#### Εισαγωγή

Η φωτοσύνθεση είναι η διαδικασία εκείνη που εξασφαλίζει την συνεχή ροή ενέργειας στην βιόσφαιρα, είναι ο μηχανισμός μετατροπής της ηλιακής ενέργειας σε χημική και στη συνέχεια σε οργανική ύλη. Ειδικά ο σχηματισμός των χλωροφυλλών μάλλον αποτελεί την μεγαλύτερη βιοσυνθετική διαδικασία στη γη και εκτιμάται σε πάνω από 10<sup>10</sup> metric tn ετησίως [Henry et al., 1987]. Η ενέργεια αυτή των "παραγωγών" οργανισμών, εξασφαλίζει τη διατήρηση των ανώτερων τροφικών επιπέδων του γήινου οικοσυστήματος τα οποία συγκροτούνται από οργανισμούς που μπορούν μόνο να μεταβολίσουν οργανική ύλη ("καταναλωτές") και όχι να τη συνθέσουν από ανόργανη όπως οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί.

Ο χλωροπλάστης είναι το κατεξοχήν οργανίδιο της φωτοσύνθεσης και οφείλει το όνομα του αλλά και τις ιδιότητες του κυρίως στις πράσινες χρωστικές (χλωροφύλλες) που συσσωρεύει. Η δομή ενός ώριμου χλωροπλάστη φαίνεται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1. Χλωροπλάστης κατινού Nicotiana tabacum σε εγκάρσια διατομη που διακρίνονται τα grana, τα θυλακοειδή, το στρώμα και κόκκοι αμύλου. Μεγέθυνση 196.000. Το οργανίδιο αυτό εκτός από το διπλό μεμβρανικό φάκελλο που το περιβάλλει έχει και ένα άλλο εσωτερικό σύστημα μεμβρανών. Πιο συγκεκριμένα, στο χλωροπλάστη απαντάται ένα σύστημα συζευγμένων μεμβρανών, τα θυλακοειδή, το οποίο περιβάλλεται από το "θεμελιώδες" υλικό, το στρώμα. 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 CO2 ("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 (σχήμα 3). Ενώ το σύμπλοκο του PS II βρίσκεται κυρίως στα θυλακοειδή των grana, το PS I και η ΑΤΡ συνθάση εντοπίζονται κυρίως στα θυλακοειδή του στρώματος. Παρ' ότι τα φωτοσυνθετικά σύμπλοκα βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία των θυλακοειδών μεμβρανών, λειτουργούν συντονισμένα, σαν μια μονάδα. Το παρακάτω σχήμα παρουσιάζει το είδος και τη σχετική σειρά των βιοχημικών ενδιαμέσων που συμβάλλουν στην απορρόφηση της ενέργειας του φωτός και στην μετατροπή της σε χημική ενέργεια.



Σχήμα 2. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το νερό στο NADPH.



Σχήμα 3. Λεπτή δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

#### Η ανάπτυξη του χλωροπλάστη (παρουσία ή απουσία φωτός)

Η διαδικασία μετάβασης του πλαστιδίου από το στάδιο του μη λειτουργικού φωτοσυνθετικά οργανιδίου (ωχροπλάστης) στην τελική μορφή της πλήρους ωρίμανσης και κατά συνέπεια λειτουργικότητας (χλωροπλάστης) ορίζεται ως η αναπτύξη του χλωροπλάστη. Στο σχήμα 4 φαίνονται τα στάδια της μετάβασης του οργανιδίου από την ανώριμη στην ώριμη κατάσταση. Πιο αναλυτικά, οι ωχροπλάστες των αγγειόσπερμων φυτών δεν έχουν θυλακοειδή αλλά ομάδες σωληνοειδών σχηματισμών κυκλικής διάταξης και μεμβρανικής φύσης (PLB: prolamellar bodies: προελασματοειδή σωμάτια) καθώς και επιμηκυσμένες μεμβράνες (προθυλακοειδή) που εκτείνονται μεταξύ του χλωροπλαστικού φακέλλου και των παραπάνω σωματίων. Αντίθετα υπάρχουν οργανισμοί όπως είναι τα πράσινα φύκια και τα γυμνόσπερμα φυτά που τα πλαστίδια τους ωριμάζουν ως το στάδιο του χλωροπλάστη ακόμη και απουσία φωτός και συνεπώς δεν εμφανίζουν δομές αντίστοιχες των προελασματοειδών σωματίων. Η βιοσύνθεση των χλωροφυλλών στα αγγειόσπερμα σταματά στο επίπεδο του πρωτοχλωροφυλλιδίου και μόνο μέσω φωτισμού μπορεί αυτό το ενδιάμεσο του βιοσυνθετικού μονοπατιού να μετατραπεί σε χλωροφυλλίδιο και στη συνέχεια σε χλωροφύλλη [Ruediger και Schoch, 1988, Senger και Brinkmann, 1986]. Γενικά, η βιοσύνθεση των χλωροφυλλών (δηλαδή η αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο) συνδυάζεται με τον μετασχηματισμό των προελασματοειδών



Σχήμα 4. Η ανάπτυξη του χλωροπλάστη.

σωματίων σε πιο επιμηκυσμένες δομές ώσπου να σχηματιστούν τα θυλακοειδή και τα grana. [Wellburn et al., 1980]. 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 πρασίνα και στο σκοτάδι αφού έχουν χλωροπλάστες. Η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης ξεκινά από το γλουταμικό, μέσω ενός περίπλοκου μονοπατιού (C<sub>5</sub>-pathway), το οποίο αποτελείται τουλάχιστο από δεκαπέντε ενζυμικά βήματα [Wettstein at al., 1995; Reinbothe S. and Reinbothe C., 1996] (σχήμα 5).



## Σχήμα 5. Στο σχήμα φαίνεται η πορεία βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης καθως 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 και Brinkmann 1980] ЗЦ αποτέλεσμα тην συσσώρευση TOU πρωτοχλωροφυλλιδίου στους ωχροπλάστες. Ένα από τα κύρια στάδια στη βιοσύνθεση χλωροφύλλης αποτελεί αναγωγή της ŋ TOU πρωτοχλωροφυλλιδίου (Pchlide) σε χλωροφυλλίδιο (Chlide) (σχήμα 6). Στο στάδιο αυτό, ένας από τους πυρρολικούς δακτυλίους (D δακτύλιος) του

μορίου του Pchlide, ανάγεται με τη βοήθεια του ενζύμου Pchlide oxidoreductase (POR), στις θέσεις 17 και 18, σχηματίζοντας το Chlide. Η αναγωγή αυτή ρυθμίζεται άμεσα από το φως [Griffiths et al., 1978 Apel et al., 1980]. Ειδικά για το μετάλλαγμα C-2Α΄ έχει βρεθεί ότι μειώνοντας την θερμοκρασία επώασης τους 33°C στους 15-20°C από то 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. Εχει προταθεί ότι η αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου οφείλεται σε μία αλλαγή στερεοδιαμόρφωσης της οξειδοαναγωγάσης του λόγω της μείωσης της θερμοκρασίας (Oh-Hama et al 1987).



# Σχήμα 6. Αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο. Η αντίδραση καταλύεται από την οξειδοαναγωγάση του πρωτοχλωροφυλλιδίου (από Fujita Y., 1995).

Αυτή η ενζυμική διαδικασία περιλαμβάνει πολλά, αλλά σύντομα, βήματα, στη διάρκεια των οποίων συμβαίνει εναλλαγή διαφόρων ενδιαμέσων, μέχρι να σχηματιστεί το τελικό, σταθερότερο Chlide, το οποίο στη συνέχεια με την προσθήκη μιας φυτόλης θα δώσει τη χλωροφύλλη. Στο σχήμα 7 απεικονίζονται τα διαφορετικά αυτά στάδια όπως προτάθηκαν από τους Schulz και Senger (1993).



Σχήμα 7. Η φωτομετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο (E, protochlorophyllide oxidoreductase). Τα μήκη κύματος που σημειώνονται αναφέρονται στις διαφορετικές φασματικές μορφές των χρωστικών (Aπó Schulz and Senger, 1993)

Η τελική κατάλυση έχει προταθεί ως το ρυθμιστικό στάδιο που θα καθορίσει το πότε θα ωριμάσει το οργανίδιο. Οι Brinkmann και Senger то 1980 δημοσίευσαν δράσης ÓΤΙ то φάσμα για тην αναγωγή TOU πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο είναι σχεδόν πανομοιότυπο με το φάσμα απορρόφησης του πρωτοχλωροφυλλιδίου οπότε το πρωτοχλωροφυλλίδιο είναι ο πρωτογενής φωτοϋποδοχέας που ενεργοποιεί την ίδια φωτομετατροπή. Προτάθηκε λοιπόν ÓΤΙ то ίδιο TOU тην то πρωτοχλωροφυλλίδιο είναι ο φωτοϋποδοχέας γι'αυτή τη μετατροπή του ωχροπλάστη σε χλωροπλάστη.

Με την έναρξη της βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης (φωτομετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο) αρχίζει και η μεταγραφή και μετάφραση πυρηνικών και χλωροπλαστικών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού [Barkan et al., 1995; Morishige D.T., 1995]. Ύστερα από μεταφραστικές και μετα-μεταφραστικές 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 και Friedmann 1993]. Για την περίπτωση της φωτοανεξάρτητης αναγωγής του

πρωτοχλωροφυλλιδίου έχουν γίνει ήδη κάποιες έρευνες από τους Oh-Hama et al (1987) και κατέληξαν στο ότι μεμβράνες προθυλακοειδών από κύτταρα που αναπτύχθηκαν στους 20° C εμφανίζουν ικανότητα αναγωγής του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο ενώ δεν ισχύει το ίδιο για κύτταρα που επωάστηκαν σε υψηλότερες θερμοκρασίες (30° C). Οι ίδιοι ερευνητές προτείνουν ότι είτε υπάρχει κάποιος ενεργοποιητής της NADPH:POR ή είτε υπάρχει ένα άλλο ενζυμικό σύστημα που ενεργοποιείται από τις χαμηλές θερμοκρασίες όπως από το φως.

αναγωγή του Η οξειδοαναγωγάση του πρωτοχλωροφυλλιδίου: Η χλωροφυλλίδιο πρωτοχλωροφυλλιδίου σε μπορεί να καταλυθεί φωτοεξαρτώμενα ή φωτοανεξάρτητα. Η φωτοεξαρτώμενη επιτελείται από το protochlorophyllide ένζυμο LPOR (light depedent oxidoreductase: οξειδοαναγωγάση του πρωτοχλωροφυλλιδίου)[Griffiths et al., 1978 Apel et al,. 1980].Το LPOR αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα και υπάρχει σε μεγάλα ποσά στους ωχροπλάστες, σαν σύμπλοκο με τα δύο υποστρώματά του, το NADPH και το Pchlide. Το ίδιο το Pchlide που βρίσκεται δεσμευμένο στο ένζυμο λειτουργεί και σαν φωτοϋποδοχέας για την αντίδραση της αναγωγής του. Με απορρόφηση της φωτεινής ενέργειας από το Pchlide, το μόριό του διεγείρεται (ενεργό Pchlide) και ο διπλός δεσμός του άνθρακα 18, με τη βοήθεια του ενζύμου, ανάγεται από το NADPH σχηματίζοντας Chlide, το οποίο δίνει άμεσα τη χλωροφύλλη. Έχει προταθεί ότι η LPOR είναι μια φλαβοπρωτεΐνη. Εντούτοις, ο ρόλος του FAD στην αντίδραση που καταλύει το ένζυμο παραμένει άγνωστος.

Το γονίδιο του ενζύμου είναι πυρηνικό. Η LPOR συντίθεται σαν πρόδρομο μόριο, με μια αμινοτελική ουρά που λειτουργεί σαν οδηγό-πεπτίδιο για την εισαγωγή του ενζύμου στα πλαστίδια. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο ισοένζυμα της LPOR, το POR-A και το POR-B. Σε γενικές γραμμές φαίνεται πως τα δύο ισοένζυμα έχουν λειτουργικές διαφορές μεταξύ τους: σε ωχροπλάστες η POR-A υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες, ενώ με την έναρξη του φωτισμού η ενεργότητά της μειώνεται για να εξαφανιστεί μέσα σε 24 ώρες [διασπάται μέσω μιας φωτοεπαγώμενης πρωτεάσης [Apel et al., 1995]. Η POR-B παραμένει σε μικρότερο, αλλά σταθερό επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια του πρασινίσματος των φυτών [Armstrong et al., 1995, Hiltorf et al., 1995]. Η είσοδος της pPOR-A στα πλαστίδια εξαρτάται από την ύπαρξη του Pchlide

(αύξηση του ενδογενούς Pchlide αυξάνει την είσοδο του ενζύμου στο χλωροπλάστη) [Reinbothe et al., 1997], ενώ η pPOR-B εισέρχεται στον χλωροπλάστη άσχετα με την παρουσία ή απουσία του Pchlide. Επίσης η POR-A εντοπίζεται στα προελασματοειδή σωμάτια των ωχροπλαστών και στα προθυλακοειδή, ενώ η POR-B στον μεμβρανικό φάκελο ωχρο- και χλωροπλαστών [Armstrong et al., 1995).

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 Y., 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 C., Wang W., 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 συμπαράγοντα/συμπαραγόντων, 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 ιόντα (Ca<sup>2+</sup>) αυξάνουν την ενεργότητά του.

Το σύμπλοκο POR-Pchlide: Είναι γενικά γνωστό ότι οι ωχροπλάστες περιέχουν τρείς φασματοσκοπικά διαφορετικές μορφές του συμπλόκου του Pchlide [Schulz R. and Senger H., 1993; Sundqvist and Dahlin, 1997]: Pchlide<sub>628-632</sub>, Pchlide<sub>636-657</sub>, και Pchlide<sub>650-657</sub>. Τα δύο τελευταία (Pchlide<sub>636-657</sub>, και Pchlide<sub>650-657</sub>) αποτελούν σύμπλοκο με την POR, και με το φως ανάγονται εύκολα σε Chlide, ενώ το πρώτο (Pchlide<sub>628-632</sub>), 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 Pchlide, 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 συνδεμένο με τη μεμβράνη, αλλά δεν είναι διαμεμβρανικό [Birve et al., 1996].

# Ο ρόλος των πολυαμινών στον σχηματισμό του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

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) (σχήμα 8):

Put = 1,4-butanediamine [Putrescine]

Spd =  $N^{1}$ -(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine [Spermidine]

Spm = N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis(3-aminopropyI)-1,4-butanediamine [Spermine]



## Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής δομής των κύριων πολυαμινών [Seiler et. al, 1997].

Γενικά, οι πολυαμίνες είναι πολυκατιοντικά μόρια υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η δράση τους σε πολλές περιπτώσεις φαίνεται να οφείλεται στο φορτίο τους. Τα πρωτόνιά τους ευνούν τον σχηματισμό ηλεκτροστατικών δυνάμεων με τις οποίες προσδένονται σε νουκλεϊκά οξέα [Flink and Pettijohn, 1975], πρωτεΐνες [Apelbaum et al., 1988] και φωσφολιπίδια [Chapel et al., 1984]. Έχει επίσης αναφερθεί και ο σχηματισμός ομοιοπολικών δυνάμεων μεταξύ πολυαμινών και πρωτεϊνών.

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] και η απόκριση σε περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το stress [Galston et al., 1996]. Σε κυτταρικό επίπεδο, οι λειτουργίες αυτές μεταφράζονται σε σταθεροποίηση μεμβρανών, παρεμποδισμό 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 RNAάσες και οι πρωτεάσες, και ελέγχουν τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου στο επίπεδο της ACC συνθάσης [Tiburcio et al., 1997].

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* [Torrigiani 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 συνδεμένες σε υποσύμπολοκα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, όπως το LHC και το PS II. Ο πυρήνας (PS IIcore) και το κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II, περιέχουν πρωτίστως την τετραμίνη Spm, σε μεγάλη συγκέντρωση [Kotzabasis et al., 1993].

Ο Del Duka και οι συνεργάτες του (1994), έδειξαν ότι υπάρχει ενδοπλαστιδιακή τρανσγλουταμινάση, η οποία καταλύει και την σύζευξη των πολυαμινών, στις μεμβράνες των θυλακοειδών και στις πρωτεΐνες του στρώματος, ενεργοποιείται από το φως, και από ιόντα Ca<sup>2+</sup>. Υποστρώματα

αυτού του ενζύμου αποτελούν οι αποπρωτεΐνες του συμπλόκου της κεραίας χλωροφύλλης α/β (LHC II, CP 24, CP 26, CP 29), καθώς και η μεγάλη υπομονάδα της Rubisco.

Οι ενθαρρυντικές αυτές ενδείξεις απαίτησαν, όπως ήταν φυσικό, μια πιο προσεκτική έρευνα, η οποία ξεκίνησε με την διερεύνηση του τρόπου δράσης των πολυαμινών. Στο πλαίσιο αυτό, με εξωγενή ρύθμιση του επιπέδου των πολυαμινών (προσθήκη εξωγενών πολυαμινών και χρήση αναστολέων της βιοσύνθεσής τους) βρέθηκε, ότι διαφοροποίηση του επιπέδου των πολυαμινών (μείωση της πουτρεσίνης ή αύξηση της σπερμίνης) παρεμποδίζει την αποδόμηση πρωτεϊνών και την απώλεια χλωροφύλλης και σταθεροποιούν τις μεμβράνες των θυλακοειδών [Besford et al., 1993]. Πρωτεΐνες στις οποίες εντοπίστηκε κυρίως αυτή η δράση των πολυαμινών, είναι οι D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, Cyt f και η μεγάλη υπομονάδα της Rubisco.

Πολλά από τα πειράματα, στη συνέχεια, έγιναν με το μονοκύτταρο χλωροφύκος Scenedesmus obliguus και το μεταλλαγμένο του στέλεχος, C-2Α', 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]. Αντίστοιχα, μείωση του ενδοκυτταρικού επιπέδου της Spd και της Spm, είχε επίδραση μόνο στην φωτοεξαρτώμενη βιοσύνθεση της χλωροφύλλης (ένζυμο LPOR) [Beigbeder et al., 1995]. Τα δεδομένα αυτά, συμφωνούν με προηγούμενη αναφορά, κατά την οποία, σε συγχρονισμένες καλλιέργειες του χλωροφύκους, το μέγιστο των συζευγμένων πολυαμινών στον κυτταρικό κύκλο, εμφανίζεται ταυτόχρονα με την μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα [Kotzabasis and Senger, 1994].

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 DAO [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]. Πρόσφατες μελέτες των Kotzabasis et al (1999) καταλήγουν στο ότι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα πολυαμινών φωτορυθμίζονται. Μάλιστα προτείνουν ότι δύο συστήματα φωτοϋποδοχέων για αυτή την ρύθμιση: έναν φωτοϋποδοχέα κυανού φωτός (πρωτοχλωροφυλλίδιο) ο οποίος ρυθμίζει την μείωση των πολυαμινών κατά την ωρίμανση του χλωροπλάστη και έναν υποδοχέα ερυθρού/κυανού φωτός (κέντρο αντίδρασης φωτοσυστήματος ΙΙ) για την ρύθμιση της αύξησης των πολυαμινών στα πράσινα κύτταρα. Μολονότι, η φωτοανάπτυξη του χλωροπλάστη και η μείωση των πολυαμινών πιθανόν να έχουν τον ίδιο πρωτογενή φωτοϋποδοχέα φαίνεται ότι η μείωση των πολυαμινών δεν συμμετέχει άμεσα στην αλυσίδα μεταφοράς σήματος ενώ φαίνεται να συμμετέχουν ετεροτριμερείς G-πρωτεϊνες. Ο πιο πιθανός ρόλος για την επίδραση των πολυαμινών στην ωρίμανση του χλωροπλάστη αφορά την σταθεροποίηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μέσω της αυξομείωσης των επιπέδων τους. Όλα τα παραπάνω, συνεπώς, συνηγορούν στην ανάληψη ενός ζωτικού ρόλου από τις πολυαμίνες στους χλωροπλάστες, και στη διαδικασία φωτοανάπτυξης αυτών.

Για το λόγο αυτό, δρομολογήθηκε η παρούσα έρευνα, η οποία σκοπό έχει, να εξετάσει την επίδραση του επιπέδου των πολυαμινών στη φωτοελεγχόμενη και φωτοανεξάρτητη μετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο και στην ανάπτυξη του χλωροπλάστη.

#### Υλικά και μέθοδοι

#### Οργανισμός και συνθήκες καλλιέργειας

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το μετάλλαγμα C-2A΄ του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus. Η φυλογενετική του ταξινόμηση είναι η εξής:

Οικογένεια : Χλωροφύκη (Chlorophyceae)Γένος: ScenedesmusΥπογένος: AcutodesmusΕίδος: Obliquus

Ο οργανισμός αυτός είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός, με διάμετρο κυττάρου περίπου 2 μm. Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις 20 ώρες. Στη διάρκεια αυτή, διαιρείται μία φορά δίνοντας 8 θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως, αποκόπτονται 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 ενεργά φωτοσυστήματα Ι και ΙΙ (εφ' όσον του παρέχεται κάποια πηγή οργανικού άνθρακα στο θρεπτικό μέσο).

Πολύ μεγάλη βοήθεια στην έρευνα της Φωτοσύνθεσης, έχει προσφέρει η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών των φωτοσυνθετικών οργανισμών. Το μεταλλαγμένο στέλεχος του *Scenedesmus obliquus*, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι το <u>C-2A΄</u>: Προέκυψε το 1972 μετά από ακτινοβόληση του άγριου τύπου (Bishop 1972) και συμπεριφέρεται όπως και τα αγγειόσπερμα 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 μεχανισμό. Με την έκθεση του στο φως μετατρέπεται το πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο και αρχίζει η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης και η διαμόρφωση του φωτοσυνθετικά ενεργού χλωροπλάστη [Wellburn et al., 1980; Brinkmann and Senger, 1978].

Η ανάπτυξη του οργανισμού έγινε σε ετερότροφες καλλιέργειες. Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο του οποίου η σύσταση φαίνεται στον πίνακα Ι, εμπλουτισμένο με 0.5% (w/v) D<sup>+</sup>-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 Erlenmeyer 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 συνθήκες green safe light. Πολλαπλά δείγματα, που πάρθηκαν τiς αναλύσεις πολυαμινών, χλωροφυλλών και western blot, για αποθηκεύτηκαν σαν ιζήματα, στους -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

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

Πίνακας Ι: Θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus

#### Υπολογισμός κυτταρικής συγκέντρωσης

Δείγματα 5ml από τις καλλιέργειες φυκών φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά 1500g προκειμένου να καθιζήσουν σε βαθμολογημένο υαλοσωλήνα [Senger&Brinkmann, 1986]. Η εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης γίνεται με ακρίβεια 0,025 ml.

#### Ανάλυση των χρωστικών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των χλωροφυλλών α, β και πρωτοχλωροφυλλιδίου έγινε φασματοφωτομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο των Brouers and Wolwertz (1983). Σε ιζήματα κυττάρων από 5ml καλλιέργειας, έγινε εκχύλιση των χρωστικών με προσθήκη ζεστής μεθανόλης (70°C). Το εκχύλισμα φυγοκεντρίθηκε 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) [nmole] = -4.37(E664)-7.44(E647)+33.67(E626)Chl(ide) a [nmole] = 13,16(E664)-2,63(E647)+0,23(E626)Chl(ide) b [nmole] = -4,95(E664)+25,24(E647)-2,29(E626)

#### Ηλεκτροφόρηση και ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών

Η προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση έγινε μετά από επώαση κυτταρικών δειγμάτων στους 100°C για 15 min με ρυθμιστικό διάλυμα (0.125M Tris pH 6,8, 20%Glycerol, 4%SDS, 10% mercaptoethanol). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (10%) συμφωνά με τη μέθοδο του Laemmli (1970) με ελάχιστες αλλαγές. Οι πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των μοριακών βαρών των αγνώστων πρωτεϊνών ειναι οι: αλβουμίνη από ορό βοδιού (66kD), ωοαλβουμίνη (45kD), πεψίνη (34,7kD), θρυψινογόνο (24kD), β-λακτοσφαιρινη (18,4kD) και η λυσοζύμη (14,3kD). Τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό ακολούθησε ηλεκτροφορητική μεταφορά σε νιτροκυτταρίνη (2.45 μm Biotrace NT 66485 Gelman Sciences) σύμφωνα με την μέθοδο των Schmid και Schaefer (1976). Η ανοσοανίχνευση έγινε με δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση. Η πυκνότητα του σήματος στη νιτροκυτταρίνη υπολογίστηκε με laser scaner και η ψηφιακή ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα Kodak Digital analyser 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak Company, Rochester, NY).

#### Ενεργότητα της οξειδοαναγωγάσης του πρωτοχλωροφυλλιδίου

Ο υπολογισμός της ενεργότητας της POR έγινε με επεξεργασία δεδομένων από το φάσμα εκπομπής φθορισμού (580–750nm) σε φθοροφωτόμετρο Perkin Elmer LS 50B 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 650nm (Helium-Neon laser έντασης 30μmole m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) σε δείγματα τα οποία πριν και μετά από φωτισμό εκχυλίστηκαν σε 2,5ml ακετόνη. Η ενεργότητα της POR καταγράφεται σαν αύξηση του χλωροφυλλιδίου στα 10 sec ανά όγκο

κυττάρων (Packed Cell Volume). Κρίθηκε σκόπιμο να αφαιρεθεί σε κάθε τιμή φθορισμού ο θόρυβος που οφείλεται στην απορρόφηση του εκχυλίσματος. Για αυτό το σκοπό φυγοκεντρήθηκαν δείγματα για 5 min στα 12.000 g και ελήφθησαν φάσματα εκπομπής με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Στο παρακάτω σχήμα με το βέλος παρουσιάζεται η διαφορά η οποία χρησιμοποιείται στον υπολογισμό της φωτομετατροπής καθώς και η απορρόφηση του απαλλάγμένου από κύτταρα διαλύματος (baseline).



Φάσματα εκπομπής φθορισμού εκχυλισμάτων χρωστικών (95% ακετόνη) από δείγματα καλλιεργειών C-2A΄. Η διέγερση των χρωστικών έγινε με ακτινοβολία μήκους κύματος 430nm. (\_\_\_\_ φάσμα χρωστικών πρίν τον παλμό φωτός, ..... φάσμα χρωστικών μετά τον παλμό φωτός .\_. baseline).

#### Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών

Οι συνολικές πρωτεΐνες στα δείγματα των κυττάρων και στα θυλακοειδή μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (1976), όπως προτείνεται και από τους Jones et al., (1989).

#### Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού

Οι μετρησείς του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη συσκευή της Hansatech Instruments Plant Efficiency Analyser (PEA) 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 Fv/Fm που συνδέεται ανάλογα με τη φωτοσυνθετική απόδοση σύμφωνα με τη μέθοδο Strasser and Strasser (1995) . Επίσης με εφαρμογή του JIP TEST για τιμές φθορισμού που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια (J, I και P) υπολογίστηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όπως το σχετικό μέγεθος φωτοσυνθετικής κεραίας (ABS/RC), η απόδοση (Ψο=ETo/TRo) με την οποία ένα παγιδευμένο φωτόνιο μπορεί να κινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την QA, η πιθανότητα να μετακινηθεί ένα ηλεκτρόνιο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETo/TRo) η μέγιστη τιμή ενεργειάκης διάχυσης στη δεξαμενή πλαστοκινόνης (**q**<sub>PQ</sub>), η κβαντική απόδοση της φωτοχημείας του PS II (**φ**PO) και οι δείκτες ευρωστίας (SFI abs) και επίδοσης (Performance Index). Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit αναλύση και η διέγερση έγινε από 6 διόδους φωτισμού (LEDs) οι οποίες έχουν ένταση ακτινοβολίας μέχρι 600Wm<sup>-2</sup> ερυθρού φωτός (630nm). Πιο συγκεκριμένα η καμπύλη επαγωγικού φθορισμού ονομάζεται και καμπύλη Kautsky. Τα διαφορετικά βήματα σημειώνονται με γραμματα Ο Ι D P S M T. Η αύξηση του φθορισμού από το Ο στο Ρ λαβαίνει χώρα στο πρώτο δευτερόλεπτο της ακτινοβόλησης και ονομάζεται γρήγορη φάση. Η αργή φάση ακολουθεί μετά το Ρ και ίσως χρειαστούν μερικά λεπτά μέχρι την τελική φάση Τ. Στο σχήμα 2 φαίνεται που αντιστοιχεί το κάθε βήμα της καμπύλης και με τη χρήση της μεθόδου Strasser και Strasser (1995) για τις τιμές φθορισμού συγκεκριμένων χρόνων υπολογίζουμε τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στον πίνακα 2 συγκεντρώνουμε τις πιο σημαντικές παραμέτρους.



Σχήμα 2. Κινητική επαγωγικού φθορισμού χλωροφύλλης α και οι αντίστοιχες αντιδράσεις στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων: Ο I D P S M Τ:διακριτές φάσεις φθορισμού, hv: φωτόνιο, LHC I & ΙΙ:σύμπλοκα αποκομιδής φωτός φωτοσυστημάτων I & ΙΙ,  $P_{680}$  &  $P_{700}$ : κέντρα αντίδρασης φωτοσυστημάτων I & ΙΙ,  $e^-$ : ηλεκτρόνιο,  $Z^+$ :αποβολή ηλεκτρονίου από το σύστημα φωτόλυσης νερού, H<sup>+</sup>:πρωτόνιο, Ι:ενδιάμεσος δέκτης, φαιοφυτίνη α,  $Q_A$ :πρωτογενής δέκτης του PS II (πλαστοκινόνη),  $Q_B$ :δευτερογενής δέκτης του PS II, PQH<sub>2</sub>:ανηγμένη πλαστοκινόνη, Cytb<sub>6</sub>f:κυτόχρωμα f/b<sub>6</sub>, PC:πλαστοκυανίνη, ChI<sup>-</sup>: ενδιάμεσος δέκτης ηλεκτρονίων του PS I

Τιμές φθορισμού			
Fo	F <sub>50µs</sub> , ένταση φθορισμού στα 50µs		
F <sub>150</sub>	ένταση φθορισμού στα 150μs		
F <sub>300</sub>	ένταση φθορισμού στα 300μs		
FJ	ένταση φθορισμού στο στάδιο J		
F <sub>M</sub>	μέγιστη ένταση φθορισμού		
M <sub>o</sub> ή (dV/dt) <sub>o</sub>	4(F <sub>300</sub> -F <sub>o</sub> )/(F <sub>M</sub> -F <sub>o</sub> )		
Κβαντικές αποδόσεις			
φ <sub>Po</sub> ή TRo/ABS	$(1-F_o/F_M)=F_V/F_M$		
φ <sub>Eo</sub> ή ETo/ABS	$(1-F_o/F_M)\psi_o$		
Ψ₀ ή ETo/TRo	1-V <sub>J</sub>		
Ενεργότητες ανά κέντρο			
αντίδρασης	(1+K)M <sub>o</sub> (1/V <sub>J</sub> )(1/φ <sub>po</sub> )		
ABS/RC	$(1+K)M_{0}(1/V_{1})(1/W_{0})$		
TRo/RC	(ABS/CS)/(ABS/RC)		
DIo/RC			
Γενικοί Δείκτες			
Pl <sub>ABS</sub> Δείκτης απόδοσης	(RC/ABS)[ φ <sub>Po</sub> /1- φ <sub>Po</sub> ][ ψ₀/1- ψ₀]		
(Performance Index)			
SFI <sub>ABS</sub> Δείκτης πρωτογενούς	(1- φ <sub>Po</sub> )( 1- ψ <sub>o</sub> )		
Φωτοχημείας			

Πίνακας 2. Εξισώσεις από το JIP TEST των Strasser&Strasser (1995)

#### Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των πολυαμινών

ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των κύριων πολυαμινών Н (πουτρεσίνης, σπερμίνης και σπερμιδίνης) στα κύτταρα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Kotzabasis et al. (1993). Οι πολυαμίνες ανιχνεύτηκαν ως βενζυλιωμένα παράγωγα με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Aπόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Н προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε τη φυγοκέντριση 5ml της καλλιέργειας (5 min, 1400g) και προσθήκη στο ίζημα 200μl 1 N NaOH. Στη συνέχεια, καλή ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 20 min σε 0°C. Ακολούθησε προσθήκη 200μΙ 36% ΗCΙ και τα δείγματα υδρολύθηκαν στους 110°C, για 18 h. Μετά από εξάτμιση των υπερκειμένων στους 80°C, τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 300μl 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 10μl Benzoyl Chloride. Μετά από ισχυρή ανάδευση και επώαση για 20min στους 25°C, προστέθηκαν 2ml κορεσμένου διαλύματος NaCl και εκχυλίστηκαν οι πολυαμίνες σε 2.5ml διεθυλαιθέρα, ο οποίος συλλέχθηκε και εξατμίστηκε σε υδατόλουτρο στους 60°C. Οι βενζυλιωμένες πλέον πολυαμίνες επαναδιαλύθηκαν σε 200μl 63% (v/v) μεθανόλης (HPLC grade).

Η ανάλυση σε HPLC, έγινε με τη χρησιμοποίηση στήλης narrow bore C-18 (2.1 mm × 200 mm, 5 μm Hypersil, Hewlett Packard) και ένα σύστημα δύο διαλυτών που περιλάμβανε μια διαβάθμιση μεθανόλης (55%-84%, v/v). Η καταγραφή των αποτελεσμάτων έγινε με την χρησιμοποίηση ενός DPU multichannel integrator και ενός συστήματος diode array (Hewlett Packard), το οποίο διευκολύνει τον χαρακτηρισμό κάθε πολυαμίνης με μεγάλη επαναληψιμότητα μεταξύ των δειγμάτων.

#### Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών

Μετά τη μηχανική ρήξη των κυτταρικών τοιχωμάτων από γυάλινες σφαίρες (0.5mm) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού pH=7 τα εκχυλίσματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στα 500g σύμφωνα με τη μέθοδο των Kotzabasis et al 1986) προκειμένου να πέσουν τα άσπαστα κύτταρα. Στη

συνέχεια φυγοκεντρούμε το υπερκείμενο στα 10.000g για 45 λεπτά και στη συνέχεια απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Με τη βοήθεια ενός πινέλου παίρνουμε προσεχτικά την υπερκείμενη στοιβάδα (μεμβράνες θυλακοειδών) και επαναδιαλύουμε σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 20mM pH=7 ρυθμισμένο με KOH.

#### Αποτελέσματα & Συζήτηση

Η κατανόηση του μηχανισμού φωτοανάπτυξης του χλωροπλάστη αποτελεί σύγχρονο ερευνητικό στόχο. Ένα καθοριστικό βήμα στην μετάβαση του ωχροπλάστη σε χλωροπλάστη είναι ο σχηματισμός των χρωστικών (κυρίως Chl a και Chl b) που θα χρησιμεύσουν στη δόμηση της φωτοσυνθετικής μηχανής (Cytbef, PS I, PS II, LHC)[Wollaman et al, 1999]. Την σημαντική αυτή κατάλυση TOU προδρόμου των χρωστικών (πρωτοχλωροφυλλίδιο) την επιτελεί n οξειδοαναγωγάση TOU πρωτοχλωροφυλλιδίου (Protochlorophyllide Oxidoreductase POR E.C, 1.3.1.33). Το ένζυμο αυτό δεσμεύει ένα μόριο πρωτοχλωροφυλλιδίου και μαζί με τον συμπαράγοντα NADPH αποτελούν το ενεργό πρωτοχλωροφυλλιδίο (POR:Pchlide:NADPH) δηλαδή το σύμπλοκο το οποίο όταν ακτινοβοληθεί έχει τη δυνατότητα να ανάγει το πρωτοχλωροφυλλίδιο. Εκτός από τα δεσμευμένα μόρια πρωτοχλωροφυλλιδίου στο πλαστίδιο υπάρχουν και ελεύθερα μόρια. Μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι η ύπαρξη ελεύθερου πρωτοχλωροφυλλιδίου στον ωχροπλάστη επάγει την είσοδο της οξειδοαναγωγάσης στο πλαστίδιο [Reinbothe et al., 1997]. Επίσης το ελεύθερο πρωτοχλωροφυλλίδιο έχει βρεθεί ότι μπλοκάρει την ίδια του την βιοσύνθεση στα αρχικά της στάδια επιδρώντας στην λιγάση που συνδέει το γλουταμικό στο tRNA [Doernemann et al., 1989].

Προκειμένου να μελετήσουμε την ΝΑDPH:POR χρησιμοποιήσαμε το μετάλλαγμα C-2A' του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus. Στον άγριο τύπο, η ανάπτυξη του χλωροπλάστη ολοκληρώνεται τόσο στο φως, όσο κι στο σκοτάδι. Αντίθετα, στο μετάλλαγμα C-2A' που προέκυψε από ακτινοβόληση ακτίνων X [Bishop 1972] η ανάπτυξη του πλαστιδίου -απουσία φωτός- σταματά στο στάδιο του ωχροπλάστη όταν αναπτύσσεται στους 32°C, αφού υπάρχει μειωμένη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο, με αποτέλεσμα το μετάλλαγμα να εμφανίζει συσσώρευση πρωτοχλωροφυλλιδίου, όπως ακριβώς και τα ανώτερα φυτά που αναπτύσσονται στο σκοτάδι [Ruediger και Schoch 1988]. Η χρήση του εν λόγω μεταλλάγματος C-2A' είναι σημαντική για την μελέτη της

φωτοανάπτυξης του χλωροπλάστη γιατί ξεχωρίζει κατά κάποιο τρόπο τα δύο σκέλη αυτής της ανάπτυξης (βιοσύνθεση χρωστικών και βιοσύνθεση των απαραίτητων πρωτεϊνών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού). Είναι γνωστό ότι τα φύκη σε αντίθεση με τα αγγειόσπερμα σχηματίζουν λειτουργικό φωτοσυνθετικό μηχανισμό και στο απόλυτο σκοτάδι. Το μετάλλαγμα C-2A' που άλλαξε την λειτουργία της POR μπλοκάρει στο σκοτάδι την βιοσύνθεση των χλωροφυλλών στο επίπεδο του πρωτοχλωροφυλλιδίου και οι σχηματιζόμενες πρωτεϊνες δεν μπορούν να οργανωθούν σε φωτοσυνθετικά σύμπλοκα με τις χρωστικές, λόγω έλλειψης χρωστικών (μόνο ίχνη χλωροφυλλών ανιχνεύονται [Senger και Brinkmann 1986]). Με αυτά τα δεδομένα ο σχηματισμός του φωτοσυνθετικού μηχανισμού εξαρτάται μόνο από την ενεργοποίηση του ενζύμου POR που θα μετατρέψει το πρωτοχλωροφυλλίδιο σε χλωροφυλλίδιο (είτε με το φώς [Senger και Brinkmann 1986], είτε με την μείωση της θερμοκρασίας [Oh-Hama et al 1987]) και στην συνέχεια σε χλωροφύλλη για να σχηματίσει με τις αντίστοιχες πρωτεϊνες ενεργά φωτοσυνθετικά σύμπλοκα. Σε αντίθεση με το εν λόγω μετάλλαγμα η ανάπτυξη του χλωροπλάστη στα αγγειόσπερμα εξαρτάται όχι μόνο από την ενεργοποίηση της POR, αλλά και από τον πολύπλοκο μηχανισμό της επαγωγής της βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών που απαιτούνται για τον σχηματισμό του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Συνεπώς δεν παρατηρείται διαφοροποίηση του φαινοτύπου των αγγειόσπερμων σε οποιαδήποτε αλλαγή της δομής και λειτουργείας του ενζύμου POR όταν είναι αποκομμένη από τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών.

Η συγκέντρωση του Pchlide και του Chlide εκτιμήθηκε φθοροφωτομετρικά μετά από διέγερση στα 430nm μετρήθηκε ο φθορισμός εκπομπής στα 580-720nm όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι (Σχ. 1). Για να εντοπιστούν οι καταλληλότερες συνθήκες καλλιέργειας του μεταλλάγματος καταγράφηκαν στη διάρκεια του χρόνου όλες οι αλλαγές στην συγκέντρωση του Pchlide και του Chlide από καλλιέργειες C-2A΄ που αναπτύχθηκαν στο απόλυτο σκοτάδι.



