

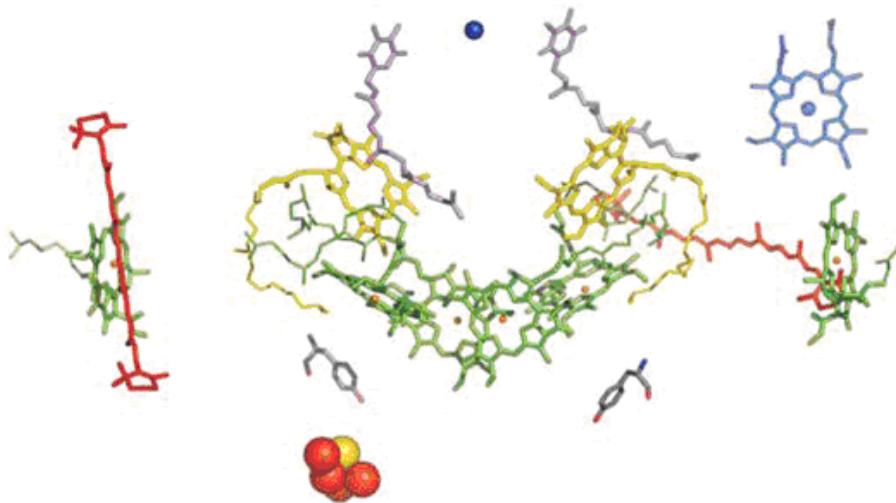


ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
BIOLOGY DEPARTMENT UNIVERSITY OF CRETE

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

*Ο ρόλος της σπερμίνης στο κέντρο αντίδρασης του
φωτοσυστήματος II*



Επιβλέπων Καθηγητής: Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Συνεπιβλέποντες:

Καθ. Δημήτριος Γανωτάκης
Επικ. Καθ. Στέργιος Πυρίντσος

Ιωάννης Ναούμ (Α.Μ.: 555)

Ηράκλειο, 2011

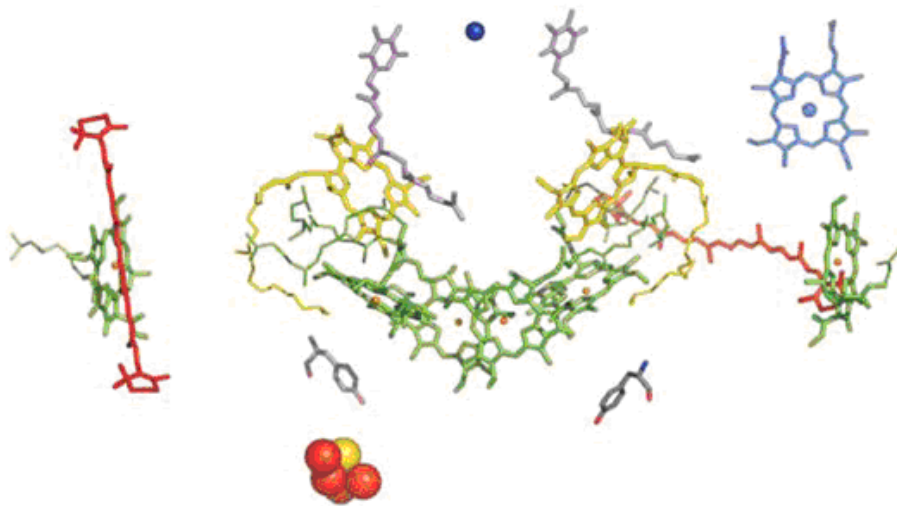


ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
BIOLOGY DEPARTMENT UNIVERSITY OF CRETE

Graduate Program
Plant Molecular Biology & Biotechnology

Master Thesis

*The role of spermine in the reaction center of
photosystem II*



Supervisor: Prof. Kiriakos Kotzabasis

Co- Supervisors:

Prof. Demetrios Ghanotakis
Assist. Prof. Stergios Pirintsos

Ioannis Naoum

Heraklion, 2011

Περίληψη

Ο όρος πολυαμίνες περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό οργανικών μορίων, με περισσότερες από μια αμινομάδες, που απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς. Κυριότερες είναι οι διαμίνες αγματίνη και πουτρεσίνη, η τριαμίνη σπερμιδίνη και η τετραμίνη σπερμίνη. Έρευνες έχουν δείξει πως οι Put, Spd και Spm υπάρχουν σε άθικτους χλωροπλάστες, συγκεκρωμένα σε μεμβράνες θυλακοειδών, σε μεμβράνες του PS II, σε πρωτεΐνες του LHC II και στο σύμπλοκο PS II (Kotzabasis et al., 1993). Επιπρόσθετα, μόνο σπερμίνη ανιχνεύτηκε σε φωτοχημικά ενεργούς πυρήνες PS II και στο κέντρο αντίδρασης του PS II (Kotzabasis et al., 1993).

Μέσα από τη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή επιχειρήθηκε να εντοπισθεί και να κατανοηθεί ο ρόλος της σπερμίνης στη λειτουργία του φωτοσυστήματος II, *in vitro*, έπειτα από απομόνωση μεμβρανών εμπλουτισμένων σε PSII.

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε, σε χαμηλές συγκεντρώσεις σπερμίνης (<100μM), μικρή αύξηση του επαγωγικού φθορισμού. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση του χρόνου που απαιτείται για να φθάσει ο φθορισμός στο μέγιστο του (F_{max}), γεγονός που δείχνει ότι με κάποιο τρόπο η σπερμίνη κρατά την Q_A οξειδωμένη, λειτουργώντας πιθανότατα ως πρωτονοφόρο.

Αντίθετα, υψηλές συγκεντρώσεις σπερμίνης, πάνω από 100μM, προκαλούν σε μεμβράνες πλούσιες σε φωτοσύστημα II (~50μg Chl /ml) απελευθέρωση των τριών εξωτερικών πολυπεπτιδίων (17,23 και 33kDa). Η απελευθέρωση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τόσο τη μείωση του μέγιστου επαγωγικού φθορισμού όσο και τη μείωση της έκλυσης του οξυγόνου.

Επίσης, η σπερμίνη, όπως και πολλές αμίνες που έχουν μελετηθεί στο παρελθόν, σε steady state πειράματα αναστολής του φωτοσυστήματος II, ανταγωνίζεται με το χλώριο για μια θέση πρόσδεσης.

Τέλος, μέσω της φασματοσκοπίας EPR πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια για την ανίχνευση της παρουσίας της σπερμίνης στο σύμπλοκο του Mn. Φάνηκε πως παρουσία σπερμίνης εμποδίζεται η μετάβαση στην S_3 κατάσταση, πιθανότατα λόγω πρόσδεσης της πολυαμίνης στην S_2 .

Abstract

Polyamines include a large number of organic molecules with more than one amino groups, and are found in all organisms. The most important are the diamines agmatine and putrescine, the triamine spermidine and the tetramine spermine. Studies have shown that Put, Spd and Spm are present in intact chloroplasts, particularly in thylakoids membranes, in PS II membranes and in the light harvesting complex, LHCI (Kotzabasis et al., 1993). Additionally, only spermine was detected in photochemically active PS II reaction centers and in the PS II core (Kotzabasis et al., 1993).

Through this master thesis was made an attempt to identify and understand the role of spermine in the reaction center of photosystem II, *in vitro*, after isolation of PSII enriched membranes.

At low concentrations (<100mM), exogenous spermine increased chlorophyll fluorescence. The time needed to reach the maximal fluorescence intensity (F_{max}) is increased in the presence of spermine, suggesting that , somehow, spermine keeps Q_A oxidized, probably acting as ionophore.

In contrast, high concentrations of spermine, more than 100mM, induced release of the three extrinsic polypeptides of photosystem II, with apparent molecular weights of 17, 23 and 33kDa. The loss of the three extrinsic polypeptides has resulted in reduction of the maximal fluorescence induction and inhibition of oxygen evolution.

Spermine, like other primary amines, is purely competitive with Cl^- , as was found in steady state inhibition studies of photosystem II.

Finally, EPR spectroscopy revealed the presence of spermine in the complex of Mn. Moreover, exogenously supplied spermine prevented the transition to state S_3 , probably due to binding of polyamine in S_2 state.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	2
1.1. Φωτοσύνθεση	2
1.2. Χλωροπλάστες	2
1.3. Οργάνωση Φωτοσυνθετικών Συμπλόκων	3
1.4. Το φωτοσύστημα II (PS II)	4
1.4.1. Οι υπομονάδες του Φωτοσυστήματος II (PS II)	7
1.4.2. Συλλογή φωτός και μεταφορά προς το ενεργό κέντρο: χλωροφύλλες και καροτενοειδή	10
1.4.3. Η πλευρά του δότη ηλεκτρονίων: το σύμπλοκο του Mn	11
1.5. Πολυαμίνες	15
1.6. Φασματοσκοπία EPR	17
1.6.1. Σπιν και μαγνητική ροπή	17
1.6.2. Το φαινόμενο Zeeman και ο παραμαγνητικός συντονισμός	18
1.6.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ένταση του σήματος EPR	20
1.6.4. Κορεσμός	21
1.6.5. Υπέρλεπτες αλληλεπιδράσεις	22
2. Υλικά και Μέθοδοι	24
2.1. Απομόνωση και επεξεργασία δειγμάτων φωτοσυστήματος II	24
2.1.1. Σύσταση Διαλυμάτων	24
2.1.2. Απομόνωση Θυλακοειδών Μembrανών από Σπανάκι	25
2.1.3. Απομόνωση PSII Μembrανών (BBY) από Σπανάκι	25
2.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης	26
2.3. Πολαρογραφικές μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου	26
2.4. Επαγωγικός Φθορισμός	27
2.5. Ηλεκτροφόρηση	29
2.5.1. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση	29
2.6. Φασματοσκοπία EPR	31
2.6.1. Γέφυρα μικροκυμάτων	31
2.6.2. Κοιλότητα συντονισμού	32
2.6.3. Μαγνήτης	32
2.6.4. Ανιχνευτής 'Lock in'	33
2.6.5. Λογισμικά Συστήματα	33
2.6.6. Κρυοστάτης	33
3. Αποτελέσματα-Συζήτηση	35
3.1. Γενικά	35
3.2. Επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων σπερμίνης στη μοριακή οργάνωση και λειτουργικότητα του PSII	36
3.3. Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων σπερμίνης στη μοριακή οργάνωση και λειτουργικότητα του PSII	41
3.4. Επίδραση της σπερμίνης στο σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου του φωτοσυστήματος II (OEC)	47
4. Συμπεράσματα	56
5. Βιβλιογραφία	57

1. Εισαγωγή

1.1. Φωτοσύνθεση

Για να μπορέσει να διατηρηθεί η ζωή στο πλανήτη μας χρειάζεται μια συνεχή παροχή ενέργειας, την οποία προμηθεύονταν οι πρώτοι ζωντανοί οργανισμοί από τα οργανικά αποθέματα, όταν ακόμα η ατμόσφαιρα της γης ήταν πολύ διαφορετική (Rothschild, 2008). Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, κάποια βακτήρια μπόρεσαν να εκμεταλλευτούν την ηλιακή ακτινοβολία, μετατρέποντάς την σε χημική, και να παράγουν οργανικές ενώσεις απαραίτητες για την επιβίωσή τους. Επομένως, οι οργανισμοί αυτοί μπόρεσαν να ανεξαρτητοποιηθούν από τα οργανικά αποθέματα, έγιναν δηλαδή αυτότροφοι, και παρήγαγαν ένα μεγάλο ποσοστό της ενέργειας πάνω στον πλανήτη μας είτε σε πρόσφατους (βιομάζα) είτε σε πολύ παλιούς χρόνους (απολιθωμένη καύσιμη ύλη).

Κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, το φως προμηθεύει την ενέργεια που απαιτείται για την οξείδωση του νερού με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται ως παραπροϊόν οξυγόνο. Έτσι, μέσω αυτής της βιοχημικής διαδικασίας, το ποσοστό οξυγόνου στην ατμόσφαιρα αυξήθηκε, εμφανίστηκε το στρώμα του στρατοσφαιρικού όζοντος δημιουργώντας επομένως τις κατάλληλες συνθήκες για την εξέλιξη της ζωής με τη μορφή που τη γνωρίζουμε σήμερα. Ο όλος μηχανισμός της φωτοσύνθεσης είναι εξαιρετικά πολύπλοκος, απαιτεί τη συμμετοχή και αλληλεπίδραση αρκετών πρωτεϊνικών μορίων και χρωστικών και μπορεί να χωριστεί σε δυο στάδια:

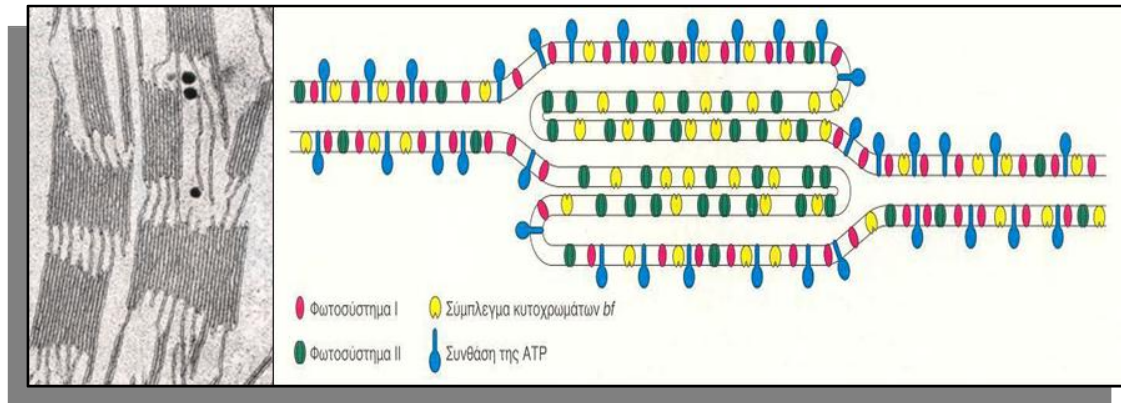
α) τις φωτεινές αντιδράσεις, όπου με τη βοήθεια του φωτός πραγματοποιείται η διάσπαση του νερού, η μεταφορά ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας, η αναγωγή του NADP⁺ και η δημιουργία μιας ηλεκτροχημικής διαβάθμισης απαραίτητης για το σχηματισμό του ATP.

β) τις σκοτεινές αντιδράσεις, όπου τα παραγόμενα από τις φωτεινές αντιδράσεις NADPH και ATP επενδύονται για την αναγωγή του CO₂ προς υδατάνθρακες και επομένως την παραγωγή οργανικής ύλης από ανόργανη.

1.2. Χλωροπλάστες

Η φωτοσυνθετική διεργασία λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά οργανίδια στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς γνωστά ως χλωροπλάστες, αλλά και σε μεμβράνες φωτοσυνθετικών βακτηρίων. Τα

οργανίδια αυτά έχουν μέγεθος 4-5 μm και περιέχουν εξειδικευμένες πράσινες χρωστικές, τις χλωροφύλλες, από όπου και παίρνουν το όνομά τους. Οι χλωροπλάστες έχουν το δικό τους γενετικό υλικό καθώς και ριβοσώματα όπου πραγματοποιείται η σύνθεση μερικών εκ των πρωτεϊνών των οργανιδίων αυτών. Περιβάλλονται από διπλό πλαστιδιακό φάκελο, αλλά το πλέον αξιοπρόσεκτο στοιχείο της δομής τους είναι το εκτεταμένο σύστημα των εσωτερικών τους μεμβρανών, γνωστό ως θυλακοειδή.



Εικόνα 1.1: (α) Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου χλωροπλάστη από φύλλο σπανακιού, όπου φαίνονται τα grana που συνδέονται μεταξύ τους με τα θυλακοειδή στρώματα, (β) Μοριακή οργάνωση των μεμβρανών των θυλακοειδών. [Από *Βιοχημεία I*, J.M.Berg, J.L.Tymoczko, L.Stryer]

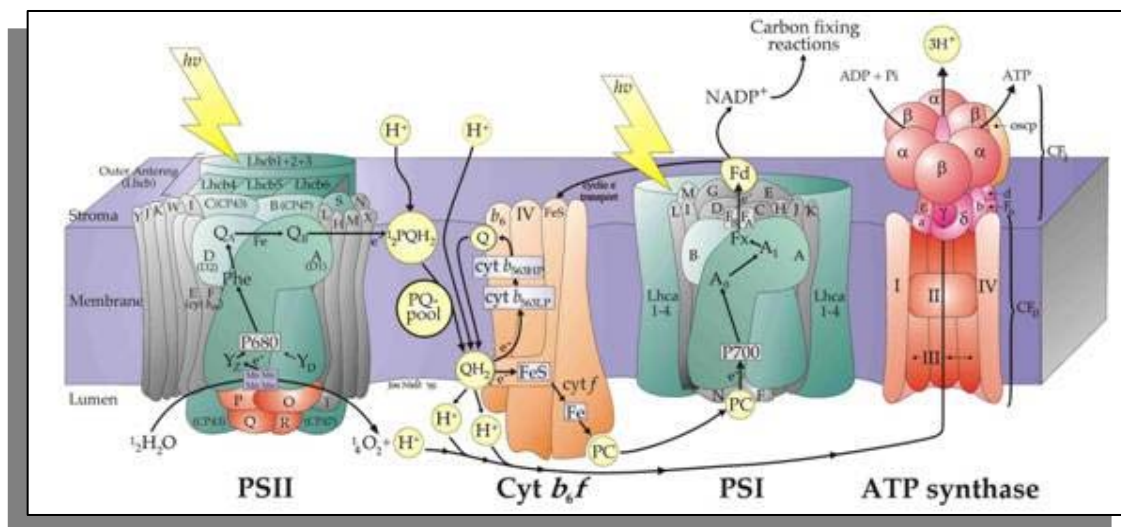
Τα θυλακοειδή περιβάλλονται από ένα πυκνόρρευστο υλικό, το στρώμα, όπου πραγματοποιούνται όλες οι αντιδράσεις αφομοίωσης του άνθρακα από υδατοδιαλυτά ένζυμα, ενώ στο εσωτερικό τους σχηματίζεται ο μικροχώρος (lumen). Τα περισσότερα θυλακοειδή βρίσκονται σε στενή επαφή μεταξύ τους δημιουργώντας στιβάδες μεμβρανών, γνωστές ως grana. Επάνω στο εσωτερικό αυτό σύστημα μεμβρανών εντοπίζονται οι φωτοσυνθετικές μονάδες, οι οποίες αποτελούνται από πολύπλοκα σύμπλοκα πρωτεϊνών και φωτοσυνθετικών χρωστικών.

1.3. Οργάνωση Φωτοσυνθετικών Συμπλόκων

Η φωτοσύνθεση περιλαμβάνει τις φωτεινές και τις σκοτεινές αντιδράσεις. Στις φωτεινές γίνεται παραγωγή ATP και αναγωγή του NADP⁺ σε NADPH. Στη συνέχεια, το ATP και το NADPH χρησιμοποιούνται στις σκοτεινές αντιδράσεις για την αναγωγή του CO₂

σε γλυκόζη. Τα περισσότερα ένζυμα που παίρνουν μέρος στις σκοτεινές αντιδράσεις βρίσκονται στο στρώμα.

Στις φωτεινές αντιδράσεις συμμετέχουν τέσσερα σύμπλοκα πρωτεϊνών, που βρίσκονται στη μεμβράνη των θυλακοειδών: το φωτοσύστημα II (PS II), το κυτόχρωμα *b₆f*, το φωτοσύστημα I (PS I) και η ATP συνθετάση. Στην εικόνα 1.1β φαίνεται η θέση που εντοπίζεται το κάθε ένα από τα σύμπλοκα. Στην εικόνα 1.2 παρουσιάζεται σχηματική απεικόνιση της διάταξης των συμπλόκων στην μεμβράνη του θυλακοειδούς.



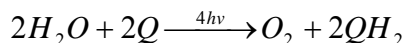
Εικόνα 1.2: Σχηματική διάταξη των συμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όπως αυτός είναι τοποθετημένος στη μεμβράνη και η ροή μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Όταν το PS II διεγερθεί από φωτόνια κατάλληλου μήκους κύματος, ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το H₂O προς την πλαστοκινόνη Q_B, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται στο *cyt b₆f*. Μέσω του *cyt b₆f* τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται σε μια διαλυτή πρωτεΐνη που βρίσκεται στον μικροχώρο, την πλαστοκυανίνη (PC), και μέσω αυτής στο PS I. Δια μέσου του PS I μεταφέρονται στην φερρεδοξίνη (Fd), που βρίσκεται στην πλευρά του στρώματος και στη συνέχεια η αναγωγή του ζεύγους φερρεδοξίνης-NADP⁺ χρησιμοποιώντας τη Fd ανάγει το NADP⁺ σε NADPH. Παράλληλα με όλη αυτή τη διαδικασία αντλούνται H⁺ προς τον μικροχώρο, και έτσι δημιουργείται βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων, για να παραχθεί ATP από την ATP-συνθετάση.

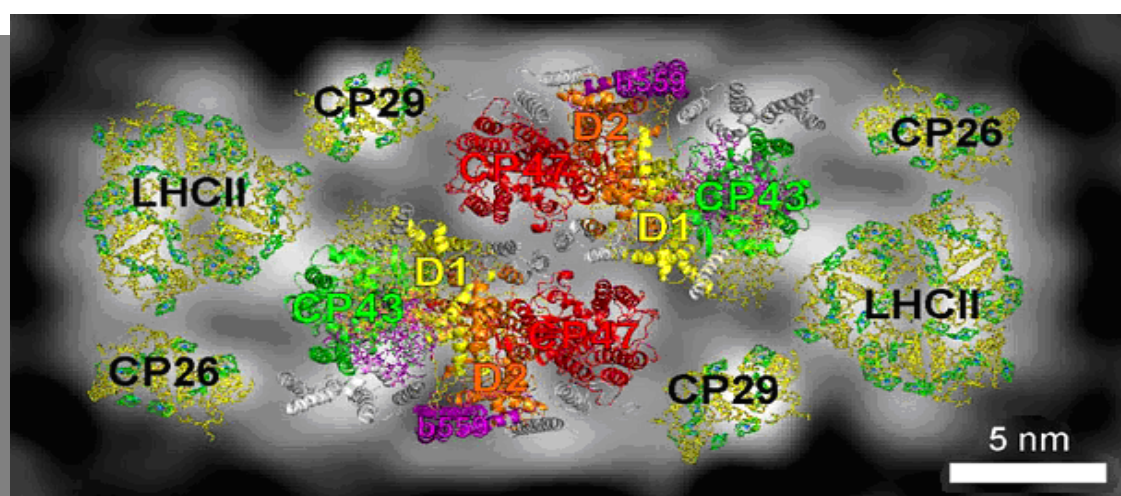
1.4. Το φωτοσύστημα II (PS II)

Το PS II είναι ένα διαμεμβρανικό σύμπλοκο πρωτεϊνών που βρίσκεται κυρίως στις περιοχές των grana που δεν έρχονται σε επαφή με

το στρώμα (εικόνα 1.1β) και λειτουργεί ως οξειδοαναγωγή νερού-πλαστοκινόνης, καταλύοντας την παρακάτω αντίδραση:



Στα ανώτερα φυτά αποτελείται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός (light harvesting complex II, LHC II) και τον πυρήνα του PS II (PS II core), (εικόνα 1.3). Ο πυρήνας του PS II (PS II core) είναι διμερές, που παρουσιάζει ψευδοσυμμετρία δεύτερης τάξης, και έχει ύψος 105 Å (45 Å μέσα στη μεμβράνη), μήκος 205 Å και πλάτος 110 Å (Ferreira et al., 2004) και μοριακό βάρος 700 kDa (Mayers et al., 1993). Περιφερειακά βρίσκονται τριμερή του LHC II, η CP26 και η CP29.



