

Ακαδημαϊκό έτος 2005-2006
Τμήμα Βιολογίας
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών
Πανεπιστήμιο Κρήτης



Ερευνητική διατριβή προς απόκτηση Μεταπτυχιακού Τίτλου
Ειδίκευσης στο πρόγραμμα Μοριακής Βιολογίας και
Βιοτεχνολογίας Φυτών

Θέμα: Ο ρόλος του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στη βιοχημεία του μηχανισμού μετα-μεταγραφικής σύγησης γονιδίων στα ανώτερα φυτά.

Διάρκεια: 15/10/2005-30/9/2006

Χρήστος Κωτάκης

Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας
σε συνεργασία με το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών

Σεπτέμβριος 2006
Ηράκλειο

Υπεύθυνος επιβλέπων, (πρώτος εξεταστής): Αναπληρωτής
καθηγητής Κυριάκος Κοτζαμπάσης*
Δεύτερος εξεταστής: Δρ. Κρίτων Καλαντίδης**

***Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας**, Τομέας Βιολογίας Οργανισμών, Πληθυσμών, Περιβάλλοντος και Θαλάσσιας Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

****Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών**, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας.

[...].....η μελαγχολία της αντίστασης,
.....στον συγγραφέα.....[...]

Περιεχόμενα

	αριθμ. σελ
Περιεχόμενα.....	4
Περίληψη.....	5
Εισαγωγή.....	7
Μηχανισμός σίγησης γονιδίων μέσω RNA.....	7
Πλαστικότητα των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης προς φωτοπροστασία και παραγωγή ενέργειας.....	9
Επίδραση περιβαλλοντικών παραμέτρων στην αποτελεσματικότητα του μηχανισμού μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων στα φυτά.....	13
Σκοπός της εργασίας.....	15
Υλικά και Μέθοδοι.....	16
Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης.....	16
Φυτικό υλικό.....	16
Απολύμανση σπόρων, σπορά, μεταφύτευση σποροφύτων και συνθήκες ανάπτυξης.....	16
Υπόστρωμα Murashige & Skoog (MS medium).....	17
Φαινοτυπική ανάλυση.....	18
Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού χλωροφύλλης a.....	18
Απομόνωση και εκτίμηση χλωροφυλλών.....	19
Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών.....	20
Πολαρογραφικές μετρήσεις.....	21
Στατιστική επεξεργασία.....	21
Αποτελέσματα και συζήτηση.....	23
<i>In vivo</i> μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού της χλωροφύλλης a.....	23
Οξειδοαναγωγική κατάσταση της πλαστοκινόνης.....	28
Σχετικά επίπεδα χλωροφύλλης a και χλωροφύλλης b.....	31
<i>In vitro</i> δραστηριότητες φωτοσυστημάτων I και II.....	32
Συμπεράσματα.....	34
Μελλοντικές προοπτικές.....	36
Βιβλιογραφία.....	38

Περίληψη

Ο μηχανισμός της μετα-μεταγραφικής σίγησης στα φυτά αποτελεί ένα ρυθμιστικό μηχανισμό ο οποίος ρυθμίζει αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση μέσω της αποικοδόμησης των προϊόντων της μεταγραφής με τρόπο ειδικό ως προς την νουκλεοτιδική αλληλουχία των μεταγράφων (messenger RNA, mRNA).

Μία σειρά από μελέτες μαρτυρούν νύξεις ως προς την επίδραση ποικίλων οικοφυσιολογικών παραμέτρων κυρίως αβιοτικών στην επαγωγή, εξάπλωση και εδραίωση του μηχανισμού RNA σίγησης στα ανώτερα φυτά. Παρόλα αυτά, μία σχετική λεπτομερής και διεξοδική προσπάθεια συσχέτισης υπόκωφα απουσιάζει από την διεθνή βιβλιογραφία της επιστημονικής κοινότητας μέχρι σήμερα.

Η φύση του παράγοντα φως πέρα από το ρόλο της στην αναπτυξιακή πτυχή των ανώτερων φυτικών οργανισμών διέπεται και από μηχανιστικές λεπτομέρειες που αφορούν αλληλεπιδραστικά την καθαυτό φυσιολογική ιδιοσυγκρασία της φωτοσυνθετικής διαδικασίας. Στη παρούσα μελέτη, επιχειρούμε να χαρακτηρίσουμε την μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ως προς αυτόν τον δεύτερο ρόλο του φωτός, αναφορικά με το μη κυτταρικά αυτόνομο μεγάλων αποστάσεων σήμα της RNA σίγησης.

Για αυτό το σκοπό, *in vivo* μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού της χλωροφύλλης *a*, ποσοτικοποίηση των χλωροφυλλών *a* (Chl*a*) και *b* (Chl*b*) καθώς και *in vitro* εκτιμήσεις της δραστηριότητας των φωτοσυστημάτων I (PSI) και II (PSII) πραγματοποιήθηκαν σε διαγονιδιακά φυτά *Nicotiana benthamiana* που παράγουν αυθόρμητα το σήμα της διασυστηματικής RNA σίγησης ως προς το διαγονίδιο της Πράσινης Φθορίζουσας Πρωτεΐνης (GFP).

Σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου καθώς και με φυτά που εκφράζουν συστατικά το διαγονίδιο της GFP (πειράματα ελέγχου), φυτά στα οποία το σήμα της RNA σίγησης έχει εδραιωθεί, χαρακτηρίζονται από μειωμένη πυκνότητα PSII ενεργών κέντρων ενώ αντίθετα το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του LHCP (Light-Harvesting Complex II) καθώς και η μη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας αυξάνονται.

Επίσης ο λόγος χλωροφύλλης *a*/χλωροφύλλης *b* μειώνεται ενώ ο λόγος δραστηριότητας των φωτοσυστημάτων PSI/PSII εμφανίζεται σημαντικά αυξημένος σε ιστούς με σίγηση. Τέλος τα ανηγμένα αποθέματα της δεξαμενής της πλαστοκινόνης (PQ) σε κατάσταση παρεμπόδισης της ροής ηλεκτρονίων στο επίπεδο

της Q_B , επαρκούν να υποστηρίξουν αποτελεσματική μεταφορά ηλεκτρονίων προς την αναγωγική πλευρά του PSI.

Από τα παραπάνω απορρέουν ισχυρές ενδείξεις οι οποίες συνάγουν για κυκλική ροή ηλεκτρονίων γύρω από το PSI προς αντιστάθμιση της μειωμένης χημειωσμοτικής ικανότητας ιστών με RNA σίγηση.

Τα ευρήματα μας συζητούνται λαμβάνοντας υπόψη τη βιοχημεία και λειτουργία του μηχανισμού σίγησης μέσω RNA, ενσωματώνοντας παράλληλα πιθανές προοπτικές.

Εισαγωγή

Μηχανισμός σίγησης γονιδίων μέσω RNA

Ο όρος «RNA σίγηση» αναφέρεται συλλογικά σε ποικίλες RNA-εξαρτώμενες διαδικασίες οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ειδική ως προς την αλληλουχία αναστολή της γονιδιακής έκφρασης δρώντας είτε στην μεταγραφή είτε στη σταθερότητα του mRNA, (και) στα αντίστοιχα μεταφραστικά επίπεδα είτε σε τροποποίηση της χρωματίνης (Brodersen and Voinnet, 2006).

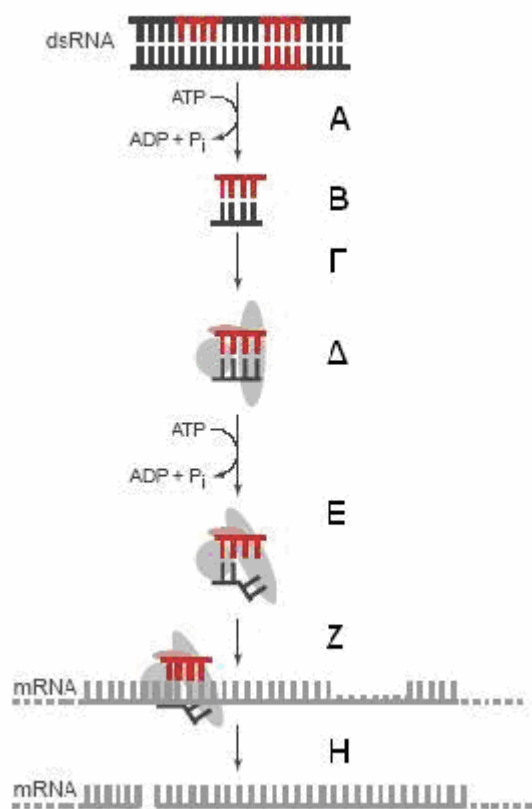
Ιστορικά, η πρώτη αναφορά εντοπίζεται το 1990, όταν δύο ομάδες προσπάθησαν να υπερεκφράσουν ένα ένζυμο βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών με σκοπό την παραγωγή μωβ άνθεων σε φυτά πετούνιας. Αντί αυτού, τα αναμενόμενα μωβ άνθη ήταν λευκά (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990). Το φαινόμενο ονομάστηκε «συνκαταστολή» εξαιτίας της συνεργιστικής δράσης τόσο των διαγονιδίων όσο και των αντίστοιχων ενδογενών γονιδίων προς καταστολή της έκφρασης. Μέχρι το τέλος της δεκαετίας, φαινόμενα σίγησης μέσω RNA είχαν ανακαλυφθεί σε ένα ευρύ φάσμα ευκαρυωτικών οργανισμών.

Ο μηχανισμός της σίγησης μέσω RNA ταξινομείται σε δυο κατηγορίες, στην μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (transcriptional gene silencing, TGS) όπου παρεμποδίζεται η μεταγραφή ενός γονιδίου και στην μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (PTGS), όπου το γονίδιο μεταγράφεται αλλά τα μετάγραφα του αποδομούνται (Matzke and Matzke, 2004).

Ο μηχανισμός της μετα-μεταγραφικής σίγησης (PTGS) περιγράφεται συνοπτικά (εικόνα 1) από την παρακάτω εξής αλληλουχία βημάτων. **α)** Σχηματισμός δίκλωνου μορίου RNA, το οποίο μπορεί να προέρχεται από αντιγραφή του RNA RNA-ιών, τη δράση μεταθετών στοιχείων, τη μεταγραφή γονιδίων ή διαγονιδίων με παλίνδρομες αλληλουχίες και την υπερέκφραση διαγονιδίων; ωστόσο η περίπτωση μονόκλωνου RNA ως επαγωγέα του μηχανισμού σημειώνεται (Matzke and Matzke, 2004; Brodersen and Voinnet, 2006; Tomari and Zamore, 2006). **β)** Την ATP-εξαρτώμενη μετατροπή του δικλώνου μορίου RNA σε μικρά δίκλινα μόρια RNA (20-26 νουκλεοτιδίων), στον πυρήνα, τα οποία ονομάζονται μικρά παρεμποδιστικά RNAs (siRNAs) με προεξέχοντα 3' άκρα (2 νουκλεοτιδίων) που φέρουν υδροξυλικές ομάδες και 5' άκρα με φωσφορικές ομάδες (Zamore et al., 2001; Tang et al., 2003) μέσω RNA-III τύπου ενζύμων καλούμενων Dicers (Bernstein et al., 2001). Τα ένζυμα αυτά φέρουν μία περιοχή πρόσδεσης δίκλωνου RNA, μία περιοχή RNA ελικάσης, καθώς

και RNAάσης III και PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) μοτίβα. **γ**) Στην συνέχεια μία από τις δύο αλυσίδες του μορίου siRNA ενσωματώνεται στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο RISC, (RNA Induced Silencing Complex) το οποίο αναλαμβάνει τη μεταφορά, το ξετύλιγμα και την ενεργοποίηση των siRNAs.

Η δραστηριότητα του συμπλόκου οφείλεται σ' ένα πρωτεϊνικό συστατικό που είναι μέλος της οικογένειας των Αργοναυτών (Agos). Οι πρωτεΐνες Αργοναυτές έχουν ένα μοτίβο πρόσδεσης μονόκλωνου RNA τύπου PAZ και ένα PIWI μοτίβο που παρέχει ενδονουκλεολυτική (slicer) ενεργότητα στους RNA στόχους (Liu et al., 2004; Song et al., 2004;). Έτσι, η ενεργοποιημένη siRNA αλυσίδα προσδένεται με το mRNA-στόχο και δίνει την εντολή της ενδονουκλεόλυσής του. Τέλος **δ**) η δράση μιας RNA-εξαρτώμενης πολυμεράσης (RdRP) μπορεί να συμβάλλει σε μερικές περιπτώσεις στον πολλαπλασιασμό του σήματος σίγησης με αντιγραφή των μονόκλωνων RNA στόχων (μήτρων) προς δίκλιωνα μόρια με απώτερο σκοπό την αύξηση των επιπέδων των siRNAs (Tang et al., 2003).



Εικόνα 1: Απλοποιημένο σχηματικό μοντέλο του βιοχημικού μονοπατιού που αναφέρεται στο μηχανισμό της σίγησης γονιδίων μέσω RNA. **A:** Σχηματισμός siRNA(s) από dsRNA, **B:** siRNA(s), **Γ:** Σχηματισμός συμπλόκου RISC-siRNA(s), **Δ:** Σύμπλοκο RISC-siRNA(s), **Ε:** Ξετύλιγμα και ενεργοποίηση siRNA(s), **Z:** Αναγνώριση mRNA στόχου, **H:** Αποικοδόμηση mRNA στόχου, (τροποποιημένο σχήμα από Zamore, 2001).

Ο μηχανισμός σίγησης μέσω RNA παρουσιάζει τόσο ομοιότητες όσο και διαφορές, ως προς τα βασικά χαρακτηριστικά του ανάμεσα στα βασίλεια των ευκαρυωτικών οργανισμών (από επισκόπηση Susi et al., 2004). Επιπλέον τα επιμέρους βιοχημικά και λειτουργικά μονοπάτια που ανήκουν στο σκελετό του

μηχανισμού *δανείζονται* επίσης ομοιότητες και διαφορές μεταξύ τους (Meins et al., 2005). Έτσι πέρα από το βασικό μονοπάτι που περιγράφεται παραπάνω, αξίζει να αναφερθεί η ύπαρξη των microRNAs (miRNAs, ρυθμιστικών μικρών μορίων RNAs τα οποία προέρχονται από RNAs με δομή φουρκέτας και στοχεύουν mRNAs προς αποικοδόμηση ή προς καταστολή της μετάφρασης τους) καθώς και η ύπαρξη των trans-acting small RNAs (ta-siRNAs, ενδογενών μικρών RNAs τα οποία προέρχονται από γονίδια που δεν κωδικοποιούνται, μοιάζουν στα siRNAs ως προς τη βιογένεση τους αλλά δρουν σαν trans-miRNAs, οδηγώντας αποικοδόμηση RNA στόχων), (Meins et al., 2005; Brodersen and Voinnet, 2006).

Στην σίγηση μέσω RNA διακρίνονται τουλάχιστον τρία διακριτά στάδια: έναρξη, εδραίωση και διασυστημική εξάπλωση του σήματος (Vaucheret et al., 2001).

Έτσι το σήμα σίγησης μπορεί να εκταθεί πέρα από τα σημεία έναρξης του και τη μετακίνηση από κύτταρο σε κύτταρο, πιθανόν λόγω των siRNAs, ακολουθώντας συμπλαστική μεταβατικότητα (transitivity) διαμέσου των πλασμοδεσμάτων και του φλοιώματος σε ολόκληρο το φυτό (Voinnet, 2005), από μεταβολική πηγή προς μεταβολικό αποδέκτη (source to sink), ανάλογα της ροής του φλοιώματος (Tournier et al., 2006).

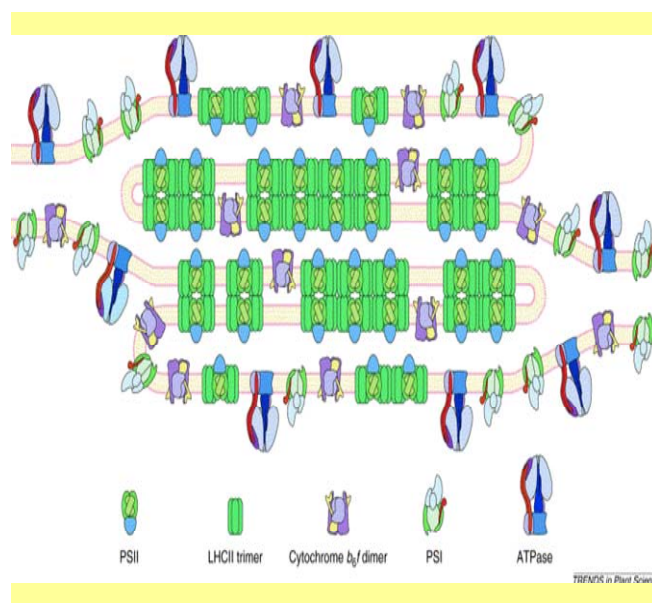
Πλαστικότητα των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης προς φωτοπροστασία και παραγωγή ενέργειας

Η φωτεινή ενέργεια συλλέγεται από φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα πρωτεϊνών/χλωροφυλλών (LHCs) και οδηγείται στα φωτοχημικά κέντρα αντίδρασης, φωτοσύστημα II (PSII) και φωτοσύστημα I (PSI) (Ort and Yocum, 1996). Μόρια χλωροφυλλών προσδεδεμένα στα φωτοσυστήματα διεγείρονται από το φως, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο σε ηλεκτρόνια τους να μεταφερθούν από μία σειρά οξειδοαναγωγικών μεταφορέων οι οποίοι βρίσκονται προσδεδεμένοι σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα (ηλεκτρονιακή ροή ηλεκτρονίων), ξεκινώντας από το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου του PSII (το οποίο οξειδώνει H₂O προς απελευθέρωση O₂ και πρωτονίων), (Diner and Babcock, 1996), διαμέσου της δεξαμενής της πλαστοκινόνης (PQ), του κυτοχρώματος b₆f (Sacksteder et al., 2000), της πλαστοκυανίνης (PC) και τελικά διαμέσου του PSI (Malkin., 1996). Ηλεκτρόνια από το PSI μεταφέρονται στην φερρεδοξίνη που με τη σειρά της ανάγει NADP⁺ σε NADPH μέσω της εξαρτώμενης από φερρεδοξίνη:αναγωγάσης του NADP⁺ (Knaff, 1996).

Αυτή η γραμμική ροή ηλεκτρονίων (εικόνα 3A) με τελικό αποδέκτη το NADP^+ συνοδεύεται από παράλληλη απελευθέρωση πρωτονίων μεταξύ του μικροχώρου των θυλακοειδών και του στρώματος κατά μήκος της θυλακοειδούς μεμβράνης από την δεξαμενή της πλαστοκινόνης και τον κύκλο-Q του κυτοχρώματος b_6f , η οποία εγκαθιδρύει ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό πρωτονίων (κινητήρια δύναμη πρωτονίων) το οποίο οδηγεί στην χημειωσμοτική ATP σύνθεση διαμέσου της ATP συνθετάσης (McCarty, 1996; Mitchell, 1966).

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός χαρακτηρίζεται από δομική και λειτουργική ευελιξία ανταποκρινόμενος σε μία πληθώρα δραματικών περιβαλλοντικών συνθηκών (κυρίως μεταβολές στην ένταση και ποιότητα του φωτός αλλά και στην διαθεσιμότητα O_2 , CO_2 , θρεπτικών, νερού) και βιοχημικών μεταβολικών απαιτήσεων με σκοπό τον ιδεατό συγχρονισμό φωτοπροστασίας και παραγωγής ενέργειας.

Έτσι πέρα από την δομική διαφορική κατανομή των φωτοσυνθετικών συμπλόκων στο χλωροπλάστη (εικόνα 2), [PSII κυρίως στα εσώτερα (μη εκτεθειμένα) θυλακοειδή των grana, το PSI εντοπίζεται στη εξωτερική επιφάνεια των grana (εκτεθειμένα θυλακοειδή των grana) και στα θυλακοειδή του στρώματος, η ATP συνθετάση σχεδόν απολειστικά στα θυλακοειδή του στρώματος, το κυτοχρωμικό b_6f σύμπλοκο κατανέμεται εξίσου σε όλα τα θυλακοειδή (Per-Åke Albertsson, 2001)] έχουμε διαφοροποίηση του περιεχομένου των χλωροφυλλών, αλλαγή στα επίπεδα των φωτοσυνθετικών αποπρωτεϊνών αλλά και της στοιχειομετρίας των φωτοσυστημάτων και τροποποίησης του λόγου των χλωροφυλλών a/b ανάλογα των συνθηκών εγκλιματισμού που υπόκειται ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός (από επισκόπηση Walters, 2005).



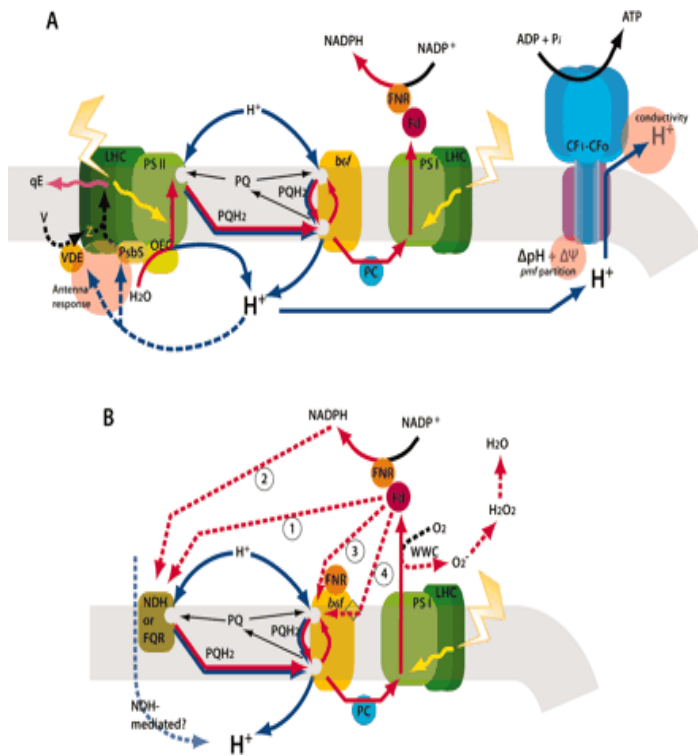
Εικόνα 2: Διαφορική κατανομή των φωτοσυνθετικών υποσυμπλόκων στις θυλακοειδείς μεμβράνες του χλωροπλάστη. PSII: φωτοσύστημα II, LHCII trimer: τριμερές LHCII σύμπλοκο, cytochrome b_6f dimer: διμερές κυτοχρωμικό σύμπλοκο b_6f , PSI: φωτοσύστημα I, ATPase: ATP συνθετάση. Εικόνα από Per-Åke Albertsson, (2001).

Τα στοιχεία και επίπεδα ελέγχου κυμαίνονται ποικίλα στο μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο (από επισκόπηση Walters, 2005).

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση της πλαστοκινόνης (PQ) αποτελεί α) έναν από του κεντρικούς αισθητήρες ως προς την αναγωγική ομοιοστασία του χλωροπλάστη (Scheibe et al., 2005), β) ενορχηστρωτή της έκφρασης των γονιδίων στον χλωροπλάστη και στον πυρήνα (Huner, 1998; Pfannschmidt et al., 1999, 2001; Allen and Pfannschmidt, 2000) και γ) κεντρικό διακόπτη του μηχανισμού ανακατανομής της ενέργειας ή ενεργειακής *υπερχείλισης* (state transitions) μέσω των οξειδοαναγωγικών καταστάσεων της; ανηγμένη ή οξειδωμένη PQ οδηγεί σε φωσφορυλίωση ή αποφωσφορυλίωση του κινητού μέρους της κεραίας του LHCI και σε συνεπή μετακίνηση της στο PSI (state 2) ή PSII (state 1) προς διοχεύτηση της ενέργειας, αντίστοιχα (Allen, 2003).

Η περίπτωση της ‘υπερ-διέγερσης’ των φωτοσυστημάτων λόγω παροχής φωτονίων μεγαλύτερης από αυτής που μπορούν να διαχειριστούν οδηγεί σε *φωτοαναστολή* του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και στον σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου (Anderson and Barber, 1996; Kramer and Crofts, 1996). Ο μηχανισμός της μη φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ, non-photochemical quenching), έχει ακριβώς αυτό τον ρόλο της απόσβεσης της περίσσειας ενέργειας ως θερμότητα (Maxwell and Johnson, 2000). Η ενεργοποίηση του μηχανισμού NPQ περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο διαδικασίες (εικόνα 2A): α) Ενζυμική αλληλομετατροπή των χρωστικών που εμπεριέχονται στον κύκλο των ξανθοφυλλών; μετατροπή της βιολαξανθίνης σε ανθεραξανθίνη και ζεαξανθίνη από το ένζυμο αποεποξειδάση της βιολαξανθίνης (VDE) (Eskling et al., 2001) και β) την πρωτονίωση της αμινοτελικής πλευράς των αλυσίδων μίας πρωτεΐνης που προσδένεται στην φωτοσυλλεκτική κεραία ονόματι PsbS (Li et al., 2004). Οι προαναφερόμενες διαδικασίες ενεργοποιούνται με οξינוποίηση του μικροχώρου των θυλακοειδών από το ΔpH συστατικό της κινητήριας δύναμης πρωτονίων.

Η τροποποίηση του λόγου ATP/NADPH ανάλογα με τις απαιτήσεις του χλωροπλαστικού μεταβολισμού επιτυγχάνεται μέσω βραχυπρόθεσμων μηχανισμών (εικόνα 3B) που αυξάνουν τη μεταφορά πρωτονίων κατά μήκος του μικροχώρου (αύξηση ATP/NADPH και NPQ).



Εικόνα 3*: Βραχυπρόθεσμοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης: (Α) Γραμμική ροή ηλεκτρονίων, (Β): Εναλλακτικοί δρόμοι ροής ηλεκτρονίων.

***Εικόνα 3:** (Α): Η αποθήκευση της ενέργειας ξεκινά με την απορρόφηση της (κίτρινα βέλη) από τα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα (LHC) τα οποία είναι συνδεδεμένα με τα φωτοσυστήματα (PS) II και I, αντίστοιχα. Η γραμμική ροή ηλεκτρονίων (LEF), (κόκκινα βέλη) ξεκινά από την οξειδωση του H_2O στο σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (OEC), μέσω του PSII, για την αναγωγή διαδοχικά της πλαστοκινόνης (PQ) σε πλαστοκινόλη (PQH_2). Στην συνέχεια η οξειδωση της PQH_2 , συμβαίνει στο κυτόχρωμα b_6f , όπου μισά από τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται γραμμικά στο ζεύγος $NADP^+/NADPH$ μέσω της πλαστοκυανίνης (PC), του PSI, της φερρεδοξίνης (Fd) και της Fd: $NADP^+$ αναγωγάσης (FNR). Τα άλλα μισά ηλεκτρόνια επιστρέφουν στην δεξαμενή της PQH_2 . Ροή πρωτονίων (μπλε βέλη) προέρχεται από την οξειδωση του H_2O στο OEC και την κυκλική αναγωγή και οξείδωση της PQ/ PQH_2 εγκαθιδρύοντας μία ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων κατά μήκος της θυλακοειδούς μεμβράνης (*pmf*) η οποία συνιστά ένα ΔpH και ένα ηλεκτρικό πεδίο $\Delta\psi$. Η συνολική *pmf* οδηγεί στην παραγωγή ATP από ATD και P_i , όπου τα πρωτόνια εκτονώνουν την ηλεκτροχημική τους διαβάθμιση διαμέσου της CF_1-CF_0 ATP συνθετάσης. Η απόσβεση της ενέργειας (μωβ βέλη), από το qE (η κύρια μορφή του NPQ) είναι pH-εξαρτώμενη εξαιτίας της pH-εξαρτώμενης ενεργότητας του ενζύμου της αποεποξειδάσης της βιολαξανθίνης, η οποία διαδοχικά μετατρέπει την βιολαξανθίνη (V) σε ζεαξανθίνη (Z), καθώς και λόγω της πρωτονίωσης της πρωτεΐνης PsbS. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί (που περιγράφονται με κόκκινα βέλη) σχετίζονται με ποικιλότητα λειτουργικής απόκρισης, ανεξαρτήτως του λόγου ATP/NADPH: α) τροποποίηση του qE μέσω του pH του μικροχώρου, β) αγωγικές ιδιότητες της ATP συνθετάσης και γ) σχετική συμμετοχή του *pmf* στο ΔpH και στο $\Delta\psi$. (Β) Οι εναλλακτικοί δρόμοι της μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναγωγική πλευρά του PSI, περιλαμβάνουν το κύκλο νερού-νερού (WWC), (ή αλλιώς την επονομαζόμενη ψευδοκυκλική ροή ηλεκτρονίων ή αντίδραση Mehler) και την κυκλική ροή ηλεκτρονίων γύρω από το PSI (CEF1). Ο WWC χρησιμοποιεί τα ίδια μονοπάτια ηλεκτρονιακής μεταφοράς με την κανονική LEF με εξαίρεση την αναγωγική πλευρά του PSI, όπου εκεί στον WWC, ανάγεται το O_2 σε O_2^- , το οποίο με τη σειρά του αποτοξικοποιείται σε H_2O . Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα τέσσερα μονοπάτια έχουν προταθεί για την κυκλική ροή ηλεκτρονίων, από το PSI πίσω στη δεξαμενή της πλαστοκινόνης (CEF1): (1) μία εξαρτώμενη από Fd:αναγωγάση της πλαστοκινόνης (FQR), (2) μία NADPH εξαρτώμενη: αναγωγάση της PQ (NDH), (3) οξείδωση της Fd από ένα FNR/ b_6f υπερσύμπλοκο και (4) οξείδωση, για παράδειγμα, της Fd, από μία νέα αίμη η οποία συνδέεται με την προς το στρώμα πλευρά του b_6f συμπλόκου. Εικόνα από Cruz et al., (2005).

Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται με αλλαγές στον λόγο H^+/e^- αναφορικά για τη γραμμική ροή ηλεκτρονίων αλλά και σε εναλλακτικούς δρόμους ροής ηλεκτρονίων που αποκλείουν την αναγωγή του $NADP^+$ (κυκλική ροή ηλεκτρονίων γύρω από το PSI, κύκλος νερού-νερού).

Περίληπτικά, η κυκλική ροή ηλεκτρονίων γύρω από το PSI, αγνοεί το φωτοσυνθετικό Z-σχήμα (Merchant and Sawaya, 2005) και περιλαμβάνει μόνο ένα από τα δύο φωτοσυστήματα (PSI). Το φως διεγείρει το PSI, με αποτέλεσμα την αναγωγή των σιδηροθειϊκών κέντρων του (FeS) και οξείδωση του πρωτογενή φωτοχημικού κέντρου (χλωροφυλλικού δέκτη) P_{700} . Όπως και στην γραμμική ροή ηλεκτρονίων, το οξειδωμένο P_{700}^+ ανάγεται από ηλεκτρόνια προερχόμενα από τη δεξαμενή της πλαστοκινόνης, μέσω του κυτοχρώματος b_6f (Bendall and Manasse, 1995). Τα ηλεκτρόνια στην αναγωγική πλευρά του PSI, τελικά ανάγουν την πλαστοκινόνη ολοκληρώνοντας τον κύκλο.

Όσον αφορά τον κύκλο νερού-νερού (ψευδοκυκλική ροή ηλεκτρονίων), ηλεκτρόνια από το H_2O , μέσω του PSII μεταφέρονται μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στο PSI, όπου το O_2 δρα σαν τελικός αποδέκτης, σχηματίζοντας ενεργή ρίζα υπεροξειδίου (O_2^-). Το O_2^- μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και O_2 από το ένζυμο της σουπεροξειδικής δισμουτάσης και ακολούθως το H_2O_2 ανάγεται σε H_2O , από την ασκορβική περοξειδάση, ολοκληρώνοντας τον κύκλο (από επισκόπηση Cruz et al., 2005). Από τη στιγμή που το O_2 , ανάγεται πιο αργά από τη φερρεδοξίνη παρά από την Fd-εξαρτώμενη οξυρεδοκτάση του $NADP^+$, έχει προταθεί ότι ο κύκλος νερού-νερού λαμβάνει μεγαλύτερη λειτουργική έκταση όταν η συγκέντρωση του $NADP^+$ κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα (Asada, 1996).

Επίδραση περιβαλλοντικών παραμέτρων στην αποτελεσματικότητα του μηχανισμού μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων στα φυτά

Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν το ρόλο περιβαλλοντικών παραγόντων (κυρίως της θερμοκρασίας) σε διάφορες πτυχές του μηχανισμού μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων (κυρίως αυτής που σχετίζεται με την αντική άμυνα των φυτών).

Ιστορικά, οι Kalantidis et al., (2002) καθώς και οι Szittyta et al., (2003) πρότειναν ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες δρουν ανασταλτικά στη RNA σίγηση; εντούτοις η εργασία των Sós-Hegedűs et al., (2005) ανατρέπει το προηγούμενο επιχείρημα προτείνοντας ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες ο μηχανισμός σίγησης είναι ενεργός.

Επιπλέον έχει βρεθεί ότι μία RNA-εξαρτώμενη πολυμεράση (RDR6) παρουσιάζει δράση εξαρτώμενη από την θερμοκρασία (ποσότητα μεταγράφων ανάλογη της αύξησης της θερμοκρασίας) στην αντική άμυνα των φυτών μέσω του μηχανισμού της RNA σίγησης (Qu et al., 2005). *In vivo* και *in vitro* πειράματα επαγωγής της RNA σίγησης μέσω αγροεμποτισμού (γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης) έδειξαν ότι σε υψηλή θερμοκρασία (30 °C) ο μηχανισμός σίγησης εδραιώνεται με πιο αποτελεσματικό τρόπο ενώ σε χαμηλή (15 °C) συμβαίνει το αντίθετο, (Cazzonelli and Velten, 2006). Τα ίδια *in vitro* πειράματα σε συνθήκες σκοταδιού/φωτός έδωσαν ένα σαφές προβάδισμα στις συνθήκες φωτός ως προς την αποτελεσματικότητα του μηχανισμού. Παρόλα ταύτα, τ' αντίστοιχα *in vivo* πειράματα προσέφεραν μία αντίθετη *αίσθηση*, αποδίδοντάς την στην εμπλοκή φυσιολογικών αλλαγών στον φυλλικό ιστό. Επίσης, πειράματα αγροεμποτισμού [(γονίδιο αναφοράς της αποσατουράσης του φυτοενίου σε ιικό φορέα TRV (Tobacco-Rattle-Virus)] σε φυτά *Nicotiana benthamiana* έδειξαν ότι RNA σίγηση επάγεται σε συνθήκες σχετικά χαμηλής θερμοκρασίας (μικρότερη των 24 °C), φωτισμού χαμηλής έντασης (250 μmol φωτονίων $\text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) και υψηλής υγρασίας (85-90%) ενώ στη συνέχεια η εδραίωση και διατήρηση του φαινοτύπου, ενδεικτικού της σίγησης, στο χρόνο απαιτεί υψηλή θερμοκρασία (28-30 °C) και φωτισμό υψηλής έντασης (1000 μmol φωτονίων $\text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), (Nethra et al., 2006).

Συζητώντας την σημασία των αποτελεσμάτων των προαναφερθέντων εργασιών, η αποσαφήνιση του ρόλου τόσο της θερμοκρασίας, όσο και του φωτός στην ρύθμιση της αναπτυξιακής βιολογίας και της αντικής άμυνας των φυτών μέσω του μηχανισμού της RNA σίγησης θα συμπλήρωνε με σφαιρικό τόνο τις συγκεκριμένες πτυχές της λειτουργικής βιολογίας των ανώτερων φυτών.

Κριτικά σκεπτόμενοι, τα παραπάνω ερευνητικά παραδείγματα συμφώνησαν σε επεξηγηματικά μοντέλα της δομής αιτίου-αποτελέσματος εκφράζοντας την σύγχρονη απουσία μηχανιστικών στοιχείων, πέρα από θεωρητικές συσχετίσεις σύμφωνα με το υπάρχον σχετικό βιολογικό υπόβαθρο.

Σκοπός της εργασίας

Στη παρούσα εργασία, γίνεται μία πρώτη προσπάθεια διερεύνησης και χαρακτηρισμού της φωτοσυνθετικής διαδικασίας με βάση αναφοράς την επαγωγή της διασυστηματικής RNA σίγησης γονιδίων. Με βασικά βιοενεργητικά εργαλεία αρχικά και βιοχημικά στη συνέχεια εντυπώνουμε την πλαστικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κάτω από συνθήκες σίγησης, ενσωματώνοντας την ιδιαιτερότητα του ρόλου του φωτός για τους φυτικούς οργανισμούς στο οικοδόμημα της μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων.

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

Φυτικό υλικό

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Nicotiana benthamiana*. αγρίου τύπου, διαγονιδιακά φυτά 16c GFP *Nicotiana benthamiana* που εκφράζουν συστατικά το διαγονίδιο της GFP καθώς και GFP *Nicotiana benthamiana* διαγονιδιακές σειρές που παράγουν αυθόρμητα το σήμα της διασυστηματικής RNA σίγησης (Kalantidis et al., 2004).

Απολύμανση σπόρων, σπορά, μεταφύτευση σποροφύτων και συνθήκες ανάπτυξης

Οι σπόροι των παραπάνω φυτών απολυμάνθηκαν με πλύσιμο τους σε 10% χλωρίνη (διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου) για 15 min. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με αποστειρωμένο νερό ώστε να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα της χλωρίνης. Στη συνέχεια απλώθηκαν σε Murashige & Skoog υπόστρωμα (πίνακας 1) σε τρυβλία petri. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες έγιναν υπό στείρες συνθήκες. Στη συνέχεια τα τρυβλία petri σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και σκοταδιού, συνθήκες που ευνοούν την βλάστηση των σπόρων. Μετά την βλάστηση των σπόρων τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θαλάμους ελεγχόμενης θερμοκρασίας ($22.1 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$) και λευκού (φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας: 400-700 nm) συνεχούς φωτισμού χαμηλής έντασης ($23.3 \pm 3.8 \mu\text{mol φωτονίων m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) για πέντε περίπου μέρες, έως ότου τα σπορόφυτα αναπτύξουν φωτοσυνθετικό μηχανισμό και «δυναμώσουν» όπου και μεταφυτεύθηκαν σε μικρού μεγέθους γλάστρες οι οποίες περιείχαν μίγμα κομπόστας: τύρφης: περλίτη με αναλογία 1:2:0.5, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο σε λίπασμα. Τα γλαστράκια ήταν καλυμμένα με διαφανή σακουλάκια ώστε να αναπτύσσεται το νεαρό φυτάριο σε περιβάλλον με υψηλή σχετική υγρασία, τα οποία αργότερα απομακρύνθηκαν. Στο στάδιο των πέντε φύλλων, τα φυτά μην αντιμετωπίζοντας πλέον κίνδυνο φωτοαναστολής, έχοντας αναπτύξει ώριμο φωτοσυνθετικό μηχανισμό, μεταφυτεύθηκαν σε μεγαλύτερου

μεγέθους γλάστρες, σε θαλάμους ελεγχόμενης θερμοκρασίας ($22.1 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$) και λευκού συνεχούς φωτισμού υψηλής έντασης ($121.2 \pm 31.2 \mu\text{mol φωτονίων m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) έως πλήρους ανάπτυξης και ωρίμανσης. Στο τελικό αυτό στάδιο η παρουσία άφθονου, κατάλληλου και υγιούς υλικού μας επέτρεψε τη συλλογή δειγμάτων (φύλλων) για τη διεξαγωγή πειραμάτων. Τα φυτά ποτίζονταν με νερό βρύσης ανά δεύτερη μέρα. Οι προκαταρκτικές μετρήσεις θερμοκρασίας και φωτισμού στους θαλάμους ανάπτυξης φυτών έγιναν με τη βοήθεια ενός QRT1 αισθητήρα φωτισμού και θερμοκρασίας (Hansatech Instruments, King's Lynn, UK).

Υπόστρωμα Murashige & Skoog (MS medium)

Χρησιμοποιήθηκε για την βλάστηση των σπόρων των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη καθώς και για τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των αντίστοιχων σποροφύτων. Η σύσταση Murashige & Skoog υποστρώματος (Murashige and Skoog, 1962), δίνεται στο παρακάτω πίνακα 1:

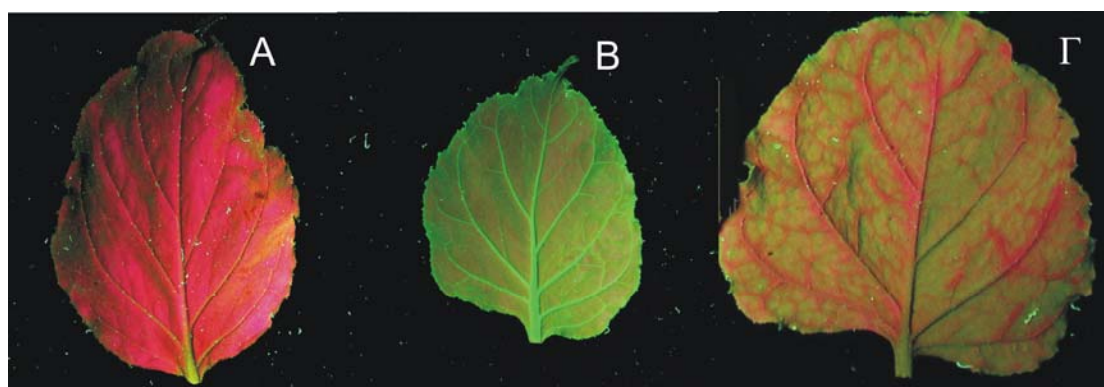
Μακροστοιχεία		Μικροστοιχεία		Βιταμίνες	
CaCl ₂	2.99 mM	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.11 μM	Γλυσίνη	26.64 mM
KH ₂ PO ₄	1.25 mM	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.10 μM	Μυο-Ινοσιτόλη	0.56 mM
KNO ₃	18.79 mM	H ₃ BO ₃	0.10 mM	Νικοτινικό οξύ	4.06 mM
MgSO ₄	1.50 mM	KI	5.00 μM	Πυριδοξίνη HCl	2.43 mM
NH ₄ NO ₃	20.61 mM	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.10 mM	Θειαμίνη HCl	0.30 mM
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.03 μM		
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	29.91 μM		

Πίνακας 1: Σύσταση Murashige & Skoog υποστρώματος

Επιπλέον προστίθεται Fe-Na-EDTA σε συγκέντρωση 0.10 mM. Το pH ρυθμίζεται στο 5.7 και προστίθεται άγαρ 8 gr/lit. Ακολουθεί αποστείρωση. Το MS υπόστρωμα «απλώνεται» σε τρυβλία petri υπό στείρες συνθήκες.

Φαινοτυπική ανάλυση

Κριτήριο της διάκρισης των εξεταζόμενων φαινοτύπων-καταστάσεων (σίγηση και μη σίγηση) προκειμένου να ληφθούν αντίστοιχα δείγματα ήταν ο φθορισμός της χλωροφύλλης ο οποίος κάτω από UV φωτισμό, είναι κόκκινος. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε μία χειροκίνητη UV λάμπα 1000W (B100AP; Ultraviolet Products, Upland, CA, USA).

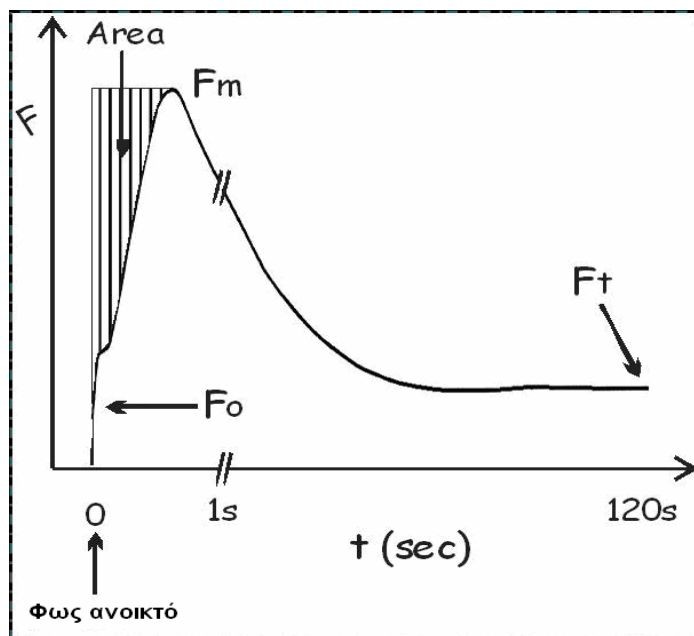


Εικόνα 4: Φωτογραφία κάτω από υπεριώδες φως, φύλλων από τους τύπους φυτών *Nicotiana benthamiana*, που μελετήθηκαν. **A:** Ιστός αγρίου τύπου, **B:** Ιστός στον οποίο η GFP εκφράζεται, **Γ:** Ιστός στον οποίο η GFP πρωτεΐνη δεν εκφράζεται (κατάσταση διασυστηματικής σίγησης).

Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού χλωροφύλλης a

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν σε φυλλικούς δίσκους οι οποίοι είχαν παραμείνει προηγουμένως στο σκοτάδι τουλάχιστον 30 min. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν με τη χρήση της συσκευής Handy-Plant Efficiency Analyser (Handy-PEA, Hansatech, King's Lynn, UK) και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής, για την OJIP-ανάλυση (Handy-PEA Biolyser 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser and Strasser, (1995). Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της μεταβολής του φθορισμού σε χρονικό διάστημα 2 min. Η διέγερση έγινε από τρεις διόδους φωτισμού (LEDs), οι οποίες εστίαζαν σε μία κυκλική επιφάνεια του δείγματος (άνω επιφάνεια φυλλικού δίσκου) διαμέτρου 5 mm

και οι οποίες συνολικά εξέπεμπαν ένταση ακτινοβολίας $2500 \mu\text{mol φωτονίων m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ερυθρού φωτός (650 nm). Η πρώτη αξιόπιστη μέτρηση (σημείο της καμπύλης φθορισμού) ήταν στα 10 μs η οποία αντιστοιχούσε στην παράμετρο F_0 .



Σχήμα 1: Μία τυπική καμπύλη φθορισμού. Ο χρόνος (χ-άξονας) παρουσιάζεται σε γραμμική κλίμακα. F_0 : ελάχιστη τιμή φθορισμού (αρχικό επίπεδο φθορισμού) που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα PSII κέντρα είναι «ανοιχτά» (οξειδωμένα), F_m : μέγιστη τιμή φθορισμού που αντιστοιχεί στο χρόνο όπου όλα τα PSII κέντρα είναι «κλειστά» (ανηγμένα), F_t : τιμή φθορισμού στα 2 min. Area: το εμβαδόν της επιφάνειας που βρίσκεται πάνω από την καμπύλη, μεταξύ του F_0 και του F_m .

Απομόνωση και εκτίμηση χλωροφυλλών

Οι χλωροφύλλες απομονώθηκαν από δείγματα φύλλων τα οποία λειοτριβήθηκαν σε γουδί, με 80% υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα ακετόνης (2.5 mM HEPES-NaOH, pH 7.5). Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στα 1500 g, για 15 min, στους 25°C και από το υπερκείμενο που προέκυψε ποσοτικοποιήθηκαν οι χλωροφύλλες (χλωροφύλλη a, χλωροφύλλη b), όπως περιγράφεται από τους Porra et al., (1989). Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες χαμηλής φωτονιακής ροής προκειμένου να αποφευχθεί φωτοοξείδωση των χλωροφυλλών. Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση των θυλακοειδών μεμβρανών.

Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών

Η διαδικασία απομόνωσης θυλακοειδών μεμβρανών έγινε όπως προτείνεται από τους Casazza et al., (2001). Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες χαμηλής φωτονιακής ροής προκειμένου να αποφευχθεί φωτοοξειδωση των χλωροφυλλών, στους 4 °C ενώ επίσης όλα τα υλικά και ρυθμιστικά διαλύματα ήταν προψυγμένα. Τα φύλλα (0.3-0.5 gr.) ομογενοποιήθηκαν γρήγορα χρησιμοποιώντας γουδί και γουδοχέρι σε 2–3 ml ρυθμιστικού διαλύματος απομόνωσης που περιείχε 0.4 M σορβιτόλη, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 20 mM Tricine/NaOH (pH 8.4) και 0.5% (w/v) BSA. Το ομογενοποίημα φιλτραρίστηκε από οκτώ στρώματα γάζας, με ήπια πίεση έτσι ώστε να αυξηθεί η απόδοση σε θυλακοειδή. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 2600 g για 3 min στους 4 °C, το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεχτικά και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 2–3 ml ρυθμιστικού διαλύματος επαναδιάλυσης που περιείχε 0.3 M σορβιτόλη, 2.5 mM EDTA, 5mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES (pH 7.6) και 0.5% (w/v) BSA. Μετά τη φυγοκέντριση (2600 g για 3 min στους 4 °C), το ίζημα πλύθηκε ξανά σε ρυθμιστικό διάλυμα επαναδιάλυσης και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1 ml ρυθμιστικού υποτονικού διαλύματος που περιείχε 2.5 mM EDTA, 5mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES (pH 7.6) και 0.5% (w/v) BSA; ο τελικός όγκος προσαρμόστηκε στα 5 ml με ρυθμιστικό υποτονικό διάλυμα. Τέλος οι θυλακοειδείς μεμβράνες συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση (2600 g για 3 min στους 4 °C). Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε μικρό όγκο (0.5–1 ml) ρυθμιστικού διαλύματος επαναδιάλυσης και το εναιώρημα αποθηκεύτηκε στο σκοτάδι και στους -80 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί. Μετά από κάθε απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών και πριν από κάθε πολαρογραφική μέτρηση, το εναιώρημα των θυλακοειδών αραιωνόταν με διάλυμα αντίδρασης που περιείχε 0.1 M σορβιτόλη, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 20 mM KCl, 30 mM Tricine/NaOH (pH 8.0) και 0.5% (w/v) BSA, σε μία τελική συγκέντρωση χλωροφύλλης 15 µg/ml και τα δείγματα μετά από τουλάχιστον 30 min παραμονής στο σκοτάδι μετρούνταν στο Handy-Plant Efficiency Analyser (Handy PEA, Hansatech, King's Lynn, UK) σε ένταση ακτινοβολίας 1500 µmol φωτονίων m⁻² sec⁻¹ ερυθρού φωτός (650 nm), και για χρόνο 5 s. προς εκτίμηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης ως προς την PSII φωτοχημεία (λόγος Fv/Fm).

Πολαρογραφικές μετρήσεις

Οι μετρήσεις δραστηριότητας των φωτοσυστημάτων πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους Romanowska et al., (2006). Οι δραστηριότητες του φωτοσυστήματος I (TMPD/ASC \rightarrow MV) και του φωτοσυστήματος II ($H_2O \rightarrow K_3Fe(CN)_6$) εκτιμήθηκαν σε θυλακοειδείς μεμβράνες πολαρογραφικά με το σύστημα ενός Clark-type ηλεκτροδίου (Hansatech Instruments). Το διάλυμα αντίδρασης (2ml) περιείχε για το PSI: 330 mM σορβιτόλη, 40 mM ρυθμιστικό διάλυμα Tricine (pH=7.6), 2 mM EDTA και 7 mM $MgCl_2$, ενώ για το PSII περιείχε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα HEPES/Tris (pH=7.8), 100 mM σορβιτόλη, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 2.5 mM NH_4Cl και 1 mM $MnCl_2$. Η δραστηριότητα του PSII μετρήθηκε ως έκλυση οξυγόνου με το νερό σαν δότη ηλεκτρονίων και 2.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ σαν δέκτη ηλεκτρονίων, με την παρουσία 10 μM DBMIB σαν αναστολέα του PSI. Η δραστηριότητα του PSI μετρήθηκε ως κατανάλωση οξυγόνου, με 0.2 mM TMPD ανηγμένου με 3 mM ασκορβικού οξέος, σαν δότη ηλεκτρονίων και 0.1 mM MV σαν δέκτη ηλεκτρονίων; 15 μM DCMU και 5 mM NaN_3 χρησιμοποιήθηκαν σαν αναστολείς του PSII και της καταλάσης, αντίστοιχα. Οι μετρήσεις των αντίστοιχων ηλεκτρονιακών ροών έγιναν σε θερμοκρασία 22-23 $^{\circ}C$, σε λευκό φωτισμό έντασης $\sim 150 \mu mol$ φωτονίων $m^{-2} sec^{-1}$ και η συγκέντρωση της χλωροφύλλης ήταν 50 $\mu g/ml$. Η οριοθέτηση του επιπέδου συγκέντρωσης του οξυγόνου από το 0-100% στο διάλυμα του δείγματος έγινε με αέριο άζωτο και κορεσμένο σε οξυγόνο νερό, αντίστοιχα. Οι τιμές των μετρήσεων εκφράστηκαν σε $\mu mol O_2 mg^{-1} Chl h^{-1}$, όπου Chl: χλωροφύλλη.

Στατιστική επεξεργασία

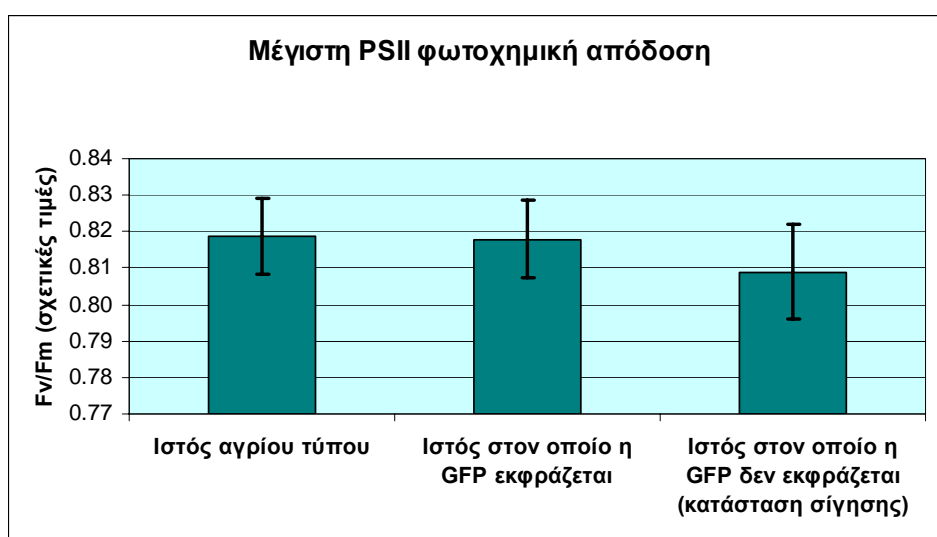
Όλα τα πειράματα αφορούν τουλάχιστον πέντε ανεξάρτητες μετρήσεις. Τα αποτελέσματα αφορούν μέσους όρους \pm τυπικές αποκλίσεις όπου αναφέρονται. Η στατιστική επεξεργασία, [t-test για δύο ανεξάρτητα δείγματα, απλή ανάλυση διασποράς με έναν παράγοντα (One-way ANOVA) αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε το Levene's test για το έλεγχο της ισότητας των διασπορών καθώς και η μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων (Tukey HSD test), έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS (SPSS 13.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)]. Οι μονοί αστερίσκοι δείχνουν στατιστικά

σημαντικές διαφορές είτε μεταξύ ιστού αγρίου τύπου και ιστού στον οποίο η GFP εκφράζεται είτε μεταξύ ιστού αγρίου τύπου και ιστού στον οποίο η GFP δεν εκφράζεται (κατάσταση σίγησης). Οι διπλοί αστερίσκοι δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ιστού στον οποίο η GFP εκφράζεται και ιστού στον οποίο η GFP δεν εκφράζεται (κατάσταση σίγησης). Οφείλουμε να αποσαφηνίσουμε ότι η έκφραση η GFP (δεν) εκφράζεται αναφέρεται στην πρωτεΐνη και όχι στην έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου, αφού στην κατάσταση σίγησης το γονίδιο εκφράζεται προς mRNA, αλλά το μετάγραφο στην συνέχεια αποικοδομείται.

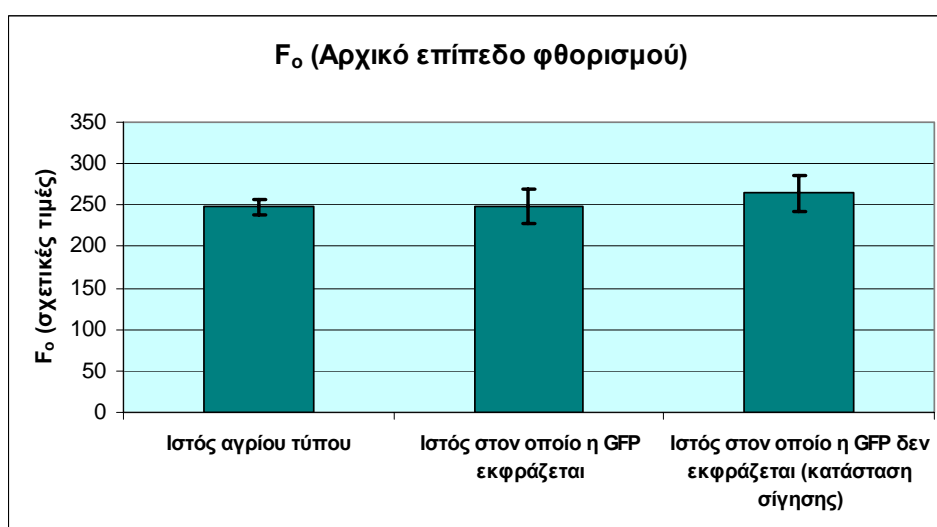
Αποτελέσματα και συζήτηση

In vivo μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού της χλωροφύλλης a

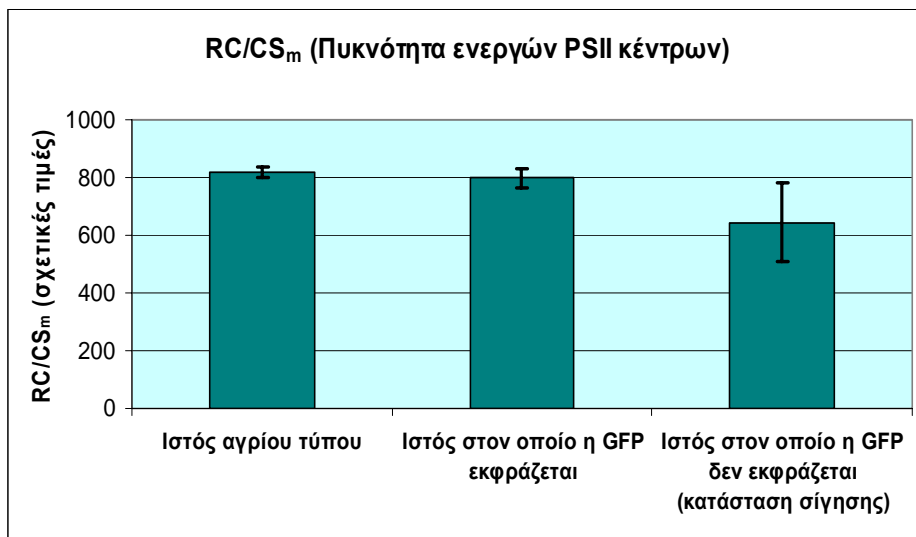
Η συμπεριφορά του PSII ποσοτικοποιήθηκε με *in vivo* μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού της χλωροφύλλης a. Τα αποτελέσματα αυτής της συγκριτικής μελέτης όσον αφορά τους τρεις εξεταζόμενους τύπους φυτών [(A: ιστός αγρίου τύπου, B: ιστός στον οποίο η GFP εκφράζεται, Γ: ιστός στον οποίο η GFP δεν εκφράζεται (κατάσταση σίγησης)] παρουσιάζονται και συνοψίζονται παρακάτω.



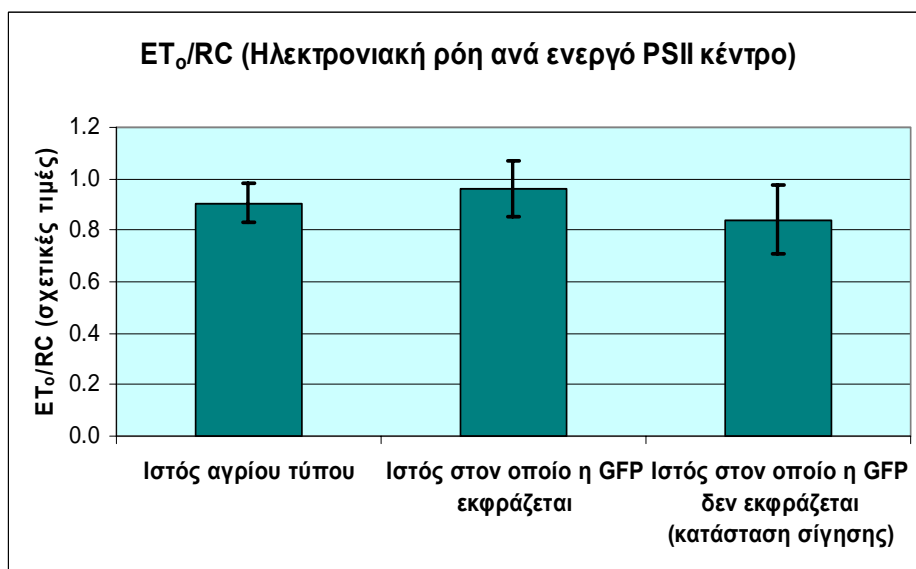
Σχήμα 2: F_v/F_m, (maximum PSII photochemical efficiency in dark-adapted state), όπου F_v=F_m-F₀: μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού.



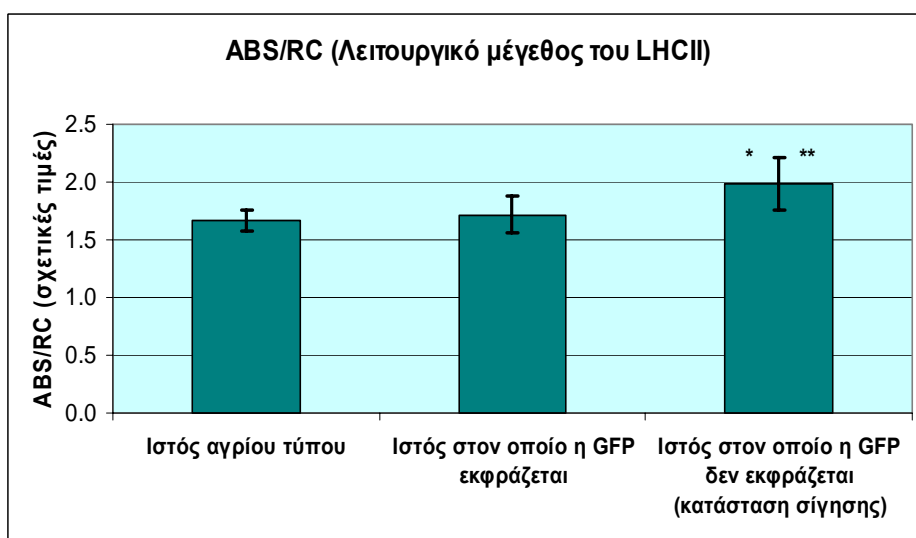
Σχήμα 3: Η τιμή F₀ αντιπροσωπεύει την αρχική εκπομπή φθορισμού η οποία προέρχεται από τα διεγερμένα μόρια της χλωροφύλλης a της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του PSII.



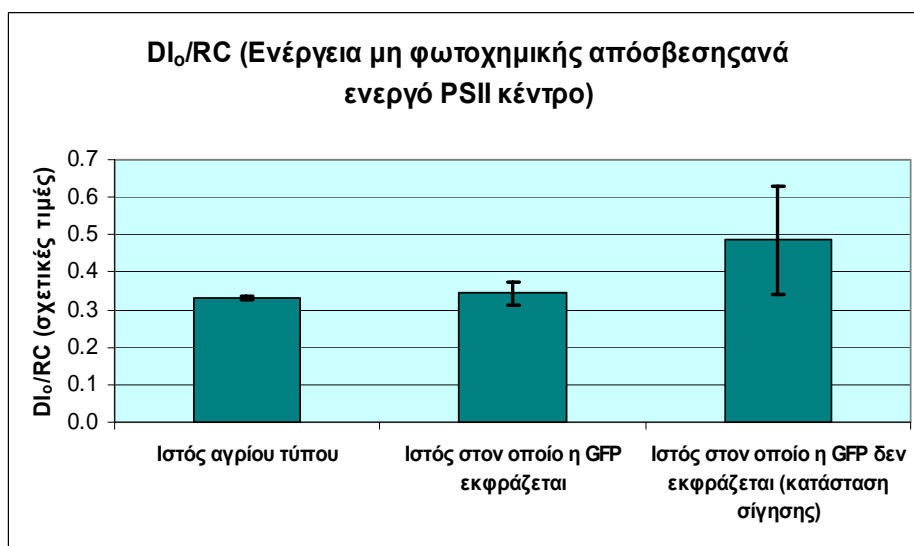
Σχήμα 4: Το RC/CS_m αναπαριστά ένα πολύ χρήσιμο όρο σχετικά με τη συγκέντρωση των ενεργών PSII κέντρων αντίδρασης ανά διεγερόμενη περιοχή.



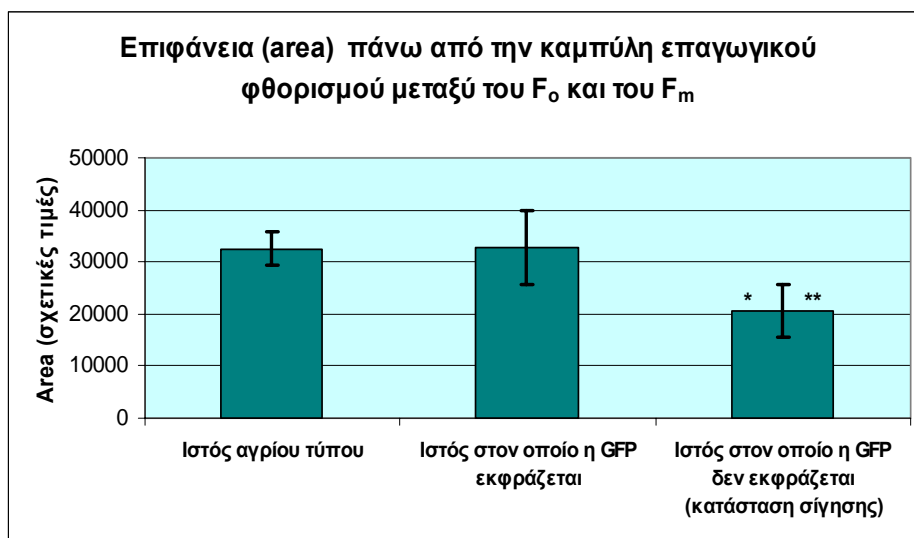
Σχήμα 5: Ο παράγοντας ET₀/RC δείχνει την ηλεκτρονιακή ροή ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης.



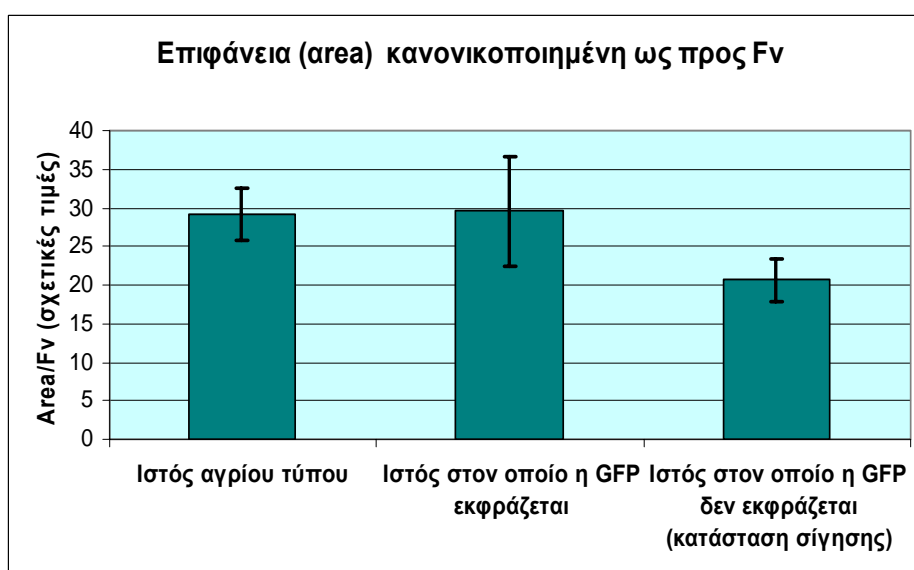
Σχήμα 6: Η παράμετρος ABS/RC αφορά το λειτουργικό μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του LHCI ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης.



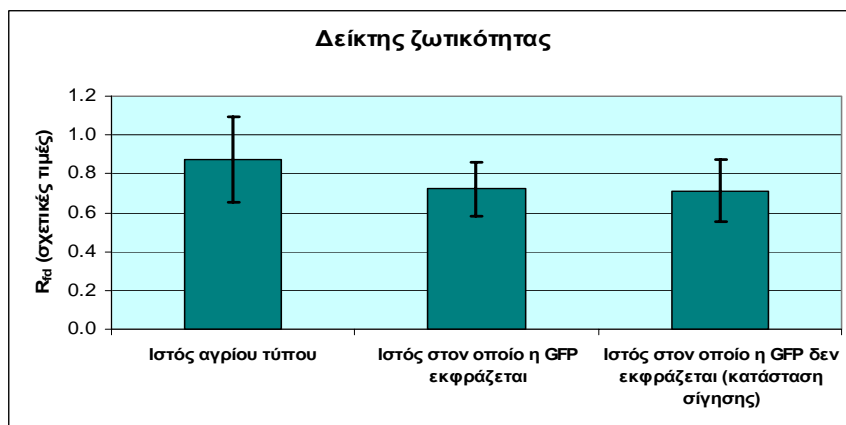
Σχήμα 7: Το DI₀/RC αναφέρεται στο ποσό της ενέργειας που απορροφάται ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης και οδηγείται σε μη φωτοχημικές διαδικασίες (λ.χ. απόσβεση ως θερμότητα).



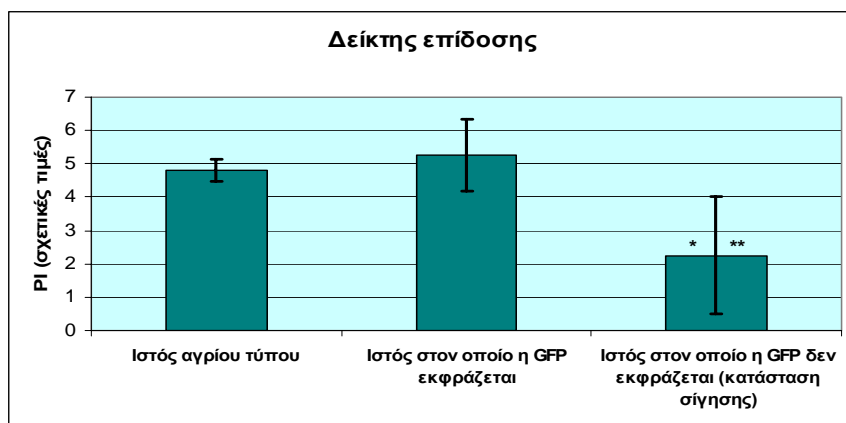
Σχήμα 8: Η παράμετρος area μας δίνει μία εκτίμηση του σχετικού μεγέθους της δεξαμενής της πλαστοκίνησης στην αναγωγική πλευρά του PSII.



Σχήμα 9: Ο παράγοντας area κανονικοποιημένος ως προς την μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής του φθορισμού, ($F_v = F_m - F_0$).



Σχήμα 10: Ο δείκτης ζωικότητας, (vitality index) [$R_{fd}=(F_m-F_t)/F_m$] εκφράζει την ικανότητα του κύκλου του Calvin να δρα σαν δέκτης (sink) για τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από το PSII.



Σχήμα 11: Το PI (performance index) είναι μία έκφραση για το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του χλωροπλάστη που οδηγεί την αλυσίδα ροής ηλεκτρονίων προς παραγωγή ATP και NADPH.

- Τα βιοενεργητικά προφίλ των φυτών αγρίου τύπου καθώς και αυτών που εκφράζουν συστατικά το γονίδιο της GFP σκιαγραφούνται παρόμοια σύμφωνα με τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού της χλωροφύλλης a
- Σε αντίθεση ο φωτοσυνθετικός μεταβολισμός των φυτικών κυττάρων που υπόκεινται σε RNA σίγηση χαρακτηρίζεται από μη αποτελεσματική PSII δραστηριότητα (σχήμα 2/αντίστοιχοι μέσοι όροι: $F_v/F_{m(A)}=0.819$, $F_v/F_{m(B)}=0.818$, $F_v/F_{m(\Gamma)}=0.809$) συνοδευόμενη από χαμηλούς ρυθμούς ηλεκτρονιακής ροής (σχήμα 5/αντίστοιχοι μέσοι όροι: $ET_o/RC_{(A)}=0.907$, $ET_o/RC_{(B)}=0.962$, $ET_o/RC_{(\Gamma)}=0.842$).
- Επίσης, η μειωμένη πυκνότητα των ενεργών κέντρων (σχήμα 4/ αντίστοιχοι μέσοι όροι: $RC/CSm_{(A)}=819.881$, $RC/CSm_{(B)}=794.864$, $RC/CSm_{(\Gamma)}=644.858$) στα φυτά στα οποία η GFP έχει σιγηθεί, προβάλλουν την αναγκαιότητα για αυξημένη ικανότητα απόσβεσης της περίσσειας ενέργειας διέγερσης (σχήμα 7/αντίστοιχοι μέσοι όροι: $DI_o/RC_{(A)}=0.332$, $DI_o/RC_{(B)}=0.343$, $DI_o/RC_{(\Gamma)}=0.486$).
- Επιπλέον, η παράμετρος F_0 (σχήμα 3/ αντίστοιχοι μέσοι όροι: $F_{0(A)}=247.8$, $F_{0(B)}=248.8$, $F_{0(\Gamma)}=264.5$) όντας ανάλογη της συγκέντρωσης των

φωτοσυλλεκτικών χρωστικών (χλωροφύλλες) που περιέχονται στα εξεταζόμενα δείγματα μας και παρόμοια ανάμεσα στους τρεις τύπους φυτών, μας παραχωρεί την συμπερασματολογία ότι οι παρατηρούμενες δομικές και λειτουργικές διαφορές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αντανακλούν διαφορετικές στρατηγικές οργάνωσής του ανεξαρτήτως των αντίστοιχων επιπέδων χλωροφύλλης.

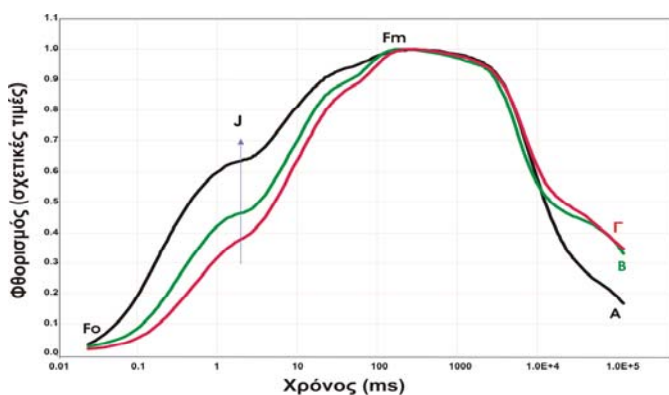
- Από την άλλη πλευρά, το μέγεθος της δεξαμενής των ενδιάμεσων ηλεκτρονιακών μεταφορέων (όπως φαίνεται από τις τιμές της “area” του σχήματος 8/αντίστοιχοι μέσοι όροι: $area_{(A)} = 32520$, $area_{(B)} = 32889$, $area_{(Γ)} = 20600$) μοιάζει να είναι επίσης περιοριστικός (αν και όχι στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τις “area/F_v” τιμές που φαίνονται στο σχήμα 9/αντίστοιχοι μέσοι όροι: $area/F_{v(A)} = 29.065$, $area/F_{v(B)} = 29.519$, $area/F_{v(Γ)} = 20.621$) στα φύλλα με σίγηση, συμφωνώντας με την πυκνότητα των PSII ενεργών κέντρων.
- **Συγκριτικά με τους χλωροπλάστες των φυτών ελέγχου, το συνολικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό των χλωροπλαστών των κυττάρων στα οποία ο μετα-μεταγραφικός μηχανισμός σίγησης είναι ενεργός δεν προμηθεύει επαρκή κινητήρια δύναμη στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό ως προς την χημειωσμοτική ικανότητά του (σχήμα 11 /αντίστοιχοι μέσοι όροι: $PI_{(A)} = 4.804$, $PI_{(B)} = 5.256$, $PI_{(Γ)} = 2.251$).**
- Επιπροσθέτως από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι οι μικροπεριβαλλοντικές συνθήκες στα κύτταρα με σίγηση επάγουν την αύξηση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του LHCI (σχήμα 6/αντίστοιχοι μέσοι όροι: $ABS/RC_{(A)} = 1.671$, $ABS/RC_{(B)} = 1.719$, $ABS/RC_{(Γ)} = 1.987$), με σκοπό την εξισσορόπηση της μειωμένης χημειωσμοτικής τους ικανότητας.
- Τέλος, ο δείκτης R_{fd} (σχήμα 10/αντίστοιχοι μέσοι όροι: $R_{fd(A)} = 0.871$, $R_{fd(B)} = 0.721$, $R_{fd(Γ)} = 0.712$) δείχνει ότι το PSI και/ή ο αναγωγικός κύκλος των φωσφορικών πεντοζών μπορεί να μην καθίστανται επαρκείς ως προς την ικανότητά τους να δέχονται (sink) τα ηλεκτρόνια που παρέχονται από το PSII στους ιστούς με σίγηση αν και δεν παρουσιάζεται σημαντικά χαμηλότερος συγκριτικά με τα αντίστοιχα φυτά ελέγχου.

Οξειδοαναγωγική κατάσταση της πλαστοκινόνης

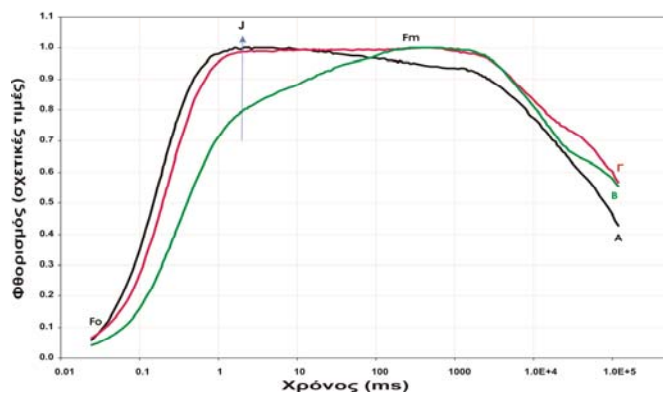
Θέλοντας να εξετάσουμε την οξειδοαναγωγική κατάσταση της πλαστοκινόνης (PQ) του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στην κατάσταση όπου ο μετα-μεταγραφικός μηχανισμός σίγησης είναι ενεργοποιημένος, βασιστήκαμε σε προηγούμενες αναφορές (Haldimann and Strasser, 1999; Haldimann and Tsimilli-Michael, 2002) σχετικά με ενδείξεις (Stirbet et al, 1998) σύμφωνα με τις οποίες όσο ψηλότερα βρίσκεται το σημείο J στις κινητικές φθορισμού OJIP, τόσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος $PQ_{\text{ανηγμένη}}/PQ_{\text{οξειδωμένη}}$.

Το πειραματικό σύστημα αφορούσε μετρήσεις (πείραμα ελέγχου) στους εξεταζόμενους τρεις τύπους φυτών τα οποία είχαν αναπτυχθεί και προσαρμοσθεί σε χαμηλές συνθήκες φωτισμού ($23.3 \pm 3.8 \mu\text{mol φωτονίων m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) καθώς και κινητικές με παρουσία DCMU (εμποτισμός με σύριγγα, 10 μM DCMU σε 1% αιθανόλη, στο φύλλο).

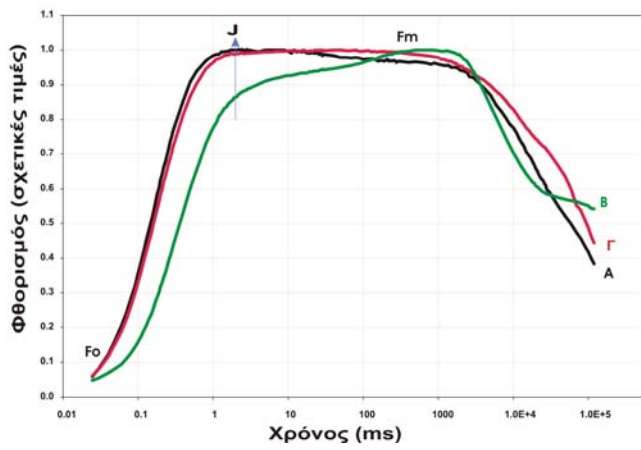
Ο αναστολέας ροής ηλεκτρονίων DCMU μπλοκάρει την αλυσίδα ροής στο επίπεδο της Q_B , πριν τη δεξαμενή της πλαστοκινόνης, (Trebst, 1972), εκπέμποντας ένα σήμα οξείδωσης στην ίδια. Με τον τρόπο αυτό, απομονώνοντας το PSII από το PSI, μελετήθηκε και συγκρίθηκε με το αντίστοιχο πείραμα ελέγχου, η *in vivo* συμπεριφορά της πλαστοκινόνης στο χρόνο (15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min με χρονική στιγμή $t_0 = 0$ min, τη στιγμή εμποτισμού). Αξίζει να αποσαφηνιστεί ότι η κινητική DCMU έγινε παρουσία φωτός, συγκεκριμένα σε φυτά που είχαν προσαρμοσθεί σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού, με τις φωτεινές αντιδράσεις (ηλεκτρονιακή ροή) *εν ενεργεία*.



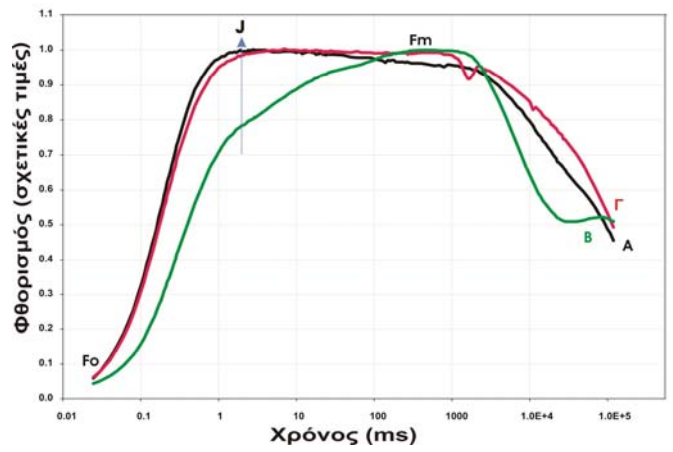
Σχήμα 12.1: $t = 0$ min



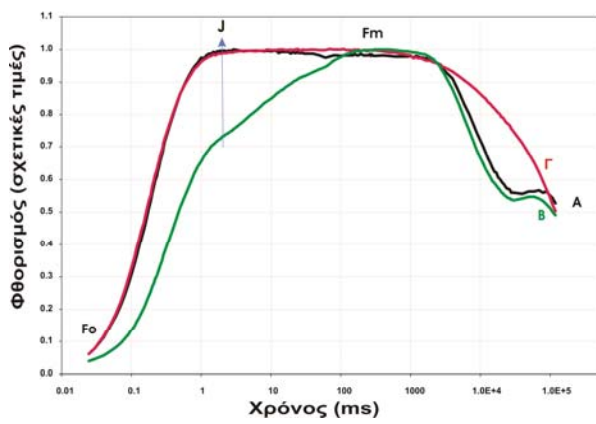
Σχήμα 12.2: $t = 15$ min



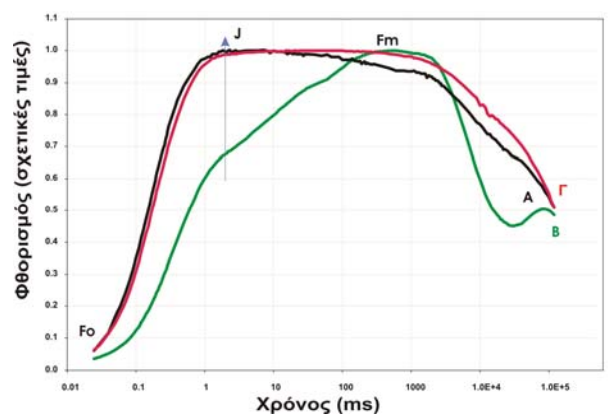
Σχήμα 12.3: $t = 30$ min



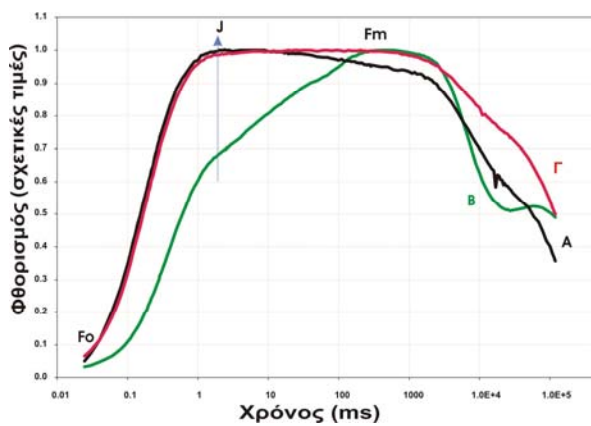
Σχήμα 12.4: $t = 45$ min



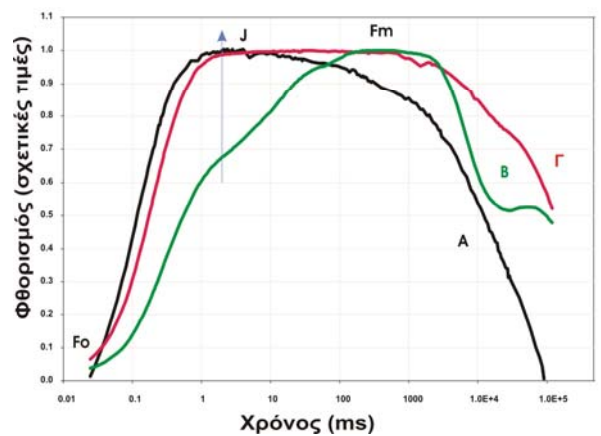
Σχήμα 12.5: $t = 60$ min



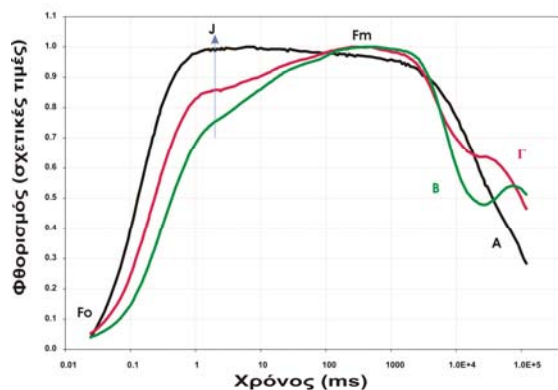
Σχήμα 12.6: $t = 120$ min



Σχήμα 12.7: $t = 180$ min



Σχήμα 12.8: $t = 240$ min



Σχήμα 12.9: $t = 300 \text{ min}$

Σχήμα 12: Καμπύλες φθορισμού και κινητική στο χρόνο, παρουσίας DCMU. Το ύψος του σημείου J είναι ανάλογο του λόγου $PQ_{\text{ανηγμένη}}/PQ_{\text{οξειδωμένη}}$.

A: Ιστός αγρίου τύπου, **B:** Ιστός στον οποίο η GFP εκφράζεται, **Γ:** Ιστός στον οποίο η GFP δεν εκφράζεται (κατάσταση διασυστηματικής σίγησης). Ο χρόνος (χ-άξονας) παρουσιάζεται σε λογαριθμική κλίμακα. Οι καμπύλες φθορισμού κανονικοποιήθηκαν τόσο ως προς το F_0 όσο και ως προς το F_m (ελάχιστη και μέγιστη τιμή του φθορισμού αντίστοιχα), προκειμένου να εξαιρεθεί η επίδραση των εξής παραγόντων: περιεχόμενο χλωροφυλλών, φωτοσυνθετική απόδοση) και να αποτιμηθούν ιδεατά οι πιθανές υπάρχουσες διαφορές ως προς τις δεξαμενή της πλαστοκινόνης και μόνο.

Όπως παρατηρούμε από τις καμπύλες του πειράματος ελέγχου (σχήμα 12.1) τα φυτά αγρίου τύπου έχουν τα μεγαλύτερα αποθέματα ανηγμένης πλαστοκινόνης με ακόλουθα τα φυτά που εκφράζουν συστατικά το γονίδιο της GFP. Τα φυτά στα οποία η GFP έχει σιγηθεί χαρακτηρίζονται από τον μικρότερο λόγο $PQ_{\text{ανηγμένη}}/PQ_{\text{οξειδωμένη}}$. Το πρότυπο αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα βαθμό αναμενόμενο εάν συγκρίνουμε την αντίστοιχη ηλεκτρονιακή ροή ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (αποτελέσματα επαγωγικού φθορισμού).

Ωστόσο, στην κατάσταση παρεμπόδισης στο επίπεδο της Q_B , θα αναμέναμε την μείωση του J μετά του χρόνου, με διατήρηση όμως της ίδιας σχετικής θέσης των καμπύλων φθορισμού για τους τρεις εξεταζόμενους τύπους φυτών.

Εντούτοις, προοδευτικά (σχήμα 12.2-12.8) αλλά σχετικά γρήγορα (15 min, σχήμα 12.2) παρατηρούμε μία εξομοίωση του J, των φυτών αγρίου τύπου με τα φυτά στα οποία το μετάγραφο της GFP αποικοδομείται (κατάσταση σίγησης). Το J των φυτών που εκφράζουν συστατικά GFP, μειώνεται σημαντικά, συγκριτικά με τις άλλες δύο κατηγορίες φυτών. Η σχετική δραστική μετατόπιση των καμπύλων φθορισμού ως προς το J (κατάσταση σίγησης-κατάσταση έκφρασης) στη συγκεκριμένη κατάσταση παρεμπόδισης της ροής ηλεκτρονίων, υπονοεί ότι οι φωτεινές αντιδράσεις στους χλωροπλάστες των ιστών με σίγηση απαιτούν μία σταθερή παροχή ηλεκτρονίων έστω και μη προερχόμενη από το PSII (λ.χ. από το PSI).

Βέβαια, στην πέμπτη ώρα (σχήμα 12.9) της κινητικής παρατηρούμε το J των φυτών αγρίου τύπου να αυξάνεται και να υπερέχει έναντι των φυτών σε κατάσταση σίγησης, με το J των GFP φυτών να παραμένει σταθερά χαμηλό. Για αυτήν την τελευταία μετατόπιση μπορεί να υποτεθεί ότι η προμήθεια ηλεκτρονίων που προέρχεται από εναλλακτικό δρόμο πλην της αναγωγικής πλευράς του PSII στα φυτά αγρίου τύπου είναι σημαντικά μεγαλύτερη και πιο εύκαμπτη σε διάρκεια με τα φυτά σε κατάσταση σίγησης.

Σχετικά επίπεδα χλωροφύλλης a και χλωροφύλλης b

Σε κάθε μελέτη που αφορά τη φωτοσυνθετική διαδικασία κρίνεται απαραίτητη μία εκτίμηση των φωτοσυλλεκτικών χρωστικών (χλωροφυλλών) αναφορικά με τον πειραματικό σκελετό του υπό εξέταση ερευνητικού θέματος. Στον πίνακα 2, δίνεται ο λόγος χλωροφύλλης a/χλωροφύλλη b τόσο σε φύλλα όσο και σε θυλακοειδείς μεμβράνες.

	Ιστός αγρίου τύπου	Ιστός στον οποίο η GFP εκφράζεται	Ιστός στον οποίο η GFP δεν εκφράζεται (κατάσταση σίγησης)
Chla/Chlb (φύλλα)	2.727 ± 0.157	2.680 ± 0.104	2.656 ± 0.111
Chla/Chlb(θυλακοειδείς μεμβράνες)	2.917 ± 0.027	2.793 ± 0.008 *	2.590 ± 0.030 **

Πίνακας 2: Λόγος Chla/Chlb, Chl: χλωροφύλλη.

Η μείωση του λόγου χλωροφυλλών a/b [ιστός αγρίου τύπου > ιστός στον οποίο η GFP εκφράζεται > ιστός στον οποίο η GFP δεν εκφράζεται (κατάσταση σίγησης)] θα μπορούσε να συσχετισθεί με μία αντιστρόφως ανάλογη σχέση ως προς το λόγο PSI/PSII ο οποίος αφορά την στοιχειομετρία των φωτοσυστημάτων (Pfannschmidt al, 1999). Σε αντίθεση με τις θυλακοειδείς μεμβράνες όπου οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές, στην περίπτωση των φύλλων προδιαγράφεται μόνο μία αντίστοιχη τάση μείωσης και αυτό γιατί η απομόνωση των χλωροφυλλών στην περίπτωση των φύλλων είναι πιο επίπονη και χρονοβόρα με σύγχρονη οξείδωση μέρους των χλωροφυλλών.

***In vitro* δραστηριότητες φωτοσυστημάτων I και II**

Οι μετρήσεις της δραστηριότητας των φωτοσυστημάτων έγιναν σε απομονωμένα θυλακοειδή και σε συνθήκες σκοταδιού (για μία εκτίμηση της μέγιστης δυνατής δραστηριότητας) αλλά και σε συνθήκες φωτός ανάλογες με αυτές στις οποίες αναπτύχθηκαν τα φυτά (προς μία εκτίμηση της *τρέχουσας* δραστηριότητας των φωτοσυστημάτων).

PSI/PSII	Ιστός αγρίου τύπου	Ιστός στον οποίο η GFP εκφράζεται	Ιστός στον οποίο η GFP δεν εκφράζεται (κατάσταση σίγησης)
Σκοτάδι	0.505	1.030	2.495
Φως	3.501	2.694	4.147

Πίνακας 3: Ο λόγος του PSI/PSII αναφέρεται στην *in vitro* δραστηριότητα των φωτοσυστημάτων I και II.

Οι τιμές του πίνακα 3 που αφορούν σκοτάδι παρουσιάζουν μία πορεία ανάλογη αυτής που υποδεικνύουν οι τιμές των λόγων χλωροφύλλης a/χλωροφύλλη b ως προς την στοιχειομετρία των φωτοσυστημάτων.

Εντούτοις, στο φως (πίνακας 3), τα θυλακοειδή στα φυτά στα οποία ο μηχανισμός της μετα-μεταγραφικής σίγησης είναι ενεργός εμφανίζουν μία σαφώς μεγαλύτερη στοιχειομετρία ενεργότητας PSI/PSII σε σχέση με τα φυτά του αγρίου τύπου ενώ στην περίπτωση των φυτών που εκφράζουν GFP η εν λόγω στοιχειομετρία εμφανίζεται η πλέον μικρότερη.

Η περίπτωση της σχετικά μικρής στοιχειομετρίας PSI:PSII, όσον αφορά την *τρέχουσα* δραστηριότητα των φωτοσυστημάτων, των φυτών που εκφράζουν συστατικά GFP συγκριτικά με τους άλλους δύο τύπους ίσως αξίζει ιδιαίτερο σχολιασμό. Το χρωμόφορο της GFP συναγωνίζεται τις χλωροφύλλες ως προς την απορρόφηση του φωτός και ειδικά την χλωροφύλλη b, αφού η χλωροφύλλη b μειώνει τέσσερις φορές σε σχέση με τη χλωροφύλλη a, το φθορισμό της GFP, σε διαγονιδιακά φυτά GFP (Zhou et al, 2005), με αποτέλεσμα ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός των συγκεκριμένων φυτών να οδηγείται σε μία προσαρμογή *ανάλογη* συνθηκών χαμηλού φωτισμού. Ο μειωμένος λόγος Chla/Chlb αποτελεί χαρακτηριστικό προσαρμογής σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού (Walters and Horton, 1994) και αυτό γιατί η διαφοροποίηση δεν οφείλεται σε απόλυτη τιμή εντάσεων

φωτός αλλά σε μετατόπιση της φασματικής κατανομής ως προς το φως που απορροφάται. Αυτή η κατάσταση οδηγεί στην οξείδωση της δεξαμενής της πλαστοκινόνης, την αποφωσφορυλίωση του κινητού μέρους της κεραίας του LHCII και τη μετακίνηση της στο φωτοσύστημα II (state 1). Το παραπάνω σενάριο εναρμονίζεται με τα ευρήματά μας; οι μειωμένοι λόγοι $PQ_{\text{αναγμένη}}/PQ_{\text{οξειδωμένη}}$, PSI/PSII καθώς και αυξημένες τιμές των περισσότερων παραμέτρων των μετρήσεων του επαγωγικού φθορισμού που αφορούν το PSII, συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου.

Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν διεξοδικά οι διαφοροποιήσεις της φωτοσυνθετικής λειτουργίας των φυτικών κυττάρων τα οποία υφίστανται τις μεταβολικές συνέπειες του ενεργού μηχανισμού της μετα-μεταγραφικής RNA σίγησης γονιδίων.

Συγκεκριμένα οι χλωροπλάστες διαγονιδιακών φυτών *Nicotiana benthamiana* που παράγουν αυθόρμητα RNA σίγηση, χαρακτηρίζονται από αύξηση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας του LHClI, μείωση της πυκνότητας των PSII ενεργών κέντρων και σημαντικά μειωμένο συνολικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό.

Λαμβάνοντας υπόψη τα πειραματικά μας δεδομένα, προτείνουμε ότι η αναγκαιότητα ενός αποτελεσματικού μηχανισμού σίγησης για αποθέματα ATP [λ.χ. ATP-εξαρτώμενη μετατροπή του δίκλωνου RNA στόχου σε siRNAs (Qi et al., 2005; Tang et al., 2003) και ενίσχυση της ενεργότητας του συμπλόκου RISC, παρουσίας ATP (Qi et al., 2005)] μπορεί να είναι υπεύθυνη για τις παρατηρούμενες αλλαγές στους εξεταζόμενους τύπους φυτών. Ενδείξεις υπάρχουν επίσης για το ρόλο του ATP στο ξεδίπλωμα του δίκλωνου siRNA καθώς επίσης και στην διατήρηση 5' φωσφορικών ομάδων σε ένα λειτουργικό μόριο siRNA (Matranga and Zamore, 2004).

Συμπερασματικά, προτείνεται ότι η κυκλική ροή ηλεκτρονίων γύρω από το φωτοσύστημα I (Bukhov and Carpentier, 2004) υπερέχει της γραμμικής ροής ηλεκτρονίων, προκειμένου να ανταποκριθεί στις ενεργειακές απαιτήσεις του μηχανισμού μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων αυξάνοντας την στοιχειομετρία ATP:NADPH. Η παρατηρούμενη αυξημένη ικανότητα απόσβεσης της ενέργειας συμφωνεί με την πρόταση μας αφού στην περίπτωση κυκλικής ροής ηλεκτρονίων έχουμε και αυξημένο NPQ (Cruz et al., 2005).

Επίσης, η έντονη *in situ* ανίχνευση υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μεσόφυλλο των φυτών στα οποία το μετάγραφο του διαγονιδίου της GFP αποικοδομείται (κατάστασης σίγησης) συγκριτικά με τα φυτά ελέγχου, πέρα από την υπόνοια ότι ίσως η δομή των μικρών RNAs (υδροξυλικές ομάδες στο 3' άκρο τους) σε συνάρτηση με τη υψηλή συγκέντρωσή των μικρών RNAs στο κυτταρόπλασμα, είναι υπεύθυνη για τη μεταβολική αυτή παράμετρο της ομοιοστασίας του κυττάρου, ίσως μπορεί να συσχετισθεί ακόμη με την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive

Oxygen Species, ROS) ως αποτέλεσμα της ψευδοκυκλικής ροής ηλεκτρονίων (Asada, 1999).

Αναπτύσσοντας τα GFP *Nicotiana benthamiana* φυτά που παράγουν αυθόρμητα διασυστηματική σίγηση, κάτω από διαφορετικές συνθήκες φωτισμού ως προς την ένταση, παρατηρήσαμε ότι εμφανίζουν μία αυξημένη τάση επαγωγής της σίγησης όσον αφορά την πληθυσμιακή συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου φαινοτύπου (συγκεκριμένα το 49% των φυτών μετά από προσαρμογή διάρκειας πέντε μηνών σε λευκό φωτισμό υψηλής έντασης ενώ μόνο το 17% των εξεταζόμενων αντίστοιχων φυτών χαρακτηρίστηκαν από διασυστηματική σίγηση μετά από προσαρμογή σε λευκό φωτισμό χαμηλής έντασης και αντίστοιχης διάρκειας), σε προσαρμογή υψηλού φωτισμού (high light acclimation), στην οποία η σύνθεση του ATP αυξάνεται σημαντικά.

Συνεπώς, συνοψίζοντας τη συλλογιστική μας πάνω στο αντικείμενο της παρούσας εργασίας, ο ρόλος του φωτός ως πρωτογενές σήμα στην προσαρμοστικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού δύναται να αποτελεί ένα κομβικό αιτιόκρατο όσον αφορά τις συνθήκες που προσομοιάζει ο μηχανισμός της μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων στην φυσιολογία των ανώτερων φυτικών οργανισμών.

Μελλοντικές προοπτικές

Βασιζόμενοι στα πειραματικά μας ευρήματα, *in vitro* μετρήσεις που θα αφορούν τη γραμμική ροή ηλεκτρονίων καθώς και τον λόγο ATP/NADPH στους εξεταζόμενους τύπους φυτών κρίνονται απαραίτητες προς εδραίωση ή τροποποίηση του προτεινόμενου μοντέλου δράσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε κατάσταση ενεργοποίησης του μηχανισμού μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων. Η οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυτοχρώματος b_6f και η κατάσταση φωσφορυλίωσης του LHCP (state transitions) αποτελούν επιμέρους ερωτήματα τα οποία εάν απαντηθούν θα συμπληρώσουν την όλη εικόνα σχετική με το θέμα. Πειράματα αγροεμποτισμού προς επαγωγή της RNA σίγησης σε φυτά 16c GFP *Nicotiana benthamiana* με παράλληλο εμπότισμό του φυλλικού ιστού με πουτρεσίνη θα δρούσαν καταλυτικά στην αποσαφήνιση του ερευνητικού αυτού θέματος, αφού η συγκεκριμένη πολυαμίνη αυξάνει σημαντικά την απόδοση της διαδικασίας της φωτοφωσφορυλίωσης (Ioannidis et al., 2006).

Από εξελικτική σκοπιά, η χρήση ειδικών αναστολέων τόσο της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων όσο και της φωτοσυνθετικής αλυσίδας των χλωροπλαστών θα μας έδινε την πηγή του παρεχόμενου ATP στο μονοπάτι σίγησης. Η αποσαφήνιση της αναγκαιότητας και κατανάλωσης του ATP στα επιμέρους βήματα του μονοπατιού σίγησης στα φυτά ως προς την βιοχημεία του, θα μας προσέφερε τη δυνατότητα να εξετάσουμε κατά πόσο η εξελικτική φυλογένεση του μηχανισμού ανάμεσα σε διαφορετικούς ευκαρυωτικούς μηχανισμούς τείνει να διαφυλάσσεται ή όχι [λ.χ. η ενεργότητα του συμπλόκου RISC στην *Drosophila melanogaster* είναι ATP-εξαρτώμενη (Tomari et al., 2004; Tomari and Zamore, 2005) ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο με τον ανθρώπινο οργανισμό (Maniataki and Mourelatos, 2005)].

Η διερεύνηση τόσο των μεταγραφικών όσο και των πρωτεϊνικών επιπέδων των βασικών φωτοσυνθετικών υποσυμπλόκων θα μας έδινε απάντηση στο αν οι παρατηρούμενες αλλαγές στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό αφορούν μακροπρόθεσμες προσαρμοστικότητες εκτός από τις βραχυπρόθεσμες υπό συζήτηση που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, σε συνάρτηση με την πιθανή αντίστοιχη μεταγωγή σινιάλων (Surpin et al., 2002; Scheibe et al., 2005; Baier and Dietz, 2005), (επικοινωνία χλωροπλάστη-πυρήνα και ενεργές μορφές οξυγόνου).

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα μαρτυρούν εποχική διαφοροποίηση στα επίπεδα των μικρών RNAs (ποιοτική και ποσοτική διαφοροποίηση όσον αφορά τις τάξεις μεγέθους 20 nt και 25 nt siRNAs) στο χυμό του φλοιώματος σε διάφορα φυτά, τα οποία αποδίδονται πιθανότατα σε ανάλογες εποχικές διαφοροποιήσεις ως προς την ανάπτυξη και αντική άμυνα των φυτών (Yoo et al., 2004).

Έτσι μία άμεση μελλοντική προοπτική θα ήταν η αντίστοιχη σύγκριση των επιπέδων των μικρών RNAs (ποιοτικά και ποσοτικά πρότυπα-μοτίβα) κάτω από διαφορετικές συνθήκες φωτισμού (ένταση ή/και ποιότητα φωτός), απομονώνοντας όμως την επίδραση της θερμοκρασίας σε αντίθεση με την παραπάνω έρευνα. Επίσης, ο σχηματισμός διαφορετικών τύπων μικρών RNAs από διαφορετικές ομόλογες Dicers στα φυτά (Tang et al., 2003) (οι Dicer 1 και Dicer 3 είναι υπεύθυνες για την παραγωγή τάξης μεγέθους 21 nt και 24 nt siRNAs; Qi et al., 2005), καθώς επίσης και οι διαφορετικές κινητικές ενεργότητας των αντίστοιχων ενζύμων παρουσία/απουσία ATP (ATP εξαρτώμενη Dicer1 και ATP-ανεξάρτητη Dicer 3; Qi et al., 2005), μας υποχρεώνει να ελέγξουμε τα μετάγραφα και τις ενεργότητες αυτών των βασικών ενζύμων-κλειδιών του μηχανισμού στην πειραματική μας δομή. Επιπλέον, η εξάρτηση ενός μέλους της οικογένειας των Αργοναυτών από το φώς (AGO1), (Sorin et al., 2005) μας υποδεικνύει να σχεδιάσουμε ανάλογα πειράματα για την Ago1 καθώς θα ήταν ενδιαφέρον και η περίπτωση της RNA-εξαρτώμενης πολυμεράσης στην οποία αποδίδεται ο ρόλος του πολλαπλασιασμού και ενίσχυσης του σήματος σίγησης.

Βιβλιογραφία

- Allen, J.F. (2003) Botany. State transitions—a question of balance. *Science*, **299**, 1530-1532.
- Allen, J.F., and Pfannschmidt, T. (2000) Balancing the two photosystems: photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **355**, 1351-1359.
- Anderson, B., and Barber, J. (1996) Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: Baker, N.R., ed. *Photosynthesis and the environment*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 101–121.
- Asada, K. (1996) Radical production and scavenging in the chloroplasts. In: Baker, N.R., ed. *Photosynthesis and the environment*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 123–150.
- Asada, K. (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 601–639.
- Baier, M., and Dietz, K.-J. (2005) Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, **56 (416)**, 1449–1462.
- Bendall, D.S., and Manasse, R.S. (1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1229**, 23-38.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409(6818)**, 363–366.
- Brodersen, P., and Voinnet, O. (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, **22(5)**, 268-280.
- Bukhov, N., and Carpentier, R. (2004) Alternative Photosystem I-driven electron transport routes: mechanisms and functions. *Photosynthesis Research*, **82**, 17–33.

- Casazza, A.P., Tarantino, D., and Soave, C. (2001) Preparation and functional characterization of thylakoids from *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*, **68**, 175–180.
- Cazzonelli, C.I., and Velten, J. (2006) An in vivo, luciferase-based, *Agrobacterium*-infiltration assay system: implications for post-transcriptional gene silencing. *Planta*, **224(3)**, 582-597.
- Cruz, J.A., Avenson, T.J., Kanazawa, A., Takizawa, K., Edwards, G.E., and Kramer, D.M. (2005) Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. Light Stress in Plants: Mechanisms and Interactions Special Issue, *Journal of Experimental Botany*, **56(411)**, 395–406.
- Diner, B.A., and Babcock, G.T. (1996) Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in photosystem II. In: Ort, D.R., and Yocum, C.F. eds. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 213–247.
- Eskling, M., Emanuelsson, A., and Akerlund, H-E. (2001) Enzymes and mechanisms for violaxanthin-zeaxanthin conversion. In: Aro, E-M, and Anderson, B., eds. *Regulation of photosynthesis*, Vol. 100. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 806–816.
- Haldimann, P, and Tsimilli-Michael, M. (2002) Mercury inhibits the non-photochemical reduction of plastoquinone by exogenous NADPH and NADH: evidence from measurements of the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise in spinach chloroplasts. *Photosynthesis Research*, **74**, 37 – 50.
- Haldimann, P., and Strasser, R.J. (1999) Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise kinetic in pea (*Pisum sativum L.*). *Photosynthesis Research*, **62**, 67 – 83.
- Huner, N.P.A., Oquist, G., and Sarhan, F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science*, **3**, 224–230.
- Ioannidis, N.E., Sfichi, L., and Kotzabasis, K. (2006) Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1757(7)**, 821-828.

- Kalantidis, K., Psaradakis, S., Tabler, M., and Tsagris, M. (2002) The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Molecular plant-microbe interactions*, **15(8)**, 826-833.
- Kalantidis, K., Tsagris, M., and Tabler, M. (2006) Spontaneous short-range silencing of a GFP transgene in *Nicotiana benthamiana* is possibly mediated by small quantities of siRNA that do not trigger systemic silencing. *The Plant Journal*, **45(6)**, 1006-1016.
- Knaff, D.B. (1996) Ferredoxin and ferredoxin-dependent enzymes. In: Ort, D.R., and Yocum, C.F. eds. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 333–361.
- Kramer, D.M., and Crofts, A.R. (1996) Control of photosynthesis and measurement of photosynthetic reactions in intact plants. In: Baker, N., ed. *Photosynthesis and the environment advances in photosynthesis*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 25–66.
- Li, X.P., Gilmore, A.M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D., and Niyogi, K.K. (2004) Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 22866–22874.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305(5689)**, 1437–1441.
- Malkin, R. (1996) Photosystem I electron transfer reactions-components and kinetics. In: Ort, D.R., and Yocum, C.F. eds. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. The Netherlands: Kluwer Academic Press, 313-332.
- Maniatakis, E., and Mourelatos, Z. (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & Development*, **19**, 2979-2990.
- Matranga, C. and Zamore, P.D. (2004) Plant RNA interference *in vitro*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **69**, 403-408.
- Matzke, M.A., and Matzke, A.J.M. (2004) Planting the seeds of a new paradigm. *Plos Biology*, **2(5)**, 582-586.

- Maxwell, K., and Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, **51**, 659–668.
- McCarty, R.E. (1996) An overview of the function, composition and structure of the chloroplast ATP synthase. In: Ort, D.R., and Yocum, C.F. eds. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 439–451.
- Meins, F., Jr., Si-Ammour, A., and Blevins, T. (2005) RNA silencing system and their relevance to plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **21**, 297-318.
- Merchant, S., and Sawaya, M.R. (2005) The Light Reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery. *The Plant Cell*, **17**, 648–663.
- Mitchell, P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **41**, 445–502.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell.*, **2(4)**, 279-289.
- Nethra, P., Nataraja, K.N., Rama, N., and Udayakumar, M. (2006) Standardization of environmental conditions for induction and retention of post-transcriptional gene silencing using tobacco rattle virus vector. *Current Science*, **90(3)**, 431-435.
- Ort, D.R., and Yocum, C.F. (1996) Light reactions of oxygenic photosynthesis. In: Ort, D.R., Yocum, C.F., eds. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1–9.
- Per-Åke Albertsson (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends in Plant Science*, **6(8)**, 349-354.
- Pfanschmidt, T., Nilsson, A., and Allen, J.F. (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature*, **397**, 625–628.

- Pfannschmidt, T., Nilsson, A., Tullberg, A., Link, G., and Allen, J.F. (1999) Direct transcriptional control of the chloroplast genes psbA and psaAB adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants. *IUBMB Life*, **48(3)**, 271- 276.
- Pfannschmidt, T., Schutze, K., Brost, M., and Oelmüller, R. (2001) A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 36125–36130.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., and Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents-verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **975 (3)**, 384-394.
- Qi, Y., Denli, A.M., and Hannon, G.J. (2005) Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Molecular Cell*, **19**, 421-428.
- Qu, F., Ye, X., Hou, G., Sato, S., Clemente, T.E., and Morris, T.J. RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virology*, **79(24)**, 15209–15217.
- Romanowska, E., Drożak, A., Pokorska, B., Shiell, B.J., and Michalski, W.P. (2006) Organization and activity of photosystems in the mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Journal of Plant Physiology*, **163**, 607- 618.
- Sacksteder, C.A., Kanazawa, A., Jacoby, M.E., and Kramer, D.M. (2000) The proton to electron stoichiometry of steady-state photosynthesis in living plants: a proton-pumping Q-cycle is continuously engaged. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **97**, 14283–14288.
- Scheibe, R., Backhausen, J.E., Emmerlich, V., and Holtgreffe, S. (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *Journal of Experimental Botany*, **56(416)**, 1481–1489.

- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, **305**, 1434–1437.
- Sorin, C., Bussell, J.D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G., and Bellinia, C. (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *The Plant Cell*, **17**, 1343–1359.
- Sós-Hegedűs, A., Lovas, Á., Kondrák, M., Kovács, G., and Bánfalvi, Z. (2005) Active RNA silencing at low temperature indicates distinct pathways for antisense-mediated gene-silencing in potato. *Plant Molecular Biology*, **59**, 595–602.
- Stirbet, A., Govindjee, Strasser, B.J., and Strasser R.J. (1998) Chlorophyll a fluorescence in higher plants: modelling and numerical simulation. *Journal of Theoretical Biology*, **193**, 131 – 151.
- Strasser, B.J., and Strasser, R.J. (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In: Mathis, P., ed. *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Vol. 5. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 977–980.
- Surpin, M., Larkin, R.M., and Chory, J. (2002) Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *The Plant Cell*, **14**, S327–S338.
- Susi, P., Hohkuri, M., Wahlroos, T., and Kilby, N.J. (2004) Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Molecular Biology*, **54(2)**, 157-174.
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Bánfalvi, Z., and Burgyán, J. (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *The EMBO Journal*, **22(3)**, 633-640.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development*, **17**, 49-63.
- Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development*, **19**, 517-529.

- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P.D. (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, **306**, 1377–1380.
- Tournier, B., Tabler, M., and Kalantidis, K. (2006) Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP *Nicotiana benthamiana* plants. *The Plant Journal*, **47**, 383-384.
- Trebst, A. (1972) Measurement of Hill reactions and photoreduction. *Methods in Enzymology*, **24**, 146-165.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., de Lange, P., Mol, J.N., and Stuitje, A.R. (1990) Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Molecular Biology*, **14(4)**, 457-466.
- Vaucheret, H., Beclin, C., and Fagard, M. (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science*, **114**, 3083–3091.
- Voinnet, O. (2005) Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Letters*, **579**, 5858-5871.
- Walters, R.G. (2005) Towards an understanding of photosynthetic acclimation. Light Stress in Plants: Mechanisms and Interactions Special Issue, *Journal of Experimental Botany*, **56 (411)**, 435–447
- Walters, R.G., and Horton, P. (1994) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: Changes in composition of the photosynthetic apparatus. *Planta*, **195**, 248-256.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J., and Lucas, W.J. (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *The Plant Cell*, **16(8)**, 1979–2000.
- Zamore, P.D. (2001) RNA interference: listening to the sound of silence. *Nature Structural Biology*, **8**, 746–750.
- Zhou, X., Carranco, R., Vitha, S., and Hall, T.C. (2005) The dark side of green fluorescent protein. *New Phytologist*, **168**, 313–322.