Σχήμα 1. Κινητική τριών ημερών στα επίπεδα των περιεχομένων χρωστικών (πρωτοχλωροφυλλίδιο και χλωροφυλλίδιο) σε κύτταρα του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus που εκτιμήθηκαν με φωτοφθορισμικές μετρήσεις.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ÓTI τα επίπεδα TOU πρωτοχλωροφυλλιδίου μειώνονται σταδιακά με το χρόνο επώασης όπως έχουν δείξει και οι Kotzabasis et al (1989). Ανάλογα αποτελέσματα παρουσιάζουν και οι Spano et al (1995) οι οποίοι κατέγραψαν ότι όσο αυξάνεται η ηλικία ενός χλωρωτικού φυτού (barley) τόσο μειώνονται τα επίπεδα του πρωτοχλωροφυλλιδίου. Ενδεχομένως αυτή η μείωση του επιπέδου του πρωτοχλωροφυλλιδίου χωρίς την παράλληλη αύξηση του χλωροφυλλιδίου να μαρτυρεί μείωση του επιπέδου της αποπρωτεΐνης του POR. Άλλωστε υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι μετά από μία χρονική διάρκεια το ένζυμο POR δεν μπορεί να ανιχνευθεί.

#### Α. Ο ρόλος των πολυαμινών στα επίπεδα του πρωτοχλωροφυλλιδίου και χλωροφυλλιδίου.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι πολυαμίνες παίζουν ένα σημαντικό οόλο στην δόμηση και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αλλά και στην ανάπτυξη του χλωροπλάστη [Andreadakis and Kotzabasis 1995, (otzabasis et al., 1999a, 1999b]. Αυτός ήταν και ο λόγος που στα πλαίσια ιυτής της εργασίας επιδιώχθηκε η μελέτη των επιπτώσεων της αλλαγής του πιπέδου των πολυαμινών στα επίπεδα του πρωτοχλωροφυλλιδίου και του (λωροφυλλιδίου. Προκειμένου να εξετάσουμε την επίδραση των κυριοτέρων πολυαμινών (Put, Spd, Spm) στα επίπεδα συσσώρευσης των χρωστικών (Pchl(ide) και Chl(ide)) πραγματοποιήσαμε πολλαπλά πειράματα ώστε να προσδιοριστεί η καταλληλότερη ποσότητα εξωγενώς προστιθέμενων πολυαμινών και αναστολέων αυτών καθώς και ο καταλληλότερος χρόνος εισαγωγής τους. Έγιναν δοκιμές συγκέντρωσης από 1 έως 5 mM πολυαμινών ή αναστολέων (ενός πάντα είδους) και εκτιμήθηκε ότι συγκεντρώσεις της τάξης του 1 mM όταν εισάγονται κατά την υποκαλλιέργεια είναι ικανές να δώσουν αποτέλεσμα χωρίς να καταντήσουν τοξικές για τον κυτταρικό πληθυσμό (αρχική κυτταρική συγκέντρωση 2μΙPCVml<sup>-1</sup>)[τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται].

Σε καλλιέργειες C-2A' ηλικίας δύο ημερών και περίπου 10 μΙ PCVml<sup>-1</sup> που επωάστηκαν με 1mM πουτρεσίνης, 1mM σπερμιδίνης, 1mM σπερμίνης, 1mM 1,4-διαμινοβουτανόνη (1,4DB: αναστολέας Put), 1mM κυκλοεξυλαμίνη (CHA: αναστολέας Spd), 1mM 1,3-διάμινο-προπάνιο (1,3DP: αναστολέας Spm) τους συνδυασμούς 1mM 1,4DB + 1mM Put και 1mM 1,3DP + 1mM Spm και μίας καλλιέργειας μάρτυρα, τα επίπεδα Chlide και Pchlide εκτιμήθηκαν με μετρήσεις φθορισμού και παρουσιάζονται στο σχήμα 2. Τόσο οι πολυαμίνες όσο και οι αναστολείς εισάγονται στο κύτταρο στις πρώτες ώρες επώασης. Επιβεβαίωση της εισαγωγής των εξωγενώς προστιθεμένων χημικών ουσιών έγινε με την μέθοδο των Kotzabasis et al (1993) μετά από βενζυλίωσή τους και ανίχνευσή τους από HPLC. Η δράση των αναστολέων κρίνεται ικανοποιητική εφόσον συμφωνεί με τις ήδη υπάρχουσες αναφορές που βεβαιώνουν ότι η κυκλοεξυλαμίνη ρίχνει δραστικά το επίπεδο της σπερμιδίνης, η 1,4-διαμινο-βουτανόνη μειώνει δραστικά το επίπεδο της πουτρεσίνης και το 1,3-διαμινο-προπάνιο της σπερμίνης επιφέροντας ταυτόχρονα μία περιορισμένη μείωση και στο επίπεδο της πουτρεσίνης [Kotzabasis et al., 1999].





Σχήμα 2. Επίδραση των πολυαμινών αλλά και των αναστολέων τους στα επίπεδα πρωτοχλωροφυλλιδίου και χλωροφυλλίδιου όπως εκτιμήθηκαν με φωτοφθορισμικές μετρήσεις σε εκχυλίσματα δειγμάτων σε διαλύματα 95% ακετόνη καλλιεργειών του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* οι οποίες επωάστηκαν για δύο μέρες στους 32°C απουσία φωτός με 1mM Put, 1mM Spd, 1mM Spm, 1mM 1,4DB, 1mM 1,3DP, 1mM CHA εκτός του μάρτυρα (control).

Τα αποτελέσματα αφορούν τη δεύτερη μέρα ανάπτυξης των κυτταρικών πληθυσμών (48 ώρες) μια και σ'αυτό το χρονικό σημείο αναδεικνύονται καλύτερα οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών κατεργασιών και ταυτόχρονα παραμένει ανιχνεύσιμο πρωτοχλωροφυλλίδιο σε όλες τις περιπτώσεις. Στα σχήματα 2A και 2B φαίνεται καλύτερα ότι η αυξημένη συγκέντρωση σπερμίνης ευνοεί την συσσώρευση πρωτοχλωροφυλλιδίου σε αντίθεση με τις πουτρεσίνη, σπερμιδίνη οι οποίες φαίνεται ότι ευνοούν την αναγωγή του και κατά συνέπεια την συσσώρευση του προϊόντος (χλωροφυλλίδιο). Ανάλογα οι αναστολείς τους παρουσιάζουν κλιμακωτή δράση και μάλιστα αντίθετη από εκείνη της αντίστοιχης πολυαμίνης. Δηλάδη ο αναστολέας της πουτρεσίνης (1,4DB) δείχνει να ευνοεί την συσσώρευση του πρωτοχλωροφυλλιδίου, ενώ τα μειωμένα επίπεδα σπερμιδίνης και σπερμίνης (CHA και 1,3DP αντίστοιχα) φαίνεται ότι ευνοούν ακριβώς το αντίθετο με τα επίπεδα πρωτοχλωροφυλλιδίου να είναι ελάχιστα και του χλωροφυλλίδιου μέγιστα. Πάντως, η μείωση των πολυαμινών με τη χρήση των αναστολέων αυτών, προκαλεί σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των χρωστικών συγκριτικά με αυτών του μάρτυρα και για αυτόν ακριβώς το λόγο κρίθηκαν αναγκαία και άλλα πειράματα με τα αντιδραστήρια αυτά καθως και με τη σπερμίνη η οποία από τη μία μεριά εμφάνιζε έντονες διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα και από την άλλη εμφάνιζε παρόμοια δράση με την 1,4 διαμινοβουτανόνη (αναστολέας πουτρεσίνης). Τέλος, το γεγονός ότι ο συνδυασμός πολυαμίνης και αντίστοιχου αναστολέα δείχνει να ισορροπεί τις επιμέρους δράσεις τους υποδηλώνει ότι οι αλλαγές στα επίπεδα των χρωστικών δεν οφείλονται σε κάποιον άλλο παράγοντα αλλά στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση της κάθε πολυαμίνης.

Σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε τον τρόπο δράσης των παραπάνω ουσιών προσθέσαμε ταυτόχρονα 1mM 1,4DB και 1mM Spm αφού έχουν παρόμοια αποτελέσματα και με την ίδια λογική προσθέσαμε ταυτόχρονα 1mM 1,3DP και 1mM CHA πάντοτε αναφερόμαστε σε καλλιέργειες που αναπτύσσονται στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 32°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3. Επίπεδα πρωτοχλωροφυλλιδίου και χλωροφυλλίδιου όπως εκτιμήθηκαν από φωτοφθορισμικές μετρήσεις (με 95% ακετόνη) σε εκχυλίσματα δειγμάτων καλλιεργειών C-2A' του χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* οι οποίες επωάστηκαν για 48 ώρες στους 31,5°C απουσία φωτός με 1mM 1,4DB, 1mM Spm, 1mM Spm+1mM 1,4DB, 1mM CHA, 1mM 1,3DP, 1mM CHA + 1mM 1,3DP.

Αυτό που φαίνεται να γίνεται είναι μία συνεργειακή δράση τόσο του 1,4DB με την σπερμίνη. Άρα όταν στο σκοτάδι (στους 32°C) μειώσουμε την ενδοκυτταρική συγκέντρωση πουτρεσίνης και ταυτόχρονα αυξήσουμε την συγκέντρωση σπερμίνης της παίρνουμε αυξημένη συγκέντρωση πρωτοχλωροφυλλιδίου. Αντίθετα, αν μειώσουμε τŋ σπερμίνη TO πρωτοχλωροφυλλίδιο μειώνεται αισθητά και το χλωροφυλλίδιο αυξάνεται δραστικά. Τέλος, η σχετικά αυξημένη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου στην καλλιέργεια ελέγχου οφείλεται στο ότι οι μετρήσεις έγιναν σε πιο προχωρημένη χρονικά φάση από αυτές του προηγούμενου πειράματος προκειμένου να αναδειχθούν καλύτερα οι διαφορές μεταξύ των κατεργασιών.

Προσπαθώντας να κατανοήσουμε το συνολικό ρόλο των πολυαμινών σχεδιάσαμε να μειώσουμε τα επίπεδα και των τριών (Put, Spd, Spm) με την αυτόχρονη εισαγωγή όλων των αναστολέων των πολυαμινών 1,4DB+CHA+1,3DP) (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Επίπεδα πρωτοχλωροφυλλιδίου και χλωροφυλλίδιου όπως εκτιμήθηκαν από φωτοφθορισμικές μετρήσεις (με 95% ακετόνη) σε εκχυλίσματα δειγμάτων καλλιεργειών C-2Α' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus οι οποίες επωάστηκαν για 48 ώρες στους 32°C απουσία φωτός με 1mM 1,4DB +1mM CHA + 1mM 1,3DP.

Το 1,4DB φαίνεται να υπερισχύει των δύο άλλων αναστολέων (CHA και 1,3DP) και τελικά το προφίλ των χρωστικών είναι ανάλογο της περίπτωσης όπου προσθέτουμε μόνο 1,4DB. Δηλαδή έχουμε μια σημαντική καθυστέρηση της ελλάτωσης (αναγωγής) του πρωτοχλωροφυλλιδίου. Η ελλάτωση της πουτρεσίνης αποδεικνύεται καθοριστικότερης σημασίας αλλαγή για το κύτταρο του C-2A' απ'ότι των δύο άλλων πολυαμινων ίσως γιατί υπό φυσιολογικές συνθήκες το επίπεδο της πουτρεσίνης είναι σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μέσα στο κύτταρο απ'ότι είναι η σπερμιδίνη ή η σπερμίνη [Beigbeder et al., 1994].

Εφόσον το 1,4DB δείχνει να επηρεάζει καθοριστικά το επίπεδο του πρωτοχλωροφυλλιδίου προγραμματίστηκε μία κινητική τριών ημερών ώστε να παρακολουθήσουμε πιο ολοκληρωμένα τη δράση του. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται μία σαφής καθυστέρηση στη μείωση του πρωτοχλωροφυλλιδίου. Οι διαφορές σε επίπεδο Chl(ide) δεν δείχνουν ανάλογα σημαντικές, παρ' όλ' αυτά παρουσιάζονται και αυτές οι τιμές στο σχημα 5.



Δείγμα	1 ημέρα	2 ημέρα	3 ημέρα	1 ημέρα	2 ημέρα	3 ημέρα
Control	<b>17.08</b> ±0.7	<b>11.8</b> ±0.6	<b>4.92</b> ±0.3	<b>25.57</b> ±0.6	<b>26.55</b> ±0.1	24.73±1.1
1mM1,4DB	<b>16.29</b> ±0.3	<b>18.64</b> ±0.6	<b>15.27</b> ±0.3	<b>23.46</b> ±0.5	<b>23.67</b> ±0.1	<b>18.38</b> ±0.2

Σχήμα 5. Επίπεδα χρωστικών (πρωτοχλωροφυλλιδίου και χλωροφυλλίδιου) όπως εκτιμήθηκαν από φωτοφθορισμικές μετρήσεις σε διαλύματα 95% ακετόνη από δείγματα καλλιεργειών του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus οι οποίες επωάστηκαν για 24, 48 και 72 ώρες στους 32°C απουσία φωτός με 1mM 1,4DB.

Από αυτό το πείραμα φαίνεται ξεκάθαρα ότι η μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης πουτρεσίνης σταθεροποιεί τα επίπεδα του πρωτοχλωροφυλλιδίου στο χρόνο ενώ σε αντίθετη περίπτωση παρουσιάζεται δραστική μείωση του επιπέδου του μετά από τρείς μέρες. Γνωρίζοντας ότι το πρωτοχλωροφυλλίδιο βρίσκεται ενωμένο με την αποπρωτεΐνη του την POR θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η μείωση της πουτρεσίνης σταθεροποιεί το ένζυμο POR. Γι'αυτό κρίνεται αναγκαία η διαλεύκανση της δράσης του 1,4DB στην ποσότητα, αλλά και στην ενεργότητα του ενζύμου.

B. Ποσοτικός προσδιορισμός της οξειδοαναγωγάσης του πρωτοχλωροφυλλιδίου με ανοσοανίχνευση (western blots).

Για την διερεύνηση της επίδρασης του επιπέδου των πολυαμινών στην ποσότητα της POR διεκπεραιώθηκαν πολυάριθμα western blots. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η επίδραση του αναστολέα της πουτρεσίνης (1,4DB) σε συγκεντρώσεις που ξεκινούν από 0,25 mM και φτάνουν έως 2,5mM



Σχήμα 6. Α. Ψηφιακή ανάλυση σήματος σε νιτροκυτταρίνη μετά από ανοσοανίχνευση της POR με πολυκλωνικό αντίσωμα από δείγματα καλλιεργειών C-2A΄ του χλωροφύκους Scenedemsus obliquus που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι για τρεις μέρες (32°C) και επωάστηκαν για 36 ώρες με 1,4DB (0,25mM-2,5mM).Β. Ραβδόγραμμα όπου απεικονίζονται γραφικά οι τιμές της ψηφιακής ανάλυσης του σήματος

Τα δεδομένα συνηγορούν υπέρ της ομοιότητας σε περιεχόμενη POR μεταξύ των δειγμάτων μάρτυρα και δειγμάτων με μειωμένα επίπεδα πουτρεσίνης ακόμη και στην περίπτωση της μέγιστης δόσης (2,5mM 1,4DB). Η επίδραση του επιπέδου της πουτρεσίνης φαίνεται δεν επιδρά στην γονιδιακή έκφραση και βιοσύνθεση της POR αλλά κυρίως στην ενεργότητα του ενζύμου μέσω πιθανών μηχανισμών «σταθεροποίησης/αποσταθεροποίησης» του ολοενζύμου NADPH:POR:Pchlide.

Γ. Επίδραση του επιπέδου της πουτρεσίνης στην φωτοεξαρτώμενη ενεργότητα της οξειδοαναγωγάσης του πρωτοχλωροφυλλιδίου (POR)

Η μείωση του πρωτοχλωροφυλλιδίου (αντιδρόν) και η αύξηση του χλωροφυλλιδίου (προϊόν) υπό την επίδραση ακτινοβολίας μπορεί να αποτελέσει μια άμεση εκτίμηση της φωτομετατροπής που οφείλεται στην δράση του ολοενζύμου NADPH:POR:Pchlide. Υπολογίζοντας τις αρχικές ποσότητες πρωτοχλωροφυλλιδίου και χλωροφυλλιδίου με τη χρήση φθοροφωτομέτρου και αφαιρώντας αυτές από τις τελικές ποσότητες έχουμε την καθαρή φωτομετατροπή που έλαβε χώρα στα 10 αυτά sec (διάστημα μεταξύ των καμπύλων του σχήματος 7).



Σχήμα 7. Φάσματα εκπομπής φθορισμού [πριν και μετά από παλμό ερυθράς ακτινοβολίας διάρκειας 10 sec και συνολικής έντασης 30 μmole m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup> συνεχής και στικτή γραμμή αντίστοιχα] από δείγματα καλλιεργειών του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus όπως εκτιμήθηκαν από φωτοφθορισμικές μετρήσεις σε διαλύματα 95% ακετόνη που διεγέρθηκαν στα 430nm και σαρώθηκαν από τα 580 nm έως τα 730 nm με ταχύτητα 5nm sec<sup>-1</sup>.

Μετά την διέγερση της φωτομετατροπής του πρωτοχλωροφυλλιδίου παρατηρούμε μείωση του επιπέδου του στα 632 nm με ταυτόχρονη αύξηση του χλωροφυλλιδίου στα 672 nm. Σαν ενεργοποίηση της POR θεωρούμε την θετική μεταβολή του χλωροφυλλιδίου στα 672 nm και όχι την αντίστοιχη μείωση του πρωτοχλωροφυλλιδίου για τον εξής λόγο: Υπάρχει η πιθανότητα φωτοοξείδωσης του πρωτοχλωροφυλλιδίου και σε αυτή την περίπτωση θα είχαμε μείωση του επιπέδου πρωτοχλωροφυλλιδίου χωρίς αλλαγή στο επίπεδο του χλωροφυλλιδίου.

Υπολογίζοντας με τον παράπανω τρόπο τις φωτομετατροπές του πρωτοχλωροφυλλιδίου μετά από 5, 10, 30, 60, 90, 120, 180 sec φωτισμού με ακτινικό φως 650 nm για την πρώτη, δεύτερη και τρίτη μέρα καλλιέργειας που κατεργάστηκε με 1,4DB σε σύγκριση με τη καλλιέργεια του μάρτυρα, πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα που απεικονίζονται γραφικά στο σχήμα 8 ως επί τοις εκατό μείωση όταν πρόκειται για το πρωτοχλωροφυλλίδιο.





Μελετώντας τις καμπύλες αυτές έχουμε τη δυνατότητα να εξάγουμε συμπεράσματα ασφαλή για την μέγιστη φωτομετατροπή TOU πρωτοχλωροφυλλιδίου και να συγκρίνουμε τις τιμές τόσο του μάρτυρα με την αντίστοιχη καλλιέργεια 1,4DB την 1η, 2η και 3η ημέρα, όσο και της κάθε χρωστικής ξεχωριστά σε σχέση με το χρόνο αυτή τη φορά. Το γεγονός ότι δεν μετατρέπεται όλο το πρωτοχλωροφυλλίδιο σε χλωροφυλλίδιο έχει διαπιστωθεί και απο τους Armstrong et al, (2000) και οφείλεται σύμφωνα με τους ίδιους στο ότι το 85% του συνολικού Pchlide δεν είναι ενεργό (non photoactive). Είναι σαφές ότι τα κύτταρα του C-2A' τις πρώτες ώρες εμφανίζουν πιο υψηλές φωτομετατροπές, όταν δηλαδή τα επίπεδα πρωτοχλωροφυλλιδίου είναι ακόμη σχετικά υψηλά, ενώ όσο γηράσκει η καλλιέργεια και μειώνεται το επίπεδο του πρωτοχλωροφυλλιδίου ελλαττώνεται δραστικά και η φωτομετατροπή. Αντίθετα είναι εμφανής μια φωτοκαταστροφή του πρωτοχλωροφυλλιδίου (φωτοοξείδωση 2η και 3η ημέρα control) δηλαδή ενώ μειώνεται το πρωτοχλωροφυλλίδιο δεν παράγεται ανάλογη ποσότητα χλωροφυλλιδίου. Στις καλλιέργειες με 1,4DB διατηρούνται και τις τρεις μέρες υψηλές τιμές φωτομετατροπής και ειδικά την τρίτη μέρα εμφανίζεται η μέγιστη διαφορά συγκριτικά με αυτή του μάρτυρα (30%). Αυτό βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία και με το γεγονός ότι την τρίτη μέρα εμφανίζεται η μεγαλύτερη διαφόρα στα επίπεδα πρωτοχλωροφυλλιδίου του μάρτυρα και του 1,4DB (βλ. Σχήμα 8).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η φωτομετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο επηρεάζεται αντιστρόφως ανάλογα με την ηλικία του κυτταρικού πληθυσμού ενώ η μείωση του επιπέδου της πουτρεσίνης φαίνεται να σταθεροποιεί το σύμπλοκο του ενεργού πρωτοχλωροφυλλιδίου (Pchlide:POR:NADPH) έτσι ώστε να μειώνεται η φωτοανεξάρτητη μετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο με αποτέλεσμα να έχουμε μεγαλύτερη συσσώρευση πρωτοχλωροφυλλιδίου στο σκοτάδι. Н «σταθεροποίηση» του ενεργού πρωτοχλωροφυλλιδίου NADPH:POR:Pchlide) μέσω της μείωσης του επιπέδου της πουτρεσίνης πιφέρει αύξηση της φωτοεξαρτώμενης ενεργότητας της POR και μείωση της ρωτοοξείδωσης του πρωτοχλωροφυλλιδίου κατα την φωτομετατροπή του τρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο και κατά την έναρξη της ρωτοανάπτυξης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αντιθέτως ένα αυξημένο
επίπεδο ενδοκυττάριας πουτρεσίνης «αποσταθεροποιεί» το ενζυμικό σύμπλοκο και οδηγεί στην φωτοοξείδωση του πρωτοχλωροφυλλιδίου.

Με δεδομένο το ρόλο κλειδί του ενεργού πρωτοχλωροφυλλιδίου στην ανάπτυξη του χλωροπλάστη, το οποίο φάνηκε να επηρεάζεται από τα ενδοκυτταρικά επίπεδα συγκεκριμένων πολυαμινών (Put-Spm), ανακύπτει εύλογα το ερώτημα τι θα συμβεί αν επιδιώξουμε την ωρίμανση ωχροπλαστών σε ωχροπλάστες υπό την επίδραση μειωμένων και αυξημένων ενδοκυτταρικών επιπέδων πολυαμινών. Το μετάλλαγμα C-2A' επιλέχθηκε και πάλι ως μοντέλο μελέτης αφού επιτρέπει να εξεταστεί η όλη διαδικασία τόσο απουσία φωτός (φωτοανεξάρτητη ωρίμανση υπό την επίδραση χαμηλής θερμοκρασίας επώασης), όσο και σε εξάρτηση από το φως. **Δ.** Πολυαμίνες και φωτοανεξάρτητη ανάπτυξη του χλωροπλάστη: Εξετάζοντας την δομή και την λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού κατά την φωτοανεξάρτητη ωρίμανσή του έχουμε ένα μοναδικό μοντέλο μελέτης. Συνήθως, η βιβλιογραφία αφορά πειράματα με χλωρωτικά φυτά που πρασινίζουν υπό την επίδραση φωτός. Το μετάλλαγμα C-2A΄ μας δίνει την σπάνια δυνατότητα να εξετάσουμε την φωτοανεξάρτητη ωρίμανση του χλωροπλάστη βήμα προς βήμα. Στον άγριο τύπο δεν μπορεί να μελετηθεί κάτι τέτοιο διότι τα μονοκύτταρα χλωροφύκη διατηρούν πράσινους τους χλωροπλάστες τους ακόμη και όταν πολλαπλασιάζονται στο σκοτάδι.

Είναι γνωστό, ότι η μείωση της θερμοκρασίας επώασης στο εν λόγω μετάλλαγμα C-2A΄ αυξάνει την φωτομετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο απουσία φωτός [Oh-hama et al, 1987]. Σε μια προσπάθεια να μελετήσουμε τη σπάνια διαδικασία της φωτοανεξάρτητης ανάπτυξης του χλωροπλάστη ελλατώσαμε τη θερμοκρασία καλλιέργειας από τους 32° C στους 20° C και με την εξωγενή προσθήκη πολυαμινών επωάσαμε τα φύκη για περισσότερο από δύο ημέρες. Πράγματι κατά τις 55 ώρες επώασης στους 20° C τα κύτταρα C-2A΄, απουσία φωτός ξεπέρασαν το φραγμό του πρωτοχλωροφυλλιδίου και παρήγαγαν σημαντικές ποσότητες χλωροφυλλών (100 pmole/μLPCV) ικανές να μεταβάλλουν το χρώμα των κυττάρων (από κίτρινο σε πράσινο) Εικόνα 1.



Εικ.1. Καλλιέργειες του μεταλλάγματος C-2A του μονοκύτταρου χλωροφύκους Scenedesmus obliquus πριν και μετά την επώαση σε χαμηλή θερμοκρασία για 24 ώρες.



Σχήμα 9. Επίπεδα πρωτοχλωροφυλλιδίου (Pchlide) και χλωροφυλλών α και β (Chls) σε καλλιέργειες C-2A΄ που επωάστηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες (32°C και 20°C) για 24 ώρες.

Κατά την 24ωρη επώαση των καλλιεργειών στην κανονική θερμοκρασία (32° C) οι πολυαμίνες και οι αναστολείς τους εισήλθαν στα κύτταρα. Η αύξηση της ενδοκυτταρικής σπερμίνης, η αύξηση της σπερμιδίνης και η μείωση της ενδοκυτταρικής πουτρεσίνης (περίπτωση 1,4 DB) επηρέασαν την μετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο. Αυτό φαίνεται στο σχήμα 10 όπου εμφανίζονται οι λόγοι Pchide/Chlide ακριβώς τη στιγμή πριν μεταφερθούν οι καλλιέργειες σε χαμηλή θερμοκρασία. Το γεγονός ότι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα πολυαμινών επηρεάζουν την συσσώρευση του πρωτοχλωροφυλλιδίου είναι ήδη γνωστό από τις έρευνες των Beigbeder και Kotzabasis (1994).



Σχήμα 10. Ισοζύγιο αντιδρώντων (Pchlide) – προϊόντων (Chlide) κατά την 24ώρη επώαση κυττάρων με πολυαμίνες και αναστολείς σε θερμοκρασία 32° C.

Εφόσον οι καλλιέργειες εμφάνιζαν διαφορές στα επίπεδα των χρωστικών, οι οποίες αποτελούν συστατικά της φωτοσυνθετικής μηχανής, εξετάστηκε το επίπεδο των χρωστικών και της φωτοσυνθετικής απόδοσης των πλαστιδίων στη διάρκεια της φωτοανεξάρτητης ανάπτυξης του χλωροπλάστη. Οι καλλιέργειες παρέμειναν σε συνθήκες που ευνοούν την βιοσύνθεση χλωροφυλλών (χαμηλές θερμοκρασίες ≅20°C) για περισσότερο από δύο μέρες (53 ώρες) και μετρήθηκαν τα παρακάτω επίπεδα χρωστικών (Σχήμα 11).



Σχήμα 11. Επίπεδα χλωροφύλλης α (Α), χλωροφύλλης β (Β), ολικών χλωροφυλλών (Γ) και ο λόγος Chl a/b (Δ) όπως προσδιορίστηκαν με μετρήσεις απορρόφησης σε διαλύματα μεθανόλης από δείγματα κυττάρων του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* οι οποίες ποσοτικοποιήθηκαν με τις εξισώσεις της μεθόδου Holden (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Οι συγκεντρώσεις των πολυαμινών ήταν τελικά 1mM.

Η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης πουτρεσίνης αλλά και της σπερμιδίνης δεν φαίνεται να επηρέασαν σημαντικά την αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου. Μόνο η αύξηση της σπερμίνης φαίνεται να εμποδίζει την βιοσύνθεση της χλωροφύλλης α και να έχει παρόμοια δράση με τη μείωση της πουτρεσίνης (περίπτωση 1,4 DB). Το γεγονός αυτό συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία όπου αναφέρεται ότι η μείωση της πουτρεσίνης και η αύξηση της σπερμίνης φέρνουν παρόμοια αποτελέσματα [Beigbeder et al 1995]. Όμως, εν προκειμένω, η αύξηση της σπερμίνης προκαλεί δραματική μείωση του ποσού της χλωροφύλλης α επιδρώντας πολύ πιο έντονα από ότι η μείωση της πουτρεσίνης. Τέλος, οι καλλιέργειες μολονότι αποτελούν θυγατρικές της ίδιας μητρικής ύπο την επίδραση των πολυαμινών εμφάνισαν τα παρακάτω προφίλ ανάπτυξης.



Σχήμα 12. Ρυθμοί αύξησης καλλιεργειών μεταλλάγματος C-2A' εκτιμώμενοι ως καθιζάνουσες στοιβάδες κυττάρων (Packed Cell Volume) από διάλυμα θρεπτικού μέσου, μετά από πεντάλεπτη φυγοκέντρηση στα 1500g, οι οποίες μετρήθηκαν με ακρίβεια 0,25 μL PCV σε βαθμολογημένο υαλοσωλήνα.

Παρατηρούμε ότι η σπερμίνη διαδραματίζει ένα γενικότερο ρόλο αναστέλλοντας ουσιαστικά την κυτταρική διαίρεση. Αυτό συμφωνεί με τις μέχρι τώρα βιβλιογραφικές αναφορές που εμφανίζουν τις πολυαμίνες να συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο [Martin & Tanguy, 1997]. Ίσως η τετραμίνη σπερμίνη λόγω του ισχυρού θετικού της φορτίου να μπορεί να αλληλεπιδρά με το DNA του πυρήνα εμποδίζοντας την αντιγραφή του αλλά και να μπορεί να δεσμεύεται πάνω στο σύμπλοκο POR:NADPH:Pchlide εμποδίζοντας την αναγωγή προς χλωροφύλλη. Πριν προχωρήσουμε στη μελέτη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού παρουσιάζουμε μια σειρά αποτελεσμάτων που αφορούν το ενεργό πρωτοχλωροφυλλίδιο. Η διαφορά σε σχέση με τις μελέτες της προηγούμενης παραγράφου είναι ότι εδώ έχουμε ήδη φύγει από το στάδιο των προελασματοειδών και προθυλακοειδών του ωχροπλάστη και αναζητούμε ενεργό πρωτοχλωροφυλλίδιο σε πλαστίδια που ωριμάζουν. Οι τιμές της φωτομετατροπής του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο για την πρώτη μέρα (24 ώρες) παρουσιάζονται στο σχήμα 13 και είναι ευδιάκριτη, τόσο η φωτοοξείδωσή στην περίπτωση της αυξημένης σπερμίνης, όσο και ο αποτρεπτικός ρόλος της μειωμένης σπερμίνης (περίπτωση αναστολέα 1,3DP). Εν γένει τα ζευγάρια πολυαμινών και αντίστοιχων αναστολέων δείχνουν να έχουν ακριβώς αντίθετη δράση στην φωτοεπαγώμενη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου. Βέβαια τον πρωταγωνιστικό ρόλο φαίνεται να παίζει η τετραμίνη Spm και ο αναστολέας της βιοσύνθεσης της πουτρεσίνης (1,4DB).



Σχήμα 13. Ποσοστά μεταβολής του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο κατά την ενεργοποίηση της POR για καλλιέργειες C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus αναγμένα ανά PCV σε καλλιέργειες που επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυαμινών (1mM).

Με βάση τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν μέχρι τώρα φαίνεται ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές λόγω της αυξομείωσης των ενδοκυτταρικών επιπέδων των πολυαμινών. Πώς, όμως, επιδρούν αυτές οι διαφορές στην ανάπτυξη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού; Με τη βοήθεια σύγχρονων μηχανημάτων ανίχνευσης επαγόμενου φθορισμού είναι δυνατόν να παρακολουθήσουμε για πρώτη φορά με ακρίβεια τη λεπτή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικου μηχανισμού. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η ωρίμανση των ωχροπλάστων του μεταλλάγματος C-2A΄ για το διάστημα κατά το οποίο η χαμηλή θερμοκρασία ευνοούσε την βιοσύνθεση χλωροφυλλών. Επειδή στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αντίστοιχες κινητικές φθορισμού (λόγω του ότι το μετάλλαγμα C-2A΄ είναι διαθέσιμο σε ελάχιστα εργαστήρια παγκοσμίως και λόγω της ανάγκης χρήσης σύγχρονων εξειδικευμένων οργάνων Plant Efficiency Analyser) τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε δύο φάσεις. Πρώτα παρουσιάζεται η καλλιέργεια ελέγχου στην πορεία του χρόνου και στη συνέχεια οι δοκιμές με πολυαμίνες. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται πιο κατανοητή η όλη διαδικασία και αναδεικνύονται τελικά καλύτερα οι όποιες διαφορές.



Σχήμα 14. Επαγωγικός φθορισμός της χλωροφύλλης α δειγμάτων που λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα από καλλιέργειες κυττάρων C-2A´ που επωάστηκαν στο σκοτάδι για 53 ώρες σε χαμηλή θερμοκρασία (20° C).

Η παραγωγή χλωροφυλλών επιτρέπει την συναρμολόγηση χρωστικών και πρωτεϊνών προκειμένου να συγκροτηθούν οι λειτουργικές μονάδες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (PS II / LHC, Cyt<sub>b6f</sub>, PS I). Το φως επάγει τη συσσώρευση των πεπτιδίων που δεσμεύουν χλωροφύλλες (CBP) όπως την D1, D2, CP47 και CP43 μολονότι τα mRNAs είναι παρόντα στους ώχροπλάστες [Edhofer et al 1998]. Από την επεξεργασία των κινητικών του επαγωγικού φθορισμού προκύπτουν στοιχεία για την απόδοση της φωτοσύνθεσης, τα οποία και εμφανίζονται στο σχήμα 15.





Ήδη από τις πρώτες ώρες φαίνεται ότι οι λιγοστές χλωροφύλλες οργανώνονται σε φωτοσυστήματα όπως έχει ήδη αναφερθεί ο σχηματισμός RC και των PS II [Kotzabasis et al, 1991] και τα κύτταρα προετοιμάζονται να αξιοποιήσουν την όποια ηλιακή ακτινοβολία μολονότι στις συνθήκες καλλιέργειας δεν υπήρχαν φωτόνια. Βέβαια θα χρειάστούν αρκετές ώρες (δύο μέρες περίπου) μέχρι να φτάσουν οι χλωροπλάστες σε αξιόλογα επίπεδα φωτοσυνθετικής απόδοσης περίπου το 50% της απόδοσης του αγρίου τύπου.

Πάντως, ακόμη και στην φωτοανεξάρτητη ανάπτυξη του χλωροπλάστη ο επαγωγικός φθορισμός της χλωροφύλλης α έδειξε μια ξεκάθαρη J φάση. Η φάση Fo έως J οφείλεται στην καθαρή φωτοχημική αναγωγή της Q<sub>A</sub> σε Q<sub>A</sub><sup>-</sup>. Αυτή η φάση επηρεάζεται από την S κατάσταση της ηλεκτρονιοδοτικής μεριάς (donor side) του PS II [Delosme 1967, Screiber and Neubauer 1987, Hsu 1993, B.J. Strasser 1998] και την αντίδραση στην ηλεκτρονιοδεκτική μεριά του PS II από  $Q_A Q_B \sigma \epsilon Q_A Q_B$ . Το ενδιάμεσο στάδιο I και το τελικό P προτάθηκαν ότι οφείλονται στην ύπαρξη ταχέων και βραδέων κέντρων αναγωγής της πλαστοκινόνης (PQ pool) καθώς επίσης και στο διαφορετικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Redox State) των RC του PS II που ανάγει την δεξαμενή πλαστοκινόνης (Strasser et al 1995). Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται η μέση οξειδοαναγωγική κατάσταση της  $Q_A$  (Sm/t<sub>Fmax</sub>) και η απόδοση (Ψο=ETo/TRo) με την οποία ένα παγιδευμένο φωτόνιο μπορεί να κινήσει ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων

Σχήμα 16. Μέση οξειδοαναγωγική κατάσταση της QA στο χρονικό διάστημα καλλιέργειες C-2A′ σε όπως t<sub>Fmax</sub> JIP-TEST υπολογίστηκε από то χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Η καλλιέργεια παρέμεινε στο σκοτάδι για 53 ώρες σε ευνοϊκές για την ανάπτυξη του χλωροπλάστη θερμοκρασίες (20° C).



Σχήμα 17. Απόδοση Ψο=ΕΤο/ΤRο σε καλλιέργειες C-2Α΄ όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Η καλλιέργεια παρέμεινε στο σκοτάδι για 53 ώρες σε ευνοικές για την ανάπτυξη του χλωροπλάστη θερμοκρασίες (20° C).



Όπως δείχνουν τα παραπάνω διαγράμματα ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός δεν είναι πλήρως ανεπτυγμένος. Όσο τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από την Q<sub>A</sub><sup>-</sup> στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων τόσο περισσότερο χρόνο κάνει ο φθορισμός για να πάρει τη μέγιστη τιμή του και τόσο μεγαλύτερο γίνεται το Sm. Εδώ έχουμε πολύ μικρό Sm και ο φθορισμός παίρνει πολύ σύντομα τη μέγιστη τιμή του άρα η δεξαμενή πλαστοκινόνης έχει πολύ μικρό μέγεθος. Πιο αναλυτικά, το παρακάτω σχήμα αποκαλύπτει την επίδραση των εξωγενώς προστιθεμένων πολυαμινών καθώς και αυτήν των αναστολέων τους στον επαγόμενο φθορισμό που οφείλεται στη χλωροφύλλη α των κυττάρων.



Διάγραμμα 18. Επαγικός φθορισμός της χλωροφύλλης α κυττάρων C-2A΄ που επωάστηκαν με διαφορετικές πολυαμίνες για 53 ώρες σε χαμηλή θερμοκρασία (20° C).

Οι μεγαλύτερες διαφορές παρατηρούνται και πάλι στην μεταχείριση με σπερμίνη. Σε αυτές τα κύτταρα φαίνεται να μην μπορούν να σχηματίσουν φωτοσυνθετικό μηχανισμό πιθανόν λόγω της απουσίας ικανοποιητικών επιπέδων κατάλληλων χρωστικών. Προκειμένου να συγκρίνουμε τις διαφορετικές καλλιέργειες στα επίπεδα φωτοσυνθετικής απόδοσης καταφύγαμε και πάλι στο JIP TEST των Strasser&Strasser (1995) με το οποίο

49

προκύπτουν τα αποτελέσματα του σχήματος 19 και 20 για τα Fv/Fm και qPQ.



Σχήμα 19. Φωτοσυνθετική απόδοση κυττάρων C-2A΄ που επωάστηκαν με διαφορετικές πολυαμίνες (τελικής συγκέντρωσης 1mM) για 53 ώρες κατά την φωτοανεξάρτητη ωρίμανση του χλωροπλάστη.

Σχήμα 20. Δείκτη q<sub>PQ</sub> του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε καλλιέργειες C-2A΄ όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις ήταν 1mM.



Η έλλειψη φωτός δεν επιτρέπει στα κύτταρα να αναπτύξουν φωτοσυνθετικό μηχανισμό πλήρως. Έτσι, από τα τρία τουλάχιστον διακριτά στάδια (J, I, P steps) των καμπύλων του επαγωγικού φθορισμού μόνο τα δύο (J και I) παρατηρούνται στους χλωροπλάστες που ωριμάζουν στο σκοτάδι και

ειδικά στην περίπτωση της σπερμίνης εμφανίζεται μόνο το πρώτο (J step). Η έλλειψή του εξηγεί και την σημαντική διαφορά στην διάχυση (qPQ) της ενέργειας στο PS II από τις οξειδομένες κινόνες της δεξαμενής πλαστοκινόνης (Krueger et al 1997). Αυτό συμφωνεί με βιοχημικές αποδείξεις για το μέγεθος της δεξαμενής πλαστοκινόνης που βρίσκουν το μέγιστο στην περίοδο φωτισμού συγχρονισμένων καλλιεργειών χλωροφυκών και το ελάχιστο στην περίοδο σκοταδιού [Senger και Frickel-Faulstich 1974 Strasser et al., 1999].