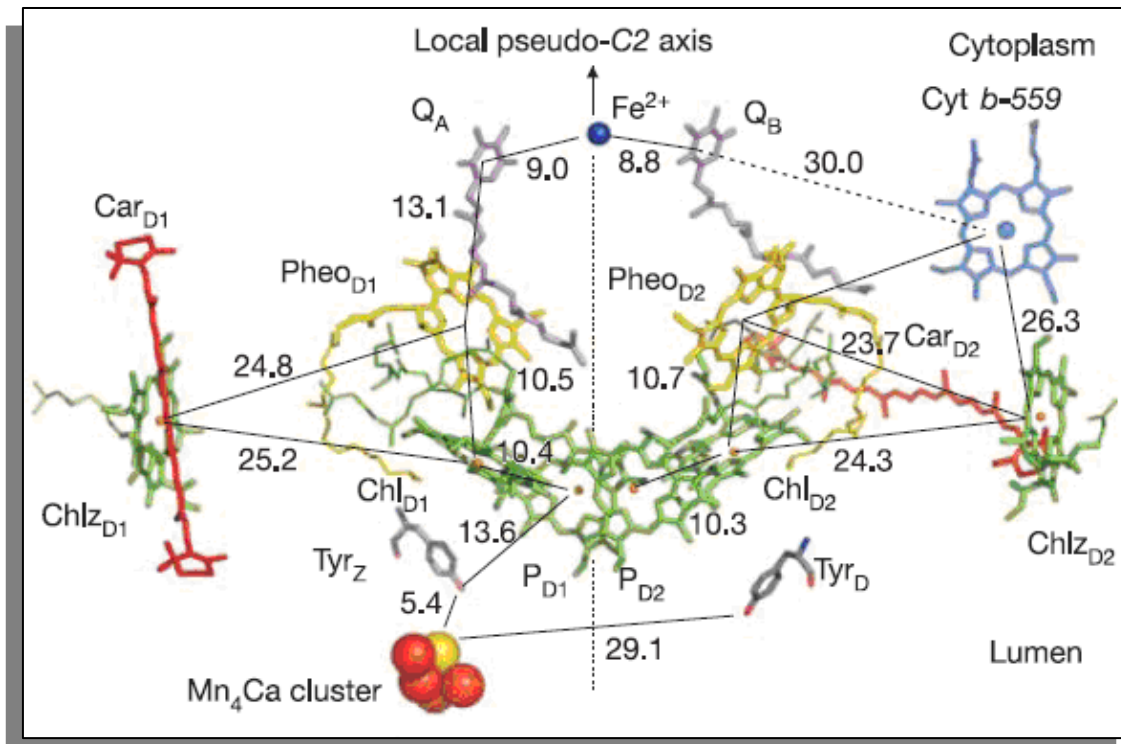
Εικόνα 1.3: Υπερσύμπλοκο PS II - LHC II από την πλευρά του αυλού: Φαίνονται οι κρυσταλλογραφικά λυμένες δομές του PS II (χωρίς τις τρεις εξωτερικές υπομονάδες) από κυανοβακτήρια και του LHC II από σπανάκι. [Από (Nield and Barber, 2006)]

Η δομή του πυρήνα (κέντρου αντίδρασης) του PSII παρουσιάζεται στην **εικόνα 1.4**. Με πράσινο διακρίνεται το συγκρότημα χλωροφυλλών P₆₈₀ (κέντρο αντίδρασης του PSII), με κίτρινο η φαιοφυτίνη, με γκριζοί οι πλαστοκινόνες Q_A και Q_B και οι δύο τυροσίνες Z και D. Με μπλε είναι ο μη αιμικός σίδηρος μεταξύ των δύο κινονών και με κόκκινο το σύμπλοκο διάσπασης του νερού, Mn₄ στο οποίο διακρίνεται με κίτρινο χρώμα και ιόν ασβεστίου.

Αρχικά, το φως διεγείρει τις χλωροφύλλες των φωτοσυλλεκτικών πρωτεϊνών LHC II, η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται από την μια χλωροφύλλη στην άλλη και μέσω των χλωροφυλλών των πρωτεϊνών CP43 και CP47 [§ 1.4.1.] καταλήγει σε ένα τροποποιημένο διμερές χλωροφυλλών, το P680, όπου γίνεται ο διαχωρισμός φορτίου. Ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από το P680 μέσω μιας φαιοφυτίνης στην πλαστοκινόνη Q_A και στη συνέχεια στην πλαστοκινόνη Q_B. Μετά από μια

δεύτερη διέγερση η Q_B έχει δύο ηλεκτρόνια, προσλαμβάνει και δύο H^+ από το στρώμα και απομακρύνεται από το κέντρο αντίδρασης προς τον διαμεμβρανικό χώρο όπου και μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο cyt_{b6f} .

Το κενό ηλεκτρονίου που δημιουργείται στο P680 καλύπτεται από ένα ηλεκτρόνιο του συμπλόκου του Mn, όπου βρίσκεται δεσμευμένο νερό, μέσω μιας οξειδοαναγωγικά ενεργής τυροσίνης, της Yz. Όταν το P680 έχει διεγερθεί τέσσερις φορές, τέσσερα ηλεκτρόνια έχουν αποσπασθεί από το σύμπλοκο του Mn, τέσσερα H^+ έχουν μετακινηθεί προς τον αυλό του θυλακοειδούς και τελικά δύο μόρια H_2O μετατρέπονται σε O_2 [§1.4.3].



Εικόνα 1.4: Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του PS II: εικόνα κάθετα στο επίπεδο της μεμβράνης. Στο OEC τα Mn είναι κόκκινα και το Ca^{2+} κίτρινο. [Από (Loll et al., 2005)].

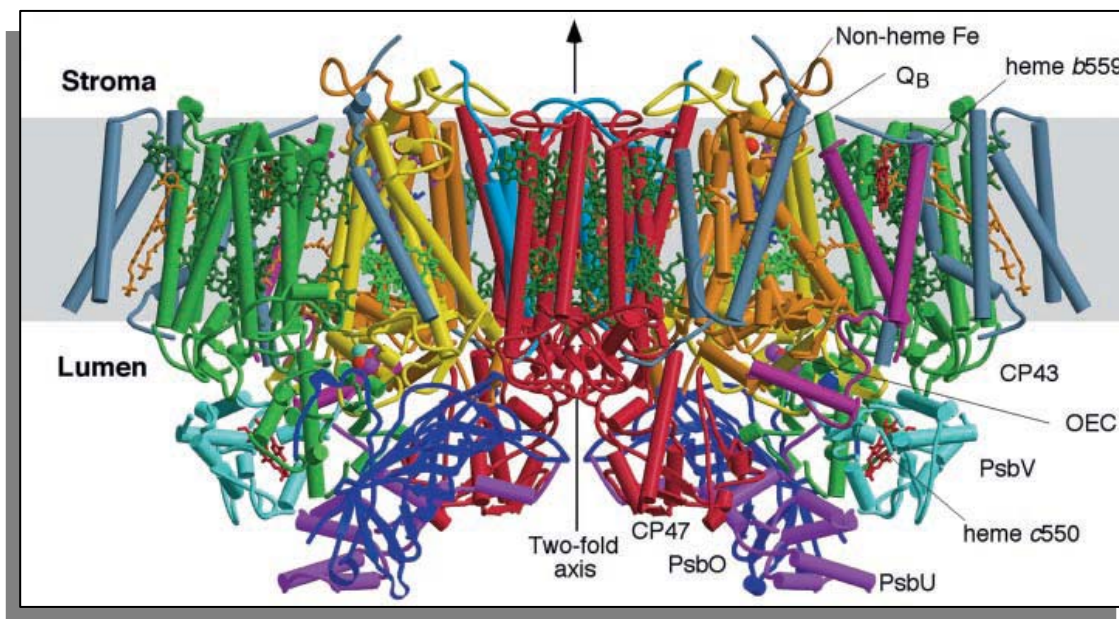
Παρακάτω περιγράφεται η δομή και ο ρόλος κάθε υπομονάδας του PS II. Ως τώρα, οι λυμένες δομές με ακτίνες X (Biesiadka, 2004; Ferreira et al., 2004; Loll et al., 2005) προέρχονται από κυανοβακτήρια. Το φυτικό PS II είναι δύσκολο να κρυσταλλωθεί λόγω πρωτεόλυσης των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης (Nelson and Yocum, 2006), έχει όμως μελετηθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία (Hankamer et al., 2001a). Οι δομές του ευκαρυωτικού και προκαρυωτικού PS II διαφέρουν στις εξωτερικές (υδατοδιαλυτές) υπομονάδες κυρίως.

1.4.1. Οι υπομονάδες του Φωτοσυστήματος II (PS II)

Στο κέντρο του κάθε μονομερούς βρίσκονται οι D1 (PsbA) και D2 (PsbD), καθεμία έχει πέντε διαμεμβρανικές έλικες και επάνω τους βρίσκονται όλοι οι συμπαράγοντες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων [εικόνα 1.4] (Hankamer et al., 2001a; Biesiadka, 2004; Ferreira et al., 2004; Loll et al., 2005). Η D1 συμμετέχει άμεσα στη διάσπαση του νερού, επάνω της βρίσκεται το OEC (oxygen evolving complex), η τυροσίνη Z, οι δύο από τις τέσσερις χλωροφύλλες του P680, η $pheo_{aD1}$ και η Q_B .

Στην D2 λειτουργεί ένα μονοπάτι δευτερογενούς μεταφοράς ηλεκτρονίων προς το P680 όταν το σύμπλοκο του Mn είναι ανενεργό, το οποίο περιλαμβάνει το $cyt\ b_{559}$, ένα β-καροτένιο και την chl_{D2} (τα δύο τελευταία βρίσκονται επάνω στην D2). Οι αντιδράσεις αυτές είναι πιο αργές και έτσι δεν ανταγωνίζονται την οξείδωση του νερού (Mayers et al., 1993).

Δίπλα στην D1 και D2 βρίσκεται αντίστοιχα η CP43 (PsbC) και η CP47 (PsbB). Οι CP43 και CP47 λειτουργούν ως κεραίες και μεταφέρουν την ενέργεια από το LHC στο κέντρο αντίδρασης (Nelson and Yocum, 2006). Αποτελούνται από έξι διαμεμβρανικές έλικες η καθεμία, τοποθετημένες κυκλικά. Οι διαμεμβρανικές έλικες και οι χλωροφύλλες της καθεμίας παρουσιάζουν ψευδοσυμμετρία τρίτης τάξης (Ferreira et al., 2004). Επίσης, και οι δύο έχουν μεγάλες λούπες που εξέχουν προς τον αυλό και προσφέρουν θέσεις πρόσδεσης για την PsbO (Nelson and Yocum, 2006).



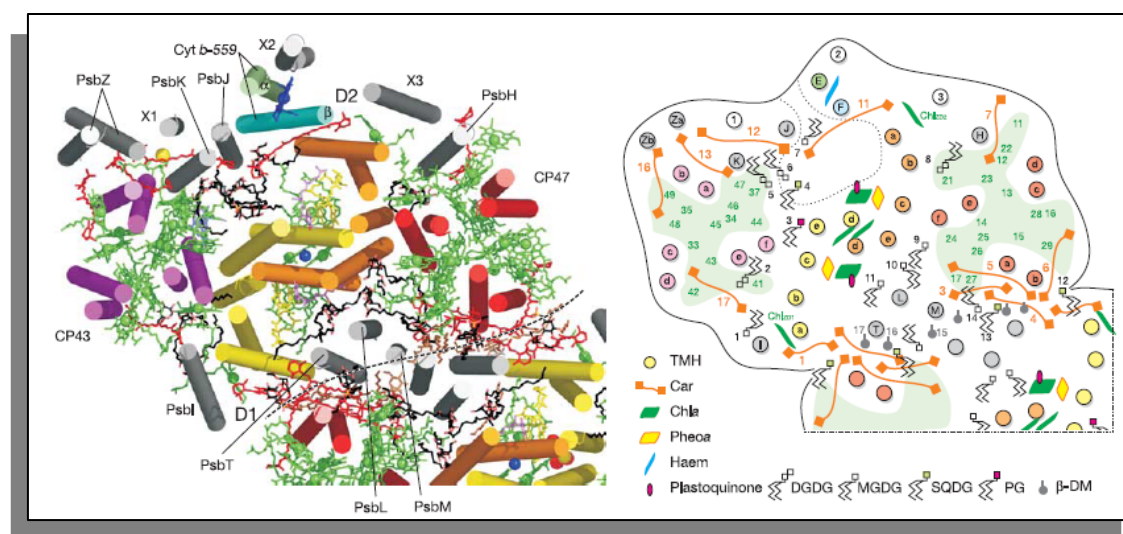
Εικόνα 1.5: Δομή του PS II. [Από (Ferreira et al., 2004)]

Εξωτερικά του πυρήνα CP43/D1/D2/CP47 βρίσκεται ένας αριθμός υπομονάδων μικρού μοριακού βάρους. Όλες, εκτός από την Z, έχουν μια διαμεμβρανική έλικα. Η PsbI και PsbX, οι οποίες βρίσκονται σε αντιδιαμετρικά σημεία, σταθεροποιούν τις περιφερειακές χλωροφύλλες των D1 και D2 (chl_{ZD1} και chl_{ZD2} [εικόνα 1.4]) αντίστοιχα. Οι D1, CP47, I είναι συμμετρικές αντίστοιχα με τις D2, CP43 και X.

Οι PsbE και PsbF αποτελούν τις α και β υπομονάδες αντίστοιχα του cyt b₅₅₉. Η αίμη του κυτοχρώματος συνδέεται μέσω δύο ιστιδινών στις δύο αυτές υπομονάδες (Ferreira et al., 2004). Το cyt b₅₅₉ φαίνεται ότι λειτουργεί ως κέντρο πυρήνωσης για την συναρμολόγηση του PS II και ως δότης ή δέκτης ηλεκτρονίων για να αποφευχθεί η φωτοαναστολή (Whitmarsh, 1996).

Οι PsbL, PsbM και PsbT βρίσκονται στο σημείο επαφής του ενός μονομερούς PS II με το άλλο και παίζουν ρόλο στο σχηματισμό του διμερούς. Οι PsbJ, PsbK, PsbN, PsbZ βρίσκονται δίπλα στην CP43 και σταθεροποιούν μόρια καρτενοειδών (Ferreira et al., 2004).

Η PsbS υπομονάδα είναι μοναδική στους ευκαρυωτικούς (Nelson and Yocum, 2006) και έχει τέσσερις διαμεμβρανικές έλικες (Hankamer et al., 2001b). Η PsbW, επίσης, υπάρχει μόνο στους ευκαρυωτικούς και φαίνεται να έχει μια διαμεμβρανική έλικα (Hankamer et al., 2001b).



Εικόνα 1.6: Μονομερές PS II από την πλευρά του στρώματος. (α) D1:κίτρινο, D2: πορτοκαλί, CP47: κόκκινο, CP43: μωβ, υπομονάδα α και β του cyt b₅₅₉: πράσινο και γαλάζιο αντίστοιχα, Υπομονάδες μικρού μοριακού βάρους: γκρι. Χλωροφύλλη α: πράσινο, φαιοφυτίνη: κίτρινο, καρτενοειδή: κόκκινο, αίμη: μπλε, κινόνες: μωβ, λιπίδια: μαύρο, καφέ: απορρυπαντικό και μη προσδιορισμένες αλκυλικές αλυσίδες, μη αιμικός σίδηρος: μπλε, Ca²⁺: κίτρινο. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει τα όρια του ενός μονομερούς με το άλλο. (β) Σχηματική αναπαράσταση του (α). Οι κεφαλές των λιπιδίων και των απορρυπαντικών που βρίσκονται προς τα πάνω ή κάτω υποδεικνύουν ότι βρίσκονται στην πλευρά του στρώματος ή του αυλού αντίστοιχα. Οι πράσινοι αριθμοί σημειώνουν τη θέση των χλωροφυλλών των κεραιών. Η κοιλότητα στην οποία διαχέεται η Q_B είναι σημειωμένη με διακεκομμένη γραμμή. [Από (Loll et al., 2005)].

Εξωτερικά της μεμβράνης, στην πλευρά του αυλού βρίσκονται οι PsbO, PsbP και PsbQ (Biesiadka, 2004; Ferreira et al., 2004; Loll et al., 2005). Αυτές οι τρεις εξωτερικές πρωτεΐνες, μαζί με το C άκρο της D2, σχηματίζουν ένα κάλυμμα πάνω από το OEC (oxygen evolving complex), αλλά καμία από τις τρεις δεν συνδέεται άμεσα με αυτό (Ferreira et al., 2004). Στα κυανοβακτήρια οι P και Q αντικαθίσταται από τις PsbV (cyt c550) και PsbU αντίστοιχα.

Πίνακας 1.1: Γονίδια, αριθμός αμινοξέων, διαμεμβρανικές έλικες, χλωροφύλλες και συμπαραγόντες των υπομονάδων του PS II.					
Υπομονάδα	γονίδιο	αριθμός αμινοξέων	διαμεμβρανικές έλικες	χλωροφύλλες	άλλοι συμπαραγόντες
A (D1)	<i>psba</i>	353	5	3	Yz, 4Mn, Pheo a, Q _B
B (CP47)	<i>psbb</i>	508	6	16	
C (CP43)	<i>psbc</i>	473	6	13	
D (D2)	<i>psbd</i>	353	5	3	Y _D , Q _A
E (a cyt b-559)	<i>psbe</i>	83	1		αίμη
F (b cyt b-559)	<i>psbf</i>	39	1		αίμη
I	<i>psbi</i>	36	1		
X	<i>psbx</i>	41	1		
H	<i>psbh</i>	73	1		
L	<i>psbl</i>	38	1		
M	<i>psbm</i>	34	1		
T	<i>psbt</i>	33	1		
J	<i>psbj</i>	40	1		
K	<i>psbk</i>	59	1		
N	<i>psbn</i>	43	1		
Z	<i>psbz</i>	62	2		
O	<i>psbo</i>	332			
U *	<i>psbu</i>	134			
V (cyt 550) *	<i>psbv</i>	163			αίμη
P**	<i>psbp</i>	267			
Q**	<i>psbq</i>	232			
S**	<i>psbs</i>	274	4		
R	<i>psbr</i>	140			
W**	<i>psbw</i>	137	1		

*, **: υπομονάδες που βρίσκονται μόνο στο προκαρυωτικό ή φυτικό PSII αντίστοιχα.

Η O σταθεροποιεί το σύμπλοκο του Mn (manganese stabilizing protein, MSP) (Nelson and Yocum, 2006). Σχηματίζει ένα β-βαρέλι που αποτελείται από 8 αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και στο εσωτερικό του βρίσκονται ογκώδεις υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες. Φαίνεται όμως ότι μια λούπα του συμμετέχει στο σχηματισμό ενός

υδρόφιλου μονοπατιού που συνδέει το OEC και τον μικροχώρο [βλ. και §1.4.3] (Ferreira et al., 2004). Η Ο προσφέρει θέσεις πρόσδεσης στις P και Q, πιθανόν μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ή δεσμών άλατος (Nelson and Yocum, 2006).

1.4.2. Συλλογή φωτός και μεταφορά προς το ενεργό κέντρο: χλωροφύλλες και καροτενοειδή

Κάθε υπερόςμπλοκο (διμερές) PS II – LHC II περιέχει 190 χλωροφύλλες. Επάνω σε κάθε μονομερές PS II βρίσκονται 35 χλωροφύλλες α: 6 στις D1 και D2, 13 στην CP43 και 16 στην CP47 (Loll et al., 2005). Οι περισσότερες από τις χλωροφύλλες των CP43 και CP47 συνδέονται με συντηρημένες ιστιδίνες (Mayers et al., 1993). Επάνω σε κάθε μονομερές LHC II βρίσκονται 14 χλωροφύλλες (8 Chla, 6 Chlb), στην CP29 8 (6 Chla, 2 Chlb) και στην CP26 9 (6 Chla, 3 Chlb) (Nield and Barber, 2006).

Οι φωτοσυλλεκτικές χλωροφύλλες, που βρίσκονται στο LHC II, CP26, CP29, CP43, CP47, είναι τοποθετημένες σε δύο στρώματα παράλληλα με τη μεμβράνη (Ferreira et al., 2004). Η διάταξη αυτή βοηθά την γρήγορη μεταφορά ενέργειας, ενώ στις CP43 και CP47 υπάρχει μια χλωροφύλλη ανάμεσα στα δύο στρώματα που τα συνδέει μεταξύ τους. (Nield and Barber, 2006).

Σε κάθε μονομερές υπάρχουν 11 μόρια καροτενοειδών (all trans β-καροτένια). Δύο βρίσκονται επάνω στις D1 και D2, τέσσερα στην CP43, πέντε στην CP47 (Loll et al., 2005). Τα περισσότερα από τα καροτενοειδή που βρίσκονται στις κεραίες συνδέονται μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals με μόρια Chla και έτσι επιτρέπουν την μεταφορά ενέργειας από τα car προς τις Chla, όπως επίσης προστατεύουν το PS II προσλαμβάνοντας την ενέργεια μιας triplet-χλωροφύλλης και αποβάλλοντας την τελικά υπό μορφή θερμότητας (Ferreira et al., 2004; Loll et al., 2005; Murray and Barber, 2007).

Τα δύο καροτενοειδή που βρίσκονται στις D1 και D2 έχουν διαφορετικό προσανατολισμό (εικόνα 1.4). Το car_{D1} βρίσκεται κοντά στην chl_{D1} και συμμετέχει στη μεταφορά ενέργειας και/ή προστατεύει από την τριπλή κατάσταση της chl_{D1} ή του singlet - οξυγόνου που μπορεί να προκληθεί από το ³P680. Το car_{D2} λειτουργεί ως «μοριακό καλώδιο» κατά την δευτερογενή μεταφορά ηλεκτρονίων, όταν το OEC δεν λειτουργεί ή είναι απόν (Loll et al., 2005).

1.4.3. Η πλευρά του δότη ηλεκτρονίων: το σύμπλοκο του Mn

Το σύμπλοκο του Mn ή σύμπλοκο απελευθέρωσης οξυγόνου (OEC, oxygen evolving complex) αποτελείται από τέσσερα ιόντα Mn, και έχει ως συμπαράγοντες ιόντα Ca^{2+} και Cl^- (Babcock, 1995; Goussias et al., 2002). Βρίσκεται επάνω στην D1, προς την πλευρά του μικροχώρου. Στην συμμετρική θέση του OEC στην πλευρά της D2 είναι τοποθετημένες ογκώδεις πλευρικές αλυσίδες φαινυλαλανίνης (Murray and Barber, 2007).

Έχουν προταθεί πολλά μοντέλα για τη δομή του OEC που έχουν προκύψει από κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ και φασματοσκοπικές μεθόδους απορρόφησης ακτίνων Χ.

Τα μοντέλα που έχουν προκύψει κρυσταλλογραφικά έχουν χαμηλή ανάλυση. Επιπλέον, οι ακτίνες-Χ υψηλής ενέργειας που χρησιμοποιούνται ανάγουν το μαγγάνιο σε Mn^{2+} , η αναγωγή αυτή συνοδεύεται και από αλλαγή της δομής (Yano et al., 2005; Yano and Yachandra, 2007). Αυτό δεν συμβαίνει όμως στην φασματοσκοπία ακτίνων Χ (EXAFS), η οποία δίνει δομές με υψηλή ανάλυση. Το μειονέκτημα όμως είναι ότι με αυτή τη μέθοδο προκύπτουν πολλές ισοδύναμες δομές και δεν παρέχονται πληροφορίες για το πρωτεϊνικό περιβάλλον.

Στο μοντέλο των (Ferreira et al., 2004) [εικόνα 1.7α] υπάρχει μια περίπου κυβική δομή Mn_3CaO_4 , τα Mn (Mn1-Mn2-Mn3) συνδέονται μέσω di(m-oxo) δεσμών (κάθε μαγγάνιο συνδέεται με δύο οξυγόνα) και η απόσταση μεταξύ τους είναι 2,7 Å, επίσης το καθένα απέχει από το Ca^{2+} 3,4 Å και συνδέεται με αυτό μέσω di(m-oxo) δεσμού. Σε απόσταση 3,3 Å βρίσκεται το Mn4 συνδεδεμένο μέσω δύο mono(m-oxo) δεσμών με τα Mn2 και 3. Από το παραπάνω μοντέλο έχει προκύψει και ένα νέο [εικόνα 1.7β], στο οποίο το Mn4 συνδέεται με το Mn_3CaO_4 μόνο με έναν oxo δεσμό, ώστε να ταιριάζει καλύτερα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα (Mayers et al., 1993).

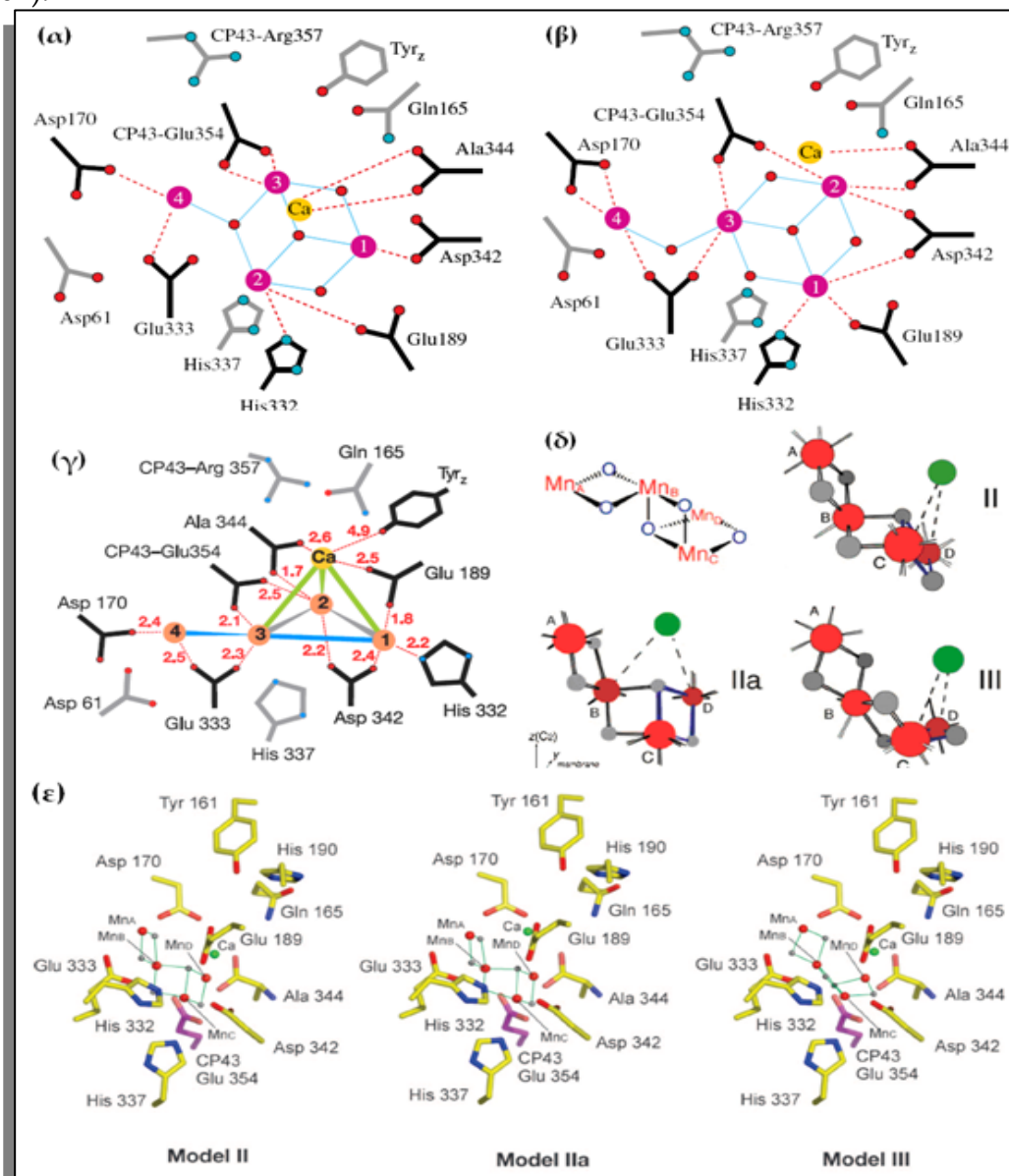
Στο μοντέλο των (Loll et al., 2005) [εικόνα 1.7γ] τα Mn σχηματίζουν έναν γάντζο, οι αποστάσεις Mn1-Mn2 και Mn2-Mn3 είναι 2,7 Å και συνδέονται με di(m-oxo) δεσμούς, ενώ η απόσταση Mn1-Mn3 και Mn3-Mn4 είναι 3,3 Å και συνδέονται με mono(m-oxo) δεσμούς. Το Ca^{2+} βρίσκεται στην κορυφή μιας τριγωνικής πυραμίδας με βάση τα Mn1-Mn2-Mn3 και απέχει από το καθένα 3,4 Å.

Από την φασματοσκοπία απορρόφησης ακτίνων-Χ προκύπτουν τρία μοντέλα [εικόνα 1.7δ] (Yano et al., 2006; Yano and Yachandra, 2008). Οι αποστάσεις MnC-MnD είναι 2,8 Å, ενώ οι αποστάσεις MnA-MnB και MnB-MnC 2,7 Å και η απόσταση MnB-MnD 3,3 Å. Το Ca^{2+} απέχει 3,4 Å, από δύο Mn. Τα μοντέλα αυτά τοποθετημένα στο πρωτεϊνικό περιβάλλον που προκύπτει από τους (Loll et al., 2005) βρίσκονται στην εικόνα 1.7ε. Έχουν,

όμως, τοποθετηθεί και μέσα στη δομή που προκύπτει από τους Ferreira et al. (Mayers et al., 1993).

Το σύμπλοκο του Μn αλληλεπιδρά με καρβοξυλομάδες συντηρημένων ασπαρτικών και γλουταμινικών (D1-Asp¹⁷⁰, D1-Glu¹⁸⁹, D1-Glu³³³, D1-Asp³⁴²), με το C άκρο (D1-Ala³⁴⁴) και με μια ιστιδίνη (D1-His³³²) της D1, καθώς και με ένα γλουταμινικό της CP43 (Glu³⁵⁴) (Ferreira et al., 2004; Loll et al., 2005; McEnoy and Brudvig, 2006).

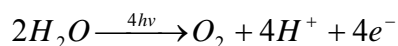
Έχουν βρεθεί τρία κανάλια που ξεκινούν από το σύμπλοκο του Μn και καταλήγουν στον μικροχώρο. Το ένα βοηθά την γρήγορη απομάκρυνση οξυγόνου από το OEC, ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση του με χλωροφύλλες και ειδικά με το P680. Μέσω των άλλων δύο γίνεται η μεταφορά μορίων νερού και H⁺ (Murray and Barber, 2007).



Εικόνα 1.7: Πιθανά μοντέλα του συμπλόκου του Μn. Μοντέλα που προέκυψαν από ΧRD: (α) Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου των Ferreira et al., (β) Σχηματική απεικόνιση του

τροποποιημένου μοντέλου των *Ferreira et al.* (Mayers et al., 1993), (α, β) Τα ιόντα Mn συμβολίζονται με μωβ σφαίρες, τα άτομα οξυγόνου με κόκκινες σφαίρες και αποστάσεις μικρότερες των 2,8 Å με διακεκομμένες γραμμές. (γ) Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου των *Loll et al.* Οι αποστάσεις ανάμεσα στα ιόντα Mn και στο Ca²⁺ παριστάνονται με γκρι (2,7 Å), μπλε (3,3 Å) και πράσινες (3,4 Å) γραμμές, τα πιο κοντινά στο σύμπλοκο αμινοξέα είναι μαύρα, ενώ τα πιο απομακρυσμένα γκρι, οι αποστάσεις είναι σε Å. Μοντέλα που προέκυψαν από φασματοσκοπία απορρόφησης ακτίνων Χ: (δ) Δομή των τριών μοντέλων (σύμφωνα με το σύστημα αξόνων που βρίσκεται κάτω αριστερά): Τα Mn συμβολίζονται με κόκκινες σφαίρες, το Ca²⁺ με πράσινη σφαίρα και τα οξυγόνα με κόκκινες. Ο τρόπος σύνδεσης του Ca²⁺ με τα Mn δεν είναι διευκρινισμένος και γι' αυτό συμβολίζεται με διακεκομμένες γραμμές. Πάνω αριστερά φαίνεται το μοτίβο που ακολουθούν τα τρία μοντέλα. (ε) Τοποθέτηση των τριών μοντέλων της εικόνας (δ) στο πρωτεϊνικό περιβάλλον των *Loll et al.* (Yano et al., 2006; Yano and Yachandra, 2008).

Το OEC καταλύει την παρακάτω αντίδραση:



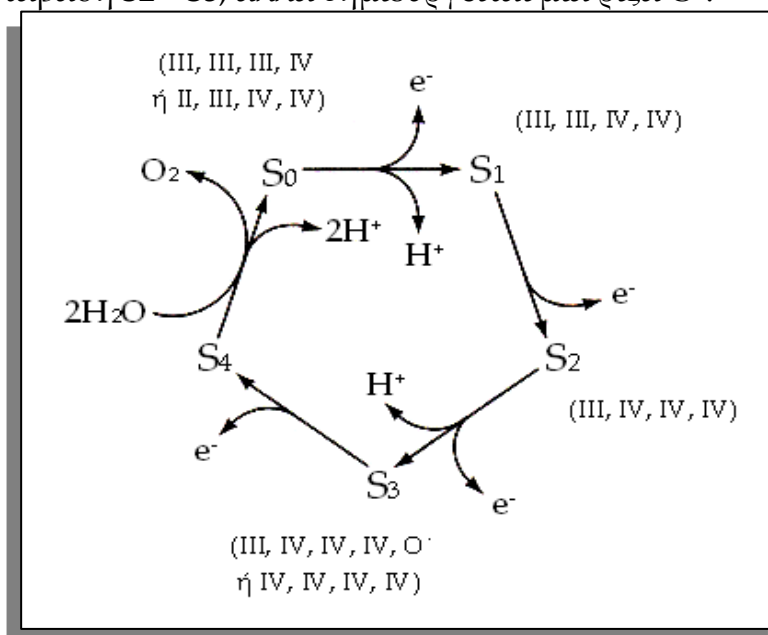
Η διάσπαση του νερού με χημικό τρόπο απαιτεί στο πρώτο βήμα περισσότερη ενέργεια από αυτήν που μπορεί να μεταφέρει ένα φωτόνιο 680 nm (1,8 eV). Όταν γίνεται όμως με τη μεσολάβηση του συμπλόκου του Mn αποθηκεύονται σε αυτό οξειδωτικά ισοδύναμα που απαιτούν χαμηλότερη ενέργεια για να δημιουργηθούν και στο τέλος μεταφέρονται στο νερό έτσι ώστε να αποφευχθεί το πρώτο δαπανηρό βήμα (Britt, 1996).

Κατά τη διάσπαση του νερού, το σύμπλοκο του Mn περνάει από 5 οξειδωτικές καταστάσεις: S0→S1→S2→S3→(S4)→S0. Κάθε φορά που το P680 διεγείρεται από φωτόνιο και γίνεται διαχωρισμός φορτίου, το σύμπλοκο του Mn οξειδώνεται, μέσω της τυροσίνης Z, περνώντας στην επόμενη οξειδωτική κατάσταση. Το πρότυπο αποβολής πρωτονίων από το OEC κατά την διάρκεια των ανωτέρω μεταβάσεων στις καταστάσεις S είναι 1, 0, 1, 2.

Η S0 είναι η πιο ανηγμένη κατάσταση. Η S1 είναι η πιο σταθερή στο σκοτάδι, γι' αυτό το μεγαλύτερο ποσοστό των κέντρων δείγματος που βρίσκεται στο σκοτάδι βρίσκονται σε αυτήν. Η S4 είναι ασταθές ενδιάμεσο και μεταπίπτει στην S0 χωρίς φωτισμό, για το λόγο αυτό, δεν έχει μπορέσει ακόμα να απομονωθεί ώστε να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά της. Κατά τη μετάβαση S3→(S4)→S0 γίνεται ο σχηματισμός του οξυγόνου [εικόνα 1.8].

Οι αριθμοί οξείδωσης των ιόντων του Mn (εικόνα 1.8) για την S1 είναι III, III, IV, IV και για την S2: III, IV, IV, IV, ενώ για την S0 υπάρχουν δύο πιθανές περιπτώσεις: III, III, III, IV (το πιθανότερο) ή II, III, IV, IV (McEvoy and Brudvig, 2006). Το ίδιο συμβαίνει και για την S3: III, IV, IV, IV (Ioannidis and Petrouleas, 2000; Ioannidis et al., 2002; Yano and Yachandra, 2007, , 2008) ή IV, IV, IV, IV (Dau and Haumann, 2007). Στην πρώτη περίπτωση, που

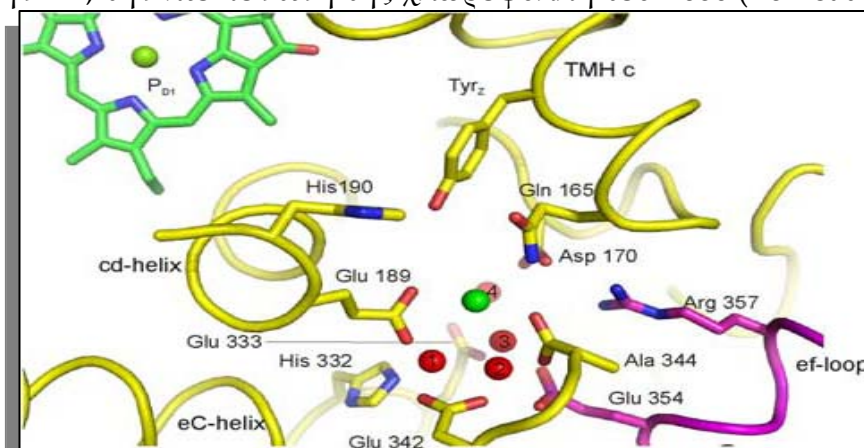
υποστηρίζεται και από τους περισσότερους, δεν γίνεται οξείδωση του Mn κατά τη μετάβαση $S_2 \rightarrow S_3$, αλλά δημιουργείται μια ρίζα O^\cdot .



Εικόνα 1.8: Ο κύκλος των S-καταστάσεων. Στις παρενθέσεις δίδονται οι πιθανές οξειδωτικές καταστάσεις των τεσσάρων μαγγανίων.

Η οξείδωση του συμπλόκου του Mn από το P680 γίνεται μέσω της D1-tyr¹⁶¹ ή τυροσίνης Z (Debus et al., 1988b), (εικόνα 1.9). Η Yz απέχει από την P_{D1} 13,6 Å και από το Ca²⁺, το πιο κοντινό σε αυτήν άτομο του OEC, 4,9 Å. Επίσης, συνδέεται με δεσμό H με την His¹⁹⁰ (2,8 Å) (Loll et al., 2005).

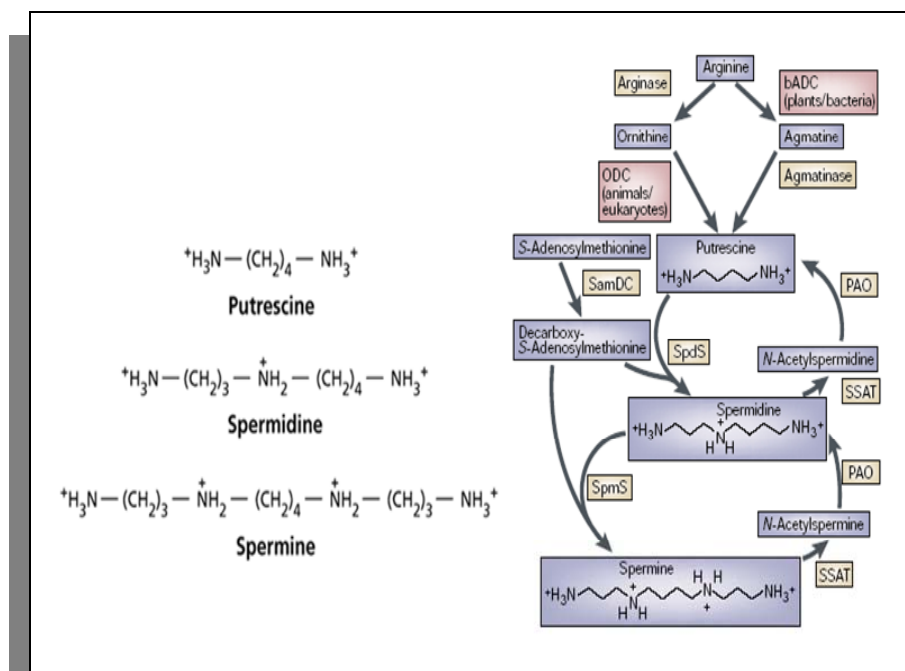
Στην D2, σε συμμετρική θέση σε σχέση με την Yz, βρίσκεται άλλη μια οξειδοαναγωγικά ενεργή τυροσίνη, η D2-tyr¹⁶⁰ ή Y_D (Barry and Babcock, 1987; Debus et al., 1988a). Οξειδώνεται από το P680, αλλά δεν παίρνει άμεσα μέρος στη διάσπαση του νερού επειδή έχει χαμηλότερο αναγωγικό δυναμικό από την Yz. Μπορεί, όμως, να οξειδώσει την S₀ προς S₁ στο σκοτάδι (Styring and Rutherford, 1987). Απέχει 29,1 Å από το OEC και 13,5 Å από την P_{D2}, την πιο κοντινή της χλωροφύλλη του P680 (Loll et al., 2005).



Εικόνα 1.9: Το OEC και το πρωτεϊνικό περιβάλλον του, η τυροσίνη Z και η χλωροφύλλη P_{D1} του P680. D1: κίτρινο, CP43: μωβ. [Από (Kern and Renger, 2007)].

1.5. Πολυαμίνες

Ο όρος πολυαμίνες περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό οργανικών μορίων, με περισσότερες από μια αμινομάδες, που απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς. Κυριότερες είναι οι διαμίνες αγματίνη και πουτρεσίνη, η τριαμίνη σπερμιδίνη και η τετραμίνη σπερμίνη (εικόνα 1.10). Όλοι οι προκαρυωτικοί και οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί συνθέτουν πουτρεσίνη (Put) και σπερμιδίνη (Spd), αλλά μόνο οι τελευταίοι συνθέτουν σπερμίνη (Spm).



Εικόνα 1.10: Οι βασικές πολυαμίνες και το μονοπάτι βιοσύνθεσής τους.

Οι πολυαμίνες μπορεί να εμφανίζονται ως ελεύθερα κατιόντα σε φυσιολογικές τιμές pH ή συνδεδεμένες με διάφορα μακρομόρια. Η ποικιλομορφία στις συγκεντρώσεις τους αλλά και οι διαφορές στην οργάνωσή τους, εξαρτώνται κυρίως από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και από καταστάσεις stress, υποδεικνύοντας έτσι ένα προσαρμοστικό ή προστατευτικό ρόλο για αυτά τα συστατικά (Smith, 1985). Επίσης, εμφανίζονται ως ρυθμιστές της ανάπτυξης των φυτών ή ως ορμονικοί δευτερογενείς αγγελιοφόροι (Galston, 1983). Επιδράσεις των πολυαμινών, που βασίζονται στο φορτίο τους, έχουν παρατηρηθεί με τη πρόσδεσή τους σε νουκλεϊκά οξέα (Flink and Pettijohn, 1975), φωσφολιπίδια (Chapel et al., 1984) και πρωτεΐνες (Metha et al., 1991).

Η πρόσδεση των πολυαμινών σε μακρομόρια, ίσως υποδεικνύει το ρόλο τους στη ρύθμιση βασικών διαδικασιών στα φυτά, όπως είναι η κυτταρική διαίρεση, η μορφογένεση, το γήρας και αντιδράσεις σε

διάφορες καταπονήσεις (Slocum et al., 1984). Έρευνες έχουν δείξει πως οι *Put*, *Spd* και *Spm* υπάρχουν σε άθικτους χλωροπλάστες, συγκεκριμένα σε μεμβράνες θυλακοειδών, σε μεμβράνες του PS II, σε πρωτεΐνες του LHC II και στο σύμπλοκο PS II (Kotzabasis et al., 1993). Επιπρόσθετα, μόνο σπερμίνη ανιχνεύτηκε σε φωτοχημικά ενεργούς πυρήνες PS II και στο κέντρο αντίδρασης του PS II (Kotzabasis et al., 1993). Τέλος, χορήγηση εξωγενών διαμινών και πολυαμινών σε ωσμωτικά καταπονημένα φύλλα, καθυστέρησε την αποικοδόμηση πρωτεϊνών, ανέστειλε την απώλεια χλωροφύλλης και σταθεροποίησε τις μεμβράνες των θυλακοειδών (Besford et al., 1993). Οι τρανσγλουταμινάσες είναι ικανές να συνδέουν ομοιοπολικά πολυαμίνες μεταξύ δύο καρβοξυλομάδων δύο καταλοίπων γλουταμίνης της ίδιας πρωτεΐνης (Icekson and Apelbaum, 1987). Οι απόπρωτεΐνες της κεραίας LHC II, CP24, CP26, CP29 (Delduca et al., 1994), οι πρωτεΐνες D1, D2, Cyt f και η μεγάλη υπομονάδα της Rubisco (Besford et al., 1993), είναι μερικά από τα υποστρώματα της τρανσγλουταμινάσης στα πλαστίδια.

Οι τρεις κύριες πολυαμίνες απαντώνται στους χλωροπλάστες ανώτερων φυτών και εμπλέκονται στην αύξηση των φυτών και σε αντιδράσεις αβιοτικών καταπονήσεων. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η πουτρεσίνη μπορεί να αυξήσει την αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας με το να διεγείρει τη φωτοφωσφορυλίωση (Ioannidis, 2006). Υπάρχει ένας διαφορετικός τρόπος δράσης της διαμίνης πουτρεσίνης και των πολυαμινών σπερμίνης και σπερμιδίνης. Η πουτρεσίνη αυξάνει τη σύνθεση ATP σε μεγαλύτερο βαθμό από τις σπερμιδίνη και σπερμίνη. Από την άλλη πλευρά, η *Spd* και η *Spm* αυξάνουν αποτελεσματικά τη μη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας, και σε μεγάλες συγκεντρώσεις, είναι αποτελεσματικοί αποσυζευκτές της φωτοφωσφορυλίωσης *in vitro*. Επιπρόσθετα, όσο μεγαλύτερο το θετικό φορτίο της αμίνης που χρησιμοποιείται, τόσο μεγαλύτερη η αποτελεσματικότητα στην λειτουργική αποκατάσταση του PS II όπως επίσης και στο στοίβαγμα θυλακοειδών χαμηλής αλατότητας (Ioannidis and Kotzabasis, 2007).

Σημαντικά στοιχεία έχουν συγκεντρωθεί όσον αφορά το ρόλο των πολυαμινών στους χλωροπλάστες. Κατά τη βιογένεση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, η έκφραση τους ρυθμίζεται αρνητικά (Dornemann et al., 1996). Η βιοσύνθεση των πολυαμινών ελέγχεται από το φως (Kramer et al., 1992), και κατά τη φωτοπροσαρμογή, η αναλογία *Spm/Put* ρυθμίζει τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Kotzabasis et al., 1999). Αλλαγές στις ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις πολυαμινών μπορούν να αυξήσουν τις αντοχές των φυτών σε καταπονήσεις όζοντος (Navakoudis et al., 2003), UVB ακτινοβολίας (Sfichi et al., 2004), χαμηλής θερμοκρασίας (Sfakianaki et al., 2006) και αλατότητας (Demetriou et al., 2007). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η σπερμίνη και η σπερμιδίνη *in vitro* οδηγούν σε αποσυναρμολόγηση του

συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου και σε αλλαγές της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών του φωτοσυστήματος II όσο αυξάνει το θετικό φορτίο (Beauchemin et al., 2007b).

1.6. Φασματοσκοπία EPR

Με την φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance, EPR) μπορούν να ανιχνευθούν μόρια που περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Το PS II περιέχει τέτοιου είδους μόρια: ελεύθερες ρίζες (Yz^{\cdot} , Yd^{\cdot}) και στοιχεία μετάπτωσης (Mn, Fe του συμπλόκου της σιδηροκινόνης) και γι' αυτό η φασματοσκοπία EPR είναι πολύ χρήσιμη στη μελέτη της λειτουργίας του.

1.6.1. Σπιν και μαγνητική ροπή

Η συνολική στροφορμή του ηλεκτρονίου σε ένα άτομο οφείλεται στην τροχιακή στροφορμή (L) και στην ιδιοστροφορμή ή σπιν (S). Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις η πρώτη συνεισφέρει ελάχιστα στον παραμαγνητικό συντονισμό.

Η συνιστώσα S_z του σπιν (εικόνα 1.11), που είναι ομόρροπη σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, δίνεται από τον τύπο:

$$S_z = m_s \hbar$$

m_s : κβαντικός αριθμός του σπιν, παίρνει τιμές $\pm 1/2$,

$\hbar = h/2\pi$, h : σταθερά του Plank.

Λόγω της ιδιοστροφορμής του, το ηλεκτρόνιο έχει μαγνητική ροπή, η οποία δίνεται από τον τύπο:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{S}$$

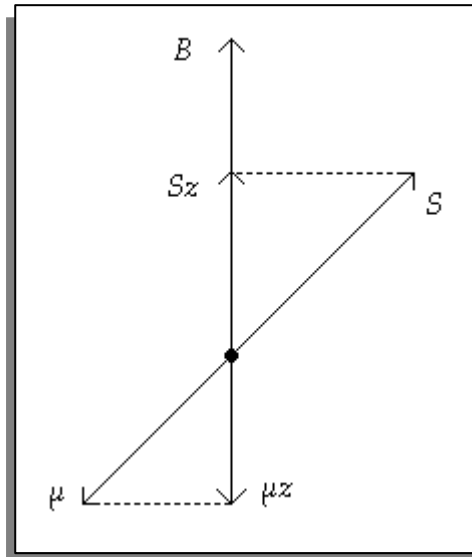
γ : γυρομαγνητικός λόγος, που ισούται με

e : φορτίο του ηλεκτρονίου,

m : μάζα του ηλεκτρονίου,

c : ταχύτητα του φωτός.

$$\gamma = -\frac{e}{2mc}$$



Εικόνα 1.11: Μαγνητικό πεδίο, σπιν και μαγνητική ροπή.

Η συνιστώσα μ_z της μαγνητικής ροπής είναι αντίρροπη με την S_z και ισούται με: $\mu_z = -g_e \frac{eh}{4\pi mc} m_s = -g_e \beta_e m_s$

β_e : η μαγνητόνη του Bohr που ισούται με: $\beta_e = \frac{eh}{4\pi mc}$

$g_e = 2,002319\dots$: παράγοντας Lande.

1.6.2. Το φαινόμενο Zeeman και ο παραμαγνητικός συντονισμός

Όταν ένα ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε μαγνητικό πεδίο η μαγνητική ροπή του προσανατολίζεται ομόρροπα ή αντίρροπα με το εξωτερικό πεδίο. Επομένως, δημιουργούνται δύο ενεργειακές στάθμες με $m_s = \pm 1/2$. Η ομόρροπη διεύθυνση στο πεδίο (με $m_s = -1/2$) έχει χαμηλότερη ενέργεια.

Η ενέργεια του ηλεκτρονίου σε αυτές τις δύο ενεργειακές στάθμες είναι: $E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = -\mu B \cos(\theta) = -\mu_z B$

B : ένταση του μαγνητικό πεδίου, θ : γωνία μεταξύ B και μ_z .

Αν αντικαταστήσουμε την μ_z : $E = g_e \beta_e B m_s = \pm \frac{1}{2} g_e \beta_e B$

Το παραπάνω ονομάζεται φαινόμενο Zeeman και προκαλεί άρση του εκφυλισμού των ενεργειακών καταστάσεων.

Αν ηλεκτρόνιο, που βρίσκεται στην χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη, απορροφήσει ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας θα μεταβεί στην υψηλότερη ενεργειακή στάθμη, δηλαδή το σπιν του θα αλλάξει προσανατολισμό. Για να γίνει αυτό θα πρέπει:

1. Να ικανοποιείται η συνθήκη συντονισμού:

$$\Delta E = h\nu_0 = g_e \beta_e B_0$$

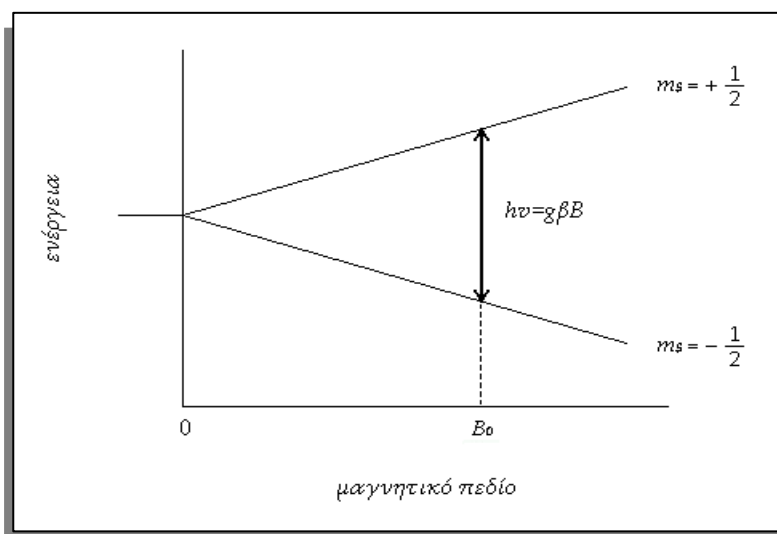
ν_0 , B_0 : συχνότητα και μαγνητικό πεδίο για τα οποία επιτυγχάνεται συντονισμός. Η κατάλληλη συχνότητα για να γίνουν μεταβάσεις αντιστοιχεί στην περιοχή των μικροκυμάτων.

2. Η μαγνητική συνιστώσα B_1 του κύματος να είναι κάθετη στο μαγνητικό πεδίο B και

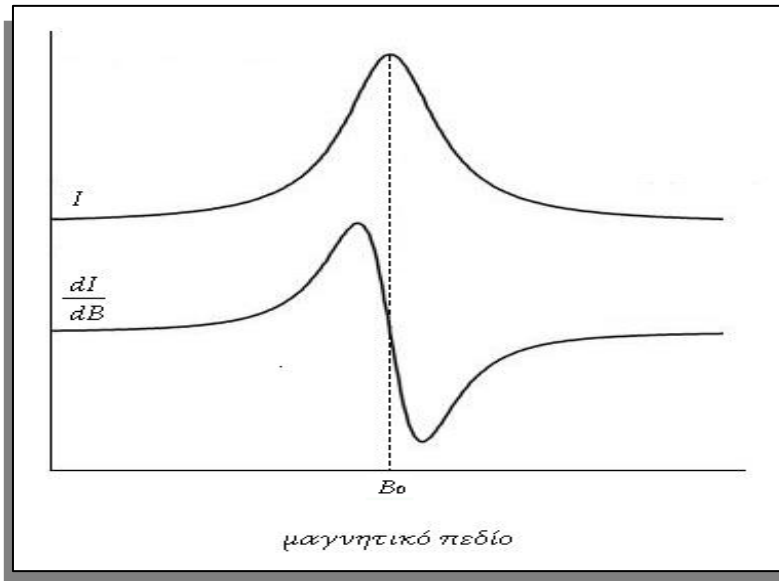
3. $|\Delta m_s|=1$, επειδή το απορροφούμενο φωτόνιο έχει μια μονάδα στροφορμής (\hbar).

Όταν το ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε μόριο και αλληλεπιδρά με μαγνητικά πεδία άλλων ηλεκτρονίων ή πυρήνων το g διαφέρει από το g_e του ελεύθερου ηλεκτρονίου.

Από την εξίσωση συντονισμού φαίνεται ότι μπορούμε να πάρουμε φάσματα EPR είτε μεταβάλλοντας τη συχνότητα της ακτινοβολίας, είτε μεταβάλλοντας το μαγνητικό πεδίο. Συνήθως, συμβαίνει το δεύτερο. Επίσης, για τεχνικούς λόγους καταγράφουμε την πρώτη παράγωγο της απορρόφησης συναρτήσει του μαγνητικού πεδίου (**εικόνα 1.13**).



Εικόνα 1.12: Διάγραμμα ενέργειας για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο ($S = 1/2$) συναρτήσει του μαγνητικού πεδίου, που δείχνει την απορρόφηση EPR.



Εικόνα 1.13: Απορρόφηση EPR και η πρώτη παράγωγος της συναρτήσεως του μαγνητικού πεδίου.

1.6.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ένταση του σήματος EPR

Όταν συμβαίνει συντονισμός, μπορούν να γίνουν μεταβάσεις είτε από την χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη προς την ανώτερη (απορρόφηση ακτινοβολίας), είτε το αντίθετο (εκπομπή). Για να δημιουργηθεί σήμα EPR, πρέπει να γίνεται καθαρή απορρόφηση και επομένως να είναι μεγαλύτερος ο πληθυσμός των ηλεκτρονίων που βρίσκονται στην χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη. Η ένταση του σήματος EPR αυξάνεται με την αύξηση της πληθυσμιακής διαφοράς μεταξύ των ενεργειακών καταστάσεων.

Τα ηλεκτρόνια κατανέμονται στα δύο ενεργειακά επίπεδα σύμφωνα με την κατανομή Boltzmann:

$$\frac{N^+}{N^-} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{g\beta B_0}{kT}}$$

N^+ και N^- : ηλεκτρόνια που βρίσκονται στο υψηλότερο και χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο αντίστοιχα,

k : σταθερά Boltzmann,

T : απόλυτη θερμοκρασία.

Από την παραπάνω εξίσωση βλέπουμε ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, μειώνεται η πληθυσμιακή διαφορά μεταξύ των καταστάσεων Zeeman και επομένως μειώνεται και η ένταση του σήματος EPR.

1.6.4. Κορεσμός

Ένα διεγερμένο σπιν αποδιεγείρεται αποδίδοντας την ενέργεια στο περιβάλλον (πλέγμα) υπό μορφή θερμότητας. Η σύζευξη σπιν-πλέγματος χαρακτηρίζεται από τον χρόνο αποκατάστασης σπιν-πλέγματος, T_1 , ενώ η σύζευξη μεταξύ δύο σπιν χαρακτηρίζεται από τον χρόνο αποδιέγερσης T_2 . Για την περίπτωση της αλληλεπίδρασης σπιν - πλέγματος, ο ρυθμός μεταφοράς ενέργειας από το σύστημα σπιν προς το πλέγμα και ο χρόνος T_1 συνδέονται από τις παρακάτω σχέσεις:

$$\frac{dE}{dt} = k_1 k (T_S - T_L)$$

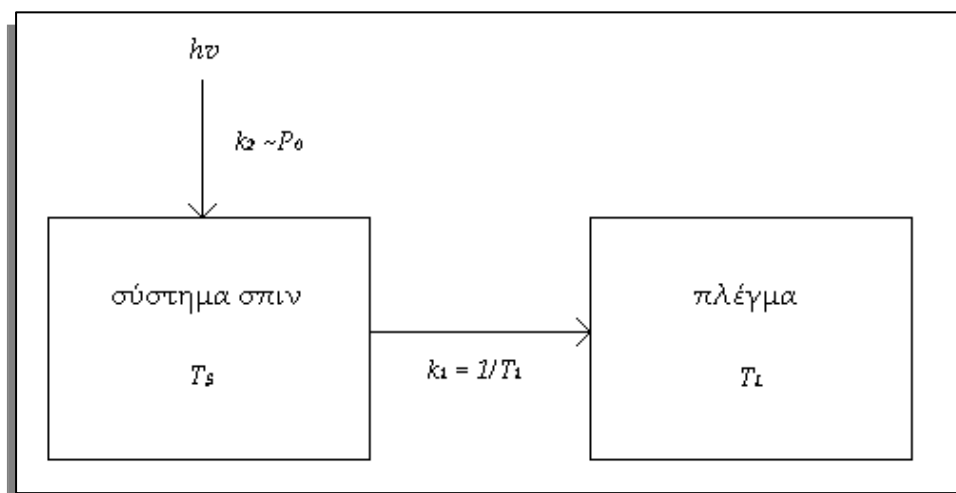
dE/dt : ρυθμός μεταφοράς ενέργειας από το σύστημα σπιν προς το πλέγμα,

T_S : απόλυτη θερμοκρασία συστήματος σπιν,

T_L : απόλυτη θερμοκρασία πλέγματος,

k : σταθερά Boltzmann,

k_1 : σταθερά (sec^{-1}), $k_1 = \frac{1}{T_1}$



Εικόνα 1.14: Ροή ενέργειας ανάμεσα στην μικροκυματική ακτινοβολία, το σύστημα σπιν και το πλέγμα

Ο ρυθμός με τον οποίο προσφέρεται ενέργεια από την ακτινοβολία χαρακτηρίζεται από την σταθερά k_2 , που είναι ανάλογη της μικροκυματικής ισχύος P_0 . Αν η μικροκυματική ισχύς είναι μεγάλη, γίνονται μεταβάσεις από την κατώτερη στην ανώτερη στάθμη Zeeman σε μεγάλο ποσοστό κέντρων και επομένως, η πληθυσμιακή διαφορά μεταξύ των καταστάσεων μειώνεται. Αν ο χρόνος αποδιέγερσης (T_1) είναι μικρός, όπως συμβαίνει συνήθως στις περιπτώσεις μαγνητικών αλληλεπιδράσεων, η πληθυσμιακή διαφορά παραμένει σταθερή. Αν αντίθετα, ο T_1 είναι μεγάλος η πληθυσμιακή διαφορά μικραίνει και επομένως η ένταση EPR μειώνεται. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται κορεσμός του σήματος EPR.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο κορεσμός εξαρτάται από τις συνθήκες ισχύος, αλλά και από τη θερμοκρασία (ο T_1 αυξάνεται με τη μείωση της θερμοκρασίας).

Για να γίνει δυνατή η παρατήρηση τέτοιων σημάτων πρέπει να χρησιμοποιηθεί χαμηλή ισχύς μικροκυμάτων, όπως συμβαίνει για την Υδ[•].

1.6.5. Υπέρλεπτες αλληλεπιδράσεις

Πολλοί πυρήνες έχουν πυρηνικό σπιν ($I \neq 0$). Η συνιστώσα του πυρηνικού σπιν στον άξονα z χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό m_I , που παίρνει τιμές $(-I, -I+1, \dots, I-1, I)$. Επομένως, για σπιν I δημιουργούνται $2I+1$ ενεργειακές στάθμες.

Λόγω του πυρηνικού σπιν οι πυρήνες αυτοί έχουν διπολική ροπή και δημιουργούν γύρω τους μαγνητικό πεδίο (B_{local}), το οποίο προστίθεται στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (B_{ext}):

$$B_{eff} = B_{ext} + B_{local}$$

Εφόσον, υπάρχουν $2I+1$ πιθανές τιμές για το m_I τόσες είναι και οι τιμές που μπορεί να πάρει το B_{local} .

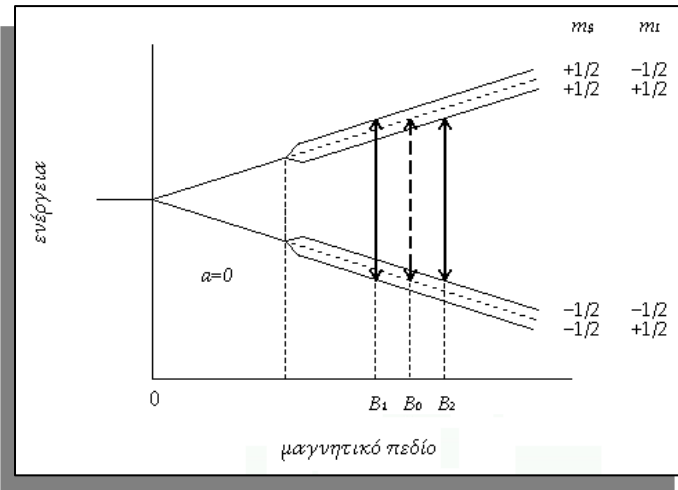
Ηλεκτρόνιο που βρίσκεται κοντά σε πυρήνα που έχει μαγνητική ροπή αλληλεπιδρά με αυτόν. Η αλληλεπίδραση αυτή ονομάζεται υπέρλεπτη αλληλεπίδραση και εξαιτίας της δημιουργούνται επιπλέον ενεργειακές στάθμες, εκτός από αυτές που οφείλονται στο φαινόμενο Zeeman, ο αριθμός των οποίων εξαρτάται από την τιμή του I .

Έτσι, η συνθήκη συντονισμού ικανοποιείται για $2I+1$ τιμές μαγνητικού πεδίου που δίνονται από τον τύπο:

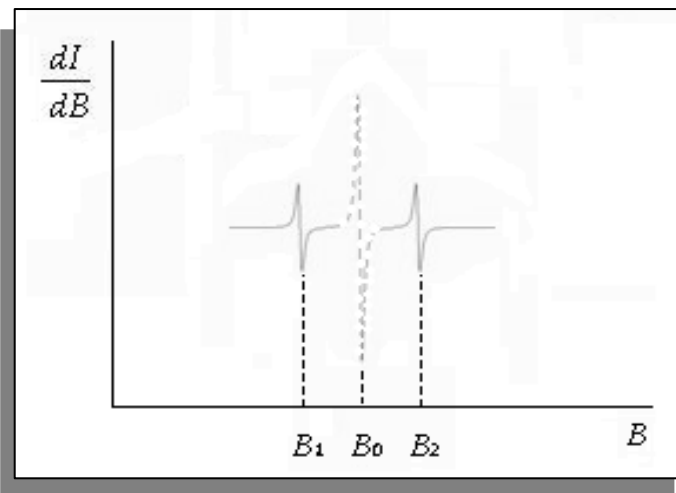
$$B_{hyperfine} = B_0 - am_I$$

a : ένταση του τοπικού μαγνητικού πεδίου.

Οι μεταβάσεις επιτρέπονται μόνο μεταξύ ενεργειακών επιπέδων για τα οποία ισχύει: $|\Delta m_s| = 1$ (§ 1.6.2) και $\Delta m_l = 0$, επειδή το πυρηνικό σπιν δεν αλλάζει κατά τις μεταβάσεις EPR.



Εικόνα 1.15: Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων σε ένα σύστημα με $S = I = 1/2$. Με διακεκομμένες γραμμές φαίνονται οι ενεργειακές στάθμες και η ΔE για $S = 1/2$, $I = 0$.



Εικόνα 1.16: Φάσμα EPR για $S = I = 1/2$. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται το φάσμα για $S = 1/2$, $I = 0$, δηλ. χωρίς υπέρλεπτη αλληλεπίδραση.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Απομόνωση και επεξεργασία δειγμάτων φωτοσυστήματος II

Για την παρασκευή δειγμάτων PS II χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες θυλακοειδών από χλωροπλάστες σπανακιού που έχουν υποστεί κατεργασία ώστε να απομακρυνθούν τα υπόλοιπα σύμπλοκα που συμμετέχουν στη φωτοσύνθεση (μεμβράνες BBY). Η απομόνωση έγινε με την μέθοδο των (Berthold et al., 1981) με κάποιες τροποποιήσεις (Ford and Evans, 1983).

2.1.1. Σύσταση Διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης

300 mM σουκρόζη

1mM PMSF

5 mM MgCl₂

0,2% αλβουμίνη ορού βοός

1 mM EDTA

20 mM Tricine (pH = 7,8)

Ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης (IRB)

70 mM σουκρόζη

5 mM CaCl₂

20 mM Tricine (pH = 7,8)

Διάλυμα TRITON

Ρυθμιστικό διάλυμα εκπλύσεως

25% κ.ο. Triton X-100

Διάλυμα SMN

0,4M σουκρόζη

15mM NaCl

25mM MES (pH=6)

2.1.2. Απομόνωση Θυλακοειδών Μεμβρανών από Σπανάκι

Αρχικά, κόπηκαν 100gr φρέσκων φύλλων σπανακιού, πλύθηκαν με απιονισμένο νερό και αλέστηκαν σε μίξερ, με 200ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης: 20mM Tricine (pH=7,8), 300 mM σουκρόζη, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0,2% BSA και 1mM PMSF. Το μείγμα διηθήθηκε από οκταπλό φύλλο γάζας και το διήθημα φυγοκεντρήθηκε στα 7500g (Sorval instruments, RC5C με ρότορα HB-4) για 20min. Το ίζημα (χλωροπλάστες) διαλυτοποιήθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης: 20mM Tricine (pH=7,8), 70mM σουκρόζη, 5mM CaCl₂ και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 7500g για 20min. Το ίζημα που καταβυθίστηκε (θυλακοειδή), διαλυτοποιήθηκε ξανά στο διάλυμα επαναιώρησης, ομογενοποιήθηκε με μηχανικό ομογενοποιητή και μετρήθηκε η περιεκτικότητά του σε χλωροφύλλη (Berthold et al., 1981). Όλα τα βήματα πραγματοποιήθηκαν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 4°C.

2.1.3. Απομόνωση PSII Μεμβρανών (BBY) από Σπανάκι

Οι PSII μεμβράνες απομονώθηκαν από τις μεμβράνες θυλακοειδών. Στο ομογενοποιημένο διάλυμα θυλακοειδών προστέθηκε σταγόνη το διάλυμα απορρυπαντικού Triton X-100 25% (στο διάλυμα επαναιώρησης) υπολογίζοντας τη ποσότητα όπως φαίνεται παρακάτω:

$$V_F \text{ (final Volume)} = [\text{Chl}_{\text{total}}]/2$$

$$V_T \text{ (Triton X-100,25\%)} = [\text{Chl}_{\text{total}}]/10$$

$$V_P = \text{thylakoids volume}$$

$$V_{\text{IRB}} = V_F - V_T - V_P$$

Το διάλυμα των θυλακοειδών μεμβρανών και απορρυπαντικού επωάστηκε για 30min στο σκοτάδι υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Κατόπιν το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 48000g για 45min. Το τελικό ίζημα

διαλυτοποιήθηκε σε όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιήθηκε, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητά του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύτηκε σε συγκέντρωση 2,5mg/ml Chl στους -80°C.

2.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της χλωροφύλλης:

1. Το αιώρημα των μεμβρανών εκχυλίζεται σε διάλυμα αιθανόλης
2. Φυγοκεντρείται στα 10000g για ~2min ώστε να ιζηματοποιηθούν οι πρωτεΐνες.
3. Μετράται το φάσμα απορρόφησης του υπερκειμένου.

Η ποσοτικοποίηση των χλωροφυλλών δίνεται από τις παρακάτω σχέσεις:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/ml}) = 13,7 (\text{OD}_{650} - \text{OD}_{750}) - 5,76 (\text{OD}_{665} - \text{OD}_{750})$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/ml}) = 25,8 (\text{OD}_{665} - \text{OD}_{750}) - 7,6 (\text{OD}_{650} - \text{OD}_{750})$$

$$\text{Chl a+b } (\mu\text{g/ml}) = 6,1 (\text{OD}_{650} - \text{OD}_{750}) - 20,04 (\text{OD}_{665} - \text{OD}_{750})$$

2.3. Πολαρογραφικές μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου

Η μέτρηση της έκλυσης οξυγόνου με τη χρήση ηλεκτροδίου τύπου Clark, είναι μια τυποποιημένη διαδικασία στον τομέα της έρευνας στη φωτοσύνθεση. Η μέτρηση είναι απλή και το ηλεκτροδίο οξυγόνου αποτελεί μια ενδιαφέρουσα μέθοδο για την αξιολόγηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας.



Εικόνα 2.1: Οξυγονόμετρο

Το Clark type ηλεκτρόδιο (Hansatech UK) αποτελείται από κάθοδο πλατίνας και άνοδο αργύρου με διαφορά δυναμικού 0,8V. Το ηλεκτρόδιο καλύπτεται από μια λεπτή μεμβράνη επιλεκτικά διαπερατή σε μικρά μόρια και ιόντα. Όταν εφαρμοστεί κατάλληλη τάση, το οξυγόνο που παράγεται από την οξείδωση του νερού, αντιδρά στη κάθοδο παράγοντας ηλεκτρικό ρεύμα. Το ρεύμα αυτό είναι ανάλογο του ποσού του οξυγόνου που διέρχεται από τη μεμβράνη.

Η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ρυθμιζόμενου όγκου (0,5-2,5ml) και διέθεται πρόσθετο περίβλημα που επιτρέπει τη διέλευση του νερού, προκειμένου να διατηρείται η θερμοκρασία σταθερή στους 25°C. Το φως παράγεται από δύο πηγές φωτός (Mille Luce, M100) και εστιάζονταν στο δείγμα, έτσι ώστε να δημιουργούνται συνθήκες φωτοκορεσμού. Το φως πριν φθάσει στη κυψελίδα διέρχονταν από φιάλη 2cm η οποία περιείχε διάλυμα 2% θειικού χαλκού (CuSO₄). Το διάλυμα αυτό έχει την ικανότητα να απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία προστατεύοντας κατά αυτόν τον τρόπο τα δείγματα από γρήγορη υπερθέρμανση.

Στην κυψελίδα τοποθετούνταν 1ml δείγματος, συγκέντρωσης 30μM χλωροφύλλης, ενώ ως ηλεκτρονοδέκτης χρησιμοποιήθηκε 450μM DCBQ.

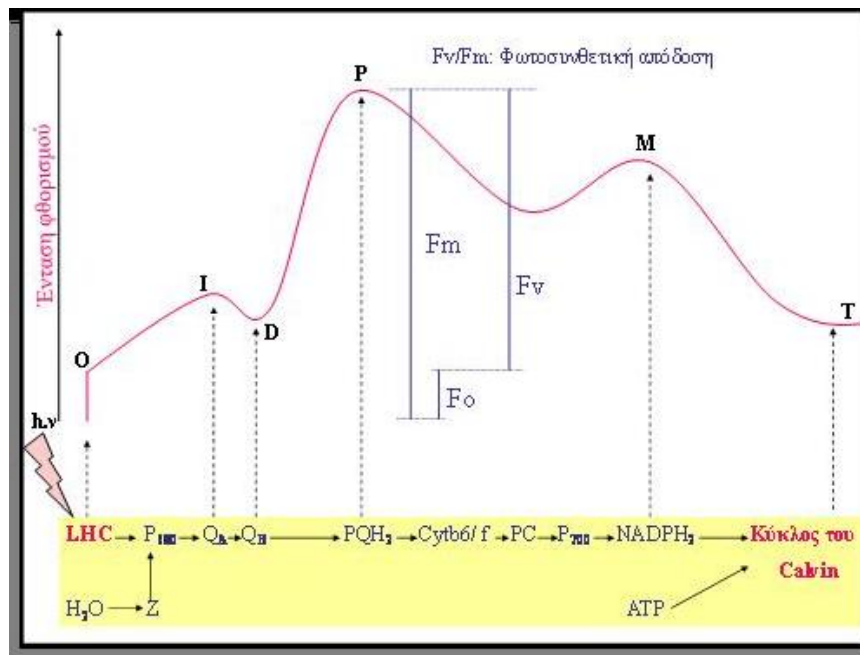
2.4. Επαγωγικός Φθορισμός

Μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης. Το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα είτε ως φθορισμός. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Kautsky το 1931 (Kautsky and Hirsch, 1931). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού - ιδιαίτερα της ταχείας φάσης - έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της δραστηριότητας αλλά και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Lazar, 1999). Βάση της μεθόδου των (Strasser and Strasser, 1995), μπορεί να εκτιμηθεί, εκτός των άλλων, το μέγεθος του LHCI, η πυκνότητα των κέντρων αντίδρασης και μια σειρά από παραμέτρους που αφορούν τη δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο, για παράδειγμα όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στην πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Το μεγαλύτερο μέρος

του φθορισμού εκπέμπεται από τις χρωστικές της κεραίας του φωτοσυστήματος II, και αυτό γιατί το PSI έχει ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό: όταν τα κέντρα του είναι «κλειστά» αυτά τα ίδια τα κέντρα αποσβένουν αρκετά αποτελεσματικά τον φθορισμό (Green and Durnford, 1996). Όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, μετά από προσαρμογή στο σκοτάδι, δεχτεί την επίδραση συνεχούς φωτισμού, τότε ο φθορισμός του αυξάνεται από το αρχικό του επίπεδο (F_0) σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_m) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μέχρις ένα σταθερό επίπεδο (F_s).

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη συσκευή «ανάλυσης της απόδοσης των φυτών» (Plant Efficiency Analyser, PEA της - Hansatech Instruments) και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (Biolyser 4.0.), σύμφωνα με τη μέθοδο των Stasser and Strasser (1995). Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος F_v/F_m , που αποτελεί το μέτρο της μέγιστης κβαντικής απόδοσης του PSII. Επίσης, με εφαρμογή της μεθόδου JIP για τιμές φθορισμού που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια (J, I και P), είναι δυνατή η μέτρηση επιμέρους χαρακτηριστικών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.



Εικόνα 2.2: Η πρότυπη καμπύλη της έντασης του φθορισμού

Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού, με συχνότητα συλλογής δεδομένων έως 100 KHz, ενώ η πλειοψηφία της πληροφορίας συγκεντρώνεται συνήθως μέσα στο πρώτο λεπτό. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs), οι οποίες έχουν ένταση ακτινοβολίας

μέχρι 3500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ερυθρού φωτός (650nm). Πιο συγκεκριμένα, η καμπύλη επαγωγικού φθορισμού ονομάζεται και καμπύλη Kautsky (Kautsky and Hirsch, 1931), της οποίας τα διαφορετικά βήματα σημειώνονται με γράμματα O-J-I-P. Η αύξηση του φθορισμού από το O στο P λαβαίνει χώρα το πρώτο δευτερόλεπτο της ακτινοβολήσης και ονομάζεται γρήγορη φάση. Η αργή φάση ακολουθεί μετά το P και ίσως χρειαστούν μερικά λεπτά μέχρι την τελική φάση T.

2.5. Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού φορτισμένων ουσιών, όπως οι πρωτεΐνες. Κατά την ηλεκτροφόρηση, ηλεκτρικά φορτισμένα μακρομόρια κινούνται προς τον ένα ή άλλο πόλο ενός ηλεκτρικού πεδίου. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται ευρύτατα για τον διαχωρισμό, την απομόνωση και την ανάλυση των πρωτεϊνικών μιγμάτων.

2.5.1. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση

Η μέθοδος της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (PAGE) παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS). Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου, που προκύπτει από το ριζικό πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου και του N-N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιου, χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών (Laemmli, 1970). Η χημική διάσπαση του υπερθειικού αμμωνίου δίνει τις ελεύθερες ρίζες που προκαλούν την έναρξη του πολυμερισμού: $\text{S}_2\text{O}_8^{2-} \rightarrow 2\text{SO}_4\cdot$. Η σταθεροποίηση των ριζών πραγματοποιείται με τη προσθήκη τετραμέθυλο-αίθυλο-διαμίνης (TEMED).

Αρχικά, οι πρωτεΐνες διέρχονται από τη πηκτή στοίβαξης περιεκτικότητας 4% w/v διαλύματος ακρυλαμίδιου, όπου και συσσωρεύονται. Έπειτα, περνάνε στη πηκτή διαχωρισμού περιεκτικότητας 16% w/v διαλύματος ακρυλαμίδιου. Με τη βοήθεια του ηλεκτρικού ρεύματος και της πηκτής οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τη μάζα τους.

Η χρώση των πρωτεϊνών έγινε με Coomassie Brilliant Blue R-250. Αποτελεί τη κλασική μέθοδο ανίχνευσης πρωτεϊνών που αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η ανίχνευση απαιτεί 0.1-1 μg πρωτεΐνης ανά πρωτεϊνική ζώνη. Η χρωστική αυτή χρειάζεται όξινο περιβάλλον για τη δημιουργία των ηλεκτροστατικών έλξεων μεταξύ των μορίων της

χρωστικής και των πρωτεϊνών και φαίνεται να αλληλεπιδρά με τις βασικές ομάδες των αμινοξέων.

Τα δείγματα πριν την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (Sample buffer) και θερμαίνονται για 5min στους 100°C.

Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν: δυναμικό 80V στη πηκτική στοίβαξη και 120V στη πηκτική διαχωρισμού. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν P9DS της Owl Separation Systems και το τροφοδοτικό το OSP-300 της ίδιας εταιρίας.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

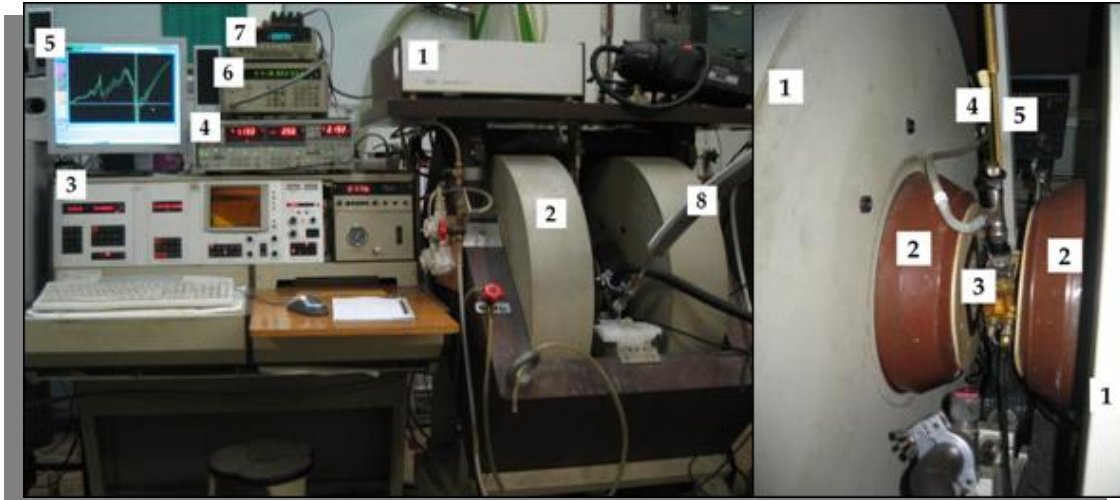
	Stacking	Running
Acryl:Bis 30%	2ml	16ml
Upper/Lower Tris	3,7ml	7,5ml
Glycerol 50%		0,6ml
Final Volume	15ml	30ml
APS 10%	52μl	120μl
TEMED	22μl	10μl

Sample Buffer pH=6.8	
SDS	12,5%
B-Mercaptoethanol	0,5mM
Glycerol	30%
Bromophenol Blue	0,6%
Tris/HCl	325mM

	Stain	Destain
Methanol	50%	50%
Acetic Acid	10%	10%
Coomasie Brilliant Blue R-250	0,5%	

2.6. Φασματοσκοπία EPR

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο EPR τύπου Bruker ER 200D-SRC συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και εξοπλισμένο με κρουστάτη τύπου ESR-900 της εταιρίας OXFORD INSTRUMENTS.



Εικόνα 2.3: Το φασματόμετρο EPR που χρησιμοποιήθηκε: αριστερά: (1) γέφυρα μικροκυμάτων, (2) μαγνήτης, (3) κονσόλα που περιέχει ρυθμιστή πεδίου, μαγνητόμετρο κλπ, (4) ανιχνευτής 'lock in', (5) υπολογιστής, (6) μετρητής συχνότητας μικροκυμάτων, (7) θερμοστοιχείο, (8) γραμμή μεταφοράς ηλίου/αζώτου από το δοχείο αποθήκευσης του προς τον κρουστάτη, δεξιά: (1) πόλοι του μαγνήτη, (2) πηνία Helmholtz, (3) κοιλότητα συντονισμού, (4) δείγμα, (5) κυματοδηγός.

Τα μέρη του φασματομέτρου EPR είναι τα ακόλουθα:

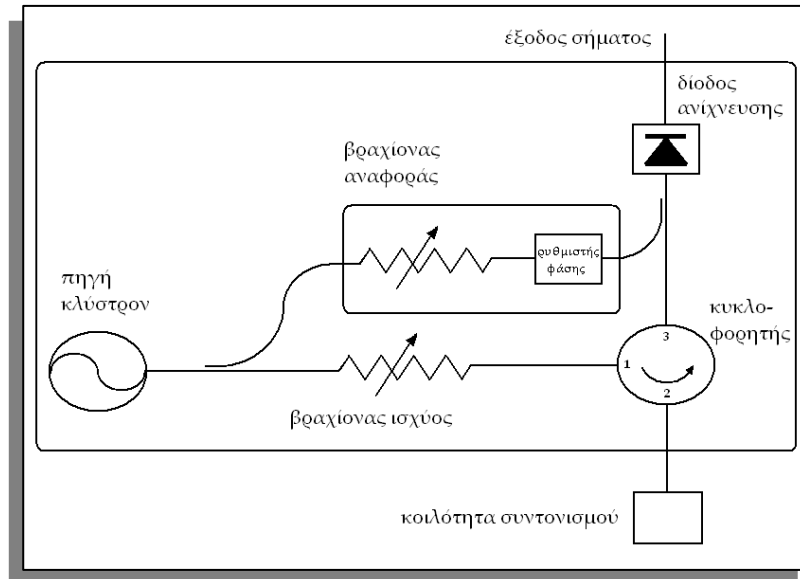
2.6.1. Γέφυρα μικροκυμάτων

Τα μικροκύματα δημιουργούνται σε μια λυχνία-κλύστρον και κατευθύνονται στην κοιλότητα συντονισμού, όπου βρίσκεται το δείγμα, μέσω ενός κυματοδηγού. Η ισχύς της ακτινοβολίας ρυθμίζεται από έναν εξασθενητή. Ο κυκλοφορητής δεν επιτρέπει στην ακτινοβολία, που ανακλάται από την κοιλότητα να επιστρέψει στη λυχνία και την οδηγεί προς την δίοδο ανίχνευσης, όπου η μικροκυματική ισχύς μετατρέπεται σε ηλεκτρικό ρεύμα.

Η δίοδος λειτουργεί σωστά όταν το ρεύμα στην έξοδό της είναι ανάλογο της τετραγωνικής ρίζας της ισχύος των μικροκυμάτων και αυτό συμβαίνει σε τιμές ρεύματος περίπου 200 μA . Γι' αυτό υπάρχει ένας βραχίονας αναφοράς που δίνει επιπλέον ισχύ στην δίοδο. Ο βραχίονας αναφοράς έχει έναν ρυθμιστή φάσης ώστε τα μικροκύματα που στέλνει

στη δίοδο να βρίσκονται σε φάση με τα μικροκύματα που έρχονται από την κοιλότητα.

Η συχνότητα των μικροκυμάτων είναι 9,408 GHz (X-band) και η συχνότητα διαμόρφωσης 100 KHz.



Εικόνα 2.4: Σχηματική απεικόνιση της γέφυρας μικροκυμάτων.

2.6.2. Κοιλότητα συντονισμού

Το δείγμα τοποθετείται στην κοιλότητα συντονισμού, η οποία έχει σχήμα ορθογώνιου παραλληλεπιπέδου με τις κατάλληλες διαστάσεις να ισούνται με πολλαπλάσιο του μισού του μήκους κύματος των μικροκυμάτων. Μ' αυτό τον τρόπο δημιουργούνται στάσιμα κύματα και ενισχύεται η ένταση των μικροκυμάτων. Το μαγνητικό πεδίο της ακτινοβολίας ταλαντώνεται κάθετα στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.

2.6.3. Μαγνήτης

Το μαγνητικό πεδίο στο χώρο του δείγματος δημιουργείται από ηλεκτρομαγνήτη και μπορεί να φτάσει μέχρι και 1,3 T. Η ένταση του μαγνητικού πεδίου μετράται με NMR μαγνητόμετρο της Bruker. Στους πόλους του μαγνήτη είναι τοποθετημένα δύο ζεύγη πηνίων Helmholtz.

Το πρώτο αυξάνει το λόγο σήματος/θόρυβο δημιουργώντας ένα χρονομεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο της μορφής:

$$B' = B_m \cdot \cos(2\pi\nu_m t)$$

Το πεδίο αυτό είναι παράλληλο με το εξωτερικό και προστίθεται σε αυτό διαμορφώνοντας το κατά πλάτος. Η συχνότητα διαμόρφωσης είναι 100 KHz και το πλάτος της διαμόρφωσης (B_m) το επιλέγουμε έτσι ώστε να είναι αρκετά μικρότερο από το εύρος της γραμμής απορρόφησης. Μ' αυτό τον τρόπο, τελικά, καταγράφουμε την πρώτη παράγωγο της απορροφούμενης μικροκυματικής ισχύος συναρτήσεως του μαγνητικού πεδίου.

Το δεύτερο ζεύγος πηνίων έχει τη δυνατότητα επαναλαμβανόμενης και γρήγορης σάρωσης μικρού εύρους πεδίου (Rapid Scanning EPR) και ρυθμίζεται από τη μονάδα χρόνου, που είναι ενσωματωμένη στον υπολογιστή.

2.6.4. Ανιχνευτής 'Lock in'

Ο ανιχνευτής 'Lock in' λαμβάνει το σήμα από τη γέφυρα ενισχυμένο και διαμορφωμένο, διαμορφώνει το μαγνητικό πεδίο και τα στέλνει στον υπολογιστή.

2.6.5. Λογισμικά Συστήματα

Τα φάσματα που έρχονται από τον ανιχνευτή 'Lock in' καταγράφονται στον υπολογιστή μέσω του προγράμματος Labview, στο οποίο είναι ενσωματωμένος ο ρυθμιστής πεδίου και η μονάδα χρόνου.

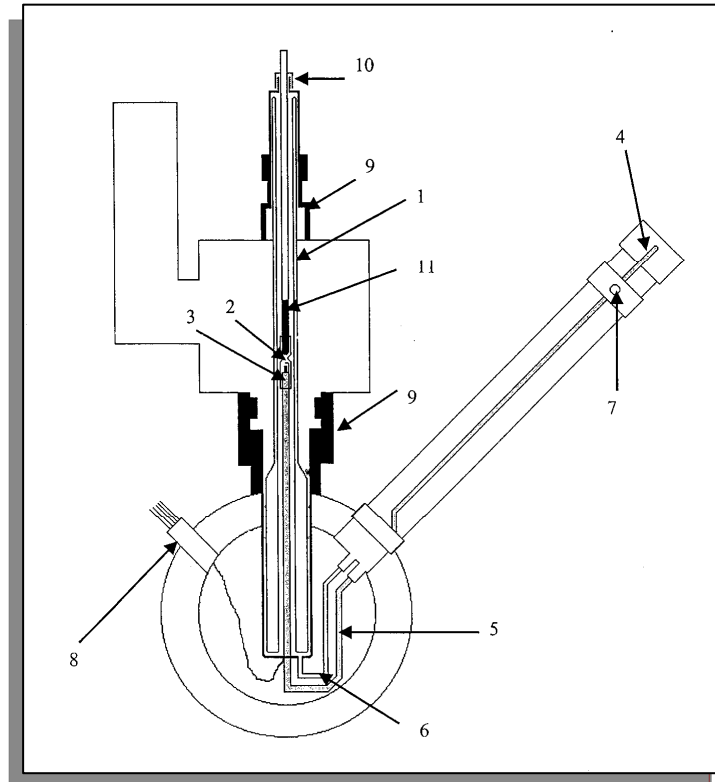
Από τον ρυθμιστή πεδίου γίνεται η επιλογή του πλάτους διαμόρφωσης (B_m), του εύρους και των τιμών μαγνητικού πεδίου. Η μονάδα χρόνου συγχρονίζει τη λήψη δεδομένων με την μεταβολή του μαγνητικού πεδίου και επίσης, από εκεί επιλέγεται ο χρόνος σάρωσης των φασμάτων.

Στα πειράματα με γρήγορη σάρωση (Rapid Scanning EPR) η μονάδα χρόνου συνδέεται με το δεύτερο ζεύγος πηνίων Helmholtz. Τα δεδομένα καταγράφονται στην κάρτα NI 6251 pci, η οποία μετατρέπει το σήμα από αναλογικό σε ψηφιακό και είναι συνδεδεμένη με το πρόγραμμα Labview.

2.6.6. Κρυοστάτης

Ο χώρος του δείγματος ψύχεται με ροή υγρού ηλίου ή αζώτου που περνάει μέσα από κρυοστάτη τύπου ESR-900 της εταιρίας OXFORD INSTRUMENTS. Η ελάχιστη θερμοκρασία που επιτυγχάνεται είναι 4,2 K,

ενώ η μέγιστη 300 K. Η θερμοκρασία ρυθμίζεται μέσω της ροής του ηλίου/αζώτου και μέσω ηλεκτρικής αντίστασης.



Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση του κρυοστάτη. (1) κυρίως σώμα κρυοστάτη (WILMAD). Αποτελείται από χαλαζία υψηλής καθαρότητας, για να μη δίνει σήμα EPR. Έχει διπλά τοιχώματα και φέρει άνοιγμα απ' όπου γίνεται άντληση για τη δημιουργία κενού (10^{-5} Torr), (2) σωλήνας από χαλαζία που φέρει κατάλληλη στένωση, ώστε να συγκρατεί το δείγμα πάνω από την έξοδο του υγρού ηλίου/αζώτου, (3) θερμοζεύγος (Au +0,03% Fe/Chromel) και αντίσταση (100 Ω) για μέτρηση και ρύθμιση της θερμοκρασίας αντίστοιχα, (4) είσοδος υγρού ηλίου/αζώτου μέσω γραμμής μεταφοράς από το δοχείο αποθήκευσής του. Η γραμμή μεταφοράς είναι τύπου GFS-300, OXFORD INSTRUMENTS, (5) γραμμή εισόδου υγρού ηλίου/αζώτου, (6) γραμμή εξόδου αερίου ηλίου/αζώτου (7) βαλβίδα σύνδεσης αντλίας κενού, (8) σύνδεση θερμοστοιχείου και αντίστασης με τα όργανα ανάγνωσης και ελέγχου της θερμοκρασίας αντίστοιχα, (9) θέσεις μηχανικής σύνδεσης του κρυοστάτη πάνω στην κοιλότητα συντονισμού, (10) είσοδος δείγματος και διάταξη στεγανοποίησης εισόδου, (11) δείγμα.

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1. Γενικά

Αρχικά, μια πρώτη ιδέα για τον πιθανό ρόλο των πολυαμινών στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό, δόθηκε μετά την ανίχνευση τους στους χλωροπλάστες διάφορων φωτοσυνθετικών οργανισμών (*Euglena gracilis* (Bagni and Serafini-Fracassini, 1973), *Zea mays* (Andreadakis and Kotzabasis, 1996), *Helianthus tuberosus* (Torrighiani et al., 1986), *Spinacia oleracea* (Kotzabasis et al., 1993). Επίσης με δεδομένο ότι η βιοσύνθεσή τους και ο καταβολισμός τους μπορεί να γίνει στον χλωροπλάστη (Andreadakis and Kotzabasis, 1996), ότι προσδέονται μέσω ειδικών ενζύμων σε καθορισμένες μόνο χλωροπλαστικές πρωτεΐνες (Delduca et al., 1994) και το ότι τα επίπεδα τους φωτορυθμίζονται (Dornemann et al., 1996) εξάγεται το συμπέρασμα ότι πρέπει να έχουν συγκεκριμένους ρόλους στο οργανίδιο αυτό.

Λεπτομερέστερη έρευνα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στα θυλακοειδή του σπανακιού έδειξε, όχι μόνο την ύπαρξη και των τριών κύριων πολυαμινών (Put, Spd, Spm) σ' αυτές τις μεμβράνες, αλλά επιπλέον, ότι οι πολυαμίνες βρίσκονται συνδεδεμένες σε υποσύμπλοκα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, όπως το LHC II και το PS II. Μάλιστα, όσο προχωρούσε η κλασμάτωση των θυλακοειδών μεμβρανών, τόσο μειωνόταν η αναλογία Put/Spd+Spm, ενώ εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι στο εσωτερικό των κέντρων αντίδρασης του σπανακιού βρέθηκε σχεδόν αποκλειστικά σπερμίνη (Kotzabasis et al., 1993). Παρόλο όμως, που είναι γνωστή η δομή, τα μονοπάτια βιοσύνθεσης (Alabadi and Carbonell, 1998; Primikirios and Roubelakis-Angelakis, 2001), καταβολισμού (Tavladoraki et al., 1998) και μεταφοράς (Kakkar et al., 1998) αλλά και οι συνθήκες που αυξάνονται (Sfichi et al., 2004) ή μειώνονται (Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005) υπάρχει μια ασάφεια για το ποιος είναι ο ρόλος τους και ποιος είναι ο μηχανισμός δράσης τους.

Μέσα από τη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή επιχειρήθηκε να εντοπισθεί και να κατανοηθεί ο ρόλος της σπερμίνης στη λειτουργία του φωτοσυστήματος II, *in vitro*, έπειτα από απομόνωση μεμβρανών εμπλουτισμένων σε PSII. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να μελετηθεί ο μηχανισμός δράσης της σπερμίνης ειδικά στο φωτόςύστημα II και στο σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου χωρίς να εμπλέκονται παράπλευρες δράσεις και δευτερογενή φαινόμενα όπως θα συνέβαινε στη περίπτωση που για αντικείμενο μελέτης είχαν χρησιμοποιηθεί ολόκληρα κύτταρα, χλωροπλάστες ή ακόμα και θυλακοειδείς μεμβράνες. Από τις πολυαμίνες αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί και να ερευνηθεί ο ρόλος μόνο της

σπερμίνης καθώς αυτή ήταν που βρέθηκε σχεδόν αποκλειστικά στα κέντρα αντίδρασης του PS II (Kotzabasis et al., 1993), χωρίς βέβαια αυτό να σημαίνει πως και η μελέτη των υπολοίπων πολυαμινών δεν παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον.

Στη προσπάθεια να διασαφηνιστεί ο ρόλος της συγκεκριμένης πολυαμίνης στο φωτοσύστημα II αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν δύο προσεγγίσεις για να διερευνηθεί πιο σφαιρικά. Στη πρώτη μελετήθηκαν οι επιδράσεις των τεχνητά αυξανόμενων συγκεντρώσεων σπερμίνης τόσο στην έκλυση οξυγόνου όσο και στη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, η οποία μελετήθηκε, μέσω της κινητικής του επαγωγικού φθορισμού της χλωροφύλλης *a*. Κατά τη δεύτερη προσέγγιση οι εμπλουτισμένες με PSII μεμβράνες επιχειρήθηκε να ξεπλυθούν από την ελαφρώς προσδεδεμένη ενδογενή σπερμίνη. Μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας ελέγχθηκε ο ρόλος της μέσω της απουσίας της αλλά και κατά πόσο είναι δυνατόν να επανέλθουν οι συγκεκριμένες μεμβράνες στα αρχικά επίπεδα απόδοσής τους ύστερα από χορήγηση εξωγενούς σπερμίνης.

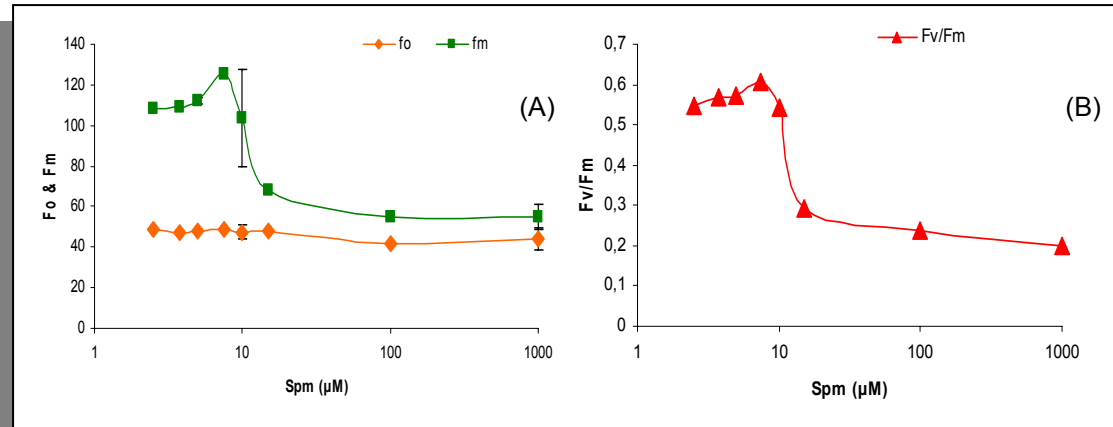
Στη περίπτωση που το σημείο δράσης της πολυαμίνης είναι το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου τότε προσθήκη εξωγενούς σπερμίνης θα άλλαζε τις μαγνητικές του ιδιότητες. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η EPR φασματοσκοπία ώστε να διαπιστωθεί το κατά πόσο η σπερμίνη είναι ικανή να βρεθεί στη κοιλότητα του συμπλόκου του Mn και να διαταράξει τις μαγνητικές του αλληλεπιδράσεις.

3.2. Επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων σπερμίνης στη μοριακή οργάνωση και λειτουργικότητα του PSII

Για να μπορέσει να χαρακτηριστεί η επίδραση της σπερμίνης στο φωτοσύστημα II αναλύθηκαν οι ιδιότητες του φθορισμού της χλωροφύλλης *a* πλούσιων σε φωτοσύστημα II μεμβρανικών συμπλόκων (BBY). Κατόπιν ακτινοβόλησης προσαρμοσμένων στο σκοτάδι δειγμάτων, ο φθορισμός αυξάνεται ακολουθώντας μια τριφασική κινητική O-J, J-I, I-P, (Strasser et al., 1995). Η φάση (O-J) αντιστοιχεί στην πλήρη αναγωγή του πρωτογενούς ηλεκτρονιοδέκτη Q_A του φωτοσυστήματος II, η άρση της απόσβεσης του φθορισμού κατά τη φάση (J-I) ελέγχεται από τη πλευρά του δότη του PS II (δραστηριότητα φωτόλυσης του νερού) και η τρίτη φάση (I-P) αντιστοιχεί στην άρση της απόσβεσης του φθορισμού από την οξειδωμένη δεξαμενή της πλαστοκινόνης (Neubauer and Schreiber, 1987).

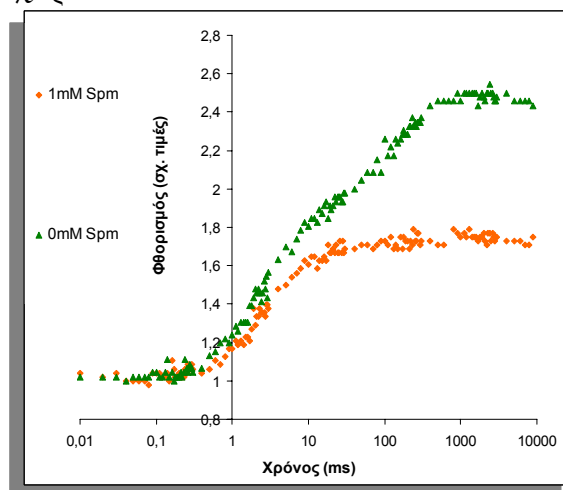
Ο αρχικός φθορισμός F₀, ο οποίος ανιχνεύεται όταν όλα τα ενεργά κέντρα είναι ανοιχτά, δεν επηρεάζεται από την σπερμίνη. Ωστόσο, το F_m, που παρατηρείται όταν όλα τα κέντρα είναι σε κλειστή κατάσταση, μειώνεται αισθητά στις ίδιες συγκεντρώσεις σπερμίνης, όπως φαίνεται

από την **εικόνα 3.1**. Επομένως, ο δείκτης μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης F_v/F_m , όπου $F_v = F_m - F_0$, ο οποίος και εξαρτάται από το μέγιστο φθορισμό, μειώνεται επίσης.



Εικόνα 3.1: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων σπερμίνης (A) στο μέγιστο φθορισμό F_m (πράσινο) και στον αρχικό φθορισμό F_0 (πορτοκαλί) και (B) στο δείκτη μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης F_v/F_m .

Για να αποκτηθεί περισσότερη πληροφορία, όσων αφορά τον επαγωγικό φθορισμό της χλωροφύλλης *a*, μελετήθηκε και παρουσιάζεται η καμπύλη O-J-I-P (**εικόνα 3.2**). Στα υπομεμβρανικά κλάσματα φωτοσυστήματος II η J-I φάση είναι πολύ αμυδρή και μόνο οι δύο άλλες φάσεις γίνονται αντιληπτές (Pospisil and Dau, 2000). Όπως άλλωστε αναμένεται εξαιτίας της μείωσης του F_v/F_m , η ένταση του φθορισμού της χλωροφύλλης μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της σπερμίνης. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2** στο 1mM σπερμίνης έχει απομείνει μόνο μια ασθενή O-J φάση, ενώ η περεταιίρω αύξηση του φθορισμού παρεμποδίζεται ισχυρά.

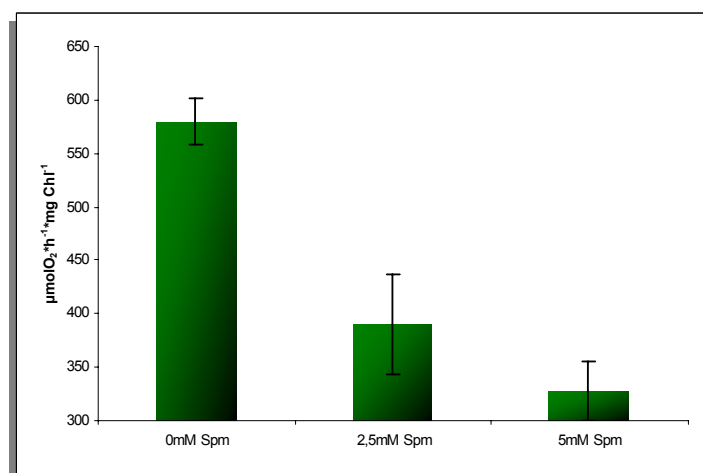


Εικόνα 3.2: Επίδραση εξωγενώς προστιθέμενης σπερμίνης, συγκέντρωσης 1mM, όπως εκτιμάται από τις κινητικές OJIP του φθορισμού της χλωροφύλλης *a*. Control (πράσινο), 1mM

Spm (πορτοκαλί). Οι τιμές του φθορισμού παρουσιάζονται ομαλοποιημένες ως προς την τιμή του φθορισμού $F_{40\mu s}$.

Η μείωση του F_v/F_m σε συνδυασμό με τη μείωση του πλάτους των φάσεων O-J και I-P της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού παρουσία σπερμίνης είναι ενδεικτικές ενός συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου που αδυνατεί να τροφοδοτήσει το φωτοσύστημα II με ηλεκτρόνια και επομένως εμφανίζεται μια πτώση της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης.

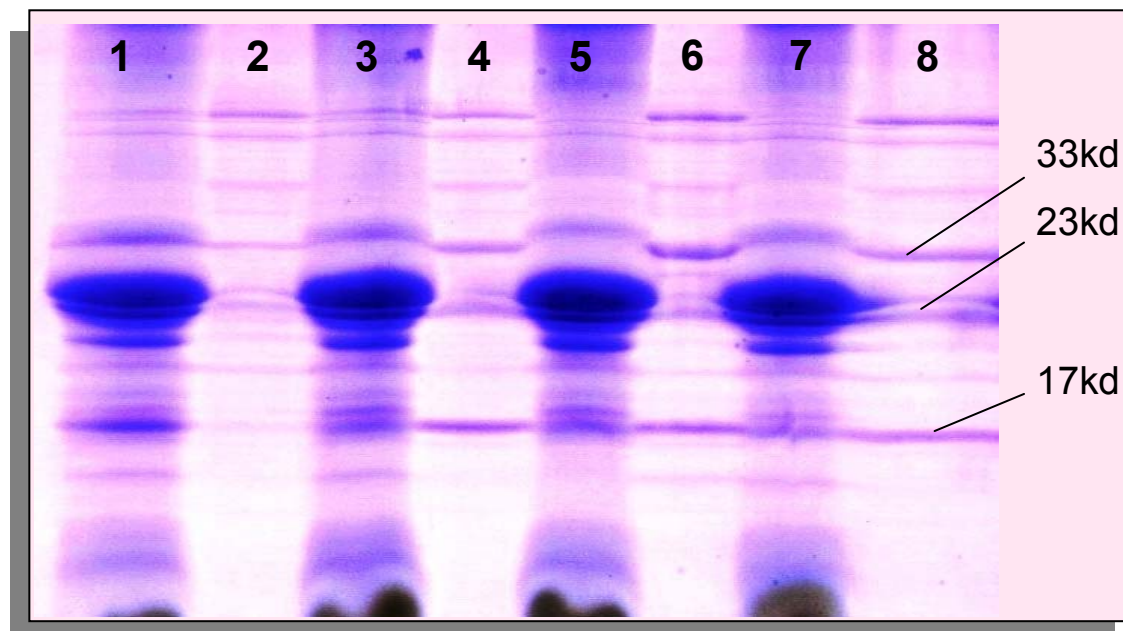
Παρόμοια αποτελέσματα, με αυτά του επαγωγικού φθορισμού, προκύπτουν και από τις πολαρογραφικές μετρήσεις της έκλυσης οξυγόνου. Απομονωμένα υπομεμβρανικά κλάσματα φωτοσυστήματος II (BBY) επωάστηκαν, για λίγα λεπτά, με διαφορετικές συγκεντρώσεις εξωγενούς προστιθέμενης σπερμίνης και στη συνέχεια μετρήθηκε πολαρογραφικά ο ρυθμός έκλυσης οξυγόνου παρουσία του 2,5-dichlorobenzoquinone (2,5-DCBQ) ως δέκτη ηλεκτρονίων. Όπως παρουσιάζεται και στην **εικόνα 3.3**, η σπερμίνη παρεμποδίζει τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που παρατηρείται μείωση του επαγωγικού φθορισμού. Συγκεκριμένα, περίπου το 50% της έκλυσης οξυγόνου έχει χαθεί στα 3mM σπερμίνης.



Εικόνα 3.3: Επίδραση της σπερμίνης στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα μεμβρανών πλούσιων σε PS II (BBY). Ως δέκτης ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε 450 μ M 2,5-DCBQ. Οι μπάρες αντιστοιχούν στη σταθερή διακύμανση (n=3).

Τόσο η μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας όσο και η παρεμπόδιση αύξησης του επαγωγικού φθορισμού είναι σημάδια ενός μη λειτουργικού συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου, το οποίο, αδυνατεί να διασπάσει το H_2O και να προσφέρει ηλεκτρόνια στην αναγωγική πλευρά του φωτοσυστήματος II. Για να μπορέσει να εξακριβωθεί λοιπόν, το κατά πόσο, η αύξηση της συγκέντρωσης της σπερμίνης επηρεάζει τη δομική ακεραιότητα του φωτοσυστήματος II, χρησιμοποιήθηκαν πηκτές πολυακρυλαμίδης. Τα BBY επωάστηκαν για λίγα λεπτά σε τρεις

συγκεντρώσεις σπερμίνης (10 μ M, 100 μ M, 1mM) και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για να διαχωριστούν από τα πολυπεπτίδια που απελευθερώθηκαν, λόγω της δράσης της πολυαμίνης, και παρέμειναν στο υπερκείμενο. Τα προφίλ των πολυπεπτιδίων τόσο του ιζήματος όσο και του υπερκειμένου παρουσιάζονται στην **εικόνα 3.4**.

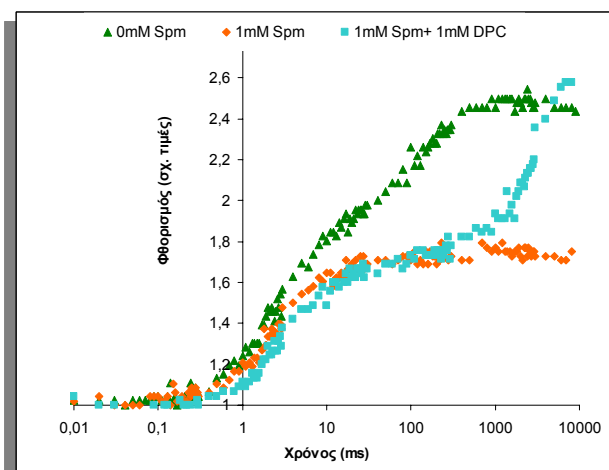


Εικόνα 3.4: Προφίλ πολυπεπτιδίων μεμβρανών πλούσιων σε φωτοσύστημα II (100 μ g Chl/ml) έπειτα από επώαση σε διάφορες συγκεντρώσεις σπερμίνης. 1: BBY μετά από επώαση σε 10 μ M Sprm, 2: υπερκείμενο επώασης BBY μεμβρανών σε 10 μ M Sprm, 3: BBY μετά από επώαση σε 100 μ M Sprm, 4: υπερκείμενο επώασης BBY μεμβρανών σε 100 μ M Sprm, 5: BBY μετά από επώαση σε 1mM Sprm, 6: υπερκείμενο επώασης BBY μεμβρανών σε 1mM Sprm, 7: BBY μετά από επώαση σε 1M Tris, 8: υπερκείμενο επώασης BBY μεμβρανών σε 1M Tris.

Μεταχείριση του φωτοσυστήματος II με 1M Tris (pH=8) οδηγεί στην απελευθέρωση των 17, 23 και 33kDa πολυπεπτιδίων του PSII (Yamamoto et al., 1981). Τα δύο εξωτερικά πολυπεπτίδια, μοριακού βάρους 17 και 23kDa, καθορίζουν το βαθμό συγγένειας του Ca²⁺ και Cl⁻ στο σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (Seidler, 1996). Οι συμπαράγοντες αυτοί, είναι απαραίτητοι για να διατηρηθεί μια ενεργή διαμόρφωση του συμπλόκου αυτού αλλά, και για τη σωστή μετάβαση των S-states. Το πολυπεπτίδιο των 33kDa συνδέεται με το σύμπλοκο του Mn, καθώς απουσία του συγκεκριμένου πεπτιδίου, το σύμπλοκο είναι αρκετά ασταθές και στις περισσότερες περιπτώσεις απελευθερώνονται από αυτό 2-4 Mn ως ελεύθερα ιόντα (Abramowicz and Dismukes, 1984; Yamamoto et al., 1984).

Ολιγόλεπτη επώαση του φωτοσυστήματος II, σε συγκεντρώσεις σπερμίνης πάνω από 100 μ M, οδηγεί σε απελευθέρωση πεπτιδίων με μοριακά βάρη που συμπίπτουν με αυτά που απελευθερώνονται από τη δράση 1M Tris (**εικόνα 3.4**). Επομένως, συγκεντρώσεις σπερμίνης πάνω από 100 μ M είναι ικανές να απελευθερώσουν τα εξωτερικά πεπτίδια του PSII, επηρεάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο το σύμπλοκο του Mn.

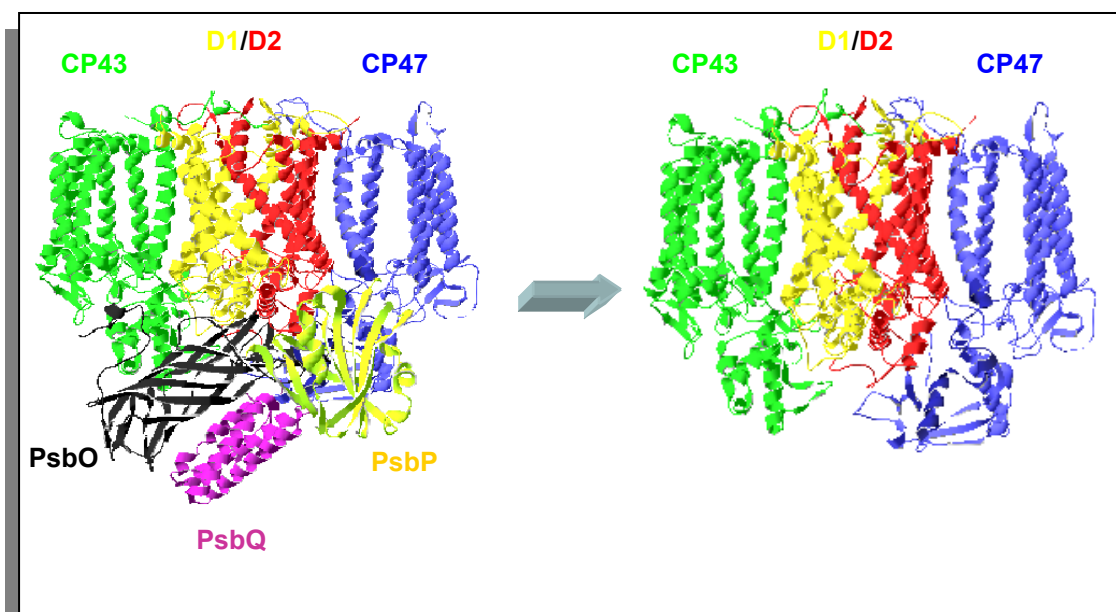
Με βάση τα συγκεκριμένα αποτελέσματα θα μπορούσαν να ερμηνευτούν τόσο η μείωση του επαγωγικού φθορισμού όσο και της έκλυσης οξυγόνου, που παρατηρήθηκαν σε παρόμοιες συγκεντρώσεις σπερμίνης. Πράγματι, αν χρησιμοποιήσουμε έναν τεχνητό δότη ηλεκτρονίων, το diphenylcarbazide (DPC), παρατηρείται πως ο φθορισμός επιστρέφει στα αρχικά του επίπεδα (εικόνα 3.5). Ο δότης αυτός μπορεί να προσφέρει ηλεκτρόνια στην Y_z , μόνο στη περίπτωση που τα εξωτερικά πεπτιδία του PSII έχουν χαθεί από τη πλευρά του μικροχώρου και το σύμπλοκο του μαγγανίου είναι μη λειτουργικό (Ghirardi et al., 1996). Επίσης, το diphenylcarbazide προσφέρει ηλεκτρόνια με αργότερους ρυθμούς σε σχέση με το φυσικό σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου και για το λόγο αυτό στη καμπύλη O-J-I-P, της **εικόνας 3.5**, παρατηρείται μια χρονική υστέρηση σε σχέση με τον μάρτυρα. Η ανάκαμψη του φθορισμού ύστερα από τη χρήση του diphenylcarbazide επαληθεύει επομένως, την αρνητική δράση υψηλών συγκεντρώσεων σπερμίνης στη δομική και λειτουργική ακεραιότητα του φωτοσυστήματος II, αποκολλώντας τα εξωτερικά πεπτιδία.



Εικόνα 3.5: Επίδραση εξωγενώς προστιθέμενης σπερμίνης (1mM), όπως εκτιμάται από τις κινητικές OJIP του φθορισμού της χλωροφύλλης a. Control (πράσινο), 1mM Spm (πορτοκαλί), 1mM Spm + 1mM DPC (ροζ). Οι τιμές του φθορισμού παρουσιάζονται ομαλοποιημένες ως προς την τιμή του φθορισμού F40μs.

Απελευθέρωση των τριών εξωτερικών πολυπεπτιδίων (**εικόνα 3.6**), προκαλώντας παρεμπόδιση της έκλυσης του οξυγόνου και μείωση του φθορισμού, έχει παρατηρηθεί πρόσφατα για τη μεθυλαμίνη (Hamdani and Carpentier, 2009). Επίσης, υψηλές συγκεντρώσεις σπερμίνης και σπερμιδίνης προκαλούν αποδιοργάνωση του OEC και επομένως παρεμπόδιση της μεταφοράς των ηλεκτρονίων από την Tyrz στο P680⁺ (Beauchemin et al., 2007a). Επιπρόσθετα, δισθενή ιόντα όπως, τα Ni²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺ οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα αλλά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Bernier and Carpentier, 1995; Boisvert et al., 2007). Μάλιστα, 50% παρεμπόδιση της έκλυσης οξυγόνου παρατηρείται σε

χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τη σπερμίνη σε σχέση με τη πουτρεσίνη και τη μεθυλαμίνη (Hamdani et al., 2011). Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται πως σχετίζονται με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυαμινών και των πρωτεϊνών του PSII και επομένως η δραστικότητα κάθε αμίνης συνδέεται με τον αριθμό των θετικών φορτίων της. Σε φυσιολογικό pH οι πολυαμίνες είναι πρωτονιομένες και άρα η σπερμίνη, με τα τέσσερα θετικά φορτία της, είναι πιο δραστική από τη σπερμιδίνη, με τα τρία, και αυτή με τη σειρά της από τη πουτρεσίνη, με τα δύο θετικά φορτία.



Εικόνα 3.6: Προτεινόμενο μοντέλο αλληλεπίδρασης της σπερμίνης με το PSII. Υψηλές συγκεντρώσεις σπερμίνης οδηγούν στην απελευθέρωση των εξωτερικών πεπτιδίων του φωτοσυστήματος II. Οι δομές των CP43 (πράσινο), D1 (κίτρινο), D2 (κόκκινο), CP47(μπλε) και PsbO (μαύρο) προέρχονται από το *Thermosynechococcus vulcanus*, (Umena et al., 2011) (PDB entry: 3ARC). Η δομή του PsbQ προέρχεται από το *Nicotiana tabacum*, (Balsera et al., 2005) (PDB entry:1VYK), ενώ αυτή του PsbP από το *Spinacia oleracea*, (Kohoutova et al., 2009) (PDB entry:2VU4).

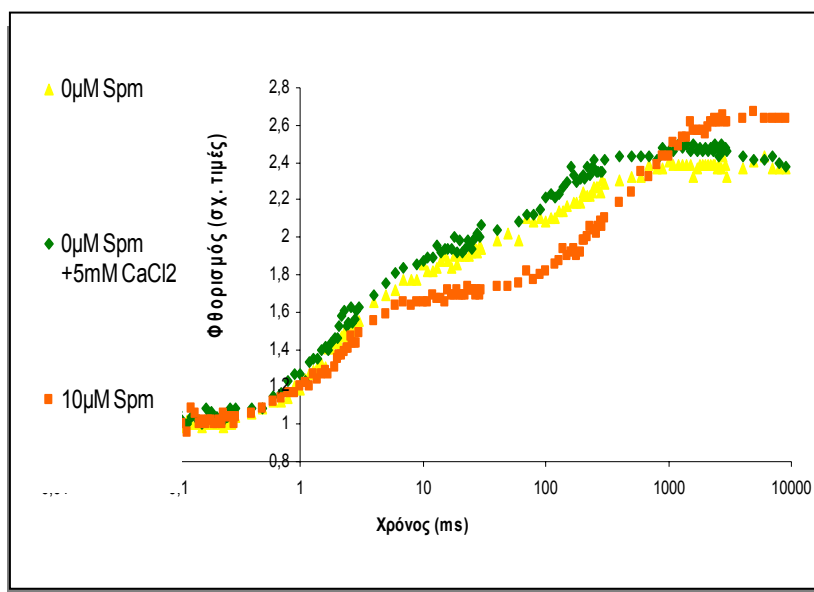
3.3. Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων σπερμίνης στη μοριακή οργάνωση και λειτουργικότητα του PSII

Στο υποκεφάλαιο 3.2. παρατέθηκαν στοιχεία, τα οποία υποδεικνύουν ότι, υψηλή συγκέντρωση σπερμίνης, λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, απελευθερώνει τα εξωτερικά πεπτιδία του PSII και μαζί μ' αυτά τους απαραίτητους συμπαραγόντες Ca^{2+} και Cl^- και ίσως κάποια Mn^{2+} . Σαν συνέπεια, έχουμε μια αποδιοργάνωση του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου, παρεμπόδιση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και επομένως μείωση της αύξησης του επαγωγικού φθορισμού.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σπερμίνης, εκτός από πιθανό λειτουργικό ρόλο *in vivo* θα μπορούσαν να

έχουν καταστροφικές συνέπειες για το φωτοσυνθετικό μηχανισμό και για το λόγο αυτό, δεν παρέχουν ασφαλείς πληροφορίες για το φυσιολογικό ρόλο της ενδογενούς πολυαμίνης. Για αυτό τον λόγο, αποφασίστηκε να ερευνηθούν μικρότερες συγκεντρώσεις σπερμίνης, σε εύρος λίγων μικρομόλαρ, και να παρατηρηθεί η επίδρασή τους στο φωτοσύστημα II.

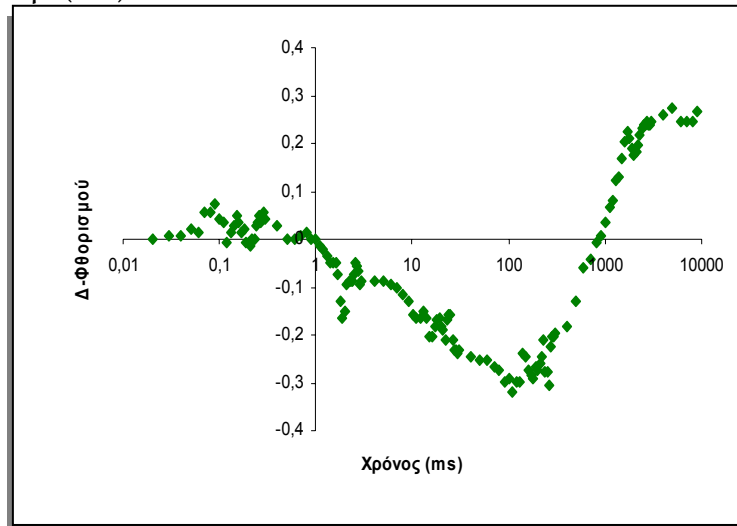
Από τις καμπύλες O-J-I-P του επαγωγικού φθορισμού (εικόνα 3.7) φαίνεται πως 10 μ M σπερμίνης, όχι μόνο δεν αλλοιώνουν το σχήμα της καμπύλης, παρεμποδίζοντας την αύξηση του φθορισμού, αλλά πιθανότατα τον βελτιώνουν κιόλας. Η βελτίωση αυτή, όπως φαίνεται και από την **εικόνα 3.1**, έγκειται στο γεγονός πως αυξάνεται ο μέγιστος φθορισμός, σε μικρές συγκεντρώσεις σπερμίνης, ενώ ο αρχικός φθορισμός F_0 παραμένει ουσιαστικά ανεπηρέαστος. Επομένως, εξαιτίας της αύξησης του επαγωγικού φθορισμού, παρατηρείται μια μικρή βελτίωση της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, η οποία ποσοτικοποιείται από τη σχέση F_v/F_m . Η συγκεκριμένη βελτίωση αδυνατεί να παρατηρηθεί στην περίπτωση που αντί για σπερμίνη προσθέσουμε 5mM $CaCl_2$, γεγονός που φανερώνει, πως η συγκεκριμένη επίδραση δεν είναι ιοντικής φύσης (**εικόνα 3.7**).



Εικόνα 3.7: Επίδραση εξωγενώς προστιθέμενης σπερμίνης (10 μ M) στο φωτοσύστημα II, όπως εκτιμάται από τις κινητικές OJIP του φθορισμού της χλωροφύλλης a. Control (κίτρινο), 5mM $CaCl_2$ (πράσινο), 10 μ M Spm (πορτοκαλί). Οι τιμές του φθορισμού παρουσιάζονται ομοιοποιημένες ως προς την τιμή του φθορισμού $F_{40\mu s}$.

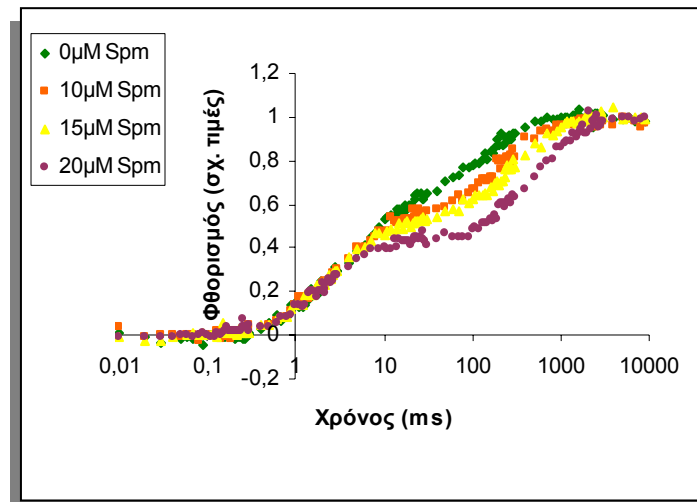
Φαίνεται πως η προσθήκη λίγων μικρομόλαρ σπερμίνης επηρεάζει την καμπύλη της κινητικής του επαγωγικού φθορισμού του φωτοσυστήματος II (BBY) σε τρία σημεία (**εικόνα 3.8**). Παρατηρείται μια μικρή αύξηση γύρω στα 0,1ms, μια μείωση στα 100ms και τέλος μια αύξηση στο μέγιστο φθορισμό (F_m). Η κινητική του φθορισμού είναι τόσο

πλούσια σε πληροφορία, που σε συνδυασμό με τη τεχνολογία και τη διακριτική ικανότητα των μηχανημάτων, μας παρέχεται ουσιαστικά η δυνατότητα να παρακολουθήσουμε τη πορεία των ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου, στην Q_A , έπειτα στη Q_B και τέλος στη δεξαμενή της πλαστοκινόνης. Θα μπορούσαμε λοιπόν, να υποστηρίξουμε πως η διαφορά στα 0,1ms οφείλεται στον πρωτογενή διαχωρισμό του φορτίου, στο P680, η διαφορά στα 100ms οφείλεται στην αναγωγή της Q_A ενώ η διαφορά στο μέγιστο φθορισμό στην αναγωγή της δεξαμενής της πλαστοκινόνης (PQ).



Εικόνα 3.8: Επίδραση εξωγενώς προστιθέμενης σπερμίνης (10μM) στο φωτοσύστημα II (BBY), όπως εκτιμάται από τη διαφορά της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού των BBY παρουσία 10μM Spm από τον αντίστοιχο μάρτυρα (BBY χωρίς προσθήκη σπερμίνης).

Από ότι φαίνεται μάλιστα η μείωση του φθορισμού στα 100ms είναι δοσοεξαρτώμενη, καθώς όσο η συγκέντρωση της σπερμίνης αυξάνεται, τόσο η συγκεκριμένη μείωση μεγαλώνει (εικόνα 3.9). Παρατηρείται επομένως, ότι στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις σπερμίνης η αύξηση του επαγωγικού φθορισμού καθυστερεί σε σχέση με τον μάρτυρα (0μM Spm).



Εικόνα 3.9: Επίδραση εξωγενώς προστιθέμενης σπερμίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων σε μεμβράνες BBY, όπως εκτιμάται από τις κινητικές OJIP του φθορισμού της χλωροφύλλης a. Control (πράσινο), 10μM Spm (πορτοκαλί), 15μM Spm (κίτρινο), 20μM Spm (μωβ). Οι τιμές του φθορισμού παρουσιάζονται διπλά ομαλοποιημένες τόσο ως προς την τιμή του φθορισμού F40μs, όσο και ως προς τον μέγιστο φθορισμό, Fm.

Ο χρόνος που απαιτείται για να φθάσει ο επαγωγικός φθορισμός στο μέγιστο του επίπεδο ποσοτικοποιείται από τον δείκτη $t_{F_{max}}$ (Strasser and Strasser, 1995). Η σπερμίνη, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, φαίνεται πως μπορεί να αυξήσει αυτόν τον χρόνο, $t_{F_{max}}$, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, πάνω από τα 1000μM, ο δείκτης αυτός μειώνεται απότομα (εικόνα 3.10).

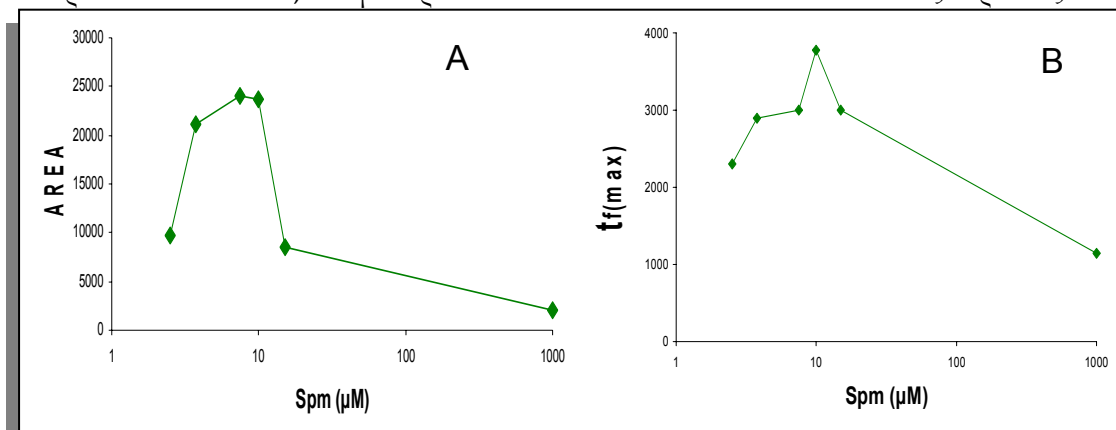
Όσο περισσότερα ηλεκτρόνια από την Q_A^- μεταφέρονται στη δεξαμενή της παστοκινόνης (PQ pool), τόσο περισσότερο ο φθορισμός παραμένει μικρότερος από τον μέγιστο φθορισμό (Fm) και επομένως μεγαλώνει το εμβαδόν της περιοχής που οριοθετείται από τη καμπύλη OJIP, τον άξονα του φθορισμού και την κάθετη σ' αυτόν ευθεία που περνά από το σημείο $F=F_m$. Το εμβαδόν της περιοχής αυτής ποσοτικοποιείται από τον δείκτη AREA και υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\text{Area} = \int_0^{t_{F_{max}}} (F_M - F_t) dt$$

Ο δείκτης αυτός εκφράζει την ενέργεια που χρειάζεται για να κλείσουν όλα τα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυστήματος II. Μικρότερη τιμή AREA έχουμε στη περίπτωση που κάθε Q_A ανάγεται μια μόνο φορά, όπως στη περίπτωση χρήσης DCMU (αναστολέας της ροής ηλεκτρονίων στην περιοχή του Q_B), ενώ όσο περισσότερους κύκλους αναγωγής της Q_A έχουμε τόσο μεγαλύτερη είναι η AREA. Στην εικόνα 3.10 παρατηρούμε πως η σπερμίνη, σε ένα συγκεκριμένο εύρος συγκέντρωσης, μπορεί να αυξήσει την AREA, γεγονός που δείχνει πως με κάποιο τρόπο έχει την ικανότητα να κρατά οξειδωμένη την Q_A .

Θα μπορούσε, πιθανότατα, να λειτουργεί ως πρωτονοφόρο, τραβώντας πρωτόνια, και επομένως ηλεκτρόνια, από κάποιο σημείο της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων καθυστερώντας κατά αυτόν τον τρόπο την πλήρη αναγωγή της Q_A . Έχει φανεί στο παρελθόν, πως απουσία τελικού ηλεκτρονιοδέκτη σε απομονωμένο φωτοσύστημα II, συγκεκριμένα πρωτονοφόρα, έχουν την ικανότητα να αποσβένουν τον επαγωγικό φθορισμό, κρατώντας οξειδωμένη την Q_A μέσω ενός μονοπατιού που εμπλέκει το $\text{cyt } b_{559}$ (McCaughey et al., 1987). Το κυτόχρωμα b_{559} έχει προταθεί ως ένας εναλλακτικός ηλεκτρονιοδέκτης, ο οποίος, εμποδίζει την πλήρη αναγωγή της PQ-pool του φωτοσυστήματος II και ως ένας βοηθητικός ηλεκτρονιοδότης για τις οξειδομένες χλωροφύλλες των κέντρων αντίδρασης (Poulson et al., 1995; Faller et al., 2001).

Στη δομή της σπερμίνης, με τις τέσσερις αμινομάδες και τον ευθύ ανθρακικό σκελετό, θα μπορούσε κάλλιστα να αποδοθεί αυτός ο ρόλος.



Εικόνα 3.10: Επίδραση εξωγενώς προστιθέμενης σπερμίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων σε απομονωμένο φωτοσύστημα II (BBY), όπως εκτιμάται από τους δείκτες AREA και t_{fmax} .

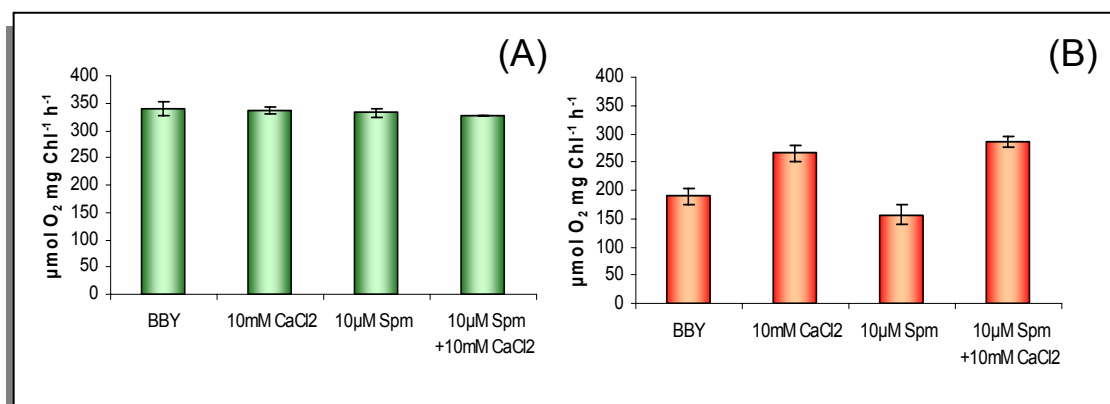
Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με αυτά των (Beauchemin et al., 2007b), που υποστηρίζουν πως η σπερμίνη προκαλεί καθυστέρηση της επανοξείδωσης της Q_A^- από τη Q_B . Βέβαια, στα δικά τους πειράματα, οι συγκεντρώσεις σπερμίνης που χρησιμοποιήθηκαν είναι αρκετά μεγάλες, μεγαλύτερες του 1mM, και επομένως η βλάβη στα εξωτερικά πεπτίδια του φωτοσυστήματος II είναι πολύ πιθανή. Είναι γνωστό, πως, απελευθέρωση Ca^{2+} από το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου αλλάζει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό της Q_A και εμποδίζει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από τη Q_A^- στη Q_B (Krieger et al., 1993; Tyystjarvi and Pospisil, 1999). Επίσης, έλλειψη των 17 και 23kDa αυξάνει τον μέσο χρόνο επανοξείδωσης της Q_A (Putrenko et al., 1999) ενώ ένα αποδιαταγμένο OEC επηρεάζει και το δυναμικό του $\text{cyt-}b_{559}$ (Losada et al., 2001). Συγκεντρώσεις σπερμίνης μόλις 10μM, όπως φαίνεται από τη πηκτή πολυακρυλαμίδης της εικόνας 3.4, δεν είναι ικανές να απελευθερώσουν τα εξωτερικά πεπτίδια του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου για το λόγο αυτό τα

αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα με αυτά των (Beauchemin et al., 2007b).

Στη συνέχεια, έγινε μια προσπάθεια να ανιχνευθούν οι παραπάνω επιδράσεις της σπερμίνης στον επαγωγικό φθορισμό μέσω πολαρογραφικών μετρήσεων. Μεμβράνες πλούσιες σε φωτοσύστημα II (BBY), σε συγκέντρωση 30 μg Chl/ml, επώαστηκαν για 1 λεπτό με 10 μM Spm ή/και 10mM CaCl₂ και στη συνέχεια μετρήθηκε πολαρογραφικά η φωτοσυνθετική έκλυση οξυγόνου. Ως δέκτης ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε το 2,5-dichlorobenzoquinone (2,5-DCBQ). Όπως παρατηρούμε και στην **εικόνα 3.11(A)**, τόσο η σπερμίνη όσο και το CaCl₂ δεν έχουν κάποια σημαντική επίδραση στην έκλυση οξυγόνου των μεμβρανών.

Ενώ στον επαγωγικό φθορισμό το σύνολο σχεδόν της πληροφορίας συγκεντρώνεται στο πρώτο δευτερόλεπτο, στην πολαρογραφία έχουμε steady state μετρήσεις λίγων λεπτών. Η διαφορά αυτή, σε συνδυασμό με την χρήση τεχνητού δέκτη ηλεκτρονίων ίσως καθιστά ανέφικτη την ανίχνευση των διαφορών, που παρατηρούνται στον επαγωγικό φθορισμό, με πολαρογραφικές μετρήσεις. Συγκεκριμένα η αύξηση της AREA και του t_{Fmax} , που παρατηρήθηκε προηγουμένως, έπειτα από τη προσθήκη 10 μM Spm, δεν είναι δυνατόν να παρατηρηθεί στις οξυγονομετρήσεις, καθώς το DCBQ τραβάει τα ηλεκτρόνια από τη Q_B και κρατάει την Q_A οξειδωμένη.

Το γεγονός πως, 10mM CaCl₂ δεν επηρεάζουν ουσιαστικά την έκλυση του οξυγόνου, επαληθεύει τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των πλούσιων σε φωτοσύστημα II μεμβρανών. Στην περίπτωση που το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου ήταν αποδιοργανωμένο, μη έχοντας κάποια από τα εξωτερικά του πεπτιδία, προσθήκη Ca²⁺ (Ghanotakis et al., 1984; Miyao and Murata, 1984) και Cl⁻ (Andersson et al., 1984; Critchley et al., 1984; Nakatani, 1984) θα μπορούσε να επαναφέρει το ρυθμό έκλυσης οξυγόνου στα αρχικά του επίπεδα.



Εικόνα 3.11: Επίδραση της σπερμίνης ή/και του CaCl₂ στο ρυθμό έκλυσης οξυγόνου μεμβρανών πλούσιων σε PS II (BBY), σε κανονική ιονική ισχύ (A) και σε χαμηλή ιονική ισχύ (B). Ως δέκτης ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε 450 μM 2,5-DCBQ. Οι μπάρες αντιστοιχούν στη σταθερή διακύμανση (n=3).

Με σκοπό να πραγματοποιηθεί μια πληρέστερη μελέτη της δράσης της σπερμίνης έγιναν προσπάθειες ώστε να ξεπλυθεί η ενδογενής σπερμίνη από τα BBY. Δύο διαδοχικές πλύσεις των μεμβρανών, σε διάλυμα με 1mM MES (pH=6), χωρίς κάποιο αλάτι, είχαν σαν στόχο να απελευθερωθεί η ελαφρώς προσδεμένη, στο φωτοσύστημα II, σπερμίνη.

Εξαιτίας της χαμηλής ιονικής ισχύος του διαλύματος, ο ρυθμός της έκλυσης οξυγόνου έχει μειωθεί για τις μεμβράνες BBY περίπου στο 60% σε σχέση με το control και ισοδυναμεί με περίπου $200 \mu\text{mol O}_2^* \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (εικόνα 3.11B). Προσθήκη 10mM CaCl_2 αυξάνουν την έκλυση του οξυγόνου αλλά δεν την επαναφέρουν στα αρχικά της επίπεδα. Ίσως, σε διαφορετική συγκέντρωση CaCl_2 οι μεμβράνες να μπορούσαν να επανέλθουν κοντά στο 100%.

Στις συγκεκριμένες συνθήκες, προσθήκη 10 μM σπερμίνης φαίνεται να επηρεάζουν ελαφρώς τη παραγωγή οξυγόνου, μειώνοντάς την. Παρόλο που θα περιμέναμε η προσθήκη της σπερμίνης, έπειτα από την σε κάποιο βαθμό έκπλυσή της, να ευνοήσει τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα εντούτοις, την μειώνει. Φαίνεται πως στο συγκεκριμένο ιοντικό περιβάλλον, η σπερμίνη γίνεται πιο δραστική και σε μικρές συγκεντρώσεις μπορεί να επηρεάσει τη παραγωγή οξυγόνου. Τέλος, προσθήκη σπερμίνης ταυτόχρονα με CaCl_2 δεν διαφέρει σημαντικά από τη προσθήκη σκέτου CaCl_2 .

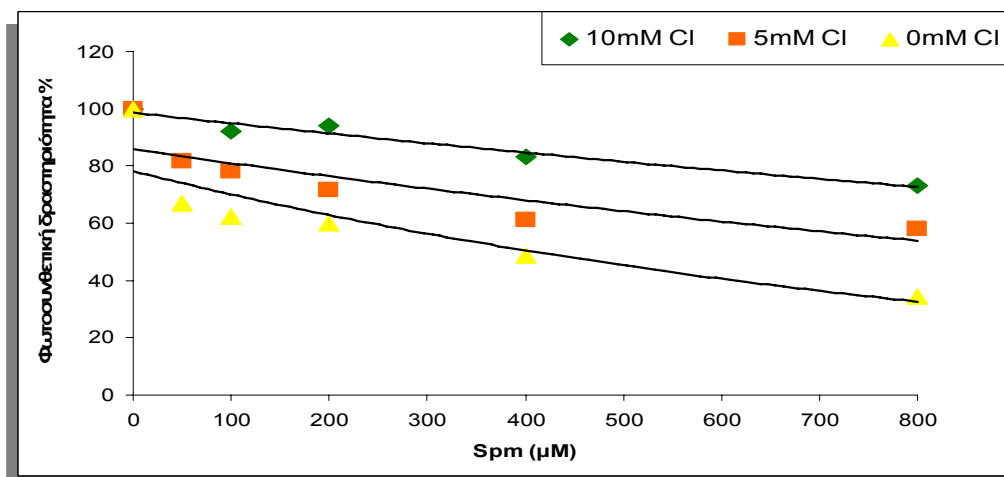
3.4. Επίδραση της σπερμίνης στο σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου του φωτοσυστήματος II (OEC)

Έχει διαπιστωθεί στο παρελθόν, ότι πολλές αμίνες (αμμωνία, μεθυλαμίνη, tert-βουτυλαμίνη, Tris), σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αναστέλλουν αντιστρεπτά την οξειδωση του νερού (Sharp and Yocum, 1981; Sandusky and Yocum, 1984). Η αποτελεσματικότητά τους ως αναστολείς είναι ανάλογη με το πόσο πυρηνόφιλα είναι (Sandusky and Yocum, 1986) και επομένως λειτουργούν σαν βάσεις κατά Lewis, αποσπώντας μόρια νερού ή άλλους προσδέτες από το σύμπλοκο του Mn (Ghanotukis et al., 1983).

Η πρόσδεση των αμινών, όπως έχει διαπιστωθεί από πολλές steady state μελέτες αναστολής, είναι καθαρά ανταγωνίσιμη με το Cl^- (Sandusky and Yocum, 1984, , 1986). Επειδή ακριβώς το Cl^- είναι ένας απαραίτητος συμπαράγοντας για την έκλυση του οξυγόνου, οι μελέτες αυτές υποστηρίζουν πως οι αμίνες απελευθερώνουν το Cl^- από μια θέση στο σύμπλοκο του Mn. Μάλιστα, η πρόσδεση των αμινών στη συγκεκριμένη θέση φαίνεται να πραγματοποιείται στην S_2 ή S_3 κατάσταση, όπως

προκύπτει από πειράματα με ηλεκτρονιοδέκτες διαφορετικής αποτελεσματικότητας (Sandusky and Yocum, 1986).

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεν θα μπορούσαμε να αγνοήσουμε τη σχέση της σπερμίνης με το Cl⁻. Για να μελετηθεί όμως η συγκεκριμένη σχέση έπρεπε αρχικά να ξεπλυθεί το χλώριο από το φωτόςστημα II, σύμφωνα με την μέθοδο των (Theg et al., 1984), και στη συνέχεια να μελετηθεί η αναστολή της έκλυσης οξυγόνου, που προκαλεί η σπερμίνη, σε διάφορες συγκεντρώσεις Cl⁻. Τα αποτελέσματα της εικόνας 3.12 φανερώνουν, πως η παρουσία χλωρίου μπορεί να μειώσει την αναστολή στην παραγωγή οξυγόνου, εξαιτίας της σπερμίνης, σε ικανοποιητικό βαθμό. Μάλιστα, απουσία χλωρίου στο διάλυμα, 800μM σπερμίνης προκαλούν πτώση της έκλυσης οξυγόνου στο 35%, σε σχέση με το control, ενώ στα 10mM χλωρίου η πτώση αυτή περιορίζεται στο 75%. Σαν control, αναφέρονται οι ρυθμοί έκλυσης οξυγόνου των μεμβρανών στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις χλωρίου, απουσία φυσικά εξωγενούς σπερμίνης.



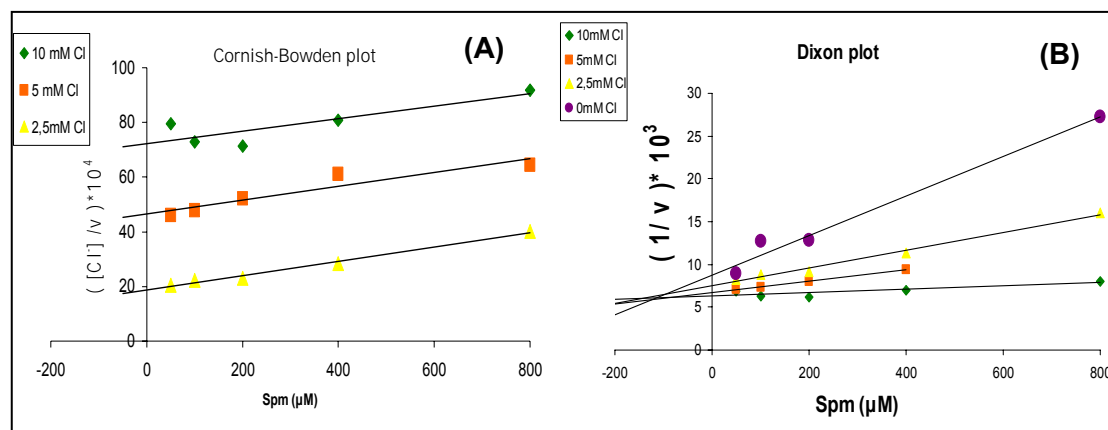
Εικόνα 3.12: Επίδραση του χλωρίου στην προκαλούμενη από τη σπερμίνη αναστολή της φωτοσυνθετικής έκλυσης οξυγόνου σε μεμβράνες BBY. Το διάλυμα περιέχει 0,4M σουκρόζη, 40mM HEPES pH=7,5 και τη συγκεκριμένη κάθε φορά συγκέντρωση Cl⁻ με τη μορφή του NaCl. Ως δέκτης ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε 450μM 2,5-DCBQ.

Το βασικό εργαλείο για να μελετηθεί η σχέση μεταξύ του χλωρίου και της αναστολής που προκαλούν οι αμίνες είναι οι κινητικές ενζύμων. Στην περίπτωση αυτή θεωρούμε ως ένα ένζυμο (E) το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου, το χλώριο ως έναν προσδεμένο συμπαραγοντα (Σ) και την αμίνη ως τον αναστολέα (Α). Τρεις απλές σχέσεις, μεταξύ του (Σ) και του (Α), μπορούν να ανιχνευτούν. Η πρόσδεση του (Α) να είναι ανταγωνιστική του (Σ), να μην είναι ανταγωνιστική ή τέλος να είναι μικτή δηλαδή ο αναστολέας να έχει δύο τρόπους δράσεις, έναν ανταγωνιστικό και έναν μη ανταγωνιστικό. Παρόλο, που υπάρχουν πολλοί ακόμα τρόποι

αναστολής, οι τρεις αυτές περιπτώσεις αποτελούν τις πιο κοινές και απλές περιπτώσεις.

Η τρόπος αναστολής ενός ενζυμικού συστήματος, μέσω των προηγούμενων τριών σχέσεων, μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί από τον συνδυασμό των διαγραμμάτων $1/v^1$ προς $[A]^2$ και $[\Sigma]^3/v$ προς $[A]$ (εικόνα 3.13). Η μέθοδος αυτή προτιμήθηκε του ευρέως χρησιμοποιούμενου διαγράμματος Lineweaver-Burk, καθώς στο τελευταίο είναι συχνά δύσκολο να διακριθεί ο μικτός τρόπος δράσης από τον ανταγωνιστικό. Επίσης, το σημείο που τέμνονται οι γραμμές στο διάγραμμα του Dixon αντιστοιχεί στη σταθερά διάστασης (K_i) του αναστολέα από το ένζυμο.

Τόσο από το διάγραμμα Cornish-Bowden, με τα σημεία να βρίσκονται πάνω σε παράλληλες γραμμές, όσο και από το διάγραμμα του Dixon, με τις ευθείες που περνούν από τα σημεία να τέμνονται στις αρνητικές τιμές του x αλλά στις θετικές του y , προκύπτει καθαρά ότι και η σπερμίνη, εκτός των άλλων αμινών, σαν αναστολέας ανταγωνίζεται με το χλώριο (εικόνα 3.13). Η μόνη από τις αμίνες που έχει μελετηθεί και έχει μικτό τρόπο δράσης είναι η NH_3 (Sandusky and Yocum, 1984). Για το λόγο αυτό υποστηρίχθηκε πως η αμμωνία προσδένεται και σε ένα δεύτερο σημείο στο σύμπλοκο του Mn, το οποίο στερεοχημικά εμποδίζει μεγαλύτερες αμίνες και δεν προσδένει χλώριο. Επειδή, μάλιστα η NH_3 είναι ισοηλεκτρονιακή με το νερό (Velthuys, 1975) υποστηρίχθηκε, πως η δεύτερη αυτή θέση είναι η θέση πρόσδεσης του H_2O (Sandusky and Yocum, 1986).



Εικόνα 3.13: Ανταγωνιστική πρόσδεση σπερμίνης και χλωρίου όπως απεικονίζεται από τα διαγράμματα Cornish-Bowden (A) και Dixon (B). Το διάλυμα περιέχει 0,4M σουκρόζη, 40mM HEPES pH=7,5 και τη συγκεκριμένη κάθε φορά συγκέντρωση Cl με τη μορφή του NaCl. Ως δέκτης ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε 450 μ M 2,5-DCBQ.

¹ V = ο ρυθμός της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδραση, στην περίπτωση μας ο ρυθμός έκλυσης οξυγόνου

² $[A]$ = η συγκέντρωση του αναστολέα, στην προκειμένη περίπτωση της σπερμίνης

³ $[\Sigma]$ = η συγκέντρωση του συμπαραγόνα, στην προκειμένη περίπτωση του χλωρίου

Στη περίπτωση που η σπερμίνη μπορεί και προσδένεται στο σύμπλοκο του Mn, θα αλλάζει τις μαγνητικές του ιδιότητες. Με τον τρόπο αυτό, μέσω της φασματοσκοπίας EPR, θα μπορούσε να ανιχνευτεί όχι μόνο η παρουσία της αλλά και σε ποια κατάσταση S προσδένεται. Η δυνατότητα αυτή στηρίζεται στο γεγονός πως, κατά την διέγερση με παλμούς φωτός μικρής διάρκειας το PS II μεταβαίνει περιοδικά στις διάφορες καταστάσεις S. Η μετάβαση αυτή χαρακτηρίζεται από περιοδική μεταβολή των ιδιοτήτων του, τις αποκαλούμενες ταλαντώσεις. Χαρακτηριστική είναι η περιοδική έκλυση O₂ με περίοδο 4 σε σχέση με τον αριθμό παλμών φωτός. Στις μετρήσεις με φασματοσκοπία EPR οι ταλαντώσεις εμφανίζονται σαν περιοδική μεταβολή των φασμάτων που χαρακτηρίζουν τις διάφορες καταστάσεις S. Οι ταλαντώσεις αυτές ποτέ δεν είναι τέλειες και αποσβένονται σταδιακά.

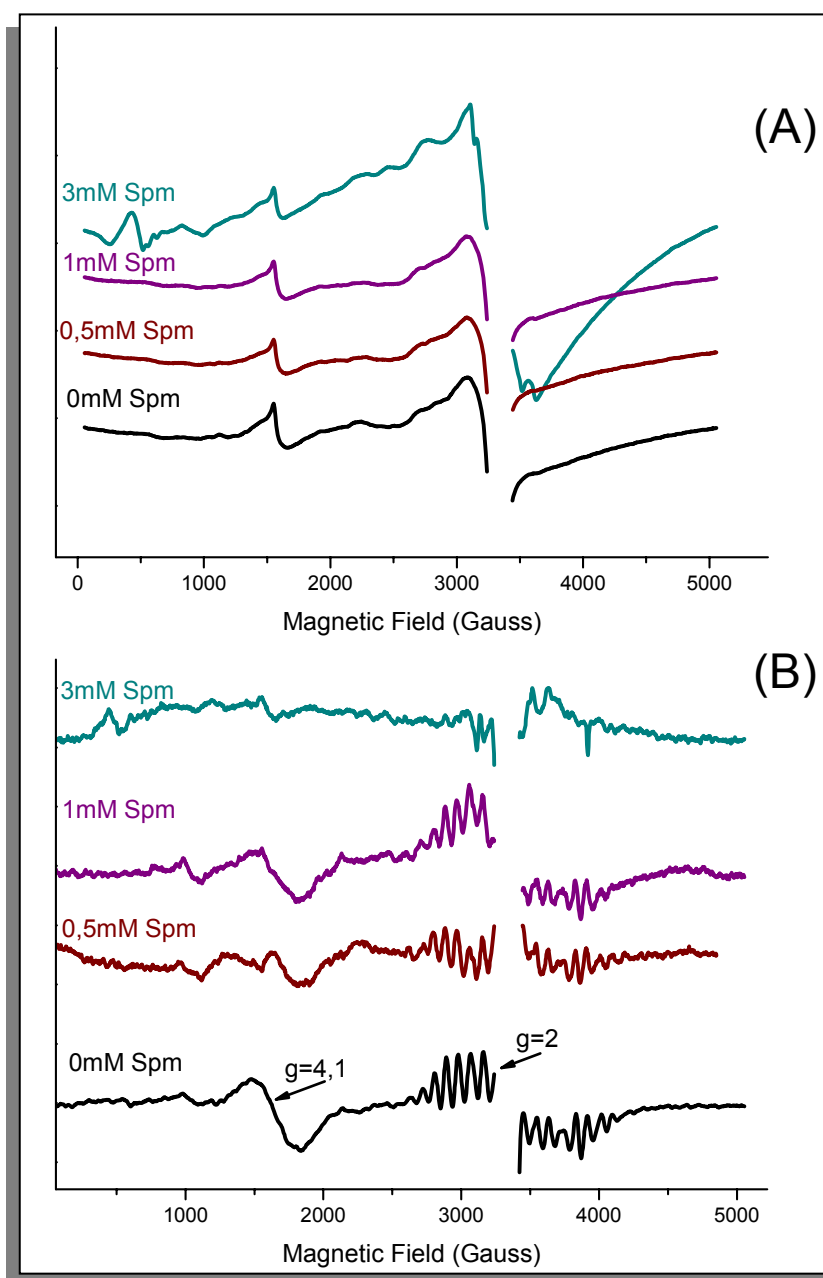
Όταν ένα δείγμα φωτίζεται για να προχωρήσει στην επόμενη S κατάσταση κάποια κέντρα δεν προχωρούν (misses), ενώ σε κάποια γίνονται διπλά βήματα (double hits). Διπλά βήματα γίνονται όταν ο φωτισμός γίνεται σε αρκετά υψηλή θερμοκρασία, ενώ απώλειες παρατηρούνται είτε σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες επειδή δεν γίνεται η μεταφορά του ηλεκτρονίου από την Q_A στην Q_B, είτε σε υψηλότερες θερμοκρασίες επειδή γίνεται επανασύνδεση με την Q_A πριν το ηλεκτρόνιο προλάβει να προχωρήσει στην Q_B. Στη συγκεκριμένη εργασία ο φωτισμός, για να μεταβούν τα κέντρα στην S₂ κατάσταση πραγματοποιήθηκε στους -20°C ενώ, τον παλμό ακολουθούσε σύντομη (30 - 60 s) επώαση στην ίδια θερμοκρασία για να ολοκληρωθεί η μεταφορά ηλεκτρονίου από την Q_A στην Q_B.

Οι PSII μεμβράνες BBY (σε συγκέντρωση χλωροφύλλης 0,5mg/ml) επωάστηκαν για 5min στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις σπερμίνης και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν, συμπυκνώθηκαν στα 5-7mg Chl/ml και τοποθετήθηκαν στα EPR tubes. Σαν τεχνητός δέκτης ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε 1mM DCBQ. Σε όλα τα δείγματα προηγείται ένας παλμός σε θερμοκρασία ~-5 °C και επώαση για μισή ώρα στους 0 °C πριν προστεθεί η εξωτερική κινόνη (1mM DCBQ), για να συγχρονιστούν όλα τα κέντρα στην S₁.

Στην κατάσταση S₁ φαίνεται πως η σπερμίνη, στις συγκεντρώσεις των 0,5 και 1mM, δεν έχει κάποια επίδραση στις μαγνητικές ιδιότητες του συμπλόκου του Mn, καθώς τα φάσματα είναι ουσιαστικά όμοια μ' αυτό του control (εικόνα 3.14A). Όμως, στη συγκέντρωση των 3mM παρατηρείται σημαντική αλλοίωση του φάσματος της S₁. Κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες, φαίνεται πως 3mM σπερμίνης προκαλούν αποδιοργάνωση του συμπλόκου έκλυσης οξυγόνου, μέσω απελευθέρωσης των εξωτερικών του πεπτιδίων, και απελευθέρωση των Mn ως ελεύθερα ιόντα.

Με τον πρώτο παλμό, στους -20°C , φαίνεται το πολυγραμμικό σήμα του Mn με $g=2$ που προέρχεται από κατάσταση $S=1/2$ (Dismukes and Siderer, 1981) και το σήμα με $g=4,1$ ($S \geq 3/2$) (Britt, 1996), που αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικούς πληθυσμούς κέντρων που βρίσκονται στην S_2 (εικόνα 3.14B). Και στην κατάσταση S_2 δεν παρατηρείται κάποια επίδραση της σπερμίνης στις συγκεντρώσεις των 0,5 και 1mM. Κάποιες μικροαλλαγές στη μορφή του φάσματος σε σχέση με το control, οφείλονται πιθανότατα σε θόρυβο παρά σε κάποια επίδραση της πολυαμίνης.

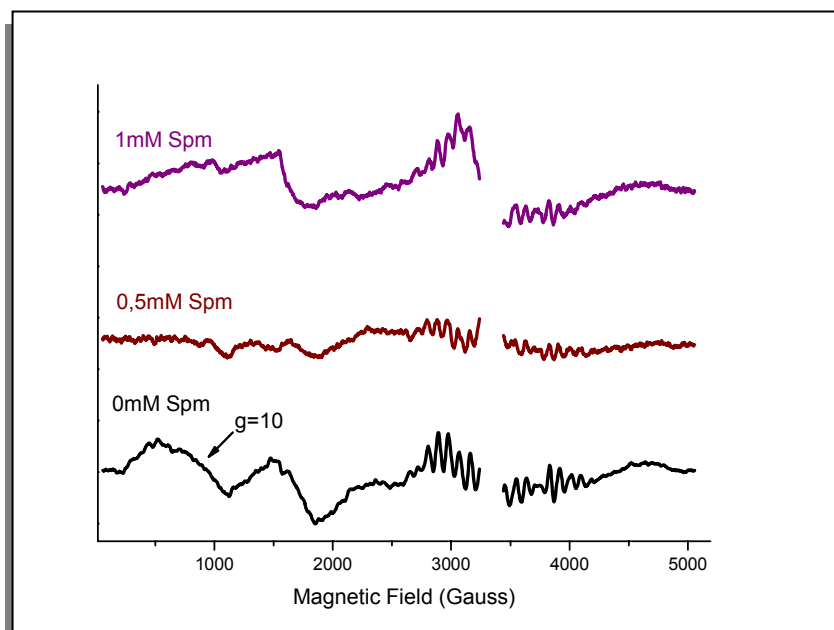
Αντίθετα, στη συγκέντρωση των 3mM σπερμίνης, η αποδιοργάνωση των συμπλόκων είναι τόσο μεγάλη, όπως άλλωστε παρατηρείται και από την κατάσταση S_1 , που αδυνατούν να μεταβούν στην κατάσταση S_2 . Χαρακτηριστική είναι τόσο η απουσία του πολυγραμμικού σήματος με $g=2$ όσο και αυτού με $g=4,1$. Γενικότερα, απουσία της 33kDa εξωτερικής πρωτεΐνης, το σήμα του EPR για τη κατάσταση S_2 μπορεί πολύ εύκολα να χαθεί (Seidler and Rutherford, 1996), ενώ σε άλλες μελέτες για να παρατηρηθεί το πολυγραμμικό σήμα έπρεπε να χρησιμοποιηθούν υψηλές συγκεντρώσεις Cl^- ίσες με 200mM (Mayfield et al., 1987; Styring et al., 1987).



Εικόνα 3.14: Επίδραση τριών συγκεντρώσεων σπερμίνης στο φωτοσύστημα II (BBY) όπως εκτιμάται από τα φάσματα του EPR για τις καταστάσεις S1 (A) και S2 (B). Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 50 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp, θερμοκρασία: 10 K. Ως τεχνητός δέκτης ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε 1mM DCBQ.

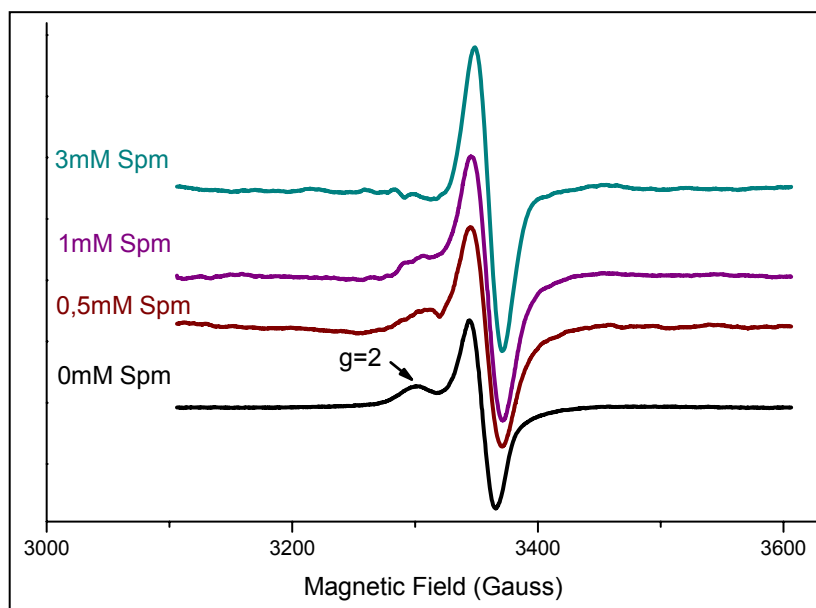
Με τον δεύτερο παλμό, στους -20°C , εμφανίζεται το σήμα της S_3 με $g=10$ (Ioannidis and Petrouleas, 2000), ενώ μειώνονται αντίστοιχα τα σήματα της S_2 (εικόνα 3.15, control). Παρόλα αυτά, στα 0,5mM σπερμίνης αν και έχουμε μείωση των σημάτων της S_2 , δεν έχουμε καμία εμφάνιση του χαρακτηριστικού σήματος της S_3 . Μάλιστα στη συγκέντρωση του 1mM σπερμίνης εκτός του ότι δεν έχουμε εμφάνιση του σήματος $g=10$, δεν έχουμε και μείωση των σημάτων της S_2 . Ίσως επομένως, η σπερμίνη να

επίδρα στην S_2 και να εμποδίζει τα κέντρα να μεταβούν σε επόμενες καταστάσεις. Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί πως παρόλο που υπάρχουν οι ενδείξεις, χρειάζεται να πραγματοποιηθεί συστηματικότερη μελέτη ώστε να μπορέσει να αποδειχθεί οποιαδήποτε επίδραση της σπερμίνης στις S καταστάσεις του συμπλόκου του Mn.



Εικόνα 3.15: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης στο φωτοσύστημα II (BBY) όπως εκτιμάται από τα φάσματα του EPR για την κατάσταση S_3 . Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 50 mW, σταθερά χρόνου: 300 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp, θερμοκρασία: 10 K. Ως τεχνητός δέκτης ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε 1mM DCBQ.

Η τυροσίνη Z δίνει φάσμα με $g=2$ μετά από φωτισμό. Το φάσμα της σε θερμοκρασίες υγρού ηλίου είναι φαρυδύ και στενεύει με την αύξηση της θερμοκρασίας (Zahariou et al., 2007) (εικόνα 3.16, control). Στη συγκεκριμένη εργασία, δόθηκαν 3 παλμοί φωτός σε θερμοκρασία υγρού ηλίου. Σε αυτήν την θερμοκρασία μπορεί να δημιουργηθεί η ρίζα της τυροσίνης Z αλλά δεν υπάρχει αρκετή ενέργεια για να γίνει η μετάβαση από την S_1 στην S_2 . Όπως διακρίνεται και από την εικόνα 3.16 τα φάσματα των 0,5 και 1mM σπερμίνης, αν εξαιρεθεί ο θόρυβος, δεν διαφέρουν σημαντικά από αυτά του control. Στη περίπτωση των 3mM σπερμίνης, όπως προειπώθηκε, λόγω της αποδιοργάνωσης των συμπλόκων δεν είναι δυνατόν να εμφανιστεί το σήμα της S_1Y_z .



Εικόνα 3.16: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων σπερμίνης στο φωτοσύστημα II (BBY) όπως εκτιμάται από τα φάσματα του EPR για ρίζα της τυροσίνης Z στην κατάσταση S_1 . Συνθήκες EPR: ισχύς μικροκυμάτων: 125 mW, πλάτος διαμόρφωσης: 25 Gpