύο (Spm) δευτεροταγείς αμινομάδες. Σε περίπτωση που οι πολυαμίνες αλληλεπιδρούν με τις χλωροφύλλες μέσω των αζωτούχων ομάδων τους η αλληλεπίδραση αυτή θα έπρεπε να επηρεάζεται από το φορτίο των εν λόγω ομάδων. Οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς ομάδες των πολυαμινών φορτίζονται θετικά με την πρόσδεση ενός πρωτονίου (οι σταθερές pK των διαφορετικών ομάδων στις πολυαμίνες παρουσιάζονται στον πίνακα IV).

Πίνακας IV. Τιμές pK για τις πολυαμίνες σύμφωνα με τους Takeda et al. (1983).

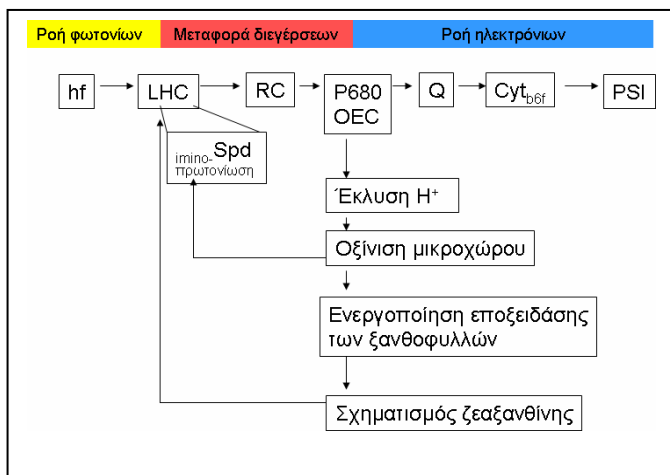
Πολυαμίνες	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄
Put	10.5	9.04		
Spd	11.16	10.06	8.51	
Spm	10.97	10.27	9.04	8.03

Τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης πολυαμινών με απομονωμένες χλωροφύλλες έδειξαν ότι τόσο η Spd όσο και η Spm δεν μπορούν να αποσβέσουν το φθορισμό σε υψηλά pH (εικόνα 7.6. Με δεδομένο ότι η απόσβεση συμβαίνει σε περιοχές $\text{pH} \leq 8,5$ η αλληλεπίδραση των χρωστικών με τις πολυαμίνες πρέπει να επιτυγχάνεται μέσω ομάδων που αποκτούν φορτίο (πρωτονιώνονται) στις συγκεκριμένες τιμές pH. Επειδή οι πρωτοταγείς αμινομάδες έχουν υψηλότερες τιμές pK από 8.5 οι πιθανότερες ομάδες για την αλληλεπίδραση είναι οι ιμινομάδες των μορίων (μια στη Spd, δύο ιμινομάδες σε συμμετρικές θέσεις στη Spm). Φαίνεται δηλαδή πως η Spd μπορεί με το πρωτόνιο στη ιμινομάδα της να αποσβέσει μέρος της ενέργειας που απορρόφησε η χλωροφύλλη. Η ελλάτωση της συγκέντρωσης των πρωτονίων στο διάλυμα (πρόσθηκη μικρής ποσότητας βάσης) άρει την απόσβεση εντός δευτερολέπτων (δεδομένα δεν παρατίθενται). Τελικά δύο πολύ σημαντικά φαινόμενα αναδεικνύονται από τα πειράματα της ενότητας 7. Από τη μία υπάρχει άμεση και ειδική αλληλεπίδραση χλωροφυλλών και πολυαμινών (Spd και Spm αλλά όχι Put). Από την άλλη η αλληλεπίδραση στηρίζεται σε ένα αντιστρεπτό pH-εξαρτώμενο μηχανισμό. Σε μια προσπάθεια ανασύνθεσης του μηχανισμού και της φυσιολογικής του σημασίας προτείνεται το μοντέλο της εικόνας 3.3.



Σχήμα 3.3. Υποθετικό μοντέλο όπου εμφανίζονται οι δύο διαφορετικές καταστάσεις των δύο κύριων υποσυμπλόκων LHC και PSII. Το LHC μπορεί να βρεθεί σε δύο μορφές μία αυξημένης διάχυσης (dissipative mode) και μια μικρής διάχυσης (non-dissipative mode). Επίσης το PSII μπορεί να απελευθερώνει πολλά πρωτόνια στη μονάδα του χρόνου ή λιγότερα. Η κυκλική διαδοχή των διαφορετικών καταστάσεων εξασφαλίζει την ικανότητα αυτορρύθμισης του μηχανισμού (βρόγχος qE). Κεντρικό ρόλο παίζει η πρωτονίωση μιας ιμινομάδας (αποτελέσματα παρούσας ενότητας).

Η Spd επιλέγεται ως η πιο πιθανή υποψήφια για το ρόλο αυτό καθώς μπορεί να είναι λιγότερο αποτελεσματική σαν αποσβέστης (quencher) σε σύγκριση με την μεγαλύτερη σε μέγεθος Spm όμως είναι αφθονότερη στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (Kotzabasis and Senger, 1994; Navakoudis et al., 2005) και η πλαστιδιακή τρανγλουταμινάση που ευθύνεται για την πολυαμινωλίωση των αποπρωτεϊνών της φωτοσυλλεκτικής κεραίας προτιμά ως υπόστρωμα τη Spd σε σχέση με την Spm (Serafini-Fracassini et al., 1995). Η Spd μπορεί να υπάρξει σε τέσσερις μορφές αφού έχει 3 θέσεις που μπορούν να πρωτονιωθούν: Spd, Spd⁺, Spd²⁺ και Spd³⁺.



Σχήμα 3.4. Σχηματική απεικόνιση της επανατροφοδοτική καταστολής (feedback inhibition) της φωτοχημικής διαδικασίας (βρόγχος qE). Το υπάρχον μοντέλο συνδέει την ενεργοποίηση του μηχανισμού μη φωτοχημικής απόσβεσης με τη δημιουργία ζεαξανθίνης (Zea). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να ερμηνευθούν από την πρωτονίωση μιας ιμινομάδας πολυαμίνων (Spd ή Spm). Η προτεινόμενη διαδικασία επιτρέπει πιο γρήγορη απόκριση (3 βήματα) αλλά λειτουργεί συμπληρωματικά προς τη διαδικασία που εμπλέκει τη ζεαξανθίνη (5 βήματα). Η συμμετοχή της ζεαξανθίνης θα μπορούσε να ενισχύσει την απόσβεση.

Όταν η Spd βρίσκεται στη μορφή Spd^{3+} τότε όλες οι διαθέσιμες θέσεις (3) είναι κατειλημμένες από πρωτόνια. Σε αυτή την περίπτωση ενδιαφέρει παρουσιάζει η σειρά με την οποία αποπρωτονιώνεται η Spd καθώς πρώτα χάνεται το πρωτόνιο από την εσωτερική ομάδα (ιμινομάδα) και μετά το πρωτόνιο από την πρωτοταγή αμινομάδα (ακραίο). Στο κύτταρο οι συνθήκες pH που επικρατούν θα καθορίσουν το ποια από τις τέσσερις μορφές θα επικρατήσει. Με δεδομένο ότι στο χλωροπλάστη το pH στο στρώμα είναι ελαφρά βασικό η πιο άφθονη μορφή πρέπει να είναι η πλήρως φορτισμένη. Είναι όμως πιθανό να υπάρχει και η μορφή Spd^{2+} αλλά σε μικρότερο ποσοστό. Στο μηχανισμό της μη φωτοχημικής απόσβεσης δύο μορφές συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον με βάση τα αποτελέσματα αυτής της ενότητας. Η μία μορφή είναι με πρωτονιωμένη την ιμινομάδα ενώ η δεύτερη με αφόρτιστη (ιμινομάδα χωρίς πρωτόνιο). Η πρωτονιωμένη μορφή λειτουργεί ως αποσβέστης και προκαλεί αύξηση της παραγόμενης θερμότητας εντός της κεραίας και μείωση της ενέργειας που θα μεταφερόταν υπό μορφή διεγέρσεων στα κέντρα αντίδρασης. Η απόσβεση δεν γίνεται μόνο από τη Spd αλλά από την αλληλεπίδραση χλωροφύλλης με πολυαμίνη και τη συνακόλουθη δημιουργία κέντρου διάχυσης της ενέργειας (quenching center). Με δεδομένο ότι διεγέρσεις μεταφέρονται σε όλο το στρώμα χρωστικών της φωτοσυλλεκτικής κεραίας -περνώντας πολλές φορές από την ίδια χρωστική προτού αξιοποιηθούν στη φωτοχημεία- η ύπαρξη μεμονωμένων κέντρων διάχυσης μπορεί να εξυπηρετήσει όχι μόνο την χρωστική-αποσβέστη αλλά και την ευρύτερη περιοχή συλλογής φωτονίων. Η μη πρωτονιωμένη μορφή δεν αποσβένει την ενέργεια που απορροφά η κεραία και επιτρέπει την ομαλή μεταφορά των διεγέρσεων από χρωστική σε χρωστική. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού φυσιολογικά θα πρέπει να συγχρονίζεται με τις ανάγκες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Μακροχρόνιες έρευνες στο χώρο έχουν συνδέσει την ενεργοποίηση του μηχανισμού διάχυσης (ουσιαστικά του qE συντελεστή του NPQ) με την έντονη οξίνιση του μικροχώρου (Krause et al., 1988). Αυτό ταιριάζει με την πρωτονίωση του κέντρου διάχυσης εντός της κεραίας (φόρτιση ιμινομάδας Spd) και είναι σε συμφωνία με αναφορές που συνδέουν το μηχανισμό qE με πρωτονίωση εκτεθειμένων στο μικροχώρο $-\text{COO}^-$ των CPs (CP29, CP26, PsbS). Οι πρωτονιώσεις αυτές έχουν συνδεθεί με στερεοδομικές αλλαγές των πεπτιδίων της κεραίας και την ενεργοποίηση του qE. Είναι πολύ πιθανό όταν ο μικροχώρος είναι πολύ όξινος η ιμινομάδα να πρωτονιώνεται και να αυξάνει η μετατροπή της συλλεγόμενης ενέργειας σε θερμότητα, ενώ όταν ο μικροχώρος έχει πιο υψηλές τιμές pH το πρωτόνιο που ευθύνεται για την απόσβεση να εγκαταλείπει την ιμινομάδα και η μεταφορά ενέργειας πραγματοποιείται απρόσκοπτα. Το πώς μπορεί να φύγει το συγκεκριμένο πρωτόνιο εφόσον το pK της ιμινομάδας είναι σχετικά υψηλό αποτελεί μια αδιευκρίνιστη πτυχή του προτεινόμενου

μηχανισμού. Αν το πρωτόνιο συνεχίσει να μένει στη θέση αυτή ακόμη και σε συνθήκες όπου το lumen είναι ακίνδυνα όξινο τότε η απόδοση θα μειωθεί χωρίς ουσιαστικό όφελος. Αν όμως υπάρχει μηχανισμός για να φύγει από τη συγκεκριμένη θέση κλείνει ένας κύκλος (βλ. σχήμα 3.3). Δεν αποκλείεται το μικροπεριβάλλον της ιμινομάδας να ελλατώνει το pK αυτής (π.χ. 1-2 θετικά φορτία σε γειτνίαση με την ιμινομάδα ελλατώνουν έως και 2 μονάδες το pK). Σε αυτή την περίπτωση η ιμινομάδα θα μπορούσε να αποφορτίζεται ακόμη και στις κοινά αποδεκτές τιμές pH για το χλωροπλάστη (περίπου 7.6). Τέλος, η σύνδεση του μηχανισμού qE με ένα αντιστρεπτά συνδεδεμένο πρωτόνιο θα επέτρεπε την εξήγηση της βραχυπρόθεσμης επίδρασης του πρωτονοφόρου νιγερισίνης (nigericin) σε συνθήκες σκοταδιού στη χαλάρωση του φθορισμού (Fm') (Ruban and Horton, 1995), η οποία δεν εξηγείται από τον κύκλο των ξανθοφυλλών ή άλλους μηχανισμούς.

Το προτεινόμενο μοντέλο για τη δράση των πολυαμινών συμφωνεί και επιπλέον για πρώτη φορά ερμηνεύει πρόσφατα και παλαιότερα αποτελέσματα πειραμάτων φυσιολογίας. Ενδεικτικά αναφέρονται παρακάτω κάποια που αφορούν σε συνθήκες καταπόνησης και έως τώρα έμοιαζαν αινιγματικά. Τα επίπεδα Spd ανεβαίνουν σε φυτά μετά από έκθεση σε ψύχος (Bouchereau et al., 1999). Αυτή η αύξηση επιτρέπει ανθεκτικότητα στο στρες (Shen et al., 2000) και αν ανασταλεί τότε ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός είναι ευαίσθητος στο ψύχος (He et al., 2002). Το γιατί συμβαίνει αυτό δεν είναι γνωστό. Με βάση το προτεινόμενο μοντέλο η αύξηση της Spd θα μπορούσε να δικαιολογηθεί. Είναι γνωστό ότι σε συνθήκες ψύχους η ενεργότητα των ενζύμων για παράδειγμα αυτών του κύκλου Calvin-Benson, μειώνεται. Επειδή η ροή φωτονίων δεν μεταβάλλεται έχουμε αύξηση στην πίεση διέγερσης που δέχεται το PSII. Σε αυτές τις συνθήκες υπάρχει αυξημένη ανάγκη για ελεγχόμενη διάχυση της παραπάνω ενέργειας (NPQ). Η Spd φάνηκε ότι μπορεί να παίζει ρόλο-κλειδί στη συγκεκριμένη διαδικασία συνεπώς είναι εύλογη η απόκριση του φυτού στο ψύχος (αύξηση ενδοκυτταρικής Spd). Το γεγονός ότι η κεραία θερμαίνεται μέσω αυτής της απόκρισης θα μπορούσε να έχει προστατευτικά αποτελέσματα στο σύνολο του χλωροπλάστη. Δεν πρέπει να διαφεύγει της προσοχής ότι το LHClI αποτελεί σημαντικό μέρος (50%) της συνολικής πρωτεΐνης στα θυλακοειδή και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό λόγω των χημικών και δομικών του ιδιοτήτων στις θερμοκρασίες (Haltia and Freire, 1995). Συνεπώς, αν το ίδιο θερμανθεί συμβάλει στην αποτροπή πτώσης της θερμοκρασίας εντός του οργανιδίου, ενώ ο κίνδυνος να μετουσιωθεί είναι μικρός.

Συνοψίζοντας τα κυριότερα συμπεράσματα είναι τα εξής:

- A. Μια κατηγορηματική διάκριση των ρόλων Put (*non-quencher*) και των Spd-Spm (*quencher*)
- B. Η Spd και η Spm αποσβένουν το φθορισμό της απομονωμένης φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHC) του φωτοσυστήματος II.
- Γ. Η απόσβεση εξακολουθεί ακόμη και όταν απουσιάζει το αποπρωτεϊνικό κομμάτι.
- Δ. Οι αποπρωτεΐνες έχουν ρόλο ενισχυτικό στην απόσβεση.
- Ε. Η Spm εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα απόσβεσης ενέργειας από την Spd.
- Ζ. Οι ιμινομάδες των πολυαμινών συμμετέχουν στην απόσβεση.
- Η. Η απόσβεση στηρίζεται σε αντιστρεπτή διαδικασία, γεγονός που επιτρέπει τη λειτουργία εν είδει διακόπτη (off/on/off).
- Θ. Η απόσβεση είναι pH εξαρτώμενη, γεγονός ιδιαίτερης σημασίας εφόσον την κάνει ευαίσθητη στην κατάσταση του μικροχώρου (lumen status).
- Ι. Η απόσβεση είναι εφικτή μέσω πρωτονίωσης και αντιστρέφεται με αποπρωτονίωση γεγονός που συνδυάζεται με τις ανάγκες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Σε αντίθετη περίπτωση, δηλαδή αν η απόσβεση ήταν pH εξαρτώμενη αλλά συνέβαινε σε υψηλές τιμές pH τότε δεν θα μπορούσε να συγχρονιστεί με τις ανάγκες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού για προστασία.
- Κ. Η πρωτονίωση είναι ταχύτατη διαδικασία που επιτρέπει άμεση απόκριση (δεν απαιτείται ενζυμικό βήμα όπως στο υπάρχον μοντέλο του κύκλου των ξανθοφυλλών).
- Λ. Ο προτεινόμενος μηχανισμός δεν έρχεται σε αντίθεση με υπάρχουσες θεωρίες και μάλλον ερμηνεύει πολλά από τα παρατηρούμενα φαινόμενα σε αυτή την εργασία αλλά και στη διεθνή βιβλιογραφία.

Εν κατακλείδι η Put είναι ξεκάθαρο ότι πρέπει να είναι επιφορτισμένη με διαφορετικό ρόλο από ότι η Spd και η Spm. Σε αυτό συμφωνούν τα αποτελέσματα των ενοτήτων 6 και 7. Στις ενότητες που ακολουθούν (8.1-8.4) γίνεται μια πολύπλευρη ανάλυση των πιθανών ρόλων της.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

**Κατιοντικές και μη κατιοντικές δράσεις
των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό
απομονωμένων χλωροπλαστών.**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο - Αποτελέσματα

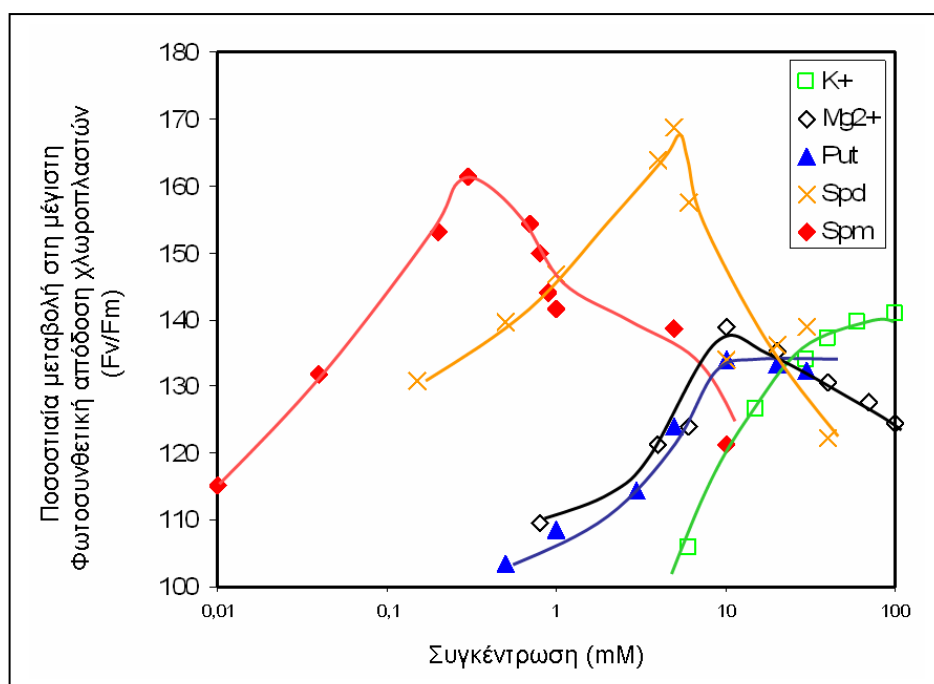
Κατιοντικές και μη κατιοντικές δράσεις των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό απομονωμένων χλωροπλαστών.