Η εικόνα των φυκών με αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα σπερμίνης εμφανίζει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Από την μία μεριά τα κύτταρα δεν διαιρούνται και από την άλλη τα πλαστίδιά τους δεν ωριμάζουν. Μήπως η εξωγενώς προστιθεμένη σπερμίνη ήταν τοξική για τα φύκη και προκάλεσε τη νέκρωσή τους; Ή μήπως τα κύτταρα είναι ζωντανά, αλλά τα αυξημένα ενδοκυτταρικα επίπεδα σπερμίνης εμποδίζουν ή αναστέλλουν μια σειρά από βιοχημικές διαδικασίες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και την ωρίμανση των πλαστιδίων; Για την απάντηση αυτών των ερωτημάτων μεταφέραμε τα φύκη στο φως (ένταση ακτινοβολίας 50μmolem<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>) και καταγράψαμε τις αλλαγές σε επίπεδο φωτοσυνθετικού μηχανισμού με την χρήση του επαγωγικού φθορισμού. Τα στατιστικά αξιόπιστα αποτελέσματα από την επεξεργασία των χιλιάδων τιμών φθορισμού καθώς και οι ενδιαφέρουσες πρωτογενείς κινητικές φθορισμού παραθέτονται στα σχήματα. Ακολουθούν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού ABS/RC, DIo/RC, RC/CSo, SFI(abs) και PI(abs) όπως εκτιμήθηκαν με το JIP TEST.



Σχήμα 21. Επαγόμενος φθορισμός της χλωροφύλλης α κυττάρων C-2A΄ που επωάστηκαν με διαφορετικές πολυαμίνες για 53 ώρες σε χαμηλή θερμοκρασία (20° C) και 12 επιπλέον ώρες σε συνεχές φως έντασης 50μmolem<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>.

Σχήμα 22. Φωτοσυνθετική απόδοση κυττάρων C-2Α΄ που επωάστηκαν με διαφορετικές πολυαμίνες (τελικής συγκέντρωσης 1mM) για 53 ώρες κατά την φωτοανεξάρτητη ωρίμανση του χλωροπλάστη και 12 επιπλέον ώρες σε συνεχές φως έντασης 50μmolem<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>.



Σχήμα 23. Μέγεθος κεραίας του φωτοσυστήματος ΙΙ σε καλλιέργειες C-2Α΄ όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις ήταν 1mM.



Σχήμα 24. Ενέργεια που διαχέεται από το φωτοσύστημα ΙΙ σε καλλιέργειες C-2Α΄ όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις ήταν 1mM.



Σχήμα 25. Το πλήθος των κέντρων αντίδρασης σε καλλιέργειες C-2A όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις ήταν 1mM.



Ειδικά για τις καλλιέργειες με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον (Spm & 1,4 DB) παρουσιάζουμε σχηματικά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του φωτοσυστήματος ΙΙ ώστε να απεικονιστούν ευκρινώς οι διαφορές μεταξύ αυτών και του μάρτυρα. Επίσης παραθέτουμε και την κατάσταση που ισχύει στην περίπτωση φωτισμού για την καλύτερη κατανόηση των δεδομένων.



Σχήμα 26. Μοντέλα για την απεικόνιση των επιμέρους χαρακτηριστικών των φωτοσυστημάτων ΙΙ φυκών που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες. Απεικονίζεται το μέγεθος της φωτοσυνθετικής κεραίας (ABS/RC), η ενέργεια που παγιδεύεται στα κέντρα αντίδρασης (TRo/RC), η ενέργεια που δεν αξιοποιείται στην φωτοχημεία και διαχέεται η υπό μορφή θερμότητας (Dl<sub>o</sub>/RC). Control:C-2A΄ ανεπτυγμένο στο απόλυτο σκοτάδι (20° C) παρουσία 1mM Spm, 1,4DB: C-2A΄ ανεπτυγμένο στο απόλυτο σκοτάδι (20° C) παρουσία 1mM1,4DB και CL: C-2A΄ ανεπτυγμένο σε συνεχές φως.



Σχήμα 27. Πρωτογενής φωτοχημεία σε καλλιέργειες C-2Α΄ όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών.Οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις ήταν 1mM.

Σχήμα 28. Δείκτη δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε καλλιέργειες C-2Α΄ όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις ήταν 1mM.



Δύο πολύ σημαντικές παρατηρήσεις προκύπτουν από τα παραπάνω δεδομένα. Η πρώτη αφορά την εμφάνιση του σταδίου P, το οποίο απουσιάζε από τις αντίστοιχες καμπύλες πριν την ακτινοβόληση των κυττάρων. Η ακτινοβολία επέτρεψε την πλήρη ωρίμανση της φωτοσυνθετικής μηχανής και οι καμπύλες επαγωγικού φθορισμού απέκτησαν πλεον την τυπική μορφή που συναντάμε και στον άγριο τύπο.

Η δεύτερη παρατήρηση αφορά το κρίσιμο θέμα της ευρωστίας των κυττάρων για την περίπτωση της σπερμίνης. Τα κύτταρα μεσα σε λίγες ώρες

κατάφεραν να προσεγγίσουν ικανοποιητικά επίπεδα φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fm=0,55) αποδεικνύοντας ότι δεν είχαμε φαινόμενα τοξικότητας. Βέβαια και πάλι είναι εμφανής η υστέρηση σε σύγκριση με την καλλιέργεια ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα σπερμίνης προκαλούν αύξηση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας και συνεπακόλουθη αύξηση της διάχυσης ενέργειας από τα φωτοσυστήματα. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι μία αύξηση στο ABS/RC -το οποίο δίνει ένα μέτρο του μέσου μεγέθους της φωτοσυνθετικής κεραίας δηλαδή του συνόλου των χλωροφυλλών που διεγείρονται ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης (RC)δείχνει την απεργοποίηση ενός αριθμού κέντρων αντίδρασης τα οποία καταντούν πηγές ενεργειακής διάχυσης (quenching sinks) [Krueger et al, 1997] Tsimilli-Michael et al, 1998]. Επίσης ο αριθμός των κέντρων αντίδρασης μειώνεται και γενικότερα οι δείκτες που αφορούν τόσο τη δομή, όσο και τη λειτουργεία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, όπως οι δείκτες απόδοσης (Fv/Fm) και ευρωστίας (Pl<sub>ABS</sub>) κυμαίνονται σε χαμηλες τιμές. Τέλος από τις καμπύλες φθορισμού παρατηρούμε ότι εμφανίζεται ένα ενδιάμεσο βήμα (Κ) μεταξύ του Ι και του Ρ. Αυτό το βήμα έχει συσχετιστεί με την μειωμένη ικανότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού να ελευθερώνει οξυγόνο [Strasser et al 1997, Tsimilli-Michael et al, 1998].

**Ε. Πολυαμίνες και φωτοανάπτυξη του χλωροπλάστη:** Σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε το ρόλο των πολυαμινών, τούτη τη φορά στην φωτοανάπτυξη του χλωροπλάστη, μεταχειριστήκαμε το μετάλλαγμα C-2A' παρουσία φωτός. Τα χλωρωτικά φύκη επωάστηκαν για 24ώρες στο σκοτάδι παρουσία ενός είδους πολυαμίνης κάθε φορά. Το χρονικό αυτό διάστημα απαιτείται προκειμένου να προλάβουν να εισαχθούν οι πολυαμίνες στα κύτταρα προτού αυτά εκτεθούν σε συνεχές φώς. Ο αριθμός των καλλιεργειών για τις 3 πολυαμίνες (Put, Spd, Spm), τους 3 αναστολείς τους (αντίστοιχα 1,4DB, CHA, 1,3DP) και την καλλιέργεια ελέγχου ανήλθε στις επτά (7), ενώ οι τελικές συγκεντρώσεις πολυαμινών ήταν 1mM. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στο φως 50μmolm<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup> ώσπου να αναπτύξουν πλήρως φωτοσυνθετικό μηχανισμό (περίπου 15 ώρες) και η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 32° C. Με τη βοήθεια του επαγωγικού φθορισμού προσδιορίστηκε η φωτοσυνθετική απόδοση των καλλιεργειών και το περιεχόμενο σε Chlide a καθόλη την φωτοανάπτυξη του χλωροπλάστη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα σχήματα 29 Β και 29 Β.



Σχήμα 29. Α.Τιμές φωτοσυνθετικής απόδοσης Fv/Fm μετά από 15 ώρες φωτισμού 50μmolm<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup> για τις καλλιέργειες του μεταλλάγματος C-2A΄ του μονοκύτταρου χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus.* Οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις ήταν 1mM.B. Τιμές φωτοσυνθετικής απόδοσης κατά την φωτοανάπτυξη της καλλιέργειας ελέγχου.

Η φωτοσυνθετική απόδοση φαίνεται να επηρεάζεται από την μείωση της πουτρεσίνης και την αύξηση της σπερμίνης. Μάλιστα, η δράση της

αυξημένης τετραμίνης (Spm) αποδεικνύεται αρκετά ισχυρότερη από αυτήν της μειωμένης διαμίνης (Put).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τόσο η αύξηση του επιπέδου της σπερμίνης όσο και η μείωση του επιπέδου της πουτρεσίνης επιφέρουν τις ίδιες αλλαγές τόσο στην διαδικασία της φωτομετατροπής του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο όσο και στην ίδια την ανάπτυξη του χλωροπλάστη.

Τελικά συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της φωτοεξαρτώμενης ανάπτυξης του χλωροπλάστη με εκείνα της φωτοανεξάρτητης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους. Φαίνεται το πλαστίδιο θα ακολουθήσει την ίδια πορεία είτε οι χλωροφύλλες του συντεθούν παρουσία είτε απουσία φωτός. Βέβαια μόνο στην περίπτωση που εκτεθεί στο φως θα αναπτυχθεί πλήρως ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός (τιμές Fv/Fm >0,7). Επιδιώκοντας την πλήρη αναστολή της φυσιολογικής ανάπτυξης του χλωροπλάστη εστιάσαμε προσπάθεια στην ελέγχου της οξειδοαναγωγάσης του πρωτοχλωροφυλλιδίου. Ηδη n μείωση της πουτρεσίνης και η αύξηση της σπερμίνης φάνηκε να σταθεροποιούν το σύμπλοκο του ενεργού πρωτοχλωροφυλλιδίου. Στη συνέχεια θα δοκιμάσουμε να αυξήσουμε σε διαφορετικό βαθμό τα ενδοκυτταρικά επίπεδα σπερμίνης μελετώντας τις επιπτώσεις στην ανάπτυξη του χλωροπλάστη.

## Ο ρόλος της σπερμίνης (Spm) στην φωτοανεξάρτητη ωρίμανση του χλωροπλάστη

Η πολυαμίνη σπερμίνη φάνηκε να έχει την ισχυρότερη επίδραση από τις υπόλοιπες, στην μετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο καθώς και στην ωρίμανση των ωχροπλαστών του C-2A' είτε παρουσία, είτε απουσία φωτός. Η επιδρασή της είναι στην ίδια κατεύθυνση με την μείωση της πουτρεσίνης όμως το τελικό αποτέλεσμά της είναι σαφώς εντονότερο. Το γεγονός αυτό έστρεψε τις έρευνες στην διερεύνηση του ρόλου της σπερμίνης. Προκειμένου να κατανοηθεί πλήρως η δράση αυτής της τετραμίνης προστέθηκαν εξωγενώς διαφορετικές συγκεντρώσεις σπερμίνης σε καλλιέργειες C-2A' οι οποίες παρέμειναν στο σκοτάδι σε όλη τη διάρκεια των μετρήσεων. Οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις σπερμίνης ήταν 0,25mM, 1mM. 1.5mM και 3mM, ενώ η θερμοκρασία των καλλιεργειών διατηρήθηκε στους 32° C για να αποφευχθεί η φωτοανεξάρτητη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου στο διάστημα μιας μέρας (24 ώρες) ώσπου να εισέλθουν τα μόρια σπερμίνης στα κύτταρα. Εν συνεχεία, η θερμοκρασία ελλατώθηκε στους 20° C προκειμένου να ευνοηθεί η φωτοανεξάρτητη βιοσύνθεση των φωτοσυνθετικών χρωστικών και η ανάπτυξη του 30A δείχνει TO περιεχόμενο σε χλωροπλάστη. To σχήμα πρωτοχλωροφυλλίδιο μετά από επώαση μιας μέρας.



Σχήμα 30. Επίπεδα πρωτοχλωροφυλλίδιου (Α) και ολικών χλωροφυλλών (Chl a και b) (B) όπως προσδιορίστηκαν με μετρήσεις απορρόφησεις σε διαλύματα ακετόνης από δείγματα κυττάρων του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus οι pποίες ποσοτικοποιήθηκαν με τις εξισώσεις της μεθόδου Brouers (βλ. Υλικά και Μέθοδοι).

Είναι φανερό ότι η σπερμίνη ευνοεί τη συσσώρευση πρωτοχλωροφυλλιδίου στο σκοτάδι. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση της εξωγενούς προστιθεμένης σπερμίνης τόσο αυξάνει και η συγκέντρωση του πρωτοχλωροφυλλιδίου. Τί συμβαίνει όμως με τις χλωροφύλλες α και β τη στιγμή που η σπερμίνη φαίνεται να εμποδίζει την αναγωγή του προδρόμου τους. Στο σχήμα 30 Β παρουσιάζονται τα επίπεδα των χρωστικών αυτών πάντοτε μετά από επώαση μιας ημέρας.

Είναι σαφές ότι η σπερμίνη έχει εμποδίσει την βιοσύνθεση των (λωροφυλλών προκαλώντας διαφορές μέχρι και δεκα φορές μικρότερες της (αλλιέργειας ελέγχου.

Οι χλωροφύλλες α και β φαίνεται να επηρεάζονται με διαφορετικό ρόπο. Στο παρακάτω σχήμα (31) παρουσιάζεται ο λόγος χλωροφύλλης α τρος β μετά από 24 ώρες επώασης.



Σχήμα 31. Ισοζύγιο χλωροφυλλών α/β όπως προσδιορίστηκαν με μετρήσεις απορρόφησεις σε διαλύματα ακετόνης από δείγματα κυττάρων του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus οι οποίες ποσοτικοποιήθηκαν με τις εξισώσεις της μεθόδου Brouers (βλ. Υλικά και Μέθοδοι).

Πράγματι ο λόγος χλωροφύλλης α προς χλωροφύλλη β μειώνεται σημαντικά. Με προσεχτικότερη παρατήρηση διαπιστώνουμε ότι η αναλογία χλωροφύλλης α προς β αντιστρέφεται. Ενώ ο μάρτυρας εμφανίζει περισσότερη χλωροφύλλη α από ότι β (τιμή λόγου 1,85) οι καλλιέργειες με σπερμίνη εμφανίζουν πολύ περισσότερη χλωροφύλλη β από ότι α με τιμές λόγου α/β κοντα στο 0,5. Αξιοσημείωτο είναι πως η χλωροφύλλη β που προέρχεται αποκλειστικά από την α (Kotzabasis et al 1991 και Oster et al 2000) παράγεται ενώ η χλωροφύλλη α δείχνει να έχει κατεσταλμένη βιοσύνθεση.

Προκειμένου να διαπιστώσουμε την κατάσταση του ενεργού πρωτοχλωροφυλλιδίου δηλαδή του συμπλόκου POR:Pchlide:NADPH ακτινοβολήσαμε τις καλλιέργειες με ισχυρούς παλμούς ακτινικού φωτός μήκους κύματος 650nm. Η διάρκεια των παλμών φωτός αυξανόταν σταδιακά ώσπου να επιτευχθεί κορεσμός. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο σχήμα 32.



Σχήμα 32. Ποσοστά μεταβολής του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο κατά την ενεργοποίηση της POR για καλλιέργειες C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus αναγμένα ανά PCV σε καλλιέργειες που επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις Spm (0,25mM, 1mM, 1,5mM και 3mM) για 24 ώρες απουσία φωτός στους 32° C. Είναι φανερό από τα παραπάνω αποτελέσματα ότι η σπερμίνη εμποδίζει την φωτοεξαρτώμενη μετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο. Έτσι, μολονότι οι καλλιέργειες που περιέχουν εξωγενώς προστιθέμενη σπερμίνη ξεπερνούν το μάρτυρα σε ποσό υποστρώματος της POR (πρωτοχλωροφυλλιδίο) δεν παρουσιάζουν αντίστοιχα υψηλές τιμές φωτομετατροπής. Μάλιστα σε όλες τις περιπτώσεις από τα 0,25 mM έως τα 3mM οι φωτομετατροπές μετρήθηκαν μικρότερες του μάρτυρα. Η σπερμίνη λοιπόν, φαίνεται να εμποδίζει τη δράση του ενζύμου POR.

Με βάση αυτά τα δεδομένα οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία (20° C) και παρακολουθήθηκαν στην πορεία του χρόνου κυρίως με φυσικοχημικές μεθόδους. Η χαμηλή θερμοκρασία ευνοεί την φωτοανεξάρτητη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου αλλά σε μικρότερο βαθμό από την ηλιακή ακτινοβολία, συνεπώς ο χρόνος δημιουργίας της φωτοσυνθετικής μηχανής είναι μεγαλύτερος. Για αυτό το λόγο ενώ στην περίπτωση της φωτοανάπτυξης ο χλωροπλάστης ωρίμαζε τις πρώτες 15 ώρες, στην προκείμενη περίπτωση χρειάζομαστε περισσότερες από 24 ώρες. Στο σχήμα 33 παρουσιάζονται οι τιμές του πρωτοχλωροφυλλιδίου μετά από επώαση μιας μέρας (24 ώρες) στους 20° C.



Σχήμα 33. Επίπεδα πρωτοχλωροφυλλίδιου όπως προσδιορίστηκαν με μετρήσεις απορρόφησεις σε διαλύματα ακετόνης από δείγματα κυττάρων του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus οι οποίες ποσοτικοποιήθηκαν με τις εξισώσεις της μεθόδου Brouers (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Πιο συγκεκριμένα, στην παρακάτω εικόνα φαίνονται αρκετά ευκρινώς οι μορφολογικές διαφορές των χλωροφυκών μετά από δύο μέρες επώασης σε χαμηλές θερμοκρασίες (20° C).



Εικόνα 2. Χλωρωτικά μονοκύτταρα φύκη (μετάλλαγμα C-2A') του γένους Scenedesmus τα οποία αφέθηκαν να πρασινίσουν -απουσία φωτός- λόγω επίδρασης χαμηλής θερμοκρασίας παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης.

Η φωτοσυνθετική απόδοση των φυκών εκτιμήθηκε σε όλη την διάρκεια της ανάπτυξης του χλωροπλάστη με τη βοήθεια επαγωγικού φθορισμού. Οι πρωτογενείς καμπύλες από μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν τη στιγμή που ο χλωροπλάστης της καλλιέργειας ελέγχου ωρίμασε στο μέγιστο βαθμό παρουσιάζονται στο σχήμα 36. Επίσης στο σχήμα 37 παρουσιάζονται τα επεξεργασμένα αποτελέσματα των παραπάνω καμπύλων όπως υπολογίστηκαν από το JIP TEST των Strasser&Strasser (1995).



Σχήμα 36. Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού σε μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus που επωάστηκαν για 48 ώρες στους 20° C παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης.



Σχήμα 37. Μέγεθος κεραίας του φωτοσυστήματος ΙΙ σε καλλιέργειες C-2A΄ όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Σχήμα 38. Ενέργεια που δεν καταλήγει στην φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης αλλά διαχέεται από το φωτοσύστημα ΙΙ στο περιβάλλον σε καλλιέργειες C-2A΄ όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθο-ρισμού της χλωροφύλλης α των φυκών.



Σχήμα 39. Το πλήθος των κέντρων αντιδρασης σε καλλιέργειες C-2A΄ όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών.



Η σπερμίνη φαίνεται να επηρεάζει τη δημιουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στο μετάλλαγμα C-2A' όπως ο χαμηλός φωτισμός επηρεάζει τον ήδη διαμορφωμένο φωτοσυνθετικό μηχανισμό του αγρίου τύπου (Kotzabasis et al 1999). Προκαλεί σε μικρές συγκεντρώσεις (0,25-1,5mM) αύξηση του μεγέθους του συμπλόκου αποκομιδής φωτός (LHC) και αύξηση του αριθμού των κέντρων αντίδρασης (RC) του φωτοσυστήματος II (Σχήματα 37 και 38 αντίστοιχα). Αυτό πιθανόν να έχει σχέση με τα αποτελέσματα των

Kotzabasis et al (1993) που μέτρησαν σημαντικές συγκεντρώσεις σπερμίνης σε απομονωμένα σύμπλοκα στο LHC και στα κέντρα αντίδρασης του PS II.

Εξάλλου ήδη οι Besford et al (1993) έχουν δείξει ότι η αυξημένη συγκέντρωση σπερμίνης (και η μείωση της πουτρεσίνης) εμποδίζει την αποδόμηση των  $D_1$  και  $D_2$  καθώς και του κυτοχρώματος f (Cytf). Επίσης έδειξαν ότι η αυξημένη σπερμίνη σε συνδυασμό με την μειωμένη πουτρεσίνη εμποδίζει τη γήρανση. Από ανοσολογικά στοιχεία φάνηκε πως οι πολυαμίνες και ειδικά η σπερμίνη σταθεροποιούν τη δομή των θυλακοειδών μεμβρανών και τελικά αποτρέπουν τη γήρανση. Το ότι η σπερμίνη μπορεί να λειτουργεί προστατευτικά ως εξουδετερωτής ριζών (radical scavenger) έχει ήδη προταθεί και από τους Kotzabasis et al (1993). Oι Doernemann et al (1996), έδειξαν ότι κατά την φωτοανάπτυξη του χλωροπλάστη τα συζευγμένα στις μεμβράνες των θυλακοειδών μόρια πουτρεσίνης μειώνονται εκθετικά, ενώ η σπερμίνη παραμένει σταθερή ή αυξάνει σε μικρό βαθμό. Τελικά οι Kotzabasis et al (1999) προτείνουν ότι ο λόγος Spm/Put και όχι το επίπεδο πουτρεσίνηςσπερμίνης είναι ο κύριος ρυθμιστικός παράγοντας για τη δομή και τη λειτουργεία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Οι ίδιοι ερευνητές δείχνουν ότι πρωτογενείς φωτοϋποδοχείς για 01 την φωτοπροσαρμογή TOU φωτοσυνθετικού μηχανισμού και των φωτοελεγχόμενων αλλαγών των πολυαμινών στους χλωροπλάστες είναι κοινοί και πρόκειται για συνδυασμό ενός κρυπτοχρωμικού φωτοϋποδοχέα κυανού φωτός και ενός δεύτερου που απορροφά περί τα 680nm και ίσως είναι το κέντρο αντίδρασης του PS II. Τέλος, φαίνεται ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες κυρίως οι αλλαγές της πουτρεσίνης και όχι της σπερμίνης ρυθμίζουν το λόγο Spm/Put. Στα πειράματα όμως αυτής της εργασίας είναι λογικό να επιδρά πιο δραστικά η τεχνητή αύξηση της ενδοκυτταρική συγκέντρωσης σπερμίνης που βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις από ότι η τεχνητή μείωση της πουτρεσίνης η οποία εμφανίζει πολύ υψηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις.

**Σπερμίνη και φωτοανάπτυξη του χλωροπλάστη:** Η σπερμίνη μέχρι αυτό το σημείο έδειξε ότι μπορεί να αναστείλει την φωτοανεξάρτητη ωρίμανση του ωχροπλάστη. Βέβαια η φωτοανεξάρτητη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου μοιάζει πολύ πιο ήπια διαδικασία συγκρινόμενη με την φωτοεξαρτώμενη αναγωγή του. Το γεγονός αυτό έχει βάση στις διαφορετικές κινητικές των δύο αντιδράσεων (η πρώτη είναι αργή, η δεύτερη ταχύτατη) και γεννά το ερώτημα αν είναι ικανή η συγκεκριμένη πολυαμίνη να εμποδίσει με κάποιο τρόπο το ενεργό πρωτοχλωροφυλλίδιο να μετατραπεί σε χλωροφυλλίδιο; Ήδη από τα πειράματα φωτομετατροπής της προηγούμενης ενότητας είχε φανεί μία τάση της σπερμίνης να επηρεάζει το ενεργό πρωτογλωροφυλλίδιο. Για την διαλεύκανση του ρόλου της σπερμίνης ρίξαμε φως  $(50 \mu molem^{-2} sec^{-1})$  στα χλωρωτικά φύκη, αφού πρώτα επωάσαμε για 24 ώρες στο σκοτάδι τις καλλιέργειες προκειμένου να προλάβουν τα μόρια της τετραμίνης να εισέλθουν στα κύτταρα. Οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις σπερμίνης ήταν 0,25mM, 0,75mM, 1,5mM και 3mM και η διάρκεια φωτισμού ξεπέρασε τις 10 ώρες. Τα κύτταρα υπό την επίδραση του φωτός ωρίμασαν τα πλαστίδια τους και όλη αυτή η ταχύτατη αλλαγή καταγράφηκε με αξιοποίηση των ιδιοτήτων απορρόφησης καθώς και του in vitro και in vivo φθορισμού των χλωροφυλλών. Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των κυριοτέρων φωτοσυνθετικών χρωστικών (Chl a , Chl b) παρουσιάζονται στο σχήμα 40.



Σχήμα 40. Επίπεδα χλωροφυλλών α όπως προσδιορίστηκαν με μετρήσεις απορρόφησεις σε διαλύματα ακετόνης από δείγματα κυττάρων του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus οι οποίες ποσοτικοποιήθηκαν με τις εξισώσεις της μεθόδου Brouers. Τα φύκη επωάστηκαν για 24 ώρες στο σκοτάδι παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης και στην συνέχεια ακτινοβολήθηκαν για 10 ώρες (συνεχές φως έντασης 50μmolem<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>).



Σχήμα 40. Επίπεδα χλωροφυλλών β όπως προσδιορίστηκαν με μετρήσεις απορρόφησεις σε διαλύματα ακετόνης από δείγματα κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις σπερμίνης του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus οι οποίες ποσοτικοποιήθηκαν με τις εξισώσεις της μεθόδου Brouers. Τα φύκη επωάστηκαν για 24 ώρες στο σκοτάδι παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης και στην συνέχεια ακτινοβολήθηκαν για 10 ώρες (συνεχές φως έντασης 50μmolem<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>).



Σχήμα 42. Ισοζύγιο χλωροφυλλών α/β όπως προσδιορίστηκε με μετρήσεις απορρόφησεις σε διαλύματα ακετόνης από δείγματα κυττάρων του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus οι οποίες ποσοτικοποιήθηκαν με τις εξισώσεις της μεθόδου Brouers (βλ. Υλικά και Μέθοδοι).

Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνουμε ότι η σπερμίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της βιοσύνθεσης των χλωροφυλλών. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,25μΜ) φαίνεται να επιταχύνει την παραγωγή χλωροφυλλών και να θέτει τις βάσεις για μιά ταχεία ανάπτυξη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Σε υψηλότερες όμως συγκεντρώσεις έχει αντίθετο αποτέλεσμα. Εμποδίζει ή και αναστέλλει την παραγωγή χρωστικών και στην πράξη δεν επιτρέπει στο πλαστίδιο να συγκεντρώσει τις απαραίτητες χρωστικές για την οργάνωση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Ιδιαίτερης σημασίας είναι οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού με τις οποίες καταγράφηκαν οι διαφορετικές φάσεις από τις οποίες διήλθαν τα πλαστίδια υπό την επίδραση της ακτινοβολίας. Στο σχήμα 43 παρουσιάζονται οι πρωτογενείς καμπύλες της ωρίμανσης του χλωροπλάστη της καλλιέργειας ελέγχου (Α) και δεξιά (Β) οι πρωτογενείς καμπύλες όλων των καλλιεργειών (Control, 0,25mM Spm, 0,75mM Spm, 1,5mM Spm και 3mM Spm) τη χρονική καλλιέργεια ελέγχου έφτασε ικανοποιητικές στιγμή που n τιμές φωτοσυνθετικής απόδοσης (5 ώρες ακτινοβόλησης).



Σχήμα 43. Α. Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού χλωροφύλλης α καλλιέργειας μεταλλάγματος C-2A του γένους *Scenedesmus,* για τις 10 ώρες που ακτινοβολήθηκε (ένταση ακτινοβολίας 50nmolem<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>). Β. Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού χλωροφύλλης α πέντε (5) καλλιεργειών (Control, 0,25mM Spm, 0,75mM Spm, 1,5mM Spm και 3mM Spm) μετά από ακτινοβόληση 5 ωρών (ένταση ακτινοβολίας 50nmolem<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>).

Αξιοποιώντας τις παραπάνω μετρήσεις φθορισμού (οι οποίες ξεπερνούν τις χίλιες τιμές για κάθε καμπύλη) και με εφαρμογή του JIP TEST των Strasser&Strasser 1995 εξάγουμε κάποια συμπεράσματα για την κατάσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των φυκών. Μετά από 5 ώρες συνεχούς φωτισμού έχουμε τα παρακάτω στοιχεία σε ότι αφορά το μέγεθος του LHC (σχήμα 44), την ενέργεια που διαχέεται από το φωτοσύστημα II (σχήμα 45), το πλήθος των κέντρων αντιδρασης (σχήμα 46), την πρωτογενή φωτοχημεία (σχήμα 47) και τέλος ένα γενικό δείκτη δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (σχήμα 48).



Σχήμα 44. Μέγεθος κεραίας των κέντρων αντίδρασης (RC) σε καλλιέργειες C-2A όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Τα φύκη επωάστηκαν για 24 ώρες στο σκοτάδι παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης και στην συνέχεια ακτινοβολήθηκαν για 10 ώρες (συνεχές φως έντασης 50μmolem<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>).



Σχήμα 45. Ενέργεια που διαχέεται από τα φωτοσυστήματα σε καλλιέργειες C-2A όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Τα φύκη επωάστηκαν για 24 ώρες στο σκοτάδι παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης και στην συνέχεια ακτινοβολήθηκαν για 10 ώρες (συνεχές φως έντασης 50μmolem<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>).



Σχήμα 46. Το πλήθος των κέντρων αντιδρασης των φωτοσυστημάτων σε καλλιέργειες C-2A όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Τα φύκη επωάστηκαν για 24 ώρες στο σκοτάδι παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης και στην συνέχεια ακτινοβολήθηκαν για 10 ώρες (συνεχές φως έντασης 50μmolem<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>).



Σχήμα 47. Πρωτογενής φωτοχημεία σε καλλιέργειες C-2A΄ όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών. Τα φύκη επωάστηκαν για 24 ώρες στο σκοτάδι παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης και στην συνέχεια ακτινοβολήθηκαν για 10 ώρες (συνεχές φως έντασης 50μmolem<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>).



Σχήμα 48. Δείκτη δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε καλλιέργειες C-2A΄ όπως υπολογίστηκε από το JIP-TEST χρησιμοποιώντας τιμές φθορισμού της χλωροφύλλης α των φυκών.

Παρατηρούμε ότι η χαμηλή συγκέντρωση σπερμίνης μειώνει την ενέργεια που διαχέεται από τα φωτοσυστήματα εις βάρος της πρωτογενούς φωτοχημείας (Σχήμα 45). Αντίθετα οι υψηλές συγκεντρώσεις (πάνω από 0,75mM) προκαλούν πολύ υψηλές τιμές διάχυσης ενέργειας που φτάνουν

300% πάνω από το μάρτυρα. Επίσης, σε μεγάλο βαθμό φαίνεται να επηρεάζονται τα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυστήματος. Όπως φαίνεται στο σχήμα 46, ενώ στη χαμηλή συγκέντρωση σπερμίνης το πλήθος των φωτοσυνθετικών κέντρων αντίδρασης είναι μεγαλύτερο της καλλιέργειας ελέγχου, στις υψηλές συγκεντρώσεις είναι πολύ μικρότερο, για να μηδενισθεί πρακτικά στην καλλιέργεια με συγκέντρωση σπερμίνης 3mM. Εξάλλου, αυτή η καλλιέργεια παρέμεινε χλωρωτική ενώ ο μάρτυρας είχε ήδη πάρει ένα απαλό πράσινο χρώμα. Από το σχήμα 47 βλέπουμε ότι η καλλιέργεια που προηγείται στην καλύτερη αξιοποίηση (0,86) των φωτονίων είναι αυτή με την χαμηλότερη συγκέντρωση εξωγενώς προστιθέμενης σπερμίνης (0,25mM). Η καλλιέργεια του μάρτυρα υστερεί αισθήτα (τιμή 0,64) και αυτό μπορεί έχει σχέση με το ρόλο της σπερμίνης στην συναρμολόγηση των κέντρων αντίδρασης. Οι Kotzabasis et al ,1993 έδειξαν ότι μόρια σπερμίνης απαντώνται στα κέντρα αντίδρασης πιθανότατα σταθεροποιώντας τις πρωτεϊνες και τις χρωστικές τους. Αντίθετα οι υψηλές συγκεντρώσεις σπερμίνης δεν επιτρέπουν την βελτιστοποίηση της πρωτογενούς φωτοχημείας και ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός παραμένει ανώριμος. Αυτό μπορεί να συσχετισθεί με την ήδη από την προηγούμενη ενότητα- διαπιστωμένη αναστολή της βιοσύνθεσης των συστατικών της φωτοσυνθετικής μηχανής που δεν είναι άλλα από τις χλωροφύλλες. Τέλος, ο γενικός δείκτης τόσο της δομής, όσο και της λειτουργείας των φωτοσυστημάτων περιγράφει με σαφή τρόπο τις διαφορές των δειγμάτων. Σε μικρές δόσεις η σπερμίνη φαίνεται να ενεργοποιεί και να βοηθά το χλωροπλάστη να ωριμάσει (βιοσύνθεση χρωστικών σχήματα 40 και 41, δείκτης ευρωστίας σχήμα 48) μεγάλες φαίνεται να τον αιχμαλωτίζει στο στάδιο του ωχροπλάστη.

Εξάλλου ήδη οι Besford et al (1993) έχουν δείξει ότι η αυξημένη συγκέντρωση σπερμίνης εμποδίζει την αποδόμηση των D<sub>1</sub> και D<sub>2</sub> καθώς και του κυτοχρώματος f (Cytf). Επίσης έδειξαν ότι η αυξημένη σπερμίνη σε συνδυασμό με την μειωμένη πουτρεσίνη εμποδίζει τη γήρανση. Από ανοσολογικά στοιχεία φάνηκε πως οι πολυαμίνες και ειδικά η σπερμίνη σταθεροποιούν τη δομή των θυλακοειδών μεμβρανών και τελικά αποτρέπουν τη γήρανση. Το ότι η σπερμίνη μπορεί να λειτουργεί προστατευτικά (radical scavenger) έχει ήδη προταθεί και από τους Kotzabasis et al (1993). Οι Doernemann et al (1996), έδειξαν ότι κατά την φωτοανάπτυξη του

74
χλωροπλάστη τα συζευγμένα στην μεμβράνη μόρια πουτρεσίνης μειώνονται εκθετικά, ενώ η σπερμίνη παραμένει σταθερή ή αυξάνει σε μικρό βαθμό. Τελικά οι Kotzabasis et al (1999) προτείνουν ότι ο λόγος Spm/Put και όχι το επίπεδο πουτρεσίνης-σπερμίνης είναι ο κύριος ρυθμιστικός παράγοντας για τη δομή και τη λειτουργεία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Οι ίδιοι ερευνητές προτείνουν ότι οι πρωτογενείς φωτοϋποδοχείς για την φωτοπροσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι κοινοί και πιθανόν πρόκειται για συνδυασμό ενός φωτοϋποδοχέα κυανού φωτός και ενός δεύτερου που απορροφά περί τα 680nm και ίσως είναι το κέντρο αντίδρασης του PS ΙΙ. Τέλος, φαίνεται ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες κυρίως οι αλλαγές της πουτρεσίνης και όχι της σπερμίνης ρυθμίζουν το λόγο Spm/Put. Στα πειράματα όμως αυτής της εργασίας είναι λογικό να επιδρά πιο δραστικά η τεχνητή αύξηση της ενδοκυτταρική συγκέντρωσης σπερμίνης που βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις από ότι η τεχνητή μείωση της πουτρεσίνης η οποία εμφανίζει πολύ υψηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις.

## Ο ρόλος της θερμοκρασίας στην *in vitro* αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου από το ένζυμο της οξειδοαναγωγάσης του πρωτοχλωροφυλλιδίου.

Η σπάνια ικανότητα του μεταλλάγματος C-2A να ωριμάζει φωτοσυνθετικά σε χαμηλές θερμοκρασίες (χαμηλότερες των 30°C) γεννά το ερώτημα ποιος είναι υπεύθυνος για αυτήν την μεταβολή. Πρόκειται για επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης, καταστολή γονιδίων ή απλά για στερεοχημικη αλλαγή του ενζύμου κλειδί στην φωτοανάπτυξη του χλωροπλάστη (POR). Ήδη οι Kotzabasis et al, 1999 έδειξαν ότι πρωτογενής φωτοϋποδοχέας για την φωτοανάπτυξη του χλωροπλάστη είναι το ίδιο το πρωτοχλωροφυλλίδιο, συνεπώς θα αρκούσε μια αλλαγή στην καταλυτική ενεργότητα της εν λόγω οξειδοαναγωγάσης για να συντεθεί χλωροφύλλη- από το υπάρχον ενζυμικό σύμπλοκο χωρίς την σύνθεση νέων πρωτεϊνών με τη μεσολάβηση του πυρήνα- η οποία θα επιτρέψει την περαιτέρω ανάπτυξη του χλωροπλάστη. Προκειμένου να διαπιστωθεί το αν η μεταβολή της θερμοκρασίας επιδρά στην καταλυτική δράση του ενζύμου POR και το πόσο σημαντική είναι αυτή η μεταβολή προσανατολίσαμε τις έρευνες μας σε υποκυτταρικό επίπεδο. Απομονώσαμε μεμβράνες προθυλακοειδών οι οποίες περιέχουν κυρίως το ένζυμο της POR 90% [Ryberg et al., 1982 και 1986] και τις επωάσαμε σε χαμηλή θερμοκρασία (20° C) για 3 ημέρες. Αξιοσημείωτο είναι ότι στο διάλυμα επώασης προσθέσαμε 0,25mM NADPH το οποίο είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της POR [Begley et al., 1989]. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίσαμε ότι δεν θα είναι περιοριστικός παράγοντας για την λειτουργία της POR η έλλειψη του συγκεκριμένου συμπαράγοντα. Κάτα την διάρκεια του διαστήματος επώασης λαμβάνονταν τακτικά δείγματα και προσδιοριζόταν το περιεχόμενο πρωτοχλωροφυλλιδίου και χλωροφυλλιδίου χάρη στις διαφορετικές ιδιότητες φθορισμού τους. Στο σχήμα 49 παρουσιάζονται οι πρωτογενείς καμπύλες όπως ελήφθησαν από το φθοροφωτόμετρο.



Chlide



Σχήμα 49. Φάσματα εκπομπής φθορισμού από δείγματα προθυλακοειδών του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους *Scenedesmus obliquus* όπως εκτιμήθηκαν από φωτοφθορισμικές μετρήσεις σε διαλύματα 95% ακετόνη που διεγέρθηκαν στα 430nm και σαρώθηκαν από τα 580 nm έως τα 750 nm με ταχύτητα 5nm sec<sup>-1</sup>.

Αν λειτουργεί το ένζυμο της POR θα έχουμε αύξηση του χλωροφυλλιδίου (προϊόν) και ανάλογη μείωση του πρωτοχλωροφυλλιδίου (αντιδρόν). Επίσης η ενεργότητα αυτή δεν μπορεί να οφείλεται σε αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης γιατί τα δείγματα αποτελούνται κυρίως από απομονωμένες μεμβράνες. Από τις μετρήσεις είναι σαφές ότι το ένζυμο της οξειδοαναγωγάσης πρωτοχλωροφυλλιδίου (POR) TOU παρουσιάζει καταλυτική ενεργότητα και στο σκοτάδι όταν η θερμοκρασία είναι σχετικά χαμηλή (20° C). Μάλιστα τις πρώτες ώρες το ένζυμο φαίνεται να λειτουργεί πολύ πιο καλά από ότι τις επόμενες ώρες όποτε έχει μειωθεί και η συγκέντρωση του απαραίτητου συμπαράγοντα. Εξάλλου οι ενζυμικές διαδικασίες είναι πολύ ευαίσθητες λόγω της θερμοδυναμικής των in nitro συνθηκών. Σε κάθε περίπτωση ο πυρήνας δεν φαίνεται να χρειάζεται, αλλά ούτε και κάποιο άλλο σήμα προκειμένου να τροποποιηθεί η καταλυτική ενεργότητα της POR. Ίσως η τρισδιάστατη στερεοδιαμόρφωση του μορίου να τροποποιείται κατα τέτοιο τρόπο ώστε να βελτιώνεται ή/και ελευθερώνεται το ενεργό του κέντρο και τελικά να ενεργοποιείται. Εξάλλου δεν πρέπει να παραγνωρίζουμε το γεγονός ότι το ένζυμο βρίσκεται ήδη συνδεδεμένο με το υπόστρωμά του και το συμπαράγοντα [Griffiths et al., 1978] συνεπώς μια οποιαδήποτε μεταβολή των επικρατειών του (είτε οφειλόμενη στη μεταβολή της θερμοκρασίας, είτε όχι) δεν αποκλείεται να τροποποιεί τις ενζυμικές του ιδιότητες. Άλλωστε, υπάρχουν αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία και αφορούν κυρίως μεταλλαγμένα ένζυμα που είναι ανενεργά στους 32° C αλλά μερικώς ενεργά στους 24° C [Dahlin et al., 1999]. Τελικά, οι μεμβρανες προελασματοειδών σωματίων και προθυλακοειδών, κυττάρων που επωάστηκαν στους 30° C μπορεί να μην έχουν την δυνατότητα να ανάγουν το πρωτοχλωροφύλλίδιο εφόσον διατηρούνται στους 30° C [Oh-Hama et al., 1987] όμως αναμφισβήτητα την εμφανίζουν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (20° C).

Ο ρόλος της σπερμίνης στην *in vitro* αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου από το ένζυμο της οξειδοαναγωγάσης του πρωτοχλωροφυλλιδίου.

Στην προηγούμενη ενότητα πιστοποιήθηκε η δυνατότητα των μεμβρανών προθυλακοειδών να ανάγουν το πρωτοχλωροφυλλίδιο σε χαμηλή θερμοκρασία. Υπό το πρίσμα αυτό, τα υπάρχοντα δεδομένα της αναστολής τόσο της φωτοεξαρτώμενης όσο και της φωτοανεξάρτητης ανάπτυξης του χλωροπλάστη από τη σπερμίνη γεννούν μία σειρά από ερωτήματα. Μήπως η σπερμίνη δεν επιτρέπει την ωρίμανση του χλωροπλάστη με το να δεσμεύεται εντελώς ειδικά στην POR. Και αν ισχύει κάτι τέτοιο, θα μπορούσε η σπερμίνη να αναστείλει και *in vitro* την αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου από την οξειδοαναγωγάση του. Για την διελεύκανση των παραπάνω ερωτημάτων απομονώσαμε μεμβράνες προθυλακοειδών σωματίων και τις επωάσαμε σε χαμηλή θερμοκρασία (20° C) παρουσία σπερμίνης (2mM). Με τη βοήθεια φθοροφωτομέτρου υπολογίσαμε τις καμπύλες φθορισμού στο σχήμα 50.



Σχήμα 50. Φάσματα εκπομπής φθορισμού από δείγματα προθυλακοειδών του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus όπως εκτιμήθηκαν από φωτοφθορισμικές μετρήσεις σε διαλύματα 95% ακετόνη που διεγέρθηκαν στα 430nm και σαρώθηκαν από τα 580 nm έως τα 740 nm με ταχύτητα 5nm sec<sup>-1</sup>.

Με την αξιοποίηση των σχετικών τιμών φθορισμού των καμπύλων του σχήματος 50 προκύπτουν οι τιμές μετατροπής του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιου, οι οποίες παρουσιάζονται στο σχήμα 51 ώς ποσοστιαίες επί τοις εκατό μεταβολές.



Σχήμα 51. Επί τοις εκατό ποσοστά αύξησης του χλωροφυλλίδίου και μείωσης του πρωτοχλωροφυλλιδίου μετά από επώαση μεμβρανών προθυλακοειδών σε θερμοκρασία 20°C.

Η σπερμίνη φαίνεται να εμποδίζει την καταλυτική δράση της οξειδοαναγωγάσης του πρωτοχλωροφυλλιδίου και να μειώνει κατά το ήμισυ την συνολική παραγωγή του. Πιθανόν να δεσμεύεται στο σύμπλοκο NADPH:POR:Pchlide και να εμποδίζει τη αναγωγή του πρωτοχλωροφυλλιδίου.

## Ανάπτυξη του χλωροπλάστη του μεταλλάγματος C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus σε υψηλές θερμοκρασίες (<32° C) και απουσία φωτός

Ως τη φάση αυτή μελετήσαμε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία την ωρίμανση του χλωροπλάστη από τελείως διαφορετικές πλευρές. Προσεγγίσαμε την διαδικασία απουσία φωτός χάρη στην σπάνια ιδιότητα του μεταλλάγματος C-2A' να πρασινίζει βαθμιαία σε χαμηλή θερμοκρασία ακόμη και στο σκοτάδι, αποδεικνύοντας ταυτόχρονα ότι η οξειδοαναγωγάση του πρωτοχλωροφυλλιδίου έχει ψυχρόφιλο χαρακτήρα. Πετύχαμε αναστολή της φωτοανεξάρτητης αυτής ωρίμανσης του χλωροπλάστη, αυξάνοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα σπερμίνης στα πρώτα σταδια του ωχροπλάστη. Στη συνέχεια, αναστείλαμε με τον ίδιο τρόπο ακόμη και την φωτοανάπτυξη του χλωροπλάστη. Η μοναδική δυσκολία πλέον προσδιορίστηκε στο να ωριμάσει ο χλωροπλάστης σε υψηλές θερμοκρασίες απουσία φωτός. Κάτι τέτοιο θα σήμαινε ότι έχουμε τον πλήρη έλεγχο της ανάπτυξης αυτού του οργανιδίου και είμαστε σε θέση να προσομοιώνουμε οποιεσδήποτε εξωτερικές συνθήκες απλά με την αυξομείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων κατάλληλων ουσιών. Με τη χρήση του ειδικού αναστολέα βιοσύνθεσης της σπερμίνης (1,3 διαμινοπροπάνιο 1,3DP) προκαλέσαμε την μείωση των ενδοκυτταρικών επίιπέδων της. Στο παρακάτω σχήμα 52 παρουσιάζουμε τις τιμές φθορισμού περιεχόμενων χρωστικών (Chl&Chlide) όπως των μετρήθηκαν σε φθοροφωτόμετρο μετά από 36 ώρες επώσης στο σκοτάδι.



Σχήμα 52.Μετρήσεις φθορισμού χλωροφυλλίδιου σε διαλύματα 95% ακετόνη καλλιεργειών C-2A' του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus που επωάστηκαν για 36 ώρες στο σκοτάδι με διαφορετικες συγκεντρώσεις 1,3DP. Οι μετρήσεις φθορισμού έγιναν μετά από διέγερση των χρωστικών με ακτινοβολία μήκους κύματος 430 nm και λήψη του φάσματος εκπομπής για την περιοχή των 580-750nm με ταχύτητα σάρωσης 5nmsec<sup>-1</sup>. Παρατηρούμε ότι η μείωση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων σπερμίνης επιτρέπει την βιοσύνθεση των χλωροφυλλών αλλά όχι σε τέτοιο βαθμό ώστε να ικανοποιηθούν οι ανάγκες της ωρίμανσης του χλωροπλάστη σε χρωστικές.

Ο ρόλος των πολυαμινών στις φωτοσυνθετικές διαδικασίες άρχισε να γίνεται αντιληπτός, κυρίως όταν βρέθηκε ότι οι τρεις κύριες πολυαμίνες (Put, Spd, Spm) υπάρχουν μέσα στο χλωροπλάστη [Galston et al., 1983] και μάλιστα συζευγμένες με τα κύρια σύμπλοκα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού [Kotzabasis et al., 1993]. Μάλιστα, η διαφοροποίηση των επιπέδων των πολυαμινών με την εναλλαγή των αβιοτικών συνθηκών συνηγόρησε υπέρ ενός ρόλου στην προστασία και την προσαρμοστικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού [Smith et al., 1985]. Στην εργασία αυτή επιχειρήθηκε η διαλεύκανση του ρόλου των πολυαμινών στην αντίδραση αναγωγής του πρωτοχλωροφυλλιδίου υπό το πρίσμα ότι η τελευταία επιδρά στην ανάπτυξη του χλωροπλάστη. Ήδη είχε φανεί η επίδραση της ενδοκυτταρικά μειωμένης συγκέντρωσης πουτρεσίνης στην μετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο [Beigbeder et al., 1994]. Αυτό επιβεβαιώθηκε με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της ενεργότητας της οξειδοαναγωγάσης TOU πρωτοχλωροφυλλιδίου. Φάνηκε πως η μειωμένη συγκέντρωση πουτρεσίνης όχι μόνο σταθεροποιεί το σύμπλοκο του ενεργού πρωτοχλωροφυλλιδίου αλλά αυξάνει και την φωτοεξαρτώμενη ενεργότητα της POR. Επειδή η μετατροπή του πρωτοχλωροφυλλιδίου σε χλωροφυλλίδιο θεωρείται ως το πρωτογενές σήμα για την μετάβαση του ωχροπλάστη σε χλωροπλάστη [Kotzabasis et al., 1999] αναζητήθηκαν επιδράσεις των πολυαμινών στην ικανότητα, αλλά και στον απαιτούμενο χρόνο ωρίμανσης των πλαστιδίων. Θεωρήθηκε, λογικό μια διαφορά στην ποσότητα των φωτοσυνθετικών χρωστικών που οφείλεται στις τεχνητές αλλαγές των ενδοκυτταρικών επιπέδων πολυαμινών να προκαλέσει αντίκτυπο στην ανάπτυξη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Πράγματι από την παρούσα εργασία φάνηκε ότι η μείωση της πουτρεσίνης και η αύξηση της σπερμίνης επιδρούν καθοριστικά και μάλιστα με τον ίδιο τρόπο στην ανάπτυξη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αυτό συμφωνεί απόλυτα με έρευνες των Kotzabasis et al [1999] οι οποίοι συνδέουν το λόγο Spm/Put με τη ρύθμιση της φωτοπροσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Επίσης, η ανάπτυξη του ώχροπλάστη σε χλωροπλάστη έχει συνδεθεί με την πτώση των ενδοπλαστιδιακών επιπέδων πολυαμινών [Doernemann et al., 1996] και ιδίως της πουτρεσίνης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο ωχροπλάστης περιέχει

πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση (πάνω από 10 φορές) πολυαμινών από ότι ο χλωροπλάστης [Andreadakis και Kotzabasis 1996] και αυτό μπορεί να συνδυαστεί με δύο φαινόμενα τα οποία έγιναν αντιληπτά και από την παρούσα εργασία.

Πρώτον, οι Andreadakis και Kotzabasis (1996) προτείνουν ότι στον ωχροπλάστη η POR διατηρείται σε ανενεργή μορφή λόγω σταθεροποίησης από πολυαμίνες. Αυτό συνδέεται με τα υψηλά επίπεδα πολυαμινών στους ωχροπλάστες καθώς και τη μη καταστροφή του ενζύμου στο σκοτάδι. Το ένζυμο ενεργοποιείται από το φως με παράλληλη απελευθέρωση από τις πολυαμίνες, οι οποίες αποδομούνται από το κύριο ένζυμο αποδόμησης των πολυαμινών (οξειδάση των διαμινών DAO) το οποίο εμφανίζει αυξημένη ενεργότητα σε αυτή τη φάση [Andredakis και Kotzabasis 1996]. Αυτό μπορεί να συνδεθεί με τη ραγδαία αύξηση της ενεργότητας της DAO μόνο για τις πρώτες ώρες της ακτινοβολίας έχοντας σαν δεδομένο ότι το συσσωρευμένο πρωτοχλωροφυλλίδιο μετά από αυτό το χρόνο δεν υφίσταται και η POR αποδομείται [Dehesh et al 1983]. Αξιοσημείωτο είναι ότι και στην φωτοανεξάρτητη ανάπτυξη του χλωροπλάστη έχει παρατηρηθεί στο C-2A' μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων πουτρεσίνης [Doernemann et al., 1996]. Μάλιστα, οι ίδιοι ερευνητές προτείνουν ότι η μείωση των συζευγμένων στην μεμβράνη μορίων πουτρεσίνης σχετίζεται στενά με την ανάπτυξη του χλωροπλάστη στον Scenedesmus obliquus (αποτελώντας ίσως τμήμα της αλυσίδας μεταφοράς σήματος).

Η δεύτερη διαδικασία που σχετίζεται με την μείωση των πολυαμινών έχει να κάνει με την βιοσύνθεση των χλωροφυλλών και πρωτεϊνών. Δύο παρατηρήσεις συνηγορούν υπέρ του ρόλου αυτού. Αφενός μεν έρευνες έδειξαν ότι οι πολυαμίνες μπορούν να δώσουν αμινομάδες σε α-κετοοξέα μέσω αντίδρασης που καταλύουν ειδικές τρανσαμινάσες στην βιοσύνθεση των αμινοξέων [Tabor and Tabor, 1972]. Αφετέρου δε βρέθηκε ότι η αμινοτρανφεράση των διαμινών μεταφέρει εξειδικευμένα την αμινομάδα της πουτρεσίνης στο α-οξογλουταρικό σχηματίζοντας γλουταμικό οξύ που είναι πρόδρομη ένωση των χλωροφυλλών [Askar and Treptow, 1986].

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η ανάπτυξη του χλωροπλάστη συνδέεται με τη μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων πολυαμινών. Όμως στην παρούσα εργασία φάνηκε ότι η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων

85

σπερμίνης ως ένα βαθμό (έως 0,25mM) ευνοούν την ανάπτυξη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (ταχύτερη ανάπτυξη και υψηλότερες φωτοσυνθετικές αποδόσεις). Ίσως αυτό να συνδέεται με το ότι η σπερμίνη μπορεί να βοηθήσει στην συναρμολόγηση και σταθεροποίηση των επιμέρους συστατικών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Ειδικά η σπερμίνη βρέθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις στα κέντρα αντίδρασης του PS II [Kotzabasis et al., 1993]. Επίσης οι Del Duka et al (1994) έδειξαν ότι οι αποπρωτεϊνες των φωτοσυνθετικών κεραιών (CP24, CP26, CP29) είναι υποστρώματα της πλαστιδιακής τρανσγλουταμινάσης που δεσμεύουν πολυαμίνες σε πρωτεϊνες.

Τί γίνεται όμως με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σπερμίνης; Αυτό που φάνηκε καθαρά από το αποτέλεσμα της παρούσας εργασίας είναι η μερική έως ολική αναστολή της ανάπτυξης του χλωροπλάστη από τα υψηλά επίπεδα σπερμίνης (>0,25mM). Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι ωχροπλάστες περιέχουν υψηλή συγκέντρωση σπερμιδίνης και χαμηλή σπερμίνης ενώ στον χλωροπλάστη ισχύουν τα αντίθετα [Andreadakis και Kotzabasis 1996]. Φαίνεται δηλαδή, ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός έχει αυξημένες ανάγκες σε σπερμίνη αλλά αν οι αυξημένες συγκεντρώσεις σπερμίνης δεν συνδυαστούν με την ύπαρξη χλωροφυλλών, τότε λειτουργούν ανασταλτικά στην ανάπτυξή του.

Οι Beigbeder και Kotzabasis (1994) αιτιολογούν τις επιδράσεις των εξωγενώς ρυθμιζόμενων αυξήσεων της σπερμίνης στο πρωτοχλωροφυλλίδιο και στις χλωροφύλλες ως παρενέργειες των δομικών αλλαγών που συμβαίνουν στα θυλακοειδή. Δηλαδή η σπερμίνη επάγει τέτοιες δομικές αλλαγές στα συστατικά των θυλακοειδών μεμβρανών (λιπίδια και πρωτεϊνες) ώστε να αλλάζει τη συγγένεια της μεμβράνης για τις χρωστικές, οι οποίες όταν αποδεσμέυονται, φωτοοξειδώνονται και καταστρέφονται.

Βέβαια το κύτταρο έχει τρόπο να μειώνει τη συγκέντρωση των πολυαμινών μέσω των καταβολικών ενζύμων που διαθέτει. Όμως οι Andreadakis και Kotzabasis (1996) έχουν μετρήσει μηδενική ενεργότητα στο κύριο καταβολικό ένζυμο των πολυαμινών (DAO) σε απομονωμένους ωχροπλάστες. Ίσως αυτό μπορεί να συνδυαστεί με την πιο έντονη επίδραση της σπερμίνης σε σύγκριση με αυτή της μειωμένης ενδοκυτταρικής πουτρεσίνης. Δηλαδή ίσως το φύκος να έχει μειώμενη δυνατότητα να μεταβολίσει την επιπλέον σπερμίνη, ενώ την ίδια στιγμή έχει σχετικά

86

αυξημένη δυνατότητα να συνθέσει πουτρεσίνη αφού έχουν μετρηθεί από τους Beigbeder et al (1994) υψηλές τιμές ενεργότητας για το κύριο ένζυμο βιοσύνθεσης της πουτρεσίνης στο C-2A' (ornithin decarboxylase ODC).

Έχοντας υπόψιν τη διεθνή βιβλιογραφία τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας θα μπορούσαν να συμβάλλουν σε ένα μοντέλο λειτουργείας της φωτομετατροπής του Pchlide σε Chlide κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Στο σκοτάδι έχουμε υψηλές συγκεντρώσεις πολυαμινών και ιδιαίτερα πουτρεσίνης τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο πλαστιδίων αλλά και επίπεδο μεμβρανών [Andreadakis και Kotzabasis 1995, Doernemann et al 1996]. Η υψηλή σχέση Put/Spm σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας κρατάει το ένζυμο σταθεροποιημένο αλλά ικανο να μετατρέψει το Pchlide σε Chlide όταν εκτεθεί στο φως. Με την έκθεση στο φως έχουμε ραγδαία και απότομη μείωση της πουτρεσίνης και αύξηση της σπερμίνης. Αποτέλεσμα αυτής της μείωσης της σχέσης Put/Spm είναι το μπλοκάρισμα της φώτομετατροπής του Pchlide σε Chlide. Η μείωση αυτή της πουτρεσίνης παίρνει κάποιες ώρες πέραν των οποίων η ενεργότητα της POR παίζει δευτερεύοντα ρόλο. Αυτό βρίσκεται άλλωστε σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα των Apel et al (1995) όπου το ένζυμο POR μετά από περίπου 8 ώρες στο φως φωτοοξειδώνεται και καταστρέφεται. Επενδύοντας λοιπόν, στην κατανόηση της λειτουργίας του ενζύμου κλειδί (POR) υπό την επίδραση συγκεκριμένων πολυαμινών στην ανάπτυξη του χλωροπλάστη, είμαστε προς το παρόν σε θέση να ελέγχουμε στο μετάλλαγμα C-2A΄ πλήρως το αναπτυξιακό στάδιο του οργανιδίου αυτού.

Ανακεφαλαιώνοντας, τονίζουμε ότι εντοπίσαμε την κατάλληλη φάση για να μελετήσουμε τα επίπεδα πρωτοχλωροφυλλιδίου και χλωροφυλλιδίου και εν συνεχεία αναζητήσαμε την επίδραση των πολυαμινών στα επίπεδα αυτά είτε αυξάνοντας, είτε μειώνοντας τεχνητά την ενδοκυτταρική συγκέντρωσή τους. Επιβεβαιώθηκε ότι η μείωση της πουτρεσίνης και η αύξηση της σπερμίνης επιφέρουν σημαντικές διαφορές. Ετσι, εστιάσαμε στην μείωση της πουτρεσίνης γιατί φάνηκε ότι υπερισχύει έναντι των άλλων και διαπιστώσαμε POR ÓΤΙ σταθεροποιεί την και αναστέλλει την μείωση του που συμβαίνει υπό φυσιολογικές συνθήκες όταν πρωτοχλωροφυλλιδίου γηράσκουν τα κύτταρα. Με δεδομένο ότι οι πολυαμίνες επηρεάζουν τα επιπέδα των χλωροφυλλών του ωχροπλάστη ερευνήσαμε πώς αυτό επηρεάζει την ωρίμανση του οργανιδίου. Ξεχωρίσαμε τρεις περιπτώσεις ώστε να προσεγγίσουμε την διαδικασία όσο το δυνατόν πιο πολύπλευρα. Ερευνήσαμε την ανάπτυξη απουσία φωτός χάρη στην σπάνια ιδιότητα του μεταλλάγματος C-2A' να συνθέτει χλωροφύλλες σε καθορισμένες συνθήκες (θερμοκρασίες <28°C). Επίσης ερευνήσαμε την κλασσική φωτομορφογένεση και πάλι αυξάνοντας ή μειώνοντας τεχνητά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα πολυαμινών. Τέλος, ερευνήθηκε ο συνδυασμός αρχικής ανάπτυξης στο σκοτάδι, αλλά σε ευνοικές για την βιοσύνθεση των χλωροφυλλών συνθήκες (θερμοκρασίες<28°C) και στη συνέχεια μετάβαση σε συνθήκες φωτισμού προκειμένου να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του χλωροπλάστη. Όλα αυτά επαναλήφθηκαν εστιάζοντας δικαίως στην αύξηση της σπερμίνης αυτή τη φορά και όχι στη μείωση της πουτρεσίνης, επειδή η πρώτη έδειξε πιο έντονες διαφορές που έφθασαν έως την πλήρη αναστολή της διαδικασίας. Τελικά, επιδιώχθηκε η ωρίμανση του χλωροπλάστη σε αποδεδειγμένα απαγορευτικές για το C-2A' συνθήκες (απόλυτο σκοτάδι-θερμοκρασίες >32°C) και υπήρξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Επενδύοντας λοιπόν, στην κατανόηση της λειτουργείας του ενζύμου κλειδί (POR) υπό την επίδραση συγκεκριμένων πολυαμινών στην ανάπτυξη του χλωροπλάστη, είμαστε προς το παρόν σε θέση να ελέγχουμε στο μετάλλαγμα C-2A' πλήρως το αναπτυξιακό στάδιο του οργανιδίου αυτού.

## <u>Περίληψη</u>

Ένα καθοριστικό βήμα στην μετάβαση του ωχροπλάστη σε χλωροπλάστη είναι ο σχηματισμός των χρωστικών (κυρίως Chl a και Chl b) που θα χρησιμεύσουν στη δόμηση της φωτοσυνθετικής μηχανής (Cytb6f, PS I, PS II, LHC)[Wollaman et al, 1999]. Την σημαντική αυτή κατάλυση του υομόαδοαπ των χρωστικών (πρωτοχλωροφυλλίδιο) την επιτελεί η οξειδοαναγωγάση πρωτοχλωροφυλλιδίου (Protochlorophyllide TOU Oxidoreductase POR E.C, 1.3.1.33). Το ένζυμο αυτό δεσμεύει ένα μόριο πρωτοχλωροφυλλιδίου και μαζί με τον συμπαράγοντα NADPH αποτελούν το ενεργό πρωτοχλωροφυλλιδίο (POR:Pchlide:NADPH) δηλαδή το σύμπλοκο το οποίο όταν ακτινοβοληθεί έχει тη δυνατότητα να ανάγει то πρωτοχλωροφυλλίδιο. Είναι γνωστό ότι τα φύκη σε αντίθεση με τα αγγειόσπερμα σχηματίζουν λειτουργικό φωτοσυνθετικό μηχανισμό και στο απόλυτο σκοτάδι. Το μετάλλαγμα C-2A' που άλλαξε την λειτουργία της POR μπλοκάρει στο σκοτάδι την βιοσύνθεση των χλωροφυλλών στο επίπεδο του πρωτοχλωροφυλλιδίου και οι σχηματιζόμενες πρωτεϊνες δεν μπορούν να οργανωθούν σε φωτοσυνθετικά σύμπλοκα με τις χρωστικές, λόγω έλλειψης χρωστικών (μόνο ίχνη χλωροφυλλών ανιχνεύονται [Senger και Brinkmann 1986]). Με αυτά τα δεδομένα ο σχηματισμός του φωτοσυνθετικού μηχανισμού εξαρτάται μόνο από την ενεργοποίηση του ενζύμου POR που θα μετατρέψει το πρωτοχλωροφυλλίδιο σε χλωροφυλλίδιο (είτε με το φώς [Senger και Brinkmann 1986], είτε με την μείωση της θερμοκρασίας [Oh-Hama et al 1987]) και στην συνέχεια σε χλωροφύλλη για να σχηματίσει με τις αντίστοιχες πρωτεϊνες ενεργά φωτοσυνθετικά σύμπλοκα. Επίσης, η ανάπτυξη του ώχροπλάστη σε χλωροπλάστη έχει συνδεθεί με την πτώση των ενδοπλαστιδιακών επιπέδων πολυαμινών [Doernemann et al., 1996] και ιδίως της πουτρεσίνης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο ωχροπλάστης περιέχει πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση (πάνω από 10 φορές) πολυαμινών από ότι ο χλωροπλάστης [Andreadakis και Kotzabasis 1996]. Παρά το ότι η ανάπτυξη του χλωροπλάστη συνδέεται με τη μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων πολυαμινών φάνηκε ότι η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων σπερμίνης ώς ένα βαθμό (έως 0,25mM) ευνοούν την ανάπτυξη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (ταχύτερη ανάπτυξη και υψηλότερες φωτοσυνθετικές αποδόσεις).

Υψηλότερες όμως συγκεντρώσεις σπερμίνης λειτουργούν ανασταλτικά στην ανάπτυξή του χλωροπλάστη (>0,25mM). Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι ωχροπλάστες περιέχουν υψηλή συγκέντρωση σπερμιδίνης και χαμηλή σπερμίνης ενώ στον χλωροπλάστη ισχύουν τα αντίθετα [Andreadakis και Kotzabasis 1996]. Φαίνεται δηλαδή, ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός έχει αυξημένες ανάγκες σε σπερμίνη αλλά αν οι αυξημένες συγκεντρώσεις σπερμίνης δεν συνδυαστούν με την ύπαρξη χλωροφυλλών, τότε λειτουργούν ανασταλτικά στην ανάπτυξή του. Στο σκοτάδι έχουμε υψηλές συγκεντρώσεις πολυαμινών και ιδιαίτερα πουτρεσίνης τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο πλαστιδίων αλλά και επίπεδο μεμβρανών [Andreadakis και Kotzabasis 1995, Doernemann et al 1996]. Η υψηλή σχέση Put/Spm κρατάει το ένζυμο POR σταθεροποιημένο αλλά ικανο να μετατρέψει το Pchlide σε Chlide όταν εκτεθεί στο φως. Με την έκθεση στο φως έχουμε ραγδαία και απότομη μείωση της πουτρεσίνης και αύξηση της σπερμίνης. Αποτέλεσμα αυτής της μείωσης της σχέσης Put/Spm είναι το μπλοκάρισμα της φώτομετατροπής του Pchlide σε Chlide. Επενδύοντας λοιπόν, στην κατανόηση της λειτουργείας του ενζύμου κλειδί (POR) υπό την επίδραση συγκεκριμένων πολυαμινών στην ανάπτυξη του χλωροπλάστη, είμαστε προς το παρόν σε θέση να ελέγχουμε στο μετάλλαγμα C-2A' πλήρως το αναπτυξιακό στάδιο του οργανιδίου αυτού.

## Βιβλιογραφία

- Andreadakis A., Kotzabasis K., Changes in the biosynthesis and catabolism of the polyamines in isolated plastids during the chloroplast photodevelopment. J. Photochem. Photobiol. 33:163-170 (1996).
- 2. Apelbaum A., Canellakis Z.N., Applewhite P.B., Kaur-Sawney R., Galston A.W., -Binding of spermidine to a unique protein in thin layer tobacco tissue culture. Plant Physiol. 88:996-998 (1988).
- 3. Armstrong G.A, Apel K. and Ruediger –Does a light harvesting Pchlide a/bbinding protein complex exist? TiPS Vol 5, No1 40-44 (2000)
- 4. Askar A., Treptow H., Biogene amine in Lebensmitteln, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 1986.
- Bagni N., Serafini-Fracassini D.- The role of polyamines as growth factors in higher plants and their mechanism of action. *In* Plant growth substances, pp.1205-1217. Hirikawa Publ. Co., Tokyo, 1973.
- Barkan A., Voelker R., Mendel-Hartvig J., Johnson D., Walker M. Genetic analysis of chloroplast biogenesis in higher plants. Plant. Physiol. 93:163-170 (1995)
- Begley T.P. and Young H. Protochlorophyllide oxidoreductase .I Determination of the regiochemistry and the stereochemistry of the reduction of protochlorophyllide to chlorophyllide. J Am.Chem. Soc 111;3095-3096 (1989)
- Beigbeder A. and Kotzabasis K.- The influence of exogenously supplied spermine on protochlorophyllide and chlorophyll biosynthesis J.Photochem.Photobiol. 23:201-206 (1994).
- Beigbeder A., Vavadakis M., Navakoudis E., Kotzabasis K. Influence of polyamine inhibitors on light-independent and light-dependent chlorophyll biosynthesis and on the photosynthetic rate. J. Photochem. Photobiol. 28:235-242 (1995).
- Birve SJ, Selstam E, Johanson B-A: Secondary structure of NADPH: protochlorophyllide oxidureductase examined by circular dichroism and prediction methods. Biochem J 317: 549-555 (1996).
- 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.), pp.53-66. Acad. Press. N.Y.
- 12.Borell A., Carbonell L., Farras R., Puig-Parellada P., Tiburcio A.F. Polyamine metabolism and its regulation. Physiol. Plant. 99:385-390 (1997).
- Bors W., Langebartels C., Michel C., Sandermann H.Jr., Polyamines as radical scavengers and protectants against ozon damage. Phytochemistry 28(6):1589-1595 (1989).
- 14.Bradford M.M. 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 (1976).
- Brouers M., Michael-Wolwertz M.R. Estimation of protochlorophyll(ide) contents in plant extracts; re-evaluation of the molar absorption coefficient of protochlorophyll(ide). Photos. Res. 4: 265-270 (1983).

- 16.Brinkmann G., Senger H. Is there a regulatory effect of red light during greening of *Scenedesmus* mutant C-2A? *In* Photoreceptors and plant development pp.209-218. Univ. Press, Antwerp, Belgium.
- 17.Brinkmann G., Senger H. 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, 1978, pp. 201-206.
- Chapel M., Teissie J., Alibert G. Electrofusion of spermine treated plant protoplasts. FEBS Lett. 173:331-336 (1984).
- 19.Cohen A., Zalik S. Magnesium replacement by polyamines in higher plant cellfree polyphenylalanine synthesis. Phytochemistry 17:113-118 (1978).
- 20.Dahlin , Aronson, Wilks, Lebedev, Sundqvist and Timko. The role of the protein surface charge in catalytic activity and chloroplast membrane assosiation of the pea NADPH:POR as revealed by alanine scanning mutagenesis. Plant Molecular Biology39 309-323 (1999).
- 21.Del Duca S., Tidu V., Bassi R., Esposito C., Serafini-Fracassini D. Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus*. Planta 193:283-289 (1994).
- 22.Dörnemann D., Kotzabasis K., Richter P., Breu V., Senger H. The regulation of chlorophyll biosynthesis by the action of protochlorophyllide on <sup>glu</sup>t-RNA ligase. Bot. Acta 102:112-115 (1989).
- 23.Flink L., Pettijohn D.E. Polyamines stabilize DNA folds. Nature 253:62-63 (1975).
- 24.Ford C., Wang W. Temperature sensitive yellow mutants of *Chlamydomonas reihardtii*. Molec. Gen. Genet. 180:5-10 (1980).
- 25.Fujita Y. Protochlorophyllide reduction: a key step in the greening of plants. Plant Cell Physiol. 37(4): 411-421 (1996).
- 26.Galston A.W., Kaun-Sawney R., Altabella T., Tiburcio A.F. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. Bot. Acta 110: 197-207 (1997).
- 27.Griffiths WT: Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. Biochem J 174: 681-692 (1978).
- 28.Hachtel W., Friemann A. *In* Pigment-Protein complexes in plastids: synthesis and assembly. Edited by Sundqvist C. and Ryberg M., pp. 279-310
- 29.Hendry, G.A.F. Houghton J and Brown. New Physiolosy 107: 255-302 (1987)
- 30.Hoober K and Eggink L-A potential role of chlorophylls b and c in assembly of light harvesting complexes FEBS 489 1-3 (2001.
- 31.Holden M. Chlorophylls. *In* T.W. Goodwin (ed.), Chemistry and Biochemistry of plant pigments. Academic Press, London, 1965, pp. 461-488.
- 32.Hsu, B.D-Evidence for the contribution of S state transitions of oxygen evolution to the initial phase of flurescence induction- Photosynthesis Res. 36: 81-88 (1993)
- 33.Jones C., Hare D., Compton S. Measuring plant protein with Bradford assay. Evaluation and standard method. J. of Chem. Ecology 15(3): 979-992 (1989).

- 34.Kotzabasis K., Strasser B. Navakoudis E., Senger H., Doernemann D.-The regulatory role of polyamines in structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. J. Photochemistry Photobiology 50:45-52 (1999).
- 35.Kotzabasis K., E.Navakoudis,G. Tsolakis, Senger H, D. Doernemann.-Characterization of the photoreceptor (s) responsible for the regulation of the intracallular polyamine level and the putative participation of heterotrimeric Gproteins in the signal transduction chain J Photochemistry Photobiology 50:38-44 (1999)
- 36.Kotzabasis K., Christakis-Hampsas M., Roubelakis-Angelakis K.A. A narrowbore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated and bound polyamines. Anal. Biochem. 214: 484-489 (1993).
- 37.Kotzabasis K., Fotinou C., Roubelakis-Angelakis K.A., Ghanotakis D. -Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosynthesis Res. 38: 83-88 (1993).
- 38.Kotzabasis K., Romer S., Senger H. 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 (1990).
- 39.Kotzabasis K., Senger H. Free, conjugated and bound polyamines during the cell cycle in synchronized cultures of *Scenedesmus obliquus*. Z. Naturforsch 49: 181-185 (1994).
- 40.Kotzabasis K. and Senger H.- Incorporation of photoreduced protochlorophyll into reaction centers. J.Photochem. Photobiol. 8:255-262 (1991).
- 41.Kovacheva S.,Ryberg M. and Sundqvist –ADP/ATP and protein phosphorylation dpendence of phototransformable Pchlide in isolated etioplast membranes.Photosynthesis Research 64:127-136 (2000)
- 42.Krueger G, Tsimilli-Michael M. and Strasser R.J.-Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in Camellia Leaves. Physiol.Plant 101:265-277 (1997)
- 43.Kuhen G., Affolter A.U., Atmar V.J., Seebeck T., Gubler U., Braun R. Polyamine mediated phosphorylation of a nucleolar protein from *Physarum polycephalum* that stimulates rRNA synthesis. PNAS 76: 2541-2545 (1979).
- 44.Laemmli LJK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T<sub>4</sub> .Nature 227: 680-685 (1970).
- 45.Li j, Timko MP; The pc-1 phenotype of *Chlamydomonas reinhardtii* from a deletion mutation in the nuclear gene for NADPH: protochlorophyllide reductase. Plant Mol Biol 30: 15-37 (1996).
- 46.Martin-Tanguy J. Conjugated polyamines and reproductive development: Biochemical, molecular and physiological approaches. Physiol. Plant. 100: 675-688 (1997).
- 47.Masgrau C., Altabella T., Farras R., Flores D., Thompson J., Besford R., Tiburcio A.F. Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. The Plant J. 11(3):465-473 (1997).
- 48.Morishige D.T., Preiss S. Light induced biogenesis of the light harvesting complexes of photosystems I and II. Photosynthesis Res. 44: 183-190 (1995).

49.Mullet J.E. Annu. Ren Plent Physiol. Plant Mole. Biol. 39: 475-502 (1988).

- 50.Oh-Hama T.,Kotzabasis K., Senger H.-Temperature inducible protochlorophyllide reduction in darkness in a pigment mutant of Scenedesmus obliquus-Physiol.Plant 68:222-230 (1987).
- 51.Oster U., Tanaka R. Tanaka A. and Ruediger W. –Cloning and functional exprssion of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 21: (2) 305-310 (2000).
- 52.Paulsen H. Pigment ligation to proteins of the photosynthetic apparatus in higher plants. Physiol. Plant. 100: 760-768 (1997).
- 53.Rastogi R., Davies P. J. Polyamine metabolism in ripening tomato fruit. Plant Physiol. 95: 41-45 (1991).
- 54.Reinbothe C., Apel K., Reinbothe S: A light-induced protease from barley plastids degrades NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase completed with chlorophyllide biosynthesis. Plant Cell 8: 763-769 (1996).
- 55.Reinbothe C., Reinbothe S, Lebedev N., Apel K:PORA and PORB, two light depedent protochlorophyllide reducing enzymes of angiosperm chlorophyll biosynthesis. Plant cell 8: 763-769 (1996).
- 56.Reinbothe C., Lebedev N., Apel K., Reinbothe S. Regulation of chloroplast protein import through a protochlorophyllide-responsive transit peptide. PNAS 94: 8890-8894 (1997).
- 57.Reinbothe S., Reinbothe C. Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. Plant Physiol. 111: 1-7 (1996).
- 58.Ryberg M., Sundqvist C. Characterization of prolamellar bodies and prothylakoids fractionated from wheat etioplasts. Physiol Plant. 56: 125-132 (1982b).
- 59.Schulz R., Senger H. Protochlorophyllide reductase: a key enzyme in the greening process. *In* Pigment-protein complexes in plastids: synthesis and assembly. Pp.179-218 (1993). Acad. Press. Inc.
- 60.Senger H.,Brinkmann G.-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 (1986).
- 61.Spano AJ, He Z, Michel H, Hunt DF, Timko MP: Molecular cloning, nuclear gene structure and development al exprssion of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase in pea (*Pisum satvum* L.) Plant Mol Biol 18: 967-972 (1992).
- 62.Strasser B.J. and Strasser R.J- Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test- In Mathis, P. (ed.): Photosynthesis: from light to Biosphere. Vol.V. 977-980 (1995).
- 63.Strasser B.J. Strasser R.J. -Oscillation of the chlorophyll a fluorescence related to the S-state of the oxygen evolving complex.Photosynthesis: Mechanisms and effects. 5:4325-4328 (1998)
- 64.Sundqvist C., Dahlin C. With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light harvesting complexes. Physiol. Plant. 100: 748-759 (1997).
- 65.Tabor H., Tabor C.W. Biosynthesis and metabolism of 1,4-diaminobutanone, spermidine, spermine and related amines. Adv. Enzym. 36: 20 (1972).

- 66.Tamiko O., Kotzabasis K., Senger H. Temperature inducible protochlorophyllide reduction in darkness in a pigment mutant of *Scenedesmus obliquus*. Physiol Plant. 69: 29-34 (1987).
- 67.Tanaka A., Yamamoto Y., Tsuji H. Formation of chlorophyll-protein complexes during greening. 2.Redistribution of chlorophyll among apoproteins. Plant Cell Physiol. 32(2): 195-204 (1991).
- 68. Tiburcio A.F., Altabella T., Borell A., Masgrau C. Polyamine metabolism and its regulation. Physiol Plant. 100: 664-674 (1997).
- 69.Tiburcio A.F., Campos J.L., Figueras X., Besford R.T. Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. Plant Growth Regul. 12: 331-340 (1993).
- 70.Torrigiani P., Serafini-Fracassini D., Biondi S., Bagni N. Evidence for the subcellular localization of polyamines and their biosynthetic enzymes in plant cells. J. Plant Physiol. 124: 23-29 (1986).
- 71.Tsimilli-Michael m. Pecheux M. and Strasser R. J. –Vitality and stress adaptation of the symbionts of coral reef and temperate foraminifers probed *in hospite* by the flurescence Kinetics OJIP –Archs.Sci.Geneve 49:173-203 (1998)
- 72.Walden R., Cordeiro A., Tiburcio A.F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. Plant Physiol. 113: 1009-1013 (1997).
- 73.Wellburn F., Wellburn A.R., Senger H. Changes in ultrastructrure and photosynthetic capasity wtithin *Scenedesmus obliquus* mutants C-2A, C-6D and C-6E on transfer from dark grown to illuminated conditions. Protoplasma 103: 35-54 (1980).
- 74.Wellburn A.- The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J. Plant Physiol. 144: 307-313 (1994).
- 75.Wettstein D., Gough S., Kannangara C.G. Chlorophyll biosynthesis. The Plant Cell 7: 1039-1057 (1995).
- 76.Wollaman F.A., Minai L. and Nechushtai R.-The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes.Biochim.Biophysic. Acta 1411:21-85 (1999)