8. Ο βιοενεργητικός ρόλος των πολυαμινών**8.1 Η επίδραση των πολυαμινών στη μεγιστοποίηση της φωτοσυνθετικής απόδοσης- σύγκριση με ανόργανα κατιόντα.**

Οι πολυαμίνες Spm, Spd και Put υπάρχουν φυσιολογικά στους χλωροπλάστες των φωτοσυνθετικών οργανισμών (Torrigiani et al., 1987). Με δεδομένο ότι οι πολυαμίνες είναι οργανικά κατιόντα οποιοδήποτε αποτέλεσμα αφορά ηλεκτροστατικές επιδράσεις δεν μπορεί να μελετηθεί σε διαλύματα με σχετικά υψηλή ιοντική ισχύ όπως είναι τα κλασσικά μέσα απομόνωσης χλωροπλαστών. Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκαν μέθοδοι απομόνωσης που μειώνουν την λειτουργικότητα των χλωροπλαστών αλλά επιτρέπουν την εκτίμηση των ηλεκτροστατικών δράσεων των πολυαμινών. Η μελέτη του ρόλου των πολυαμινών έπρεπε να χωριστεί σε κατιοντικές και μη δράσεις και να προσεγγιστεί με διαφορετικούς τρόπους. Για τη μελέτη των κατιοντικών δράσεων χρησιμοποιήθηκαν μέσα απομόνωσης και διαλύματα αντίδρασης που ήταν ιδιαίτερα φτωχά σε μονοθενή και δισθενή ανόργανα κατιόντα. Η έλλειψη κατιόντων προκαλεί μείωση της λειτουργικής οργάνωσης και απόδοσης των χλωροπλαστών και αυτό οδηγεί σε μείωση του λόγου Fv/Fm σε τιμές αρκετά χαμηλές (Fv/Fm= 0.393± 0.016 εικόνα 8.1). Αυτό συμφωνεί με προηγούμενες αναφορές για την επίδραση των διαλυμάτων χαμηλής ιοντικής ισχύος στο φθορισμό απομονωμένων χλωροπλαστών (Moya et al., 1977).

Χλωροπλάστες καπνού απομονώθηκαν σε συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος. Η επίδραση των πολυαμινών στις φωτοσυνθετικές μεμβράνες μελετήθηκε με την καταγραφή των κινητικών OJIP. Η προσθήκη κατιόντων όπως το K⁺ και το Mg²⁺ είναι γνωστό ότι αυξάνουν το Fm σε απομονωμένους χλωροπλάστες και για αυτό δοκιμάστηκαν μόνο για λόγους σύγκρισης. Η Put φαίνεται να αυξάνει τη φωτοσυνθετική απόδοση των χλωροπλαστών κατά 35% σε μια συγκέντρωση 10 mM, ενώ η Spm και η Spd βελτιώνουν μέχρι και 70% την απόδοση (εικόνα 8.1). Πιο αναλυτικά η Put φαίνεται να έχει παρόμοια δράση με το δισθενές Mg²⁺ και να είναι πιο αποτελεσματική από το μονοθενές K⁺. Μάλιστα 10 mM Put βελτιώνουν το Fv/Fm όσο 3 φορές περισσότερη συγκέντρωση K⁺. Οι

Spd και Spm είναι ακόμη πιο αποτελεσματικές σε σύγκριση με την Put καθώς βελτιώνουν σε μεγαλύτερο βαθμό το Fv/Fm.

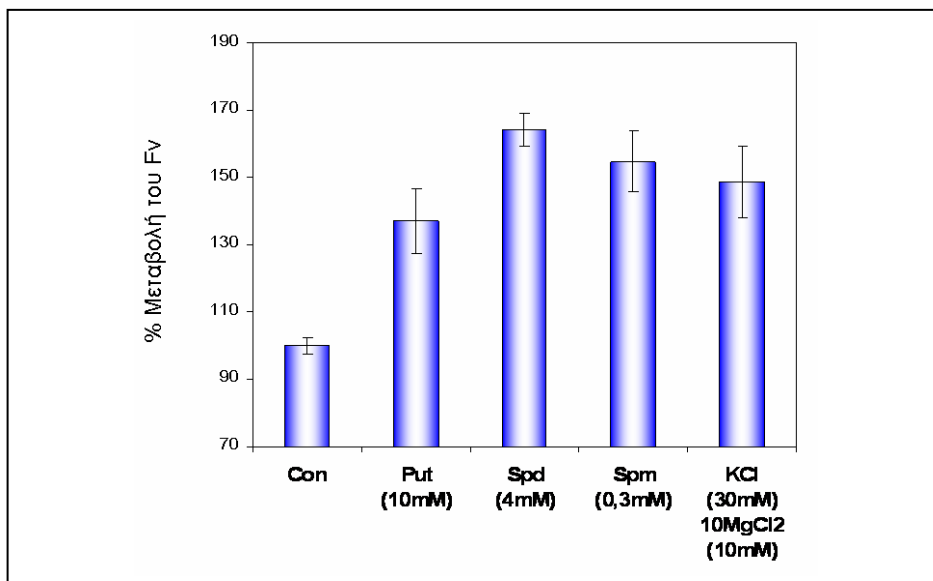


Εικόνα 8.1. Η επίδραση των πολυαμινών στη φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm) απομονωμένων χλωροπλαστών (*Nicotiana tabacum*). Οι χλωροπλάστες απομονώθηκαν σε διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος (βλ. υλικά και μέθοδοι) προκειμένου να μελετηθεί ο κατιονικός ρόλος των πολυαμινών, ενώ τα ανόργανα κατιόντα (K^+ , Mg^{2+}) χρησιμεύουν ως ένα είδος μάρτυρα. Η Spm φαίνεται να αυξάνει την απόδοση ακόμη και σε συγκεντρώσεις 30 μM , ενώ η Spd προκαλεί μεγιστοποίηση της απόδοσης σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (3 mM). Τέλος η Put φαίνεται να έχει παρόμοια δράση με το δισθενές Mg^{2+} . Η κλίμακα των συγκεντρώσεων είναι λογαριθμική. Η τιμή $Fv/Fm = 0.393 \pm 0.016$ ($n=3$) για το μάρτυρα θεωρήθηκε ως 100% και οι τιμές παρουσιάζονται σε σχετικές τιμές.

Μόλις 4 mM Spd ή 0.3 mM Spm είναι αρκετά για να αυξήσουν κατά 70% και 60% αντίστοιχα το λόγο Fv/Fm. Η Spm είναι πιο δραστική, αλλά και πιο αποτελεσματική στην αύξηση του Fv που είναι υπεύθυνο για την αύξηση του λόγου Fv/Fm σε σχέση με τις άλλες πολυαμίνες (οργανικά κατιόντα στις δεδομένες συνθήκες) αλλά και σε σχέση με συνδυασμό κατιόντων (ανόργανα κατιόντα καλίου και μαγνησίου) (εικόνα 8.2). Η Put σε συγκέντρωση 10mM αυξάνει κατά 35% το Fv. Η Spd σε συγκέντρωση 4 mM αυξάνει το Fv 60%, ενώ η Spm σε 0.3 mM προκαλεί αύξηση 55%.

Αυτό φαίνεται από το ποσοστό αύξησης καθώς και από την συνεκτίμηση της χρησιμοποιηθείσας συγκέντρωσης από το κάθε ιόν. Δηλαδή 300 μM Spm είναι πιο

αποτελεσματικά από υπερδεκαπλάσια ποσά Spd ή και από πολλαπλάσια ποσά ανόργανων κατιόντων.

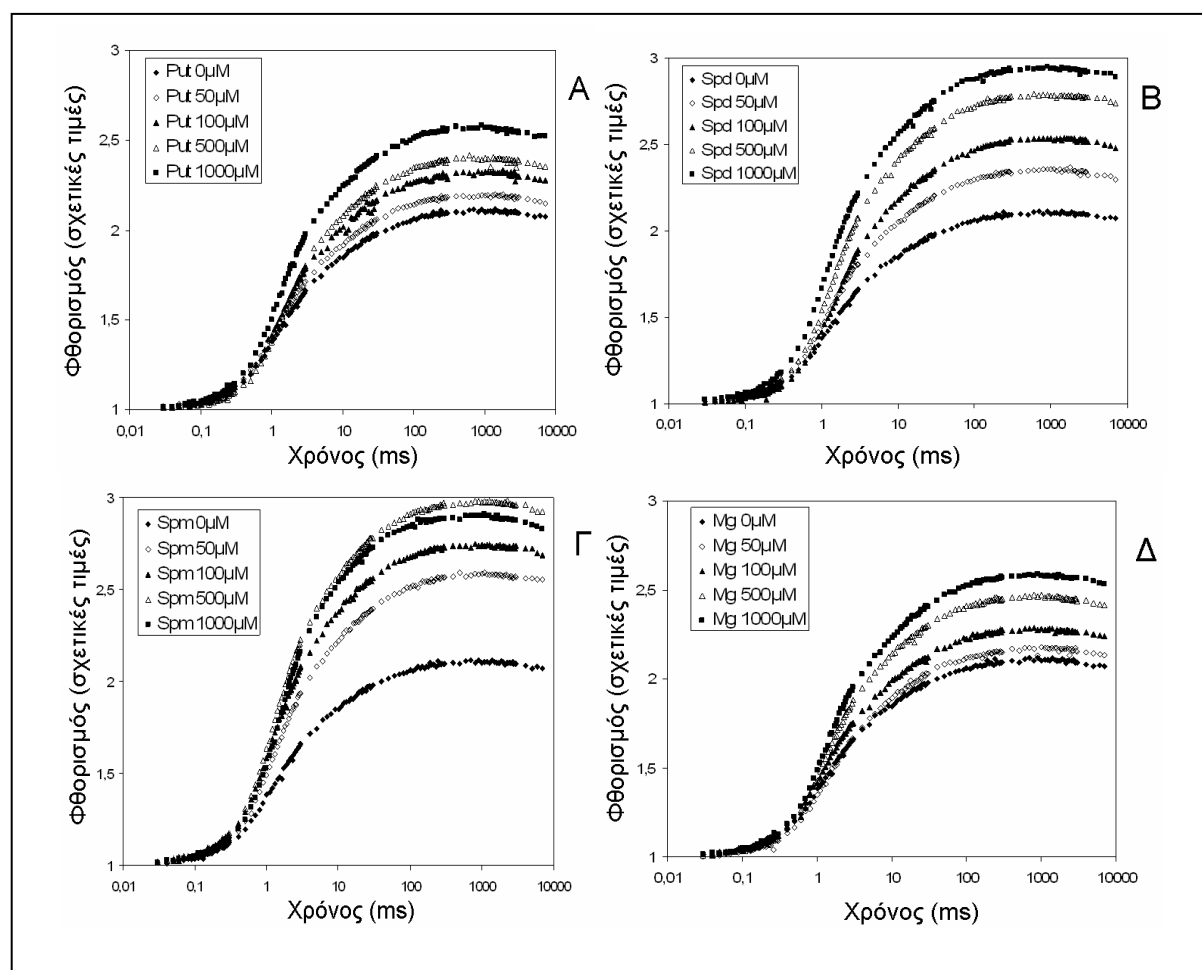


Εικόνα 8.2. Α. Σύγκριτική μελέτη της ικανότητας της βέλτιστης συγκέντρωσης των πολυαμινών να αυξάνουν τη τιμή του μεταβλητού φθορισμού (Fv) σε απομονωμένους χλωροπλάστες (*Nicotiana tabacum*). Οι χλωροπλάστες απομονώθηκαν σε διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος (βλ. υλικά και μέθοδοι) προκειμένου να μελετηθεί ο κατιονικός ρόλος των πολυαμινών, ενώ τα πειράματα με συνδυασμό K^+ και Mg^{2+} χρησιμεύουν σαν ένα είδος μάρτυρα. Οι συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν μετά από πολυάριθμες δοκιμές ως αυτές που εξασφαλίζουν βέλτιστο αποτέλεσμα στο Fv για κάθε ουσία. Για την Put επελέγη η συγκέντρωση των 10 mM, για την Spd αυτή των 4 mM, για τη Spm αυτή των 0.3 mM και για τα ανόργανα ιόντα (30 mM K^+ + 10 mM Mg^{2+}). Για την ακριβή μέτρηση του Fv χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας DCMU. Οι κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στη σταθερή διακύμανση ($n=4$).

8.2 Η επίδραση των πολυαμινών στη ενεργοποίηση των κέντρων PS II- σύγκριση με ανόργανα κατιόντα.

Η τεχνική ‘αποσύνδεση σε χαμηλή ιοντική ισχύ και επανασύνδεση με την προσθήκη κατιόντων’ (low-cation-dissociation cation-reconstitution approach) μελετήθηκε παρουσία DCMU. Με τη χρήση αυτού του αναστολέα της γραμμικής ροής ηλεκτρονίων εξασφαλίζεται ότι κάθε ενεργό κέντρο αντίδρασης θα πραγματοποιήσει έναν μόνο διαχωρισμό φορτίου. Σε αυτές τις συνθήκες το συμπληρωματικό εμβαδό της κινητικής της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού (το οποίο είναι εφικτό να υπολογιστεί αν καταγραφεί η καμπύλη OJIP με συχνότητα 100 kHz, ώστε να υπάρχει ικανοποιητικός αριθμός τιμών που να επιτρέπει την μαθηματική ολοκλήρωση) αποτελεί μέτρο των συνολικών φωτονίων που χρησιμοποιήθηκαν (Melis, 1989). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε παρουσία Put, Spd και Spm, ενώ για να

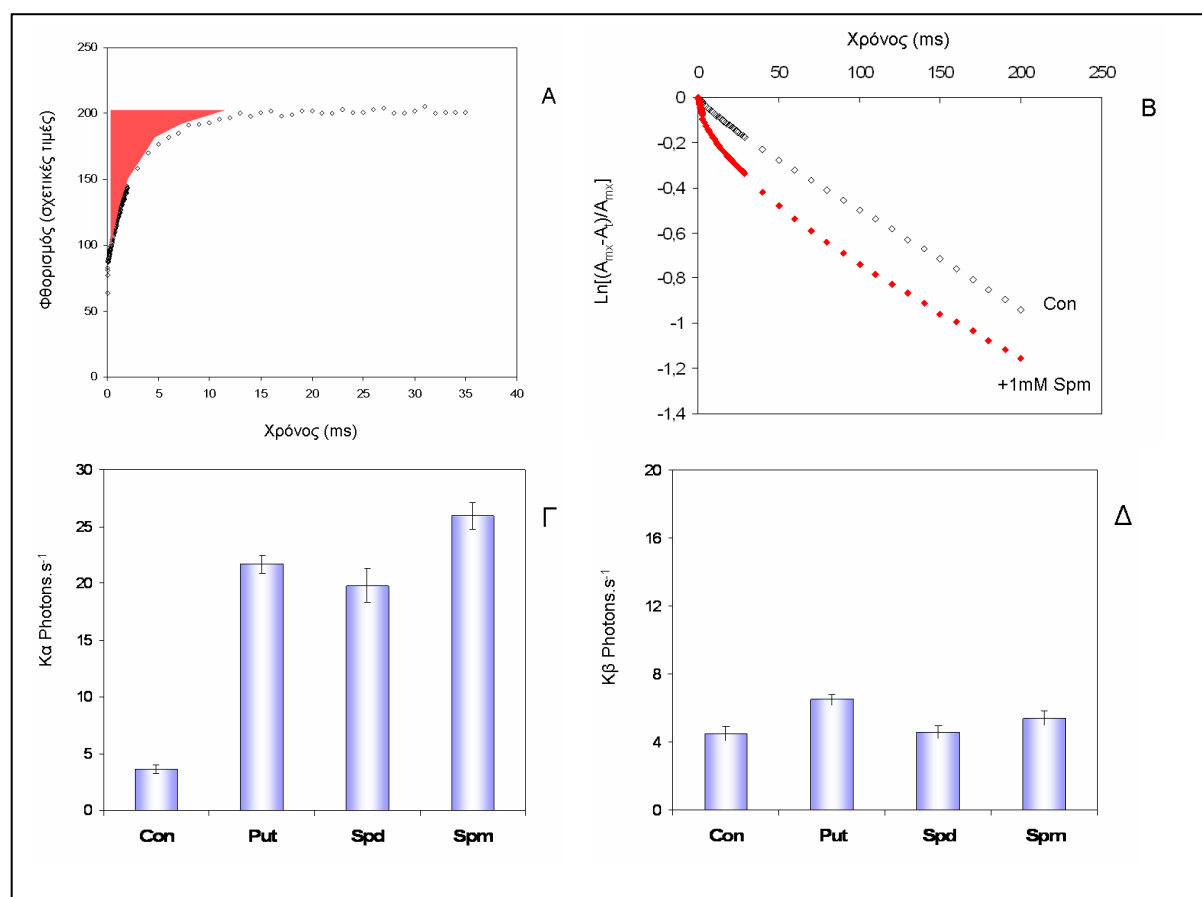
επιτραπών συγκρίσεις με προηγούμενες αναφορές χρησιμοποιήθηκε Mg^{2+} . Δοκιμάστηκαν 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε ουσία και στην εικόνα 8.3 παρουσιάζονται οι κινητικές εκθετικής αύξησης του φθορισμού. Η πιο αποτελεσματική φαίνεται ότι είναι η Spm αφού στην συγκέντρωση των 100 μM ενεργοποίησε 95% των κέντρων όταν στις ίδιες συνθήκες και στην ίδια τελική συγκέντρωση τα υπόλοιπα κατιόντα δεν αύξησαν το Fv περισσότερο από 30% του μάρτυρα.



Εικόνα 8.3. Η επίδραση των πολυαμινών στην μέγιστη τιμή φθορισμού (F_m) χλωροπλαστών (*Nicotiana tabacum*) παρουσία DCMU. Οι χλωροπλάστες απομονώθηκαν σε διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος (βλ. υλικά και μέθοδοι) προκειμένου να μελετηθεί ο κατιονικός ρόλος των πολυαμινών, ενώ τα πειράματα με Mg^{2+} χρησιμεύουν σαν ένα είδος μάρτυρα. Η παρουσία DCMU αναστέλλει τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο PS II πέρα από την Q_A και αυτό επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν αποκλειστικά τα PS II και όχι το φωτοσυνθετικό μηχανισμό γενικά όπως τα πειράματα στην εικόνα 8.1. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την Put (A), την Spd (B), την Spm (Γ) και το Mg^{2+} (Δ) ήταν 50 μM (ανοιχτός ρόμβος), 100 μM (κλειστό τρίγωνο), 500 μM (ανοιχτό τρίγωνο) και 1000 μM (κλειστό τετράγωνο). Η ένταση του φωτός ήταν $1500 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, η διάρκεια 1 s και η συγκέντρωση χλωροφύλλης $10 \mu g ml^{-1}$. Όλες οι ουσίες προστέθηκαν σε μορφή χλωριούχου άλατος. Η κλίμακα του χρόνου είναι λογαριθμική.

8.3 Η συνεισφορά των PSIIα και PSIIβ κέντρων στη αύξηση της φωτοσυνθετικής απόδοσης από τις πολυαμίνες

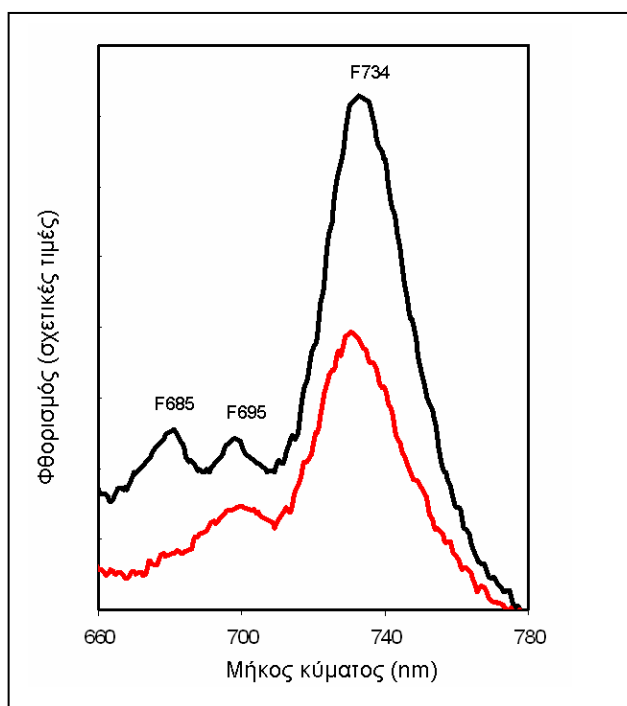
Τα κέντρα αντίδρασης του PSII μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες με κριτήριο το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής τους κεραίας. Υπάρχουν κέντρα με μεγάλη φωτοσυλλεκτική κεραία (περίπου 250 χλωροφύλλες) τα οποία ονομάζονται PSIIα και άλλα με μικρότερη κεραία (περίπου 130 χλωροφύλλες) τα οποία ονομάζονται PSIIβ (Melis, 1989). Η διάκριση των δύο ειδών κέντρων μπορεί να γίνει μετά από μαθηματική ανάλυση του εμβαδού ανάμεσα στην καμπύλη φθορισμού παρουσία αναστολέα (DCMU) και εκείνης της παράλληλης στον άξονα του χρόνου η οποία διέρχεται από το Fm. Μετά από την προσθήκη επιλεγμένων συγκεντρώσεων Put, Spd και Spm η ανάλυση κατά Melis έδειξε ότι η σταθερά K_{α} των PSIIα κέντρων αυξάνει 4 φορές, ενώ τα PS II β κέντρα επηρεάζονται σε μικρότερο βαθμό (εικόνα 8.4). Τα α τύπου κέντρα έχουν μεγαλύτερη φωτοσυλλεκτική κεραία από τα β και βρίσκονται στα grana, ενώ τα β βρίσκονται στα θυλακοειδή στρώματος.



Εικόνα 8.4. Ανάλυση της επίδρασης των πολυαμινών στους διαφορετικούς πληθυσμούς PSII κέντρων. Η επίδραση της Spm (1 mM) στο ρυθμό 'κλεισίματος' των κέντρων αντίδρασης (B). Ο παράγοντας $\ln[(A_{mix}-A)/A_{mix}]$ επιτρέπει την ανάλυση του ρυθμού με τον οποίο αυξάνεται η συμπληρωματική περιοχή (κόκκινο εμβαδό, A). Το εμβαδόν της περιοχής αυτής αποτελεί μέτρο των φωτονίων που χρησιμοποιήθηκαν από τα PSII σε συνθήκες όπου η ροή ηλεκτρονίων παρεμποδίζεται

μετά την Q_A (αναστολέας DCMU). Γ, Δ. Η επίδραση των πολυαμινών στους υποπληθυσμούς PSIIa και PSIIβ. Οι πολυαμίνες δοκιμάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μετά από προκαταρκτικά πειράματα. Οι επιλεγμένες τιμές συγκεντρώσεων αντιστοιχούν στην μέγιστη βελτίωση του Fv παρουσία DCMU και είναι 10 mM για την Put, 4 mM για την Spd και 0.3 mM για τη Spm. Οι πολυαμίνες φαίνεται ότι αυξάνουν τον αριθμό των PSIIa κέντρων πάνω από 4 φορές (Γ), ενώ η επίδρασή τους στα PSIIβ κέντρα είναι μικρή (Δ).

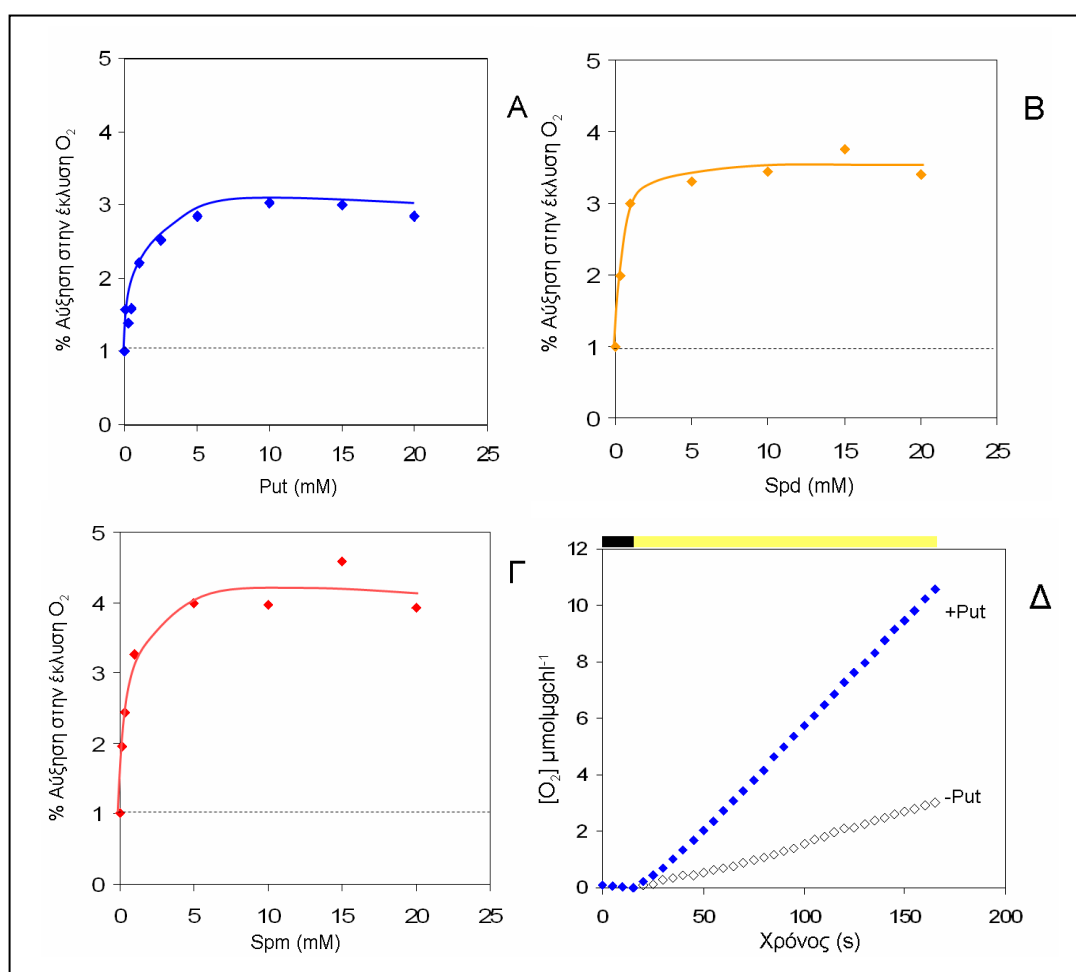
Η κατάσταση των φωτοσυστημάτων μελετήθηκε και με φασματοσκοπικές μεθόδους σε θερμοκρασία υγρού αζώτου (77K). Σε αυτές τις συνθήκες (χαμηλής ιοντικής ισχύος) τα θυλακοειδή εμφανίζουν τρία μέγιστα φθορισμού (F685, F695, F734). Η επίδραση των πολυαμινών μελετήθηκε με τη προσθήκη 1mM σπερμίνης. Μετά την επώαση με Spm εμφανίζονται δύο μόνο μέγιστα φθορισμού (F695, F734). Η κορυφή στα 685nm δεν είναι πλέον ορατή.



Εικόνα 8.5. Φασματοσκοπία εκπομπής φθορισμού χαμηλής θερμοκρασίας (77K) σε απομονωμένους χλωροπλάστες (*Nicotiana tabacum*). Χλωροπλάστες που έχουν απομονωθεί σε διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος εμφανίζουν 3 κορυφές φθορισμού στα 685 nm, στα 695 nm και στα 734 nm (μαύρη καμπύλη). Η προσθήκη Spm (0.3 mM) οδηγεί σε νέα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά με τη δραστική μείωση του μέγιστου στα 685 nm (κόκκινη καμπύλη).

8.4. Η επίδραση των πολυαμινών στην ενεργότητα του PS II

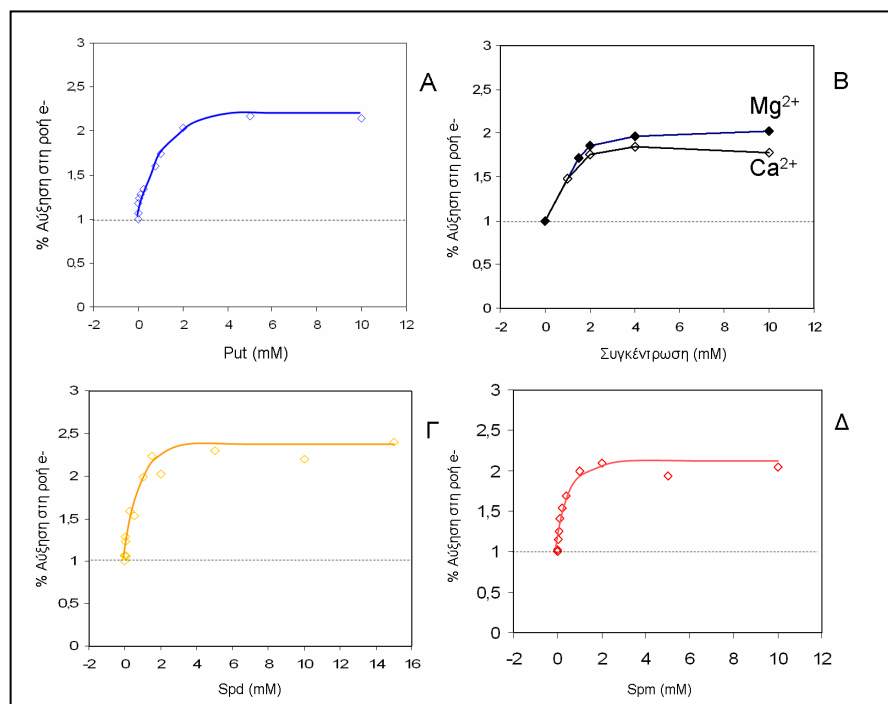
Χλωροπλάστες καπνού οι οποίοι απομονώθηκαν σε συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος εξετάστηκαν πολυρογραφικά για την ικανότητα τους να εκλύουν οξυγόνο παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων πολυαμινών (0 έως 20 mM). Το εκλυόμενο οξυγόνο προέρχεται από τη φωτόλυση του νερού από το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου του PS II, ενώ αποδέκτης ηλεκτρονίων ήταν $K_3Fe(CN)_6$. Η Put αύξησε το ρυθμό έκλυσης οξυγόνου 3 φορές, η Spd 3.5 φορές και η Spm πάνω από 4 φορές στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού. Η Put είχε μέγιστο στην έκλυση οξυγόνου στη συγκέντρωση των 10 mM, η Spd είχε μέγιστο στα 4 mM και η Spm στα 2.5 mM.



Εικόνα 8.6. Ενεργότητα του PS II σε χλωροπλάστες απομονωμένους σε διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος. Η ικανότητα τους να εκλύουν οξυγόνο σε συνθήκες φωτισμού βελτιώνεται με την προσθήκη πολυαμινών (A: Put, B: Spd, Γ: Spm). Η πιο δραστική κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες είναι η Spm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν ποσοστά των τιμών του μάρτυρα (100%, 82 $\mu\text{mol O}_2\text{mgChl}^{-1}\text{h}^{-1}$). Δ. Κινητική χρόνου για την ενεργότητα PSII σε χλωροπλάστες πριν και μετά την προσθήκη πολυαμινών (10 mM Put), η ακτινοβολία άρχισε στα 20 s (κίτρινη γραμμή). Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν 30 μgml^{-1} , οι πολυαμίνες προστέθηκαν αμέσως πριν την ακτινοβολία σαν χλωριούχο άλας και η αντίδραση έγινε σε θερμοκρασία 20° C.

8.5. Η επίδραση των πολυαμινών στη γραμμική ροή ηλεκτρονίων

Μετά την ποσοτικοποίηση των επιδράσεων των κύριων πολυαμινών στη λειτουργικότητα του PS II, και τη συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα πολυαμινών και τα επίπεδα παραγόμενου οξυγόνου πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της γραμμικής ροής ηλεκτρονίων από το PS II στο PSI μέσω του Cytb₆f. Το methyl viologen (MV) χρησιμοποιήθηκε σαν τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων στην αλυσίδα (H₂O→PS II→Cytb₆f→PS I→MV). Οι πολυαμίνες δοκιμάστηκαν και πάλι σε συγκεντρώσεις 0 έως 15 mM. Και οι τρεις πολυαμίνες αύξησαν την κατανάλωση οξυγόνου, η οποία αποτελεί μέτρο της ροής ηλεκτρονίων. Στην εικόνα 8.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της γραμμικής ροής σε σχέση με την τελική συγκέντρωση της κάθε πολυαμίνης στο διάλυμα ενώ παρουσιάζονται για σύγκριση και κινητικές συγκεντρώσεων ανόργανων κατιόντων (Mg²⁺ ή Ca²⁺). Οι Put, Spd και Spm φαίνεται να αυξάνουν περίπου στον ίδιο βαθμό τη γραμμική ροή ηλεκτρονίων. Η μέγιστη αύξηση και στις τρεις περιπτώσεις ήταν περίπου 200%. Αξιοσημείωτο είναι ότι η γραμμική ροή ηλεκτρονίων μελετήθηκε σε συνθήκες σύζευξης με τη σύνθεση ATP (παρουσία ADP, P_i, απουσία αποσυζευκτών, uncoupler).

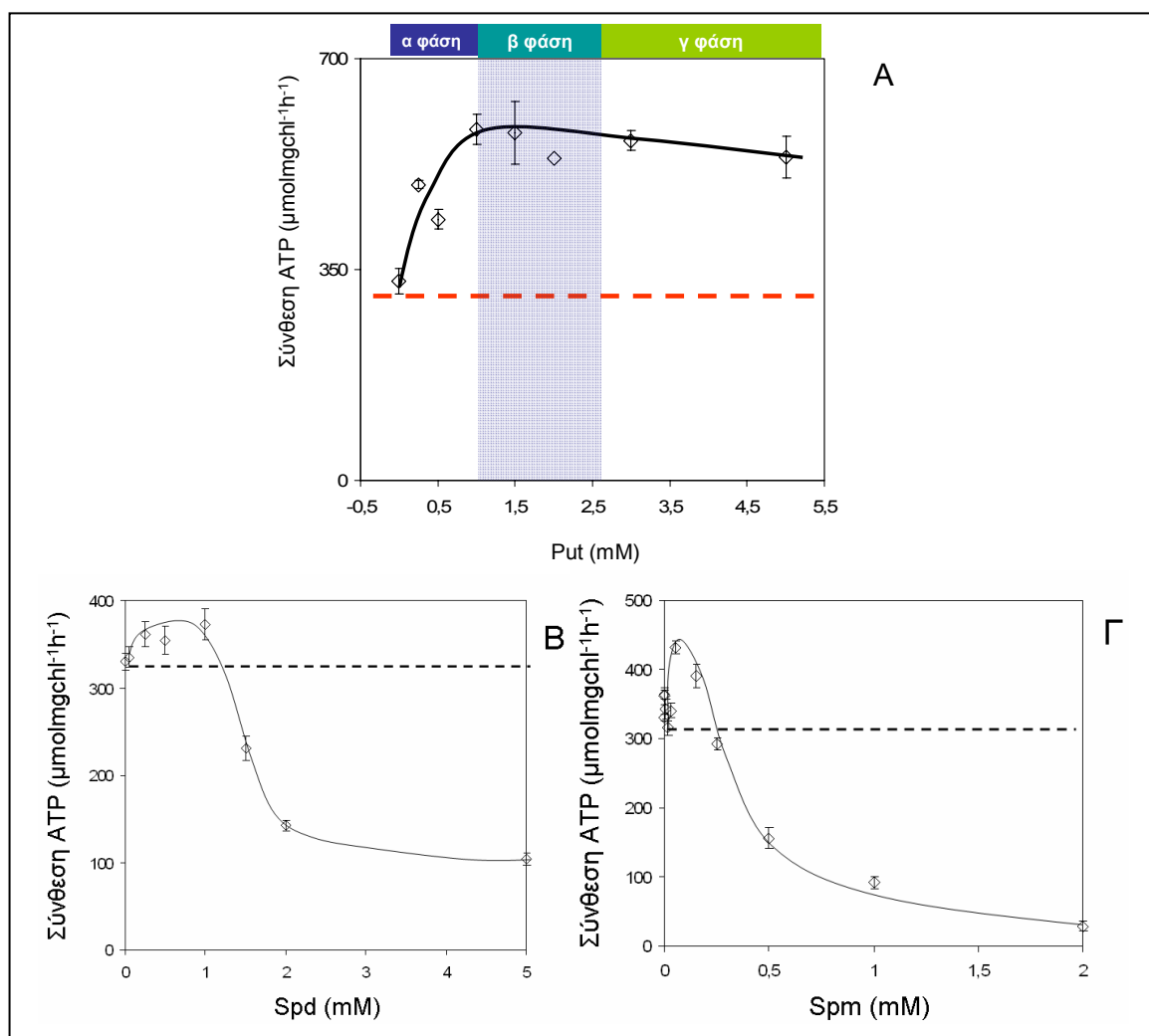


Εικόνα 8.7. Γραμμική ροή ηλεκτρονίων σε χλωροπλάστες (*Nicotiana tabacum*) απομονωμένους σε διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος. Η ικανότητα τους να εκλύουν οξυγόνο σε συνθήκες φωτισμού βελτιώνεται με την προσθήκη πολυαμινών Put, Spd, Spm), Mg²⁺ ή Ca²⁺. Η καμπύλη για τα δισθενή κατιόντα δοκιμάστηκε για να επιτραπούν οι συγκρίσεις (Ca²⁺, Mg²⁺). Στο pH (7.6) του μέσου το μεγαλύτερο μέρος της Put είναι θετικά φορτισμένη (Put²⁺, Put⁺), ενώ λιγότερο από το 1% είναι αφόρτιστη (Put). Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν 35 μgml⁻¹ και η αντίδραση έγινε σε θερμοκρασία 22° C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν ποσοστά των τιμών του μάρτυρα (100% = 76 μmol e⁻mgChl⁻¹h⁻¹).

8.6. Η επίδραση των πολυαμινών στη φωτοφωσφορυλίωση

Η ποσοτικοποίηση των επιδράσεων των πολυαμινών σε συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος τόσο στην φωτοσυνθετική απόδοση, όσο στην ενεργότητα του PS II και την γραμμική ροή ηλεκτρονίων επιτρέπει τη μελέτη στη συνέχεια άλλων επιδράσεων, όχι απαραίτητα σχετιζόμενων με το θετικό φορτίο των πολυαμινών. Η μελέτη της φωτοφωσφορυλίωσης αποκτά μάλιστα ιδιαίτερο ενδιαφέρον εφόσον πρόκειται για διαδικασία που εξαρτάται από τη φόρτιση της μεμβράνης ιδιότητα που φάνηκε στα *in vivo* πειράματα να επηρεάζεται από την αύξηση των ενδοκυτταρικών πολυαμινών. Η επίδραση των πολυαμινών στη φωτοφωσφορυλίωση έγινε με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων πολυαμινών (κινητικές συγκέντρωσης για την Put, τη Spd και τη Spm εικόνα 8.9).

Οι πολυαμίνες φαίνεται να επηρεάζουν την σύνθεση ATP με διαφορετικό τρόπο. Η Put αυξάνει τη σύνθεση του ATP (steady state ATP synthesis). Η Spd εμφανίζει μικρότερη ικανότητα επαύξησης του παραγόμενου ATP σε σχέση με την Put, αλλά προκαλεί αύξηση της τάξης του 20% ακόμη και σε 10 φορές μικρότερη συγκέντρωση από τη διαμίνη. Η Spm δρα με παρόμοιο τρόπο με τη Spd με μέγιστη θετική επίδραση 40% για τη συγκέντρωση των 50μM. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις τόσο η Spm όσο και η Spd φαίνεται να προκαλούν αποσύζευξη και ελαχιστοποιούν τη σύνθεση ATP. Η Put προκάλεσε την υψηλότερη σύνθεση ATP που μετρήθηκε στις συγκεκριμένες συνθήκες με $700 \mu\text{molATPmgChl}^{-1}\text{h}^{-1}$ στη συγκέντρωση των 1.5 mM. Η κινητική στην περίπτωση της Put δείχνει τουλάχιστον τρεις αξιοσημείωτες φάσεις. Η πρώτη φάση ξεκινά από 0 έως 1mM περίπου, όπου αυξανόμενες συγκεντρώσεις Put οδηγούν σε αυξανόμενη σύνθεση του ATP. Η δεύτερη φάση είναι μεταξύ των 1 έως 3 mM όπου η σύνθεση του ATP είναι περίπου σταθερή. Τέλος, η τρίτη φάση μετά τα 3 mM όπου η σύνθεση του ATP αρχίζει να μειώνεται.



Εικόνα 8.9. Φωτοφωσφορυλίωση σε χλωροπλάστες. Α. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Put από 0.25 mM έως 5 mM στην σύνθεση ATP. Η Put αυξάνει την παραγωγή ATP μέχρι και 80%. Β. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Spd από 0.05 mM έως 5 mM στη σύνθεση ATP. Η Spd σε μικρές συγκεντρώσεις (περίπου έως 1 mM) αυξάνει τη σύνθεση ATP, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λειτουργεί με αντίθετο τρόπο. Γ. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Spm από 0.00005 mM έως 2 mM στη σύνθεση ATP. Η Spm αυξάνει την σύνθεση ATP σε μικρές συγκεντρώσεις (έως 250 μM) και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αποσυμπλέκει την φωσφορυλίωση. Οι αντιδράσεις έγιναν σε θερμοκρασία 20°C, με συγκέντρωση χλωροφύλλης 28 μgml⁻¹ και η ακτινοβολήση διήρκησε 3 min. Οι πολυαμίνες προστέθηκαν στη μορφή χλωριούχου άλατος και παρέμειναν 1 min στο σκοτάδι προτού ξεκινήσει η ακτινοβολήση. Οι διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στην τιμή του μάρτυρα. Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν τη σταθερή διακύμανση (n=3).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο – Συζήτηση

Η μελέτη του ρόλου των πολυαμινών σε απομονωμένους χλωροπλάστες είναι περισσότερο πολύπλοκη από ότι φαίνεται αρχικά. Με δεδομένο ότι οι πολυαμίνες είναι οργανικά κατιόντα οποιοδήποτε αποτέλεσμα αφορά ηλεκτροστατικές επιδράσεις δεν μπορεί να μελετηθεί σε διαλύματα με σχετικά υψηλή ιοντική ισχύ όπως είναι τα κλασικά μέσα απομόνωσης χλωροπλαστών. Συνεπώς κρίθηκε σκόπιμο να γίνει προσέγγιση του ρόλου των πολυαμινών από δύο διαφορετικές πλευρές. Από τη μία πλευρά να ποσοτικοποιηθούν οι κατιοντικές επιδράσεις τους και από την άλλη οι μη κατιοντικές. Στην πρώτη περίπτωση επιλέχθηκαν μέσα χαμηλής ιοντικής ισχύος, ενώ στη δεύτερη σχετικά υψηλής ισχύος (κλασικά μέσα απομόνωσης χλωροπλαστών).

Πιο αναλυτικά, στο πλαίσιο μελέτης των κατιοντικών επιδράσεων επιλέχθηκαν μέθοδοι απομόνωσης (βλ. μέθοδοι) που δεν διατηρούσαν μέγιστη την λειτουργικότητα των χλωροπλαστών. Αυτή η μερική μείωση στη λειτουργικότητα είναι ένας συμβιβασμός που αποδέχονται τα ερευνητικά πρωτόκολλα σε παρόμοιες περιπτώσεις ώστε να επιτραπεί η εκτίμηση των ηλεκτροστατικών δράσεων των υπό μελέτη κατιόντων (στην προκειμένη περίπτωση των πολυαμινών). Για τη μελέτη των κατιοντικών δράσεων χρησιμοποιήθηκαν μέσα απομόνωσης και διαλύματα αντίδρασης που ήταν ιδιαίτερα φτωχά σε μονοσθενή και δισθενή ανόργανα κατιόντα.

Η έλλειψη κατιόντων προκαλεί μείωση της λειτουργικής οργάνωσης και απόδοσης των χλωροπλαστών και αυτό οδηγεί σε μείωση του λόγου F_v/F_m σε τιμές αρκετά χαμηλές ($F_v/F_m=0.39$ εικόνα 8.1). Οι πολυαμίνες στις συνθήκες pH των πειραμάτων (pH=7.6) βρίσκονται κυρίως στην πλήρως φορτισμένη μορφή. Η προσθήκη πολυαμινών επαναφέρει τις τιμές φωτοσυνθετικής απόδοσης σε υψηλά επίπεδα (αύξηση 35% με 10 mM Put, 70% με 4 mM Spd και 60% με 0.3 mM Spm εικόνα 8.1). Η αύξηση του F_v/F_m οφείλεται περισσότερο σε αύξηση του F_m και λιγότερο σε μείωση του F_o (δεδομένα δεν παρατίθενται). Η απομόνωση χλωροπλαστών σε διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος είναι γνωστό ότι προκαλεί μείωση του F_m (Moya et al., 1977; Arntzen and Ditto, 1976; Briantais, 1996). Η μείωση αυτή συνδέεται με αποστίβαξη των μεμβρανών στα grana και μπορεί να αντιστραφεί με προσθήκη 5 mM δισθενών κατιόντων ή 30mM μονοσθενών (Ow and Melis, 1982). Οι πολυαμίνες είναι ικανές να μιμηθούν τη δράση ανόργανων κατιόντων και ειδικά η Spm ($z=+4$) είναι αποτελεσματική σε εκατοντάδες φορές πιο μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα ιόντα K^+ (εικόνα 8.1). Οι σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις κατιόντων

φαίνεται να προκαλούν αντίστοιχα σταδιακή αύξηση της φωτοσυνθετικής απόδοσης (εικόνες 8.1 και 8.2).

Η δράση των κατιόντων είναι εδώ και χρόνια αντικείμενο έρευνας και είναι συνδεδεμένη μεταξύ άλλων με τον αρνητικό χαρακτήρα των θυλακοειδών μεμβρανών. Οι θυλακοειδείς μεμβράνες περιέχουν σε μεγάλο βαθμό πρωτεΐνες της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHC) οι οποίες έχουν αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια (Standfuss et al., 2005) (πλευρά που εκτίθεται στο στρώμα) και αποτρέπουν την προσέγγιση παράλληλα κείμενων μεμβρανών. Η πρόσδεση θετικών φορτίων στις περιοχές της κεραίας οδηγεί σε εξουδετέρωση των απωστικών δυνάμεων και για αυτό επιτρέπεται η στίβαξη των μεμβρανών (Barber, 1980). Δηλαδή η ιοντική ισχύς θα καθορίσει το βαθμό στίβαξης και οι πολυαμίνες ως πολυκατιόντα δείχνουν ιδιαίτερα αποτελεσματικές. Μάλιστα η στίβαξη (stacking) εκτός από αύξηση του Fm οδηγεί και σε εξαφάνιση της κορυφής στα 685nm σε φάσματα φθορισμού στους 77K χλωροπλαστών (εικόνα 8.5). Αυτή η κορυφή αρχικά είχε αποδοθεί στη φωτοσυλλεκτική κεραία LHCI, αλλά πρόσφατα προτάθηκε ότι αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη της εσωτερικής κεραίας (CP43) του RCII (Govindjee, 2004). Η κορυφή F685 (77K) εμφανίζεται σε περιπτώσεις όπου οι θυλακοειδείς μεμβράνες παύουν να είναι στιβαγμένες και οι πρωτεΐνες των φωτοσυνθετικών υποσυμπλόκων μετακινούνται ανεμπόδιστα στο επίπεδο της μεμβράνης (Barber, 1982). Η μετακίνηση επιτρέπει την προσέγγιση των φωτοσυστημάτων PSII και PSI που έως τότε ήταν απομακρυσμένα σε στιβαγμένες και μη στιβαγμένες περιοχές αντίστοιχα. Με την προσθήκη Spm ή άλλων πολυαμινών ή ανόργανων ιόντων ξεκινά και πάλι η στίβαξη των μεμβρανών. Το PSI λόγω στερεοδιαμόρφωσης (προεξοχές προς το στρώμα) εκτοπίζεται από τις περιοχές στίβαξης (grana), ενώ το PSII και η φωτοσυλλεκτική κεραία συνδέονται και παγιδεύονται στα grana (Barber, 1980). Πιθανόν η Spm (αλλά και οι άλλες πολυαμίνες) να προκαλούν ταυτόχρονα στίβαξη των μεμβρανών και επανασύνδεση των αποσυναρμολογημένων κέντρων PSII σε αυτές και να επιτρέπουν τη μερική ή ολική αποκατάσταση της λειτουργικότητας του όπως αυτή εκτιμάται από την αύξηση του Fv/Fm (εικόνα 8.1) αλλά και από την έκλυση οξυγόνου (εικόνα 8.6).

Η κινητική συγκέντρωσης για τις πολυαμίνες και τα ανόργανα κατιόντα έδειξε ότι έχουν διαφορετική δραστηριότητα. Η Spm είναι η πιο δραστική αφού μόλις σε συγκεντρώσεις 300 μ M καταφέρνει να αυξήσει τη φωτοσυνθετική απόδοση όσο 10 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση Spd ή 30 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση Put. Επειδή η φωτοσυνθετική απόδοση (Fv/Fm) αφορά συνολικά τη λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού έπρεπε να γίνει διαχωρισμός των αποτελεσμάτων που σχετίζονται με τα επιμέρους σύμπλοκα

του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Διακόπτοντας τη ροή ηλεκτρονίων μετά το Q_A (εικόνα 8.2 χρήση αναστολέα DCMU που προσδένεται στη θέση Q_B) έγινε εφικτή η μελέτη μόνο των φωτοσυστημάτων PS II. Το F_v αυξήθηκε και παρουσία του αναστολέα 37% για 10 mM Put, 64% για 4 mM Spd και 55% για 0.3 mM Spm. (εικόνα 8.3). Αυτά τα δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι στην αύξηση της απόδοσης συνεισφέρουν κυρίως τα PSII κέντρα. Μάλιστα επειδή αυτά εμφανίζουν ετερογένεια αναφορικά με τη λειτουργική τους οργάνωση έγινε προσπάθεια να ποσοτικοποιηθεί η συνεισφορά των διαφορετικών ειδών κέντρων στην παρατηρούμενη βελτίωση.

Συγκεκριμένα τα κέντρα PSII χωρίζονται σε 2 κύριες λειτουργικές κατηγορίες PSIIα και PSIIβ. Τα τύπου α έχουν μεγαλύτερη φωτοσυλλεκτική κεραία (250 χλωροφύλλες) από τα β (130 χλωροφύλλες) και θεωρούνται κέντρα που εδράζονται στις στιβαγμένες περιοχές (Melis, 1989). Τόσο οι πολυαμίνες (εικόνες 8.3 και 8.4) όσο και το μαγνήσιο (Melis, 1989 και εικόνα 8.3) φάνηκε να επηρεάζουν κατά κύριο λόγο τα PS IIα κέντρα και λιγότερο τα PSII β. Η ενεργοποίηση των PSIIβ κέντρων είναι υπεύθυνη για την αύξηση της έκλυσης οξυγόνου (εικόνα 8.5). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι πολυαμίνες φαίνεται να έχουν θετική επίδραση (μικρή ή μεγάλη ανάλογα με τη συγκέντρωση) ενώ στα *in vivo* πειράματα συνήθως η χορήγηση πολυαμινών είχε αρνητικές επιδράσεις. Αυτό αποτελεί απόδειξη του ότι οι πολυαμίνες μπορούν να βοηθούν τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αλλά και ότι πρέπει τα επίπεδά τους να ρυθμίζονται αυστηρά ώστε να βρίσκονται πάντα εντός των ορίων ανοχής των διαδικασιών. Έτσι είναι πιθανό η εξωγενής χορήγηση πολυαμινών να οδηγήσει σε δυσλειτουργία λόγω περίσσειας πολυαμινών όπως ακριβώς δυσλειτουργία θα προκαλούσε και η παντελής απουσία αυτών των μορίων.

Αν η αύξηση του F_v/F_m οφείλεται στο φορτίο των πολυαμινών τότε θα πρέπει η προσθήκη κατάλληλης συγκέντρωσης ανόργανων ιόντων να επιτρέπει το ίδιο αποτέλεσμα στη φωτοσυνθετική απόδοση. Αντίθετα αν οι πολυαμίνες εκτός από κατιοντικές δράσεις έχουν και μη κατιοντικές θα πρέπει το αποτέλεσμα των ανόργανων κατιόντων να είναι μικρότερο από ότι αυτό των πολυαμινών. Στη εικόνα 8.2 φαίνεται ότι επιλεγμένες συγκεντρώσεις πολυαμινών (αυτές που επιτρέπουν την μεγαλύτερη ποσοστιαία αύξηση σε κάθε περίπτωση) έχουν μια μικρή διαφορά από το συνδυασμό ανόργανων κατιόντων. Αυτές οι μικρές διαφορές σε συνδυασμό με την σταθερή διακύμανση (standard deviation) δεν επιτρέπουν κατηγορηματικά συμπεράσματα. Πάντως εύλογο είναι ότι *in situ* (δηλαδή εντός του φυτικού κυττάρου) ο χλωροπλάστης θα πετύχει τη μέγιστη απόδοση F_v/F_m και το επιθυμητό βαθμό στίβαξης των μεμβρανών με τη κατάλληλη αναλογία ανόργανων ιόντων (K⁺, Na⁺, Mg²⁺) και πολυαμινών (Put²⁺, Spd³⁺, Spm⁴⁺). Το πόσο συνεισφέρει το κάθε κατιόν

(πολυαμίνη ή ανόργανο κατιόν) σε *in vivo* συνθήκες τελικά θα καθοριστεί από την συγκέντρωσή του στο χλωροπλάστη.

Αν διακρίνουμε τρεις μεγάλες κατηγορίες για την κατάταξη των χλωροπλαστικών ιόντων C^+ , C^{2+} και $C^{>3+}$ τότε με βάση δημοσιευμένες τιμές (σε mM) για τις χλωροπλαστικές συγκεντρώσεις το C^+ αντιστοιχεί σε $7 Na^+$, $180 K^+$, το C^{2+} αντιστοιχεί σε $18 Mg^{2+}$ ενώ τα παράγωγα αμμωνίου (όπως οι πολυαμίνες) αντιστοιχούν σε 57 (Schroepel-Meier and Kaiser 1988). Από την παρούσα εργασία φάνηκε ότι ειδικά η Spd και η Spm είναι πολύ πιο δραστικές από τα μονοσθενή και δισθενή ιόντα άρα πολύ πιθανόν *in vivo* η οργάνωση των φωτοσυνθετικών μεμβρανών (στίβαξη/αποστίβαξη) να καθορίζεται και από τα πλαστιδιακά επίπεδα πολυαμινών. Με αυτή την πρόταση συμφωνεί το γεγονός ότι σε περιπτώσεις τροφοπενιών K^+ ή Mg^{2+} παρατηρείται μεγάλη αύξηση των πολυαμινών και ιδιαίτερα της Put (Evans and Malmberg, 1989). Η τελευταία παρατήρηση είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς η στίβαξη και αποστίβαξη των μεμβρανών έχει λειτουργικό αντίκτυπο στη φωτοσύνθεση και μπορεί να προστατεύσει σε συνθήκες στρες ή να βελτιστοποιήσει την φωτοσυνθετική απόδοση σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα (φωτοπροσαρμογή).

Οι πολυαμίνες φαίνεται ότι είναι σε θέση να αυξάνουν και τη γραμμική ροή ηλεκτρονίων μιμούμενες τη δράση κατιόντων όπως το Mg^{2+} ή το Ca^{2+} (εικόνα 8.7). Αυτό συμφωνεί με παλαιότερα αποτελέσματα (Besford et al., 1993) που έδειξαν ότι οι πολυαμίνες σταθεροποιούν τις μεμβράνες των θυλακοειδών και αναστέλλουν την αποδόμησή τους. Επίσης η υψηλή απόδοση μετά τη χορήγηση πολυαμινών στην γραμμική ροή είναι δηλωτική της καλής κατάστασης των εμπλεκόμενων υποσυμπλόκων όπως το PSII, το PSI και το Cytb₆f. Η δράση αυτή φαίνεται να είναι στο μεγαλύτερο μέρος της κατιοντική όμως οι επιπλέον 20 ποσοστιαίες μονάδες που προκαλούν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις πολυαμινών σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των ανόργανων ιόντων (210% > 190%) αφήνουν ερωτηματικά για πιθανές μη κατιοντικές επιδράσεις. Αν οι πολυαμίνες έχουν μη κατιοντικό ρόλο θα πρέπει να τον αναλαμβάνουν ακόμη και παρουσία βέλτιστης συγκέντρωσης κατιόντων. Σε αντίθετη περίπτωση αν δηλαδή παρουσία ικανής ποσότητας κατιόντων δεν προκαλούν κάποιο αποτέλεσμα σημαίνει πως δεν έχουν κάποιο ειδικό ρόλο. Η απάντηση δόθηκε με τα πειράματα φωτοφωσφορυλίωσης που πραγματοποιήθηκαν σε βέλτιστες συνθήκες ιοντικής ισχύος (εικόνα 8.9). Οι πολυαμίνες φάνηκαν να αυξάνουν την σύνθεση του ATP, με την Put να είναι η πιο αποτελεσματική και τη Spd και Spm να ακολουθούν. Μάλιστα οι δύο τελευταίες φάνηκαν να προκαλούν αποσύζευξη (uncoupling) της φωσφορυλίωσης από τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (εικόνα 8.9BΓ).

Σε ότι αφορά την αύξηση της σύνθεσης του ATP από την Put αυτή είναι η πρώτη αναφορά. Επειδή η Put είναι φυσιολογικό συστατικό των χλωροπλαστών το συγκεκριμένο αποτέλεσμα έχει ξεχωριστή σημασία. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η Put ήδη θεωρείται μόριο υψηλής βιολογικής σημασίας με έλλειψη όμως του υπεύθυνου μηχανισμού. Στο παρελθόν έχει αναφερθεί αύξηση της φωτοφωσφορυλίωσης από αμίνες παρόμοιου μεγέθους με την Put. Ο μηχανισμός της δράσης των αμινών στη αύξηση της φωτοφωσφορυλίωσης αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας για πάνω από 25 χρόνια. Αρχικά παρατηρήθηκε η επαύξηση από μικρές συγκεντρώσεις αμμωνίας (Giersch, 1981; Giersch, 1982), στη συνέχεια μελετήθηκαν πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες (Pick and Weis, 1988, Sigalat et al., 1988) και πρόσφατα άλλες χαμηλού μοριακού βάρους αμίνες (Wasniowska et al., 2002). Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Ο ένας αφορά τη pH-υποβοηθούμενη διάχυση αφόρτιστων μορίων αμίνης (ή αμμωνίας) μέσω της μεμβράνης των θυλακοειδών και την επακόλουθη φόρτιση τους στο μικροχώρο (Giersh and Meyer, 1984). Ο δεύτερος μηχανισμός δέχεται την ύπαρξη ενός μονοπατιού πρωτονίων συνολικής χωρητικότητας λίγων δεκάδων nM ανά mg Chl μέσα ή κοντά στη μεμβράνη των θυλακοειδών (Dilley, 2004; Horner and Moudrianakis, 1986). Σε κάθε περίπτωση ο ένας μηχανισμός δεν αποκλείει την ισχύ του άλλου. Στην περίπτωση της Put η αύξηση του ATP είναι δύσκολο να οφείλεται στον δεύτερο μηχανισμό. Η μέγιστη παραγωγή ATP παρατηρήθηκε σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις Put (1mM) για δείγματα με 28 μg συνολικής χλωροφύλλης ανά ml (αντιστοιχούν σε κάθε μόριο χλωροφύλλης περίπου 30 μόρια Put). Πιο πιθανός είναι ο μηχανισμός της άντλησης μορίων Put στο μικροχώρο των θυλακοειδών. Πιο αναλυτικά είναι δεδομένο από τις βιοχημικές ιδιότητες του μορίου ότι η ελεύθερη Put εμφανίζει τρεις μορφές σε ένα υδατικό διάλυμα. Η μία είναι φορτισμένη πλήρως ($\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$, Put^{2+}), η δεύτερη είναι φορτισμένη κατά το ήμισυ ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$, Put^+) και η τρίτη είναι αφόρτιστη ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, Put). Λόγω των σχετικά υψηλών pK ($\text{pK}_1=9.04$ και $\text{pK}_2=10.5$) σε φυσιολογικές τιμές pH η Put αναμένεται να είναι κυρίως στην πλήρως φορτισμένη μορφή και σε μικρότερο ποσοστό στις υπόλοιπες δύο μορφές.

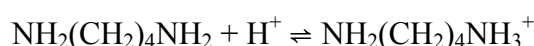
Οι σχετικές τιμές δίνονται από τις σχέσεις $\text{pH}_{\delta\mu}=\text{pK}_2+\log\left(\frac{[\text{BH}^+]}{[\text{BH}^{2+}]}\right)$ και $\text{pH}_{\delta\mu}=\text{pK}_1+\log\left(\frac{[\text{B}]}{[\text{BH}^{2+}]}\right)$.

Αν επώασουμε στο σκοτάδι θυλακοειδείς μεμβράνες με Put, η διαμίνη γρήγορα θα κατανεμηθεί ομοιόμορφα στο μικροχώρο και στον εξωτερικό χώρο (ισοδύναμο του χλωροπλαστικού στρώματος). Δηλαδή στο σκοτάδι η διαφορά συγκεντρώσεων Put μεταξύ στρώματος και μικροχώρου είναι μηδέν. Παρόλαυτά υπάρχουν τρεις τουλάχιστον δυναμικές

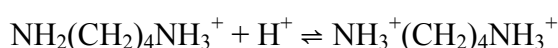
ισορροπίες αν δεχθούμε ότι η φορτισμένη Put δεν μπορεί να περάσει μέσα από τη μεμβράνη (Guarino and Cohen, 1979). Στο μικροχώρο υπάρχει η ισορροπία από τη διάσταση της βάσης, στο στρώμα υπάρχει παρόμοια κατάσταση και τέλος υπάρχει η ισορροπία ανάμεσα στα αφόρτιστα μόρια Put που ελεύθερα διαχέονται μέσω της μεμβράνης (Σχήμα 4.1).

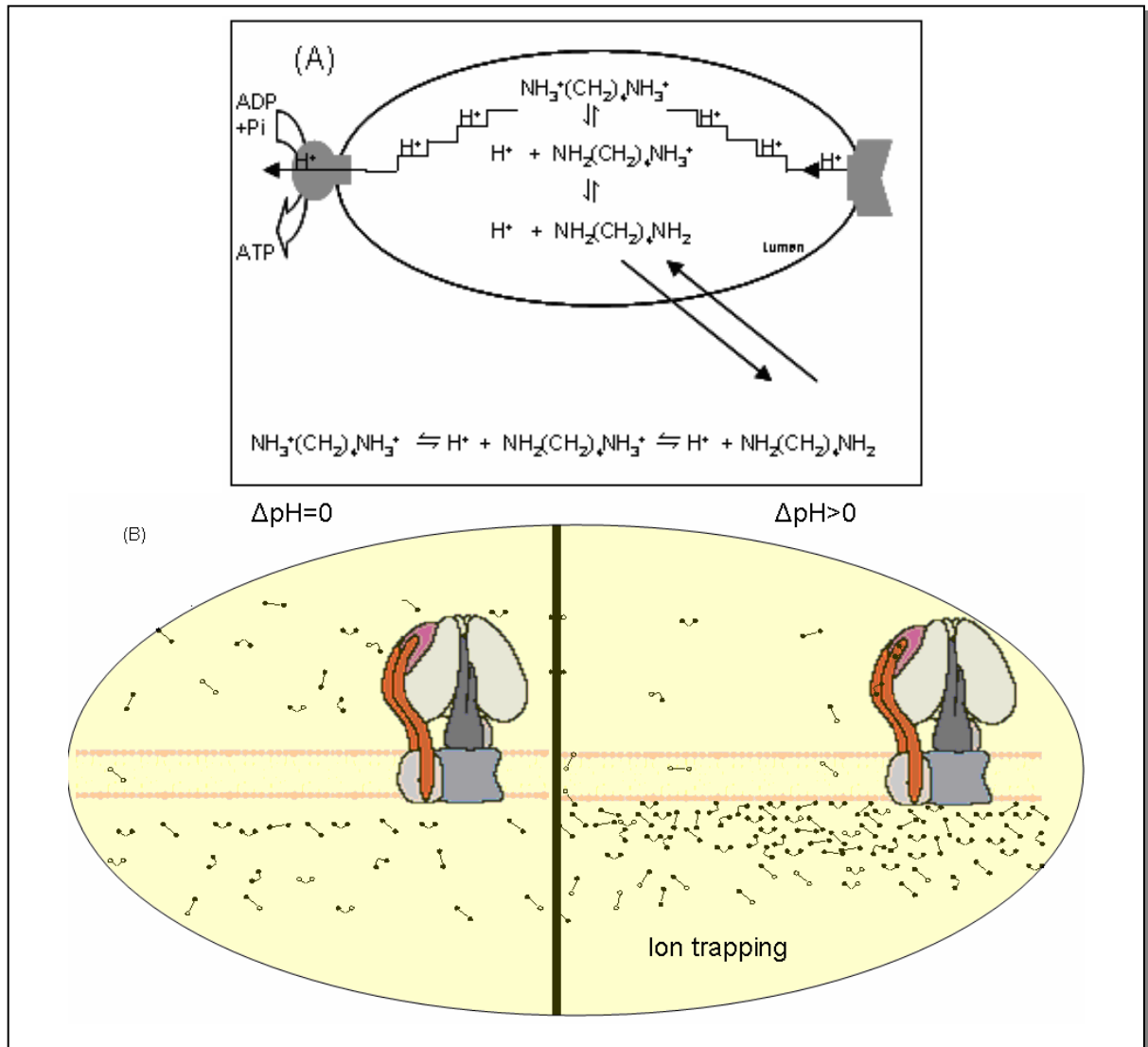
Η ανυσματική διάταξη των φωτοσυνθετικών υποσυμπλόκων στην μεμβράνη των θυλακοειδών έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση πρωτονίων αποκλειστικά προς την πλευρά του μικροχώρου. Άρα σε συνθήκες φωτισμού θα συμβεί απελευθέρωση πρωτονίων στο μικροχώρο και σταδιακή οξίνιση του διαμερίσματος αυτού. Η δυναμική ισορροπία της Put στο μικροχώρο θα αλλάξει και ο πληθυσμός της αφόρτιστης Put θα πρωτονιωθεί. Αυτή η μείωση της συγκέντρωσης αφόρτιστης Put θα προκαλέσει είσοδο αφόρτιστης Put (Guarino and Cohen, 1979) από το στρώμα προκειμένου να αναιρεθεί η μεταβολή. Δηλαδή η ακτινοβολία θα οδηγήσει σε άντληση της Put στο μικροχώρο. Τελικά το pH στο μικροχώρο δεν είναι απαραίτητα τόσο όξινο όσο θα περίμενε κανείς αφού η άντληση Put κάνει ένα είδος ρύθμισης της συγκέντρωσης πρωτονίων (buffering effect).

Αυτή η ρύθμιση (buffering) θα μπορούσε να δικαιολογήσει την εξαφάνιση του πρώιμου NPQ που προκάλεσε η χορήγηση Put στην ενότητα 6. Η κορυφή αυτή εξαφανίζεται σε φυτά χωρίς PsbS (Liu et al., 2000) το οποίο θεωρείται αισθητήρας pH που ενεργοποιείται σε χαμηλό pH συνεπώς τα δεδομένα συμφωνούν ότι με τη μερική αποτροπή της οξίνισης του μικροχώρου και τη μη ενεργοποίηση του PsbS. Επίσης η σχετικά αργή αποφόρτιση του μικροχώρου όπως εκτιμήθηκε και πάλι στην περίπτωση της χορήγησης Put (ενότητα 6) θα μπορούσε να οφείλεται στην σταδιακή απελευθέρωση των πρωτονίων που φέρουν τα μόρια Put στο μικροχώρο. Η άντληση αμινών στο μικροχώρο θεωρητικά πρέπει να προκαλεί την καθυστέρηση της έναρξης της φωτοφωσφορυλίωσης (φάση μετάβασης από το σκοτάδι στο φως) και της επιμήκυνση της στο σκοτάδι (μετάβαση από το φως στο σκοτάδι). Η πειραματική επιβεβαίωση έχει γίνει από τους Horner και Moudrianakis (1983) αλλά δεν φάνηκε η επίδραση στα πειράματα της εικόνας 8.9 επειδή η διάρκεια φωτοφωσφορυλίωσης ήταν πολύ μεγαλύτερη. Σε κάθε περίπτωση η υποθετική μείωση του ΔpH δεν είναι αντίθετη με την αύξηση του παραγόμενου ATP. Αυτό γίνεται κατανοητό αν λάβουμε υπόψη ότι το συνολικό φορτίο στα δύο μέλη της δυναμικής ισορροπίας είναι ίσο.



και





Σχήμα 4.1. Α. Απλουστευμένο σχήμα όπου φαίνεται η τριπλή δυναμική ισορροπία των πολυαμινών. Στο στρώμα υπάρχει η ισορροπία ανάμεσα στις διαφορετικές μορφές της Put (κύκλοι συμβολίζουν τις αμινομάδες και κλειστοί κύκλοι τις πρωτονιωμένες αμινομάδες) που υπακούει στις pK. Στο μικροχώρο υπάρχει μια παρόμοια ισορροπία, ενώ η μεταξύ τους ισορροπία επιτρέπεται χάρη στην περατή μορφή Put (δηλ. την μη φορτισμένη). Αν γίνει απελευθέρωση πρωτονίων στο μικροχώρο τότε θα γίνει άντληση Put (μηχανισμός ion trapping) (Guarino and Cohen, 1979). Από την εικόνα 8.9A φάνηκε ότι σε συνθήκες που επιτρέπουν την άντληση αλλά και προσομοιώνουν το φυσιολογικό pH του στρώματος η Put αυξάνει σημαντικά τη σύνθεση του ATP. Β. Υπεραπλουστευμένο σχήμα όπου φαίνεται η συγκέντρωση του μικρών μορίων Put στο μικροχώρο σε συνθήκες φωτισμού ($\Delta\text{pH}>0$).

Η αύξηση της συνεισφοράς του $\Delta\psi$ και μείωση αυτής του ΔpH που προτείνεται για το μηχανισμό δράσης της Put βρίσκεται σε συμφωνία με πρόσφατα αποτελέσματα των Cruz et al. (2001) που αποδεικνύουν ότι στα φυτά *in vivo* η σύνθεση του ATP οφείλεται μόνο κατά 50% στο ΔpH και όχι κατά το μεγαλύτερο ποσοστό όπως πιστευόταν για δεκαετίες (Kramer et al., 1999). Οι δύο παράγοντες (ΔpH και $\Delta\psi$) ουσιαστικά είναι τα κύρια σήματα που επιτρέπουν στο φωτοσυνθετικό να αυτορρυθμίζεται και για αυτό το λόγο καθορίζουν

την ικανότητα να ανταποκρίνεται στο συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον (Kanazawa and Kramer, 2002; Kramer et al., 2003; Cruz et al., 2005). Η Put θεωρητικά μπορεί να συγκεντρωθεί σε μεγάλο βαθμό (1000 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση στο μικροχώρο σε σχέση με το στρώμα για $\Delta pH=3$). Αυτό θα αύξανε αρκετά την ωσμωτική πίεση και θα οδηγούσε σε μαζική είσοδο νερού. Για να αποτραπεί διόγκωση των θυλακοειδών θα πρέπει η συγκέντρωση Put στο μικροχώρο να ελέγχεται με κάποιο τρόπο. Ο πιο πιθανός τρόπος είναι με την συμμετοχή καναλιών χλωρίου που ενεργοποιούνται όταν αυξηθεί η φόρτιση της μεμβράνης και τελικά επιτρέπουν την είσοδο ανιόντων (Schoeknecht et al., 1988) που μπορούν να εξουδετερώσουν τις θετικές πολυαμίνες και επιτρέπουν στο αφόρτιστο άλας να διαπεράσει το φράγμα της μεμβράνης και να επιστρέψει στο στρώμα.

Σε ότι αφορά το μηχανισμό δράσης της Spd και Spm έχουμε δύο διακριτές περιπτώσεις. Η πρώτη είναι αύξηση του παραγόμενου ATP και η δεύτερη είναι η μείωση (αποσύζευξη φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων από τη σύνθεση του ATP). Η αύξηση στην περίπτωση αυτή δεν είναι απαραίτητο να συμβαίνει με τον ίδιο μηχανισμό όπως στην περίπτωση της Put. Οι συγκεντρώσεις που προκαλούν επαύξηση της φωτοφωσφορυλίωσης είναι μικρότερες. Ειδικά στην περίπτωση της Spm όπου η αύξηση στην σύνθεση του ATP ξεκινά από τα 50 nM της πολυαμίνης δεν αποκλείονται μικροχημειοσωμωτικά φαινόμενα. Η ύπαρξη μιας μικρής κορυφής εκτός από την κύρια που ακολουθεί στην κινητική συγκέντρωσης για τη φωτοφωσφορυλίωση (εικόνα 8.9) υπό την επίδραση αμινών συμφωνεί με αποτελέσματα των Sigalat et al., (1988). Η ομάδα αυτή έδειξε ότι σε τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις οι αμίνες συνδέουν μονοπάτια πρωτονίων μέσα ή κοντά στη μεμβράνη και τελικά επιτρέπουν την δημιουργία ρεύματος πρωτονίων από τους παραγωγούς (π.χ. PSII) στους καταναλωτές (ATPάση). Η μετακίνηση πρωτονίων μέσα ή κοντά στη μεμβράνη αντιμετωπίζεται με αμηχανία από την ερευνητική κοινότητα παρά το συνεχώς αυξανόμενο όγκο δεδομένων (Jahns et al., 1988; Dilley et al., 1987; Laszlo et al., 1984) ίσως γιατί είναι δύσκολη η ανεύρεση της φυσιολογικής αξίας ενός τέτοιου μηχανισμού (Jagendorf, 2002). Εντούτοις ο Williams (1979) έχει προτείνει ότι μια ροή πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης θα επέτρεπε τη μείωση ενεργειακών απωλειών αφού θα απέφευγε ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός την άσκοπη ενυδάτωση των πρωτονίων. Επίσης η Spm και η Spd σε υψηλές συγκεντρώσεις δείχνουν ικανοί uncouplers (αποσυσζεύκτες της ροής ηλεκτρονίων από τη σύνθεση ATP).

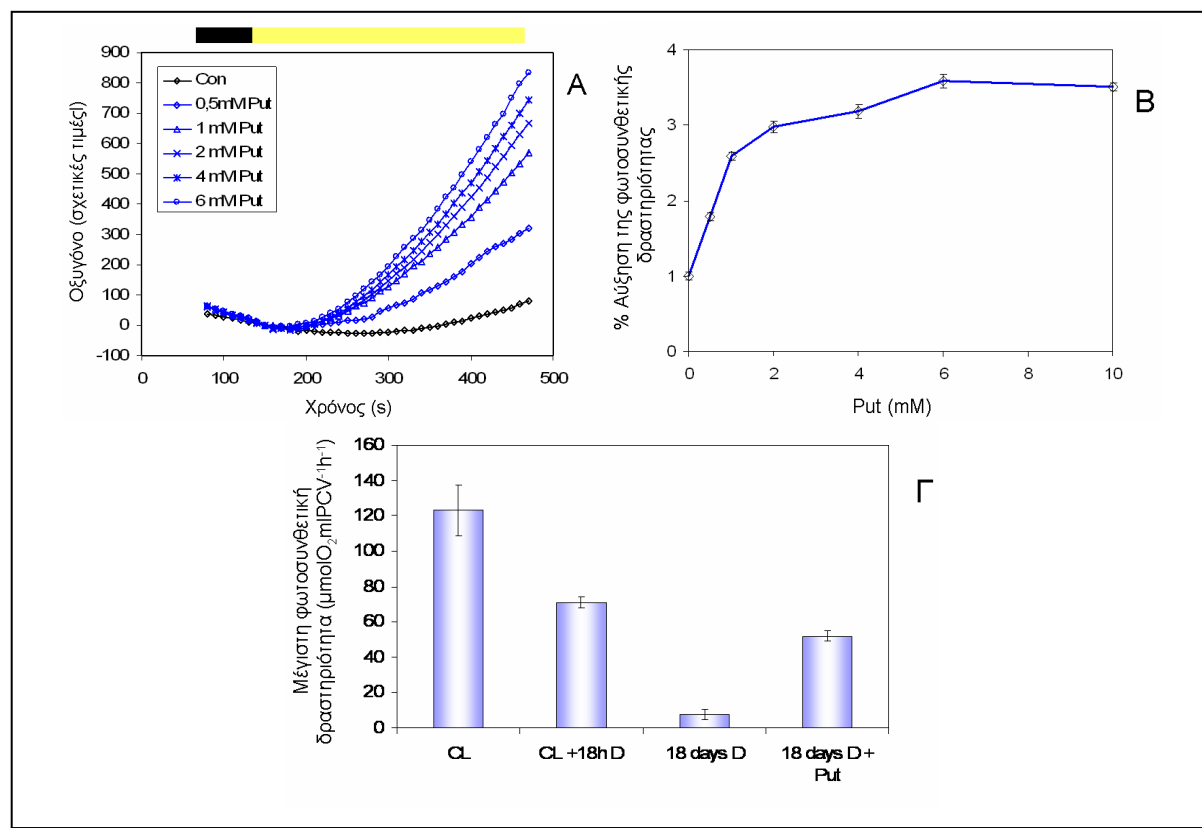
Το αν έχει φυσιολογική σημασία αυτό το αποτέλεσμα είναι λιγότερο προφανές. Πάντως η υψηλή συγκέντρωση πρωτονίων στο μικροχώρο μειώνει την ενεργότητα του PSII και όταν οι συνθήκες φωτισμού είναι έντονες θα μπορούσε μία αύξηση της συγκέντρωσης

για παράδειγμα Spm να ανακουφίσει τη φόρτιση της μεμβράνης των θυλακοειδών. Η αποσύζευξη των μεμβρανών που φωσφορυλιώνουν το ADP έχει προταθεί ως ένας από τους μηχανισμούς αποτροπής της δημιουργίας των επικίνδυνων ενεργών μορφών οξυγόνου (Brandsburg-Zabary et al., 2000).

Επιβεβαίωση προβλέψεων προτεινόμενου μοντέλου

Η ενίσχυση της σύνθεσης του ATP από τις πολυαμίνες φαίνεται να έχει ενδιαφέρουσες προεκτάσεις. Αρχικά θα πρέπει να επισημανθεί το γεγονός ότι η ίδια αιτία προκαλεί δύο διαφορετικά αποτελέσματα. Δηλαδή σε μικρές συγκεντρώσεις έχουμε αύξηση της φωτοφωσφορυλίωσης, ενώ σε μεγαλύτερες μείωση ή αποσύζευξη. Οι αναφορές στη βιβλιογραφία δείχνουν μια σαφή μείωση του επιπέδου των πολυαμινών κατά τη γήρανση (Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005a). Επίσης είναι γνωστό ότι οι μεταβολικοί ρυθμοί μειώνονται σε γηρασμένα κύτταρα. Αν οι α , β , γ φάσεις της εικόνας 8.9 έχουν ισχύ και *in vivo* τότε μπορούμε να εξηγήσουμε τα παραπάνω με βάση τον προτεινόμενο μηχανισμό σύνθεσης του ATP (σχήμα 4.1). Δηλαδή σε εύρωστα κύτταρα βρισκόμαστε στη φάση α (υψηλό επίπεδο πολυαμινών αλλά και δυνατότητα άμεσης αύξησης του ATP (π.χ σε συνθήκες στρες). Η μετάβαση από την α στη β φάση μέσω ταχείας αύξησης των πολυαμινών (που αποδεδειγμένα συμβαίνει σε καταπονήσεις) επιτρέπει την αύξηση του παραγόμενου ATP που ίσως καλύψει άμεσες ανάγκες. Στο ίδιο πλαίσιο σκέψης η χορήγηση 1mM Put σε γηρασμένα κύτταρα θα πρέπει να έχει εντελώς διαφορετική επίδραση από ότι σε νεαρά. Στα γηρασμένα όπου η Put είναι σε χαμηλά επίπεδα (Kotzabasis and Senger, 1994) η χορήγηση εξωγενώς κατάλληλης ποσότητας θα προκαλέσει την μετάβαση στη φάση β όπου η παραγωγή ATP μεγιστοποιείται (εικόνα 8.9). Στα νεαρά η ίδια αιτία (προσθήκη Put θα έχει διαφορετικό αποτέλεσμα) αφού τα κύτταρα έχουν υψηλότερα επίπεδα Put από τα γηρασμένα και πιθανόν να μεταβούν στη φάση γ όπου θα παράγουν λιγότερη ενέργεια σε σχέση με πριν τη μεταχείριση. Πρακτικά κάτι τέτοιο ισοδυναμεί με ανανέωση των γηρασμένων κυττάρων (rejuvenation). Τα γηρασμένα κύτταρα αποφεύγονται σε πειράματα επειδή εμφανίζουν χαμηλή λειτουργικότητα (βλ. ένθετο) και οι ερευνητές κατά κανόνα χρησιμοποιούν εύρωστο υλικό (ταχύτατα αναπτυσσόμενα κύτταρα). Αν όμως οι πολυαμίνες μπορούν να εισέλθουν εντός δευτερολέπτων στο φυτικό κύτταρο κινούμενες προς τον όξινο μικροχώρο (υποβοηθούμενη από τη ΔpH -εξαρτώμενη διάχυση) όπως το μοντέλο του προηγούμενου σχήματος (4.1) προβλέπει και αν οι πολυαμίνες μπορούν να αυξήσουν τη λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε συγκεκριμένες συνθήκες τότε θα πρέπει αν

δοκιμαστούν διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυαμινών κάποιες από αυτές να αυξάνουν τη λειτουργικότητα των γηρασμένων κυττάρων.



Ένθετο. Πείραμα που σχεδιάστηκε στη βάση του νέου μοντέλου. Α. Κινητικές έκλυσης οξυγόνου για γηρασμένα φύκη (18 d) και η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Put. Β. Η κινητική συγκεντρώσεων Put στη μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Γ. Μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε νεαρά μικροφύκη που αναπτύχθηκαν στο συνεχές φως (CL), σε μικροφύκη που αναπτύχθηκαν στο φως αλλά επώαστηκαν για 18 h στο σκοτάδι (CL+18hD), σε μικροφύκη που παρέμειναν 18 ημέρες στο σκοτάδι (18 days D) και τέλος μικροφύκη που παρέμειναν 18 ημέρες στο σκοτάδι αλλά τους χορηγήθηκαν 10mM Put αμέσως προτού ακτινοβοληθούν (18 days D+ Put). Συνήθως γηρασμένες καλλιέργειες δεν χρησιμοποιούνται για πειράματα είναι όμως κύτταρα με χαμηλή συγκέντρωση πολυαμινών (Kotzabasis and Senger, 1994). Φαινόμενα αναζωογόνησης σε χλωροφύκη που προέρχονται από καλλιέργεια σε φάση γηρασμού (βλ. σχήμα, μάρτυρα: con εικονίδιο Α). Η προσθήκη Put στο μέσο οξυγονομέτρησης αυξάνει την φωτοσυνθετική δραστηριότητα αποδεικνύοντας ότι η Put μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα και στη συνέχεια στο χλωροπλάστη εντός δευτερολέπτων, αλλά και ότι η αύξηση της Put ευνοεί την λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Οι επιδόσεις είναι κοντά σε αυτές νεαρών κυττάρων που έμειναν 18 h στο σκοτάδι. Το πείραμα αυτό σχεδιάστηκε στη βάση του μοντέλου που προτάθηκε για το ρόλο των πολυαμινών και δίνει παρόμοια αποτελέσματα και για την προσθήκη Spd.

Πράγματι η προσθήκη Put (ένθετο) και Spd (δεδομένα δεν παρατίθενται) αυξάνει την φωτοσυνθετική δραστηριότητα εντός 30 s σε χλωροφύκη που βρίσκονται σε φάση γηρασμού. Οι τιμές έκλυσης οξυγόνου συγκρίνονται μετά τη χορήγηση πολυαμινών με αυτές των νεαρών φυκών.

Άρα ένας από τους λόγους μείωσης της απόδοσης των κυττάρων στη φάση γηρασμού είναι τα χαμηλά επίπεδα των ενδοκυτταρικών επιπέδων πολυαμινών. Τέλος, η ομοίωση των πολυαμινών πρέπει να λαβαίνει υπόψη της: α) τις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου (παρούσα εργασία), β) τη διαθεσιμότητα κατιόντων (Evans and Malberg, 1987) την ένταση και ποιότητα φωτός (Kotzabasis et al., 1999; Doernemann and Kotzabasis, 1998) και να αναζητά μια ‘χρυσή τομή’ που συνεχώς μεταβάλλεται.

Συνοψίζοντας, τα κυριότερα συμπεράσματα είναι τα εξής:

A. Οι πολυαμίνες φαίνεται να αποτελούν ένα ενδιάμεσο ανάμεσα στους «παραγωγούς» πρωτονίων και τους «καταναλωτές» πρωτονίων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού το οποίο επιτρέπει ένα νέο ευέλικτο βήμα ρύθμισης της διαδικασίας παραγωγής ενέργειας.

B. Οι συγκεντρώσεις των πολυαμινών καθορίζουν και το ρυθμό παραγωγής ATP στο χλωροπλάστη.

Γ. Οι πολυαμίνες και ειδικά η πιο δραστική Put πιθανόν *in vivo* να έχει ρόλο ενδιάμεσου στη φωτοφωσφορυλίωση, όπως ακριβώς αποδείχθηκε και στα *in vitro* πειράματα όπου οι συνθήκες ιοντικής ισχύος, οσμωτικής ισχύος, pH στρώματος, συγκέντρωσης Put, θερμοκρασίας και ένταση φωτισμού που επιλέχθηκαν είναι ακριβώς ίδιες ή πολύ κοντινές στις κοινά αποδεκτές *in vivo* αντίστοιχες παραμέτρους.

Δ. Οι πολυαμίνες μπορούν να αναλαμβάνουν άμεσα βιοενεργητικούς ρόλους στις φωτοσυνθετικές μεμβράνες χωρίς τη μεσολάβηση αλυσίδων μεταφοράς σήματος που εμπλέκουν γονιδιακή ρύθμιση (αυτό δεν αποκλείει η ρύθμιση των επιπέδων των πολυαμινών να υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση).

E. Η Put αυξάνει 35% τη φωτοσυνθετική απόδοση, 300% την έκλυση οξυγόνου που προέρχεται από τη φωτόλυση του νερού, 210% τη γραμμική ροή ηλεκτρονίων σε συγκέντρωση 10 mM.

Η Spd αυξάνει 70% τη φωτοσυνθετική απόδοση, 320% την PSII προερχόμενη έκλυση οξυγόνου, 230% τη γραμμική ροή ηλεκτρονίων σε συγκέντρωση 4 mM.

Η Spm αυξάνει 60% την απόδοση, 250% την έκλυση οξυγόνου, 160% τη γραμμική ροή ηλεκτρονίων σε συγκέντρωση 0.3mM.

Z. Οι παραπάνω (E) επιδράσεις των πολυαμινών στην φωτοσυνθετική διαδικασία οφείλονται κυρίως στην ενεργοποίηση των PSIIα κέντρων μέσω των κατιοντικών επιδράσεων των πολυαμινών.

H. Η Put σε απομονωμένους χλωροπλάστες και σε συνθήκες που προσωμοιώνουν της *in situ* συνθήκες αυξάνει τη χημειωσμοτική σύνθεση του ATP κατά 80%. Μικρές αλλαγές στη συγκέντρωση της Put στους χλωροπλάστες οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης ενέργειας για ίσο αριθμό διαθέσιμων φωτονίων.

Εν κατακλείδι

Οι πολυαμίνες του κυττάρου είναι κάθε φορά συγκεκριμένου προφίλ (δηλαδή συγκεκριμένη ποσότητα από κάθε πολυαμίνη αλλά και συγκεκριμένη στοιχειομετρική σχέση μεταξύ Put:Spd:Spm (Kotzabasis et al., 1999; Doernemann and Kotzabasis 1998; Logothetis et al., 2004). Συνεπώς υπάρχει ένας ομοιοστατικός μηχανισμός που αλλάζει συνεχώς ουδό λειτουργίας (set point) (βλ. ακόμη έννοια ομοιοστασίας Paschalidis, 2003). Στα πειράματα των ενότητων 3, 4, 5 (1^ο κεφάλαιο) φάνηκε ότι η χορήγηση πολυαμινών ελλατώνει τη φωτοχημεία και αυξάνει τη διάχυση ενέργειας κάνοντας λιγότερο αποδοτικό το φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Ουσιαστικά η χορήγηση πολυαμινών ενεργοποιεί τη φωτοπροστασία (ακόμη και σε συνθήκες που προφανώς δε χρειάζεται, όπως σε απόλυτο σκοτάδι, ενότητα 5, 1^ο κεφάλαιο) άμεσα, χωρίς τη μεσολάβηση γονιδιακής ρύθμισης (πειράματα με Spd και Spm ενότητας 7, 1^ο κεφαλαίου). Γενικότερα οι πολυαμίνες φάνηκε από την παρούσα εργασία ότι λαβαίνουν μέρος σε λειτουργικούς 'βρόγχους' που εξασφαλίζουν από τη μία μεγάλη απόδοση και από την άλλη μεγάλη προστασία (σχήματα 3.3 και 4.1 στις σελίδες 142 και 163 αντίστοιχα). Επίσης, είναι ήδη γνωστό ότι τα επίπεδά τους πρέπει να ρυθμίζονται αυστηρά αφού οι μεταβαλλόμενες εξωτερικές συνθήκες απαιτούν συνεχή προσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Kotzabasis et al., 1999; Navakoudis et al., 2003; Logothetis et al., 2004; Sfichi et al., 2004; Luetz et al., 2005).

Η συγκριτική μελέτη της δομικής/λειτουργικής οργάνωσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε σκοτάδι και φως επέτρεψε την προσέγγιση του φυσιολογικού ρόλου των πολυαμινών αλλά και την ανακάλυψη μιας νέας φάσης ανάπτυξης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (περίπτωση λειτουργικής ενεργοποίησης ενότητας 5, 1^ο κεφαλαίου). Η διεξοδική μελέτη των ρόλων αυτών των μικρομοριακών ενώσεων οδήγησε στην πρόταση δύο πρωτότυπων μηχανισμών (σχήματα 3.1 και 4.2 στις σελίδες 142 και 163 αντίστοιχα) που επιχειρούν να καταστήσουν πιο κατανοητές τις μοριακές δράσεις των πολυαμινών. Οι πολυαμίνες φαίνεται ότι παίζουν κυρίως βιονεργητικό ρόλο στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό ενισχύοντας την απόδοση του (παραγόμενο ATP ανά διαθέσιμο φωτόνιο), προστατεύοντας τη λειτουργία του (μείωση της πίεσης διέγερσης των κέντρων αντίδρασης λόγω ελεγχόμενης αύξησης θερμικών απωλειών), ενώ για πρώτη φορά ποσοτικοποιήθηκαν οι αναμενόμενες κατιοντικές δράσεις τους στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό και συγκρίθηκαν με μονοσθενή και δισθενή ανόργανα κατιόντα που υπάρχουν φυσιολογικά στο χλωροπλάστη. Ο βιονεργητικός ρόλος των πολυαμινών έχει ιδιαίτερη σημασία αφού καθορίζει δύο κεντρικές διαδικασίες όπως η φωτοπροστασία και η απόδοση μετατροπής της ηλιακής ενέργειας σε χημική.

Οι 3 πολυαμίνες φάνηκε να έχουν διακριτούς ρόλους (πρωτεύοντες ρόλοι) αλλά και άλλους επικαλυπτόμενους ρόλους (δευτερεύοντες ρόλοι). Η διάκριση αφορά στην ειδικότητα και όχι στη βιολογική σημασία των ρόλων. Δηλαδή οι πρωτεύοντες είναι ισότιμοι με τους δευτερεύοντες. Σε ότι αφορά τους πρωτεύοντες ρόλους των πολυαμινών στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό, η Put αποδείχθηκε πιο ικανή στην ενίσχυση της φωτοφωσφορυλίωσης. Η Spd φαίνεται να είναι η πιο πιθανή μοριακή στρόφιγγα/διακόπτης της φωτοσυλλεκτικής κεραίας και ο βαθμός πρωτονίωσης της ιμινομάδας της καθορίζει το ποσοστό της συλλεγόμενης φωτονιακής ενέργειας που θα διοχετευθεί προς τα κέντρα αντίδρασης. Τέλος, η Spm φάνηκε η πιο ικανή ενισχύτρια της απόδοσης των φωτοσυνθετικών κέντρων αντίδρασης RC II. Σε ότι αφορά τους δευτερεύοντες ρόλους και οι τρεις πολυαμίνες δείχνουν ικανές να δράσουν σαν κατιόντα και όπως ήταν αναμενόμενο η σειρά δραστηριότητας τους είναι η εξής: Spm > Spd > Put. Επίσης, η Spm και η Spd δείχνουν ικανοί uncouplers (αποσυνζεύκτες της ροής ηλεκτρονίων από τη σύνθεση ATP) ιδιότητα που μπορεί να 'ανακουφίσει' τη φόρτιση της μεμβράνης των θυλακοειδών σε συνθήκες υψηλής-επικίνδυνης φόρτισης.

Οι πολυαμίνες παίζουν το ρόλο του ενισχυτή της φωτοφωσφορυλίωσης, αλλά η Put είναι σαφώς δραστηριότερη. Η Spd δείχνει να επικαλύπτεται με την Spm στο ρόλο του διακόπτη της φωτοσυλλεκτικής κεραίας. Εδώ και δεκαετίες οι πολυαμίνες των φυτών, των ζώων, των μυκήτων και των προκαρυωτικών, έχουν συνδεθεί με πολλές και κεντρικής σημασίας διαδικασίες χωρίς να υπάρχει σαφής ερμηνεία του τρόπου με τον οποίο δρουν. Πολύ λίγες ειδικές μοριακές δράσεις έχουν αναφερθεί όπως ο ρόλος της Spd στη σύνθεση υποουσίνης (Park et al., 1981) και της Spm στην απόσβεση ενεργών μορφών οξυγόνου, (Ha et al., 1998; Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προτείνουν δύο μοριακούς μηχανισμούς, οι οποίοι θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για μελλοντικά πειράματα. Ειδικά ο προτεινόμενος ρόλος της Put λόγω των συντηρημένων εξελικτικά προαπαιτούμενων (α. ύπαρξη ημιπερατής μεμβράνης β. ύπαρξης ελεύθερης Put, γ. ύπαρξη πρωτονιοκινούμενης ATPάσης και δ. ύπαρξη ΔpH κατά μήκος της μεμβράνης) αποτελεί ελκυστική βάση για επέκταση και σε άλλα μη φωτοσυνθετικά συστήματα μελέτης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams DO, Franke KE, Christensen LP** (1990) Elevated putrescine levels in grapevine leaves that display symptoms of potassium deficiency. *Am J Enol Vitic* **41**: 121-125
- Adiga PR, Prasad P** (1985) Biosynthesis and regulation of polyamines in higher plants. *Plant Growth Regul* **3**: 205-226
- Adams WW 3rd, Demmig-Adams B** (2004) Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment : in G.C. Papageorgiou, Govindjee (eds.) *Chlorophyll a Fluorescence, a signature of photosynthesis*, Springer, Dordrecht, pp583-604
- Alabadi D, Carbonell J** (1998) Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiol* **118**: 323–328
- Allen JF, Forsberg J** (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* **6**: 317–326.
- Andreadakis A, Vavadakis M, Navakoudis E, Kotzabasis K** (1995) Influence of polyamine inhibitors on light-independent and light dependent chlorophyll biosynthesis and on the photosynthetic rate. *J Photochem Photobiol* **28**: 235-242
- Andreadakis A, Kotzabasis K** (1996) Changes in the biosynthesis and catabolism of the polyamines in isolated plastids during the chloroplast photodevelopment. *J Photochem Photobiol* **33**: 163-170
- Antognoni F, Fornale S, Grimmer C, Komor E, Bagni N** (1998) Long-distance translocation of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. *Planta* **204**: 520-527
- Apelbaum A, Canellakis ZN, Applewhite PB, Kaur-Sawney R, Galston AW** (1988) Binding of spermidine to a unique protein in thin layer tobacco tissue culture. *Plant Physiol* **88**: 996-998 (1988).
- Argyroudi-Akoyunoglou JH, Thomou H** (1981) Separation of thylakoid pigment-protein complexes by SDS-sucrose density gradient centrifugation. *FEBS Lett* **135**: 177–181
- Armstrong GA** (1998) Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms. *J Photochem Photobiol B* **43**: 87–100
- Arntzen CJ, Ditto CL** (1976) Effects of cations upon chloroplast membrane subunit interactions and excitation energy distribution. *Biochim Biophys Acta* **449**: 259–274

-
- Askar A, Treptow H**, (1986) Biogene amine in Lebensmitteln, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, pp1-76
- Avron M** (1960) Photophosphorylation by swiss-chard chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **40**: 257-272.
- Bagni N, Serafini-Fracassini D** (1973) The role of polyamines as growth factors in higher plants and their mechanism of action. *In Plant growth substances*,. Hirikawa Publ. Co., Tokyo, 1205-1217pp
- Bagni N, Tassoni A** (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**: 301-317
- Barber J** (1980) An explanation for the relationship between salt-induced thylakoid stacking and the chlorophyll fluorescence changes associated with changes in spillover of energy from photosystem II to photosystem I. *FEBS Lett* **118**: 1-10.
- Barber J** (1982) Influence of surface charges on thylakoid structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol* **33**: 261-295.
- Barber J** (2002) Photosystem II: a multisubunit membrane protein that oxidises water. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 523–530
- Barkan A, Voelker R, Mendel-Hartvig J, Johnson D, Walker M** (1995) - Genetic analysis of chloroplast biogenesis in higher plants. *Plant Physiol* **93**: 163-170
- Bassi R, Caffarri S** (2000) Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls. *Photosynth Res* **64**: 243–256
- Bassi R, Wollman FA** (1991) The chlorophyll-a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **183**: 423-433
- Baymann F, Brugna M, Muhlenhoff U, Nitschke W** (2001) Daddy, where did (PS)I come from? *Biochim Biophys Acta* **1507**: 291–310
- Begley TP, Young H.** (1989) Protochlorophyllide oxidoreductase .I Determination of the regiochemistry and the stereochemistry of the reduction of protochlorophyllide to chlorophyllide. *J Am Chem Soc* **111**: 3095-3096
- Beigbeder A, Kotzabasis K** (1994) The influence of exogenously supplied spermine on protochlorophyllide and chlorophyll biosynthesis *J Photochem Photobiol* **23**: 201-206
- Beigbeder A, Vavadakis M, Navakoudis E, Kotzabasis K** (1995) Influence of polyamine inhibitors on light-independent and light-dependent chlorophyll biosynthesis and on the photosynthetic rate. *J Photochem Photobiol* **28**: 235-242
- Ben-Shem A, Frolov F, Nelson N** (2003) The crystal structure of plant photosystem I. *Nature* **426**: 630–635 (2003).
-

- Bernet E, Claparols I, Dondini L, Santos MA, Serafini-Fracassini D, Torne JM** (1999) Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases and transglutaminase activities during light/dark phases of initial differentiation in maize calluses and their chloroplasts. *Plant Physiol Biochem* **37**: 1–11
- Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang L-S, Crofts AR** (2000) Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu Rev Biochem* **69**: 1005–1075
- 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
- Bilger W, Bjoerkman O** (1994) Relationships among violaxanthin deepoxidation, thylakoid membrane conformation, and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in leaves of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* **193**: 238–246
- Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 41–60 (2001).
- Birve SJ, Selstam E, Johanson B-A** (1996) Secondary structure of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase examined by circular dichroism and prediction methods. *Biochem J* **317**: 549-555
- Bishop N.I., Senger H.** - Preparations and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*. In *Methods in enzymology*, Vol. 23, part A. (San Pietro, A., ed.), Acad. Press. N.Y. pp.53-66
- Boekema EJ, van Roon H, Calkoen F, Bassi R, Dekker JP** (1999) Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Biochemistry* **38**: 2233–2239
- Borell A, Carbonell L, Farras R, Puig-Parellada P, Tiburcio AF** (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol Plant* **99**: 385-390
- Bors W, Langebartels C, Michel C, Sandermann H Jr** (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozon damage. *Phytochemistry* **28(6)**: 1589-1595
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy** (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development *Plant Sci* **140**: 103-125
- Boyer PD** (1997) The ATP synthase — a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* **66**: 717–749
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the estimation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

- Brandsburg-Zabary S, Fried O, Marantz Y, Nachliel E, Gutman M** (2000) Biophysical aspects of intra-protein proton transfer. *Biochim Biophys Acta* **1458**: 120-134
- Briantais JM** (1996) in: Light as an Energy Source and Information Carrier in Plant Physiology (Jennings et al., Eds.) Plenum Press, New York pp113-124
- Brinkmann G, Senger H** (1978) Light-dependent formation of thylakoid membranes during the development of the photosynthetic apparatus in pigment mutant C-2A of *Scenedesmus obliquus*. In G. Akoyunoglou and J.H. Argyroudi-Akoyunoglou (eds.), Chloroplasts development, Vol II, Elsevier, Amsterdam, pp201-206
- Brinkmann G, Senger H** (1979) Lichtabhaengige Bildung der Thylakoidmembran waehrend der Entwicklung des Photosyntheseapparates in der Pigment-Mutante C-2A' von *Scenedesmusobliquus*. *Ber Deutsch Bot Ges* **92**: 629-636
- Brinkmann G, Senger H** (1980) Blue light regulation of chloroplast development in *Scenedesmus* mutant C-2A'. H. Senger (Eds), The Blue Light Syndrome, Springer, Berlin pp 526-540
- Brouers M, Michael-Wolwertz MR** (1983) Estimation of protochlorophyll(ide) contents in plant extracts; re-evaluation of the molar absorption coefficient of protochlorophyll(ide). *Photos Res* **4**: 265-270
- Chapel M, Teissie J, Alibert G** (1984) Electrofusion of spermine treated plant protoplasts. *FEBS Lett.* **173**: 331-336
- Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H** (2002) Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 2261-2265
- Coffino P** (2001) Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 187 -194
- Cohen SS, Marcu DE, Balint RF** (1982) Light-dependent fixation of polyamines into chloroplasts of chinese cabbage. *FEBS Lett* **141**: 93-97
- Cohen SS** A Guide to the Polyamines, Oxford Univ. Press, New York 1998.
- Cordella-Miele E, Miele L, Beninati S, Mukherjee AB** (1993) Transglutaminase-catalyzed incorporation of polyamines into phospholipase A2. *J Biochem (Tokyo)* **113**: 164-173
- Crofts AR, Yerkes CT** (1994) A molecular mechanism for qE-quenching, *FEBS Lett* **352**: 265-270
- Cruz JA, Avenson TJ, Kanazawa A, Takizawa K, Edwards GE, Kramer DM** (2005) Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection *Journal of Experimental Botany* **56**: 395–406

- Cruz JA, Sacksteder CA, Kanazawa A, Kramer DM** (2001) Contribution of Electric Field to Steady-State Trans-thylakoid Proton Motive Force (pmf) in Vitro and in Vivo. Control of pmf Parsing into $\Delta\psi$ and ΔpH by Ionic Strength. *Biochemistry* **40**: 1226-1237
- Dahlin, Aronson, Wilks, Lebedev, Sundqvist and Timko** (1999). The role of the protein surface charge in catalytic activity and chloroplast membrane association of the pea NADPH:POR as revealed by alanine scanning mutagenesis. *Plant Molecular Biology* **39**: 309-323
- Dai Y, Galston AW** (1981) Simultaneous phytochrome-controlled promotion and inhibition of arginine decarboxylase activity in buds and epicotyls of etiolated peas. *Plant Physiol* **67**: 266-269
- Dau H** (1994). Molecular mechanism and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochem Photobiol* **60**: 1–23
- Deisenhofer J, Epp O, Miki K, Huber R, Michel H** (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. *Nature* **318**, 618-624
- Del Duca S, Beninati S, Serafini-Fracassini D** (1995) Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl- and acetyl derivatives. *Biochem J* **305**: 233-237
- Del Duca S, Dondini L, Della Mea M, Munoz de Rueda P, Serafini-Fracassini D** (2000) Factors affecting transglutaminase activity catalysing polyamine conjugation to endogenous substrates in the entire chloroplast. *Plant Physiol Biochem* **38**: 429–439
- Del 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*. *Planta* **193**: 283-289
- 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-kDa thylakoid transglutaminase catalyses the modification by polyamines of light-harvesting complex II in a light-dependent way. **219**: 754-764
- Demmig-Adams B** (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta* **1020**: 1-24
- Demmig-Adams B, Adams WW 3rd** (2000) Harvesting sunlight safely. *Nature* **403**: 371-373
- Dilley R.A** (2004) On why thylakoids energize ATP formation using either delocalized or localized proton gradients – a Ca^{2+} mediated role in thylakoid stress responses. *Photosynthesis Research* **80**: 245–263.

- Dilley RA, Theg SM, Beard WA** (1987) Membrane-proton interactions in chloroplast bioenergetics: localized proton domains. *Annu Rev Plant Physiol* **37**: 348–389
- 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, *J Biol Chem* **277**: 22750-22758.
- Dondini L, Bonazzi S, Serafini-Fracassini D** (2000) Recovery of growth capacity and of chloroplast transglutaminase activity induced by polyamines in a polyamine-deficient variant strain of *Dunaliella salina*. *J Plant Physiol* **157**: 473–480
- Dondini L, Del Duca S, Dall'Agata L, Bassi R, Gastaldelli M, Della Mea M, Di Sandro A, Claparols I, Serafini-Fracassini D** (2003) Suborganellar localisation and effect of light on *Helianthus tuberosus* chloroplast transglutaminases and their substrates. *Planta* **217**: 84–95
- Doernemann D, Kotzabasis K, Richter P, Breu V, Senger H** (1989) The regulation of chlorophyll biosynthesis by the action of protochlorophyllide on ^{glu}t-RNA ligase. *Bot Acta* **102**: 112-115
- Doernemann 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. *J Photochem Photobiol* **36**: 293-299
- Edwards G, Walker DA** (1983) in *C3, C4 Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis*, Blackwell Scientific Publications, London pp498-500
- Egbert J, Boekema EJ, van Breemen JFL, van Roon H, Dekker JP** 2000 Conformational Changes in Photosystem II Supercomplexes upon Removal of Extrinsic Subunits *Biochemistry* **39**: 12907-12915
- Emerson R** (1958) The quantum yield of photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol* **9**:1- 24
- Evans PT, Malmberg RL** (1989) Do polyamines have a role in plant development? *Annu. Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 235-269
- Falcone P, Serafini-Fracassini D, Del Duca S** (1993) Comparative studies of transglutaminase-like activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. *J Plant Physiol* **142**: 265–273
- Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S** (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* **303**: 1831–1838

- Finazzi G, Johnson GN, Dall'Osto L, Joliot P, Wollmann FA, Bassi R** (2004) A zeaxanthin-independent nonphotochemical quenching mechanism localized in the photosystem II core complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12375–12380
- Flink L, Pettijohn DE** (1975) Polyamines stabilize DNA folds. *Nature* **253**: 62-63
- Folk JE, Park MH, Chung SI, Schrode J, Lester EP, Cooper HL** (1980) Polyamines as physiological substrates for transglutaminase. *J Biol Chem* **255**: 3695–3700
- Fotinou K** (1993) Απομόνωση και χαρακτηρισμός υποσυμπλόκων του πυρήνα του φωτοσυστήματος II των ανώτερων φυτών. PhD thesis, University of Crete.
- Ford C, Wang W** (1980) Temperature sensitive yellow mutants of *Chlamydomonas reihardtii*. *Molec. Gen. Genet.* **180**: 5-10
- Fujita Y** (1996) Protochlorophyllide reduction: a key step in the greening of plants. *Plant Cell Physiol.* **37(4)**: 411-421
- Galling G** (1978) Development of chloroplast structure and function in a temperature sensitive mutant of *Chlorella*. In chloroplast development. (Eds) Akoyonoglou G, Argyroudi-Akoyonoglou JH, Biomedical Press, Elsevier North-Holland pp 439-444
- Galston AW** (2001) Plant biology-Retrospect and prospect. *Current Science* **80**: 150-152
- Galston AW, Kaun-Sawney R, Altabella T, Tiburcio AF** (1997) Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot Acta* **110**: 197-207
- Galston AW, Kaur-Sawhney R** (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol* **94**: 406–410
- Gerner E, Meyskens LFJr** (2004) Polyamines and cancer. Old molecules new understanding. *Nature Reviews Cancer* **4**: 781-792
- Ghanotakis DF, de Paula JC, Demetriou DM, Bowlby NR, Petersen J. et al** (1989) Isolation and characterization of the 47kDa protein and the D1-D2-cytochrome b559 complex. *Biochim Biophys Acta* **974**: 44-53
- Ghanotakis DF, Yocum CF** (1990) Photosystem II and the oxygen evolving complex. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol* **41**: 255-276
- Giersch C** (1981) Stimulation of photophosphorylation by low concentrations of uncoupling amines. *Biochem Biophys Res Com* **100**:
- Giersch C**, (1982) Low concentrations of amines stimulate steady-state rate of photophosphorylation. *Z Naturforsch* **37c**: 242-250
- Giersch C, Meyer M** (1984a) Effects of carboxylic ionophores and amines at low concentrations on phosphorylation rate, phosphorylation potential and proton motive force in chloroplasts. *Bioelectrochem Bioenerget* **12**: 63-71

- Gilmore AM** (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plants chloroplasts and leaves. *Physiol Plant* **99**: 197-209
- Gilmore AM** (2004) Excess light stress: Probing excitation energy dissipation mechanisms through global analysis of Time- and Wavelength-resolved chlorophyll a fluorescence : in G.C. Papageorgiou, Govindjee (eds.) *Chlorophyll a Fluorescence, a signature of photosynthesis*, Springer, Dordrecht, pp555-581
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2273-2277.
- Gilmore AM, Shinkarev VP, Hazlett TL, Govindjee** (1998) Quantitative Analysis of the Effects of Intrathylakoid pH and Xanthophyll Cycle Pigments on Chlorophyll *a* Fluorescence Lifetime Distributions and Intensity in Thylakoids *Biochemistry* **37**: 13582-13593
- Govindjee** (2004) Chlorophyll a Fluorescence: a bit of Basics and history: in G.C. Papageorgiou, Govindjee (eds.) *Chlorophyll a Fluorescence, a signature of photosynthesis*, Springer, Dordrecht, pp1-42
- Govindjee** (2002) A Role for a Light-Harvesting Antenna Complex of Photosystem II in Photoprotection *Plant Cell* **14**: 1663–1668
- Gradinaru CC, van Grondelle R, van Amerongen H** (2003) Selective interaction between xanthophylls and chlorophylls in LHCII probed by femtosecond transient absorption spectroscopy, *J Phys Chem B* **107**: 3938-3943.
- Griffin M, Casadio R, Bergamini CM** (2002) Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J* **368**: 377–396
- Griffiths WT** (1978) Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. *Biochem J* **174**: 681-692
- Guarino L, Cohen SS** (1979) Uptake and accumulation of putrescine and its lethality in *Anacystis nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 3184-3188
- Guye MG, Vigh L, Wilson JM** (1986) Polyamine titer in relation to chill-sensitivity in *Phaseolus* sp. *J Exp Bot* **37**: 1036-1043
- Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RAJn** (1998) The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 11140-11145
- Hachtel W, Friemann A-** *In* Pigment-Protein complexes in plastids: synthesis and assembly. Edited by Sundqvist C. and Ryberg M., pp. 279-310

- Haldrup A, Jensen PE, Lunde C, Scheller HV** (2001) Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant Science* **6**: 301-305
- Haltia T, Freire E** (1995) Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins. *Biochem Biophys Acta* **1228**: 1-27
- Hamasaki N, Galston AW** (1990) The polyamines of *Xanthium strumarium* and their response to photoperiod. *Photochem Photobiol* **52**: 181-186
- Hamasaki-Katagiri N, Katagiri Y, Tabor CW, Tabor H** (1998) Spermine is not essential for growth of *saccharomyces cerevisiae*: Identification of the *Spe4* gene (spermine synthase) and characterization of a *spe4* deletion mutant. *Gene* **210**: 195:201
- Hanzawa Y, Takahashi T, Michael AJ, Burtin D, Long D, Pineiro M, Coupland G, Komeda Y** (2000) *Acaulis5*, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO J* **19**: 4248-4256
- Hanfrey C, Sommer S, Mayer MJ, Burtin D, Michael AJ** (2001) *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *The Plant J* **27**: 551-560
- Havaux M, Niyogi KK** (1999). The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8762–8767.
- He L, Nada K, Kasukabe Y, Tachibana S** (2002) Enhanced susceptibility of photosynthesis to low temperature photoinhibition due to interruption of chill0-induced increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in leaves of spinach. *Plant Cell Physiol* **43**: 196-206
- Hermsmeier D, Schulz R, Senger H** (1994) Formation of light-harvesting complexes of photosystem II in *Scenedesmus* I. Correlations between amounts of photosynthetic pigments, *Lhc* messenger RNAs and LHC apoproteins during constitutional dark- and light-dependent *Lhc-gene* expression. *Planta* **193**: 398-405
- Hill R, Bendall F** (1960) Function of the cytochrome components in chloroplasts. A working hypothesis *Nature, Lond.* **186**: 136-137
- Hind G, Nakatani HY, Izawa S** (1974) Light-dependent redistribution of ions in suspensions of chloroplast thylakoid membranes *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **71**: 1484-1488
- Hoganson CW, Babcock GT** (1997) A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. *Science* **277**: 1953–1956
- Holden M** (1965) Chlorophylls, in: T.W. Goodwin (Eds.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, London, pp461-488

-
- Holt NE, Fleming GR, Niyogi KK** (2004) Toward an Understanding of the Mechanism of Nonphotochemical Quenching in Green Plants. *Biochemistry* **43**: 8281-8289.
- 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
- Hooper JK, Argyroudi-Akoyunoglou JH** (2004) Assembly of Light-harvesting Complexes of Photosystem II and the role of chlorophyll b : in G.C. Papageorgiou, Govindjee (eds.) *Chlorophyll a Fluorescence, a signature of photosynthesis*, Springer, Dordrecht, pp679-712
- Horner TD and Moudrianakis EN** (1983) The effect of permeant buffers on initial ATP synthesis by chloroplasts using rapid mix-quench techniques. *J Biol Chem* **258**: 11643–11647
- Horner TD, Moudrianakis EN** (1986) Effects of permeant buffers on the initiation of photosynchronous phosphorylation and post-illumination phosphorylation in chloroplasts. *J Biol Chem* **261**: 13408–13414
- Horton P** (2000) Prospects for crop improvement through the genetic manipulation of photosynthesis: morphological and biochemical aspects of light capture *J. Exp. Bot.* **51**: 475-485
- Horton P, Hague A** (1988) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics* **932**: 107-115
- Horton P, Ruban A** (2004) Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection *J Exp Bot* 1-9
- Horton P, Ruban AV** (1992) Regulation of photosystem II. *Photosynth Res* **34**: 375–385
- Horton P, Ruban AV, Rees D, Noctor G, Pascal AA, Young A** (1991) Control of the light harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll protein complex. *FEBS Lett* **292**: 1–4.
- Horton P, Wentworth M, Ruban A** (2005) Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching *FEBS Lett* 20: 4201-4206
- Horton P.** (1996) *Light as an energy source and an information carrier in plant biology* (eds) Jennings R. Zucchelli G Gheti F Combetti G Non photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. Plenum Press New York pp99-112
- Hsu, B.D** (1993) Evidence for the contribution of S state transitions of oxygen evolution to the initial phase of fluorescence induction- *Photosynthesis Res* **36**: 81-88
-

- Hurt E, Hauska G** (1981) A cytochrome f/b6 complex of five polypeptides with plastoquinol–plastocyaninoxidoreductase activity from spinach chloroplasts. *Eur J Biochem* **117**: 591–595
- Igarashi K, Kashiwagi K** (2000) Polyamines: Mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Com* **271**: 559-564
- Imai A, Matsuyama T, Hanzawa Y, Akiyama T, Tamaoki M, Saji H, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Komeda Y, Takahashi T** (2004) Spermidine Synthase Genes Are Essential for Survival of Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**: 1565-1573
- Ioannidis NE, Kotzabasis K** (2005) The role of polyamines during photosynthetic induction. Book of Abstracts XVII International Botanical Congress
- Ioannidis NE, Kotzabasis K** (2004) The role of polyamines during the short-term light adaptation of the photosynthetic apparatus in dark grown *Scenedesmus* cultures. Book of Abstracts 13th FESPP Congress pp440
- Ioannidis NE, Sfichi L, Kotzabasis K** (2006) Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. (submitted)
- Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel M** (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science* **281**: 64–71
- Jaenne J, Alhonen L, Pietila M, Keinanen TA** (2004) Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur J Biochem* **271**: 877-894
- Jagendorf AT** (2002) Photophosphorylation and the chemiosmotic perspective. *Photosynth Research* **73**: 233–241
- 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
- Jokela A, Sarjala T, kaunisto S, Huttunen S** (1997) Effects of foliar potassium concentration on morphology, ultrastructure and polyamine concentrations of Scots pine needles. *Tree Physiol* **17**: 677-685
- Joliot P, Joliot A** (2002) Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10209–10214
- Jones C, Hare D, Compton S** (1989) Measuring plant protein with Bradford assay. Evaluation and standard method. *J Chem Ecology* **15(3)**: 979-992
- Jordan P. et al.** (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**: 909–917
- Kakkar RK, Rai VK, Nagar PK** (1998) Polyamine uptake and translocation in plants. *Biol Plant* **40**: 481-491.

- Kanazawa A., Kramer DM** (2002) In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12789-12794
- Kaur-Sawhney R, Shih L, Flores HE, Galston AW** (1982) Relation of polyamine synthesis and titer to aging and senescence in oat leaves. *Plant Physiol* **69**: 405-410
- Kasukabe Y, He LX, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana** (2004) Overexpression of Spermidine Synthase Enhances Tolerance to Multiple Environmental Stresses and Up-Regulates the Expression of Various Stress-Regulated Genes in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **45**: 712-722
- Kotzabasis K, Christakis-Hampsas M, Roubelakis-Angelakis KA** (1993) A narrow-bore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated and bound polyamines. *Anal. Biochem.* **214**: 484-489
- Kotzabasis K, Doernemann D** (1998) Differential changes in the photosynthetic pigments and polyamine content during photoadaptation and photoinhibition in the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. *Z. Naturforsch.* **53c**: 935-946
- Kotzabasis K, Fotinou C, Roubelakis-Angelakis KA, Ghanotakis D** (1993) Polyamines in the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Res.* **38**: 83-88
- Kotzabasis K, Romer S, Senger H** (1990) Temperature dependent reduction of protochlorophyllide in darkness followed by the assembly of active photosystems in pigment mutant C-2A of *Scenedesmus obliquus*. *Physiol. Plant.* **78**: 635-639
- Kotzabasis K, Senger H** (1994) Free, Conjugated and Bound Polyamines during the Cell Cycle in synchronized cultures of *Scenedesmus obliquus*. *Z. Naturforsch.* **49c**: 181-185
- Kotzabasis K, Strasser B, Navakoudis E, Senger H, Doernemann D** (1999) The regulatory role of polyamines in structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. *J Photochem Photobiol* **50**: 45-52
- Kovacheva S, Ryberg M, Sundqvist** (2000) ADP/ATP and protein phosphorylation dependence of phototransformable Pchl_{id} in isolated etioplast membranes. *Photosynthesis Research* **64**: 127-136
- Kramer DM, Avenson TJ, Edwards GE** (2004) Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions *TIPS* **9**: 349-357
- Kramer DM, Cruz JA, Kanazawa A** (2003) Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. *Trends Plant Sci* **8**: 27-32
- Kramer DM, Sacksteder CA, Cruz JA** (1999) How acidic is lumen? *Photosynth Res* **60**: 151-163

- 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, Laasch H, Weis E** (1988) Regulation of thermal dissipation of absorbed light energy in chloroplasts indicated by energy dependent fluorescence quenching. *Plant Physiol Biochem* **26**: 445-452
- Krueger G, Tsimilli-Michael M, Strasser R.J.** (1997) Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in *Camellia* Leaves. *Physiol Plant* **101**: 265-277
- Kuhen G, Affolter AU, Atmar VJ, Seebeck T, Gubler U, Braun R** (1979) Polyamine mediated phosphorylation of a nucleolar protein from *Physarum polycephalum* that stimulates rRNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 2541-2545
- Kuehlbrandt W, Wang DN, Fujiyoshi Y**, (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**: 614–621
- Kumar A, Altabella T, Taylor MA, Tiburcio AF** (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci* **2**: 124-130
- Kurepa J, Smalle J, Montagu MV, Inze D** (1998) Polyamines and paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **39**: 987-992
- Kurusu G, Zhang H, Smith JL, Cramer WA** (2003) Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* **302**: 1009–1014
- Laemmli LJK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685 (1970).
- Laszlo JA, Baker GM, Dilley RA** (1984) Nonequilibrium of membrane-associated protons with the internal aqueous space in dark-maintained chloroplast thylakoids. *J Bioenerg Biomembr* **16**: 37–51
- Lebedev N, Timko M** (1998) Protochlorophyllide photoreduction. *Photosynth Res* **58**: 5-23
- Lee TM, Lur IIS, Chu C** (1995) Abscisic acid and putrescine accumulation in chilling-tolerant rice cultivars. *Crop Sci* **35**: 502-508
- Legocka J, Zajchert I** (1999) Role of spermidine in the stabilization of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a:b-protein complex of photosystem II during leaf senescence process. *Acta Physiol Plant* **21**: 127–132
- Li X-P, Bjoerkman 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 X-P, 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. *J Biol Chem* **279**: 22866-22874.
- Li X-P, Phippard A, Pasari J, Niyogi KK** (2002) Structure–function analysis of photosystem II subunit S (PsbS) *in vivo*. *Funct Plant Biol* **29**: 1131–1139.
- Lilley G, Skill J, Griffin M, Bonner P** (1998) Detection of Ca²⁺-dependent transglutaminase activity in root and leaf tissue of monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Physiol* **117**: 1115–1123
- Liu, Z. Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gui L, An X, Chang W** (2004) Crystal structure of spinach major light harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**: 287–292
- Lorand L, Graham RM** (2003) Transglutaminases: Crosslinking enzymes with pleiotropic functions *Nature Reviews* **4**: 140-156
- Luetz C, Navakoudis E, Seidlitz H, Kotzabasis K** (2005) Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. *Biochim Biophys Acta* **1710**: 24-33.
- Ma Y-Z, Holt NE, Li X-P, Niyogi KK, Fleming G** (2003) Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4377–4382
- Mackintosh CA, Pegg AE** (2000) Effect of spermine synthase deficiency on polyamine biosynthesis and content in mice and embryonic fibroblasts, and the sensitivity of fibroblasts to 1,3-bis-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Biochem J* **351**: 439-447
- Margosiak SA, Dharma A, Bruce-Carver MR, Gonzales AP, Louie D, Kuehn GD** (1990) Identification of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa* L. (Alfalfa). *Plant Physiol* **92**: 88–96
- Martin-Tanguy J.** (1997) Conjugated polyamines and reproductive development: Biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol. Plant.* **100**: 675-688 (1997).
- Masgrau C, Altabella T, Farras R, Flores D, Thompson J, Besford R, Tiburcio AF** (1997) Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *The Plant J.* **11(3)**: 465-473
- Masojidek J, Torzillo G, Koblizek M, Kopecky J, Bernardini P, Sacchi A, Komenda J** (1999) Photoadaptation of two members of the Chlorophyta (*Scenedesmus* and *Chlorella*) in laboratory and outdoor cultures: changes in chlorophyll fluorescence quenching and the xanthophyll cycle. *Planta* **209**: 126-135

- Masuda T, Takamiya K** (2004) Novel insights into the enzymology, regulation and physiological functions of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms. *Photosynth Res* 1-29
- Maxwell DP, Falk S, Trick CG, Huner NPA**, (1994) Growth at Low Temperature Mimics High-Light Acclimation in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol* **105**: 535-543
- Maxwell K, Johnson G** (2000) Chlorophyll fluorescence A practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668
- McCarty RE, Evron Y, Johnson EA** (2000) The chloroplast ATP synthase: a rotary enzyme? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **51**: 83–109
- Meindl U** (1983) Cytoskeletal control of nuclear migration and anchoring in developing cells of *Micrasterias denticulata* and the change cause by the anti-microtubular herbicide amiprophosmethyl (APM), *Protoplasma* **118**: 75–90
- Melis A** (1989) Spectroscopic methods in photosynthesis: photosystem stoichiometry and chlorophyll antenna size. *Phil Trans R Soc Lond* **323**: 397-409
- Melis A, Homann PH** (1978) A selective effect of Mg^{2+} on the photochemistry at one type of reaction center in photosystem II of chloroplasts. *Ar Biochem Biophys* **190**: 523-530
- Melis A, Ow RA** (1982) Photoconversion kinetics of chloroplast Photosystems I and II. Effect of Mg^{2+} . *Biochim Biophys Acta* **682**: 1-10
- Mitchell P** (1976) Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol* **62**: 327–367
- Mitchell P** (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* **206**: 1148-1159
- Morishige D.T., Preiss S.** (1995) Light induced biogenesis of the light harvesting complexes of photosystems I and II. *Photosynthesis Res.* **44**: 183-190
- Moya I, Govindjee, Vernotte C, Briantais J-M** (1977) Antagonistic effect of mono- and divalent- cations on lifetime (τ) and quantum yield (ϕ) in isolated chloroplasts *FEBS lett* **75**: 13-18
- Mueller P, Li X-P, Niyogi KK** (2001) Non-Photochemical Quenching: A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol* **125**: 1558–1566
- Mullet JE.** (1988) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**: 475-502
- Mustardy L, Garab G,** (2003) Granum revisited a three-dimensional model where things fall into place. *Trends in Plant Science* **8**: 117-121

- Nadeau P, Delaney S, Chouinard L** (1987) Effect of cold hardening on the regulation of polyamines levels in wheat (*Triticum aestivum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Plant Physiol* **84**: 73-77
- Nanba O, Satoh K** (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 109-112
- Navakoudis E** (2003) Δομικές και λειτουργικές δράσεις των πολυαμινών στη φωτοανάπτυξη και φωτοπροσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. PhD Thesis, University of Crete
- Navakoudis E, Luetz C, Langebartels C, Luetz-Meindl U, Kotzabasis K** (2003) Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta* **1621**: 160-166
- Nelson N, Ben-Shem A** (2002) Photosystem I reaction center: past and future. *Photosynth Res* **73**: 193–206 (2002)
- Nelson N, Ben-Shem A** (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis *Nature Rev Mol Cell Biol* **5**: 1-12
- Nelson N, Sacher A, Nelson H** (2002) The significance of molecular slips in transport systems. *Nature Rev Mol Cell Biol* **3**: 876–881
- Nield J, Orlova E, Morris E, Gowen B, Van Heel M, Barber J** (2000) 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. *Nature Struct Biol.* **7**: 44–47
- Nixon PJ, Mullineaux CW** (2000) in *Advances in Photosynthesis and Respiration: Regulation of Photosynthesis*, eds. Aro, E. & Anderson, B. (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands), Vol. 11.
- Niyogi KK** (2000) Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 455-460
- Oh-Hama T, Hase E** (1980) Formation of protochlorophyll(ide) in wild type and mutant C-2A' of *Scenedesmus obliquus*. *Plant Cell Physiol* **21**: 1263-1272
- Oh-Hama T, Kotzabasis K, Senger H** (1987) Temperature inducible protochlorophyllide reduction in darkness in a pigment mutant of *Scenedesmus obliquus*. *Physiol Plant* **68**: 222-230
- Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (2005) Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death syndrome induced by the polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta* **220**: 826–837

- Papadakis IA, Kotzabasis K, Lika K** (2005) A cell-based model for the photoacclimation and CO₂-acclimation of the photosynthetic apparatus. *Biochem Biophys Acta* **1708**: 250-261
- Papageorgiou GC** (2004) Fluorescence of photosynthetic pigments in vitro and in vivo : in G.C. Papageorgiou, Govindjee (eds.) *Chlorophyll a Fluorescence, a signature of photosynthesis*, Springer, Dordrecht, pp43-63
- Park MH, Cooper HL, Folk JE** (1981) Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8890-8894
- 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
- Paschalidis KA** (2003) Ομοιοστασία πολυαμινών κατά την αύξηση και ανάπτυξη καπνού (*Nicotiana tabacum* L.) και αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) PhD Thesis, University of Crete
- Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA** (2005a) Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant: correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiol* **138**: 142-152
- Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA** (2005b) Sites and Regulation of Polyamine Catabolism in the Tobacco Plant. Correlations with Cell Division/Expansion, Cell Cycle Progression, and Vascular Development. *Plant Physiol*. **138**: 2177-2184
- Paulsen H** (1997) Pigment ligation to proteins of the photosynthetic apparatus in higher plants. *Physiol Plant* **100**: 760-768
- Perez-Amador MA, Leon JJ, Carbonel J** (2002) Induction of the arginine decarboxylase ADC2 gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wounding response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **130**: 1454-1463
- Pesaresi P, Sandonaé D, Giura E, Bassi R** (1997) A single point mutation (E166Q) prevents dicyclohexylcarbodiimide binding to the photosystem II subunit CP29. *FEBS Letters* **402**: 151-156
- Pfuendel E, Dilley RA** (1993) The pH dependence of violaxanthin deepoxidation in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol* **101**: 65-71
- Pick U, Weiss M** (1988) The mechanism of stimulation of photophosphorylation by amines and by nigericin. *Biochim Biophys Acta* **934**: 22-31
- Pirintsos SA, Kotzabasis K, Loppi S** (2004) Polyamine production in Lichens under metal pollution stress. *J Atmosph Chem* **49**: 303-315

- Pistocchi R, Antognoni F, Bagni N, Zannoni D** (1990) Spermidine uptake by mitochondria of *Helianthus tuberosus*. *Plant Physiol.* **92**: 690-695
- Popovic R, Kyle D, Cohen A, Zalik S** (1979) Stabilization of thylakoid membranes by spermine during stress induced senescence of barley leaf discs. *Plant Physiol* **64**: 721-726
- Primikirios NI, Roubelakis-Angelakis KA** (1999) Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera L.* cell suspension cultures. *Planta* **208**: 574–582
- Rastogi R., Davies P. J.** (1991) Polyamine metabolism in ripening tomato fruit. *Plant Physiol* **95**: 41-45
- Primikirios NI, Roubelakis-Angelakis KA** (2001) Indications for post-translational regulation of *Vitis vinifera L.* arginine decarboxylase. *Plant Mol Biol* **45**: 669-678
- Reinbothe C, Apel K, Reinbothe S** (1996) A light-induced protease from barley plastids degrades NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase completed with chlorophyllide biosynthesis. *Plant Cell* **8**: 763-766
- Reinbothe C, Reinbothe S, Lebedev N, Apel K** (1996) PORA and PORB, two light dependent protochlorophyllide reducing enzymes of angiosperm chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* **8**: 763-769
- Reinbothe S, Reinbothe C** (1996) Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. *Plant Physiol* **111**: 1-7
- Remelli R, Varotto C, Sandona D, Croce R, Bassi R.** (1999) Chlorophyll Binding to Monomeric Light-harvesting Complex A mutation analysis of chromophore-binding residues. *J Biol Chem* **274**: 33510–33521
- Ruban A, Horton P** (1995) An Investigation of the Sustained Component of Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence in Isolated Chloroplasts and Leaves of Spinach. *Plant Physiol.* **108**: 721-726
- Scheller HV, Jensen PE, Haldrup A, Lunde C, Knoetzel J** (2001) Role of subunits in eukaryotic photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1507**: 41–60
- Schoenknecht G, Hedfich R, Junge W, Raschke K** (1988) A voltage dependent chloride channel in the photosynthetic membrane of a higher plant. *Nature* **336**: 589-592
- Schroepel-Maier, Kaiser** (1988) Ion Homeostasis in Chloroplasts under Salinity and Mineral Deficiency. *Plant Physiol.* **87**: 822-827
- Schulz R, Senger H.** (1993) Protochlorophyllide reductase: a key enzyme in the greening process. *In* Pigment-protein complexes in plastids: synthesis and assembly. Acad. Press. Inc. 179-218pp

- Sebela M, Radova A, Angelini R, Tavladoraki P, Frebort I, Pec P** (2001) FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Sci* **160**: 197-207
- Seelert H, Poetsch A, Dencher NA, Engel A, Stahlberg H, Mueller DJ** (2000) Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* **405**: 418–419
- Senger H, Brinkmann G.** (1986) Protochlorophyllide accumulation and degradation in the dark and photoconversion to chlorophyll in the light in pigment mutant C-2A' of *Scenedesmus obliquus*. *Physiol Plant* **68**: 119-124
- Serafini-Fracassini D, Del Duca S** (2002) Biochemistry and function of plant transglutaminases. *Minerva Biotec* **14**: 135–141
- Serafini-Fracassini D, Del Duca S, Beninati S** (1995) Plant transglutaminases. *Phytochemistry* **40**: 355-365.
- Signorini M, Beninati S, Bergamini C** (1991) Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris L.*). *J Plant Physiol* **137**: 547–552
- Sfichi L, Ioannidis N, Kotzabasis K** (2004) Thylakoid-associated Polyamines Adjust the UV-B Sensitivity of the Photosynthetic Apparatus by Means of Light-harvesting Complex II Changes. *Photochem Photobiol* **80**: 499-506
- Shen W, Nada K, Tachibana S** (2000) Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars *Plant Physiol* **124**: 431-439
- Signorini M, Beninati S, Bergamini C** (1991) Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris L.*). *J Plant Physiol* **137**: 547–552
- Slocum R.D., Kaur-Sawhney R. and Galston A.W.** (1984) The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Ar Biochem Biophys* **235**: 283-303
- Srivastava A, Strasser RJ, Govindjee** (1999) Greening of peas: parallel measurements of 77 K emission spectra, OJIP chlorophyll a fluorescence transient, period for oscillation of the initial fluorescence level, delayed light emission, and P700. *Photosynthetica* **37**: 365–392
- Standfuss J, Terwisschavan AC, Lamborghini M, Kuehlbrandt W** (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5Å° resolution. *EMBO J* **24**: 919-928
- Stirbet A, Govindjee, Strasser BJ, Strasser RJ** (1998) Chlorophyll a fluorescence Induction in higher plants: Modelling and numerical simulation. *J Theor Biol* **193**: 131-151
- Stock D, Leslie AG, Walker JE** (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**: 1700–1705

- Strasser BJ, Dau H, Heinze I, Senger H** (1999) Comparison of light induced and cell cycle dependent changes in the photosynthetic apparatus : A fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Photosynth Res* **60**: 217-227
- Strasser BJ, Strasser RJ** (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test- In Mathis, P. (ed.): *Photosynthesis: from light to Biosphere*. Vol.V. 977-980
- Strasser BJ, Strasser RJ** (1998) Oscillation of the chlorophyll a fluorescence related to the S-state of the oxygen evolving complex. *Photosynthesis: Mechanisms and effects*. **5**: 4325-4328
- Strasser RJ, Govindjee** (1992) On the O-J-I-P Fluorescence transient in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Murata M (ed) *Research in photosynthesis*, vol 2. Kluwer, Dordrecht, pp29-32
- Stroebel D, Choquet Y, Popot JL, Picot D** (2003) An atypical haem in the cytochrome *b6f* complex. *Nature* **426**: 413–418
- Srivastava A, Strasser RJ, Govindjee** (1999) Greening of peas: parallel measurements of 77K emission spectra, OJIP chlorophyll *a* fluorescence transient, period four oscillation of the initial fluorescence level, delayed light emission, and P700. *Photosynthetica* **37**: 365-392
- Sundqvist C., Dahlin C.** (1997) With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light harvesting complexes. *Physiol Plant* **100**: 748-759
- Szalai G, Janda T, Bartok T, Paldi E** (1997) Role of light in changes in free amino acid and polyamine contents at chilling temperature in maize (*Zea mays*). *Physiol Plant* **101**: 434-438
- Tabor CW, Tabor H** (1999) It all started on a streetcar in Boston. *Annu Rev Biochem* **68**: 1-32.
- Tabor H, Tabor CW** (1972) Biosynthesis and metabolism of 1,4-diaminobutanone, spermidine, spermine and related amines. *Adv Enzym* **36**: 20
- Takeda Y, Samejima K, Nagano K, Watanabe M, Sugeta H, Kyogoku Y** (1983) Determination of Protonation Sites in Thermospermine and in Some Other Polyamines by ¹⁵N and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Eur J Biochem* **130**: 383-389
- Tanaka A, Yamamoto Y, Tsuji H** (1991) Formation of chlorophyll-protein complexes during greening. 2.Redistribution of chlorophyll among apoproteins. *Plant Cell Physiol*. **32(2)**: 195-204

- Tavladoraki P, Schinina ME, Cecconi F, Di Agostino S, Manera F, Rea G, Mariottini P, Federico R, Angelini R** (1998) Maize polyamine oxidase: primary structure from protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett* **426**: 62–66
- Theodoridou A, Doernemann D, Kotzabasis K** (2003) Light-dependent induction of strongly increased microalgal growth by methanol. *Biochim Biophys Acta* **1573**: 189- 198
- Tiburcio AF, Altabella T, Borell A, Masgrau C** (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol Plant.* **100**: 664-674
- Tiburcio AF, Campos JL, Figueras X, Besford RT** (1993) Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. *Plant Growth Regul.* **12**: 331-340 (1993)
- Torrigiani P, Scoccianti V** (1995) Regulation of cadaverine and putrescine levels in different organs of chickpea seed and seedlings during germination. *Physiol Plant* 93: **512-518**
- Torrigiani P, Serafini-Fracassini D, Biondi S, Bagni N** (1986) Evidence for subcellular localization of polyamines and their biosynthetic enzymes in plant cells. *J Plant Physiol* **124**: 23–29
- Trumpower BL** (1990) The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome *bc1* complex. *J Biol Chem* **265**: 11409–11412
- Tsotis G, McDermott G, Ghanotakis D** (1996) Progress towards structure elucidation of photosystem II. *Photosynthesis Research* **50**: 93-101
- Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF** (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol* **113**: 1009-1013
- Walker D** (1988) Aqueous Phase Measurements, in D. Walker (eds) *The use of oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements in photosynthesis*, Oxygraphics, Sheffield, 99-154pp
- Walters RG, Ruban A, Horton P** (1996) Identification of proton-active residues in a higher plant light-harvesting complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14204-14209
- Wang W, Boyton J, Gillham N** (1977) Genetic control of chlorophyll biosynthesis: Effect of increased δ -aminolevulinic acid synthesis on the phenotype of γ -1 mutant of *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet* **152**: 7-12
- Wang X, Ikeguchi Y, McCloskey DE, Nelson P, Peggs AE** (2004) Spermine synthesis is required for normal vitality, growth and fertility in the mouse. *J Biol Chem* **279**: 51370-51375

-
- Wasniowska A, Subczynski W, Tikhonov AN** (2002) Inhibition of ATP synthesis in chloroplasts by lipid soluble nitroxide radical spin labels. *Curr Topics Biophys* **26**: 83-91
- Wellburn F, Wellburn AR, Senger H** (1980) Changes in ultrastructure and photosynthetic capacity within *Scenedesmus obliquus* mutants C-2A, C-6D and C-6E on transfer from dark grown to illuminated conditions. *Protoplasma* **103**: 35-54
- Wentworth M, Ruban AV, Horton P** (2000) Chlorophyll fluorescence quenching in isolated light harvesting complexes induced by zeaxanthin *FEBS Lett* **471**: 71-74
- Wentworth M, Ruban AV, Horton P** (2004) The functional significance of the monomeric and trimeric states of the photosystem II light harvesting complexes. *Biochemistry* **43**: 501–509
- Wettstein D., Gough S., Kannangara C.G.** (1995) Chlorophyll biosynthesis. *The Plant Cell* **7**: 1039-1057
- Whitmarsh J, Govindjee** (2002) *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group
- Williams RJP** (1979) Some unrealistic assumptions in the theory of chemiosmosis and their consequences. *FEBS Lett* **102**: 126-132
- Wollaman FA, Minai L, Nechushtai R** (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim.Biophysic. Acta* **1411**: 21-85
- Xie QW, Tabor CW, Tabor H** (1993) Deletion mutations in the speED operon: spermidine is not essential for the growth of *Escherichia coli*. *Gene* **126**: 115-117
- Zhang SR, Li SH, Abler A, Fu J, Tso MO, Lam TT** (1996) Tissue transglutaminase in apoptosis of photoreceptor cells in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**: 1793–1799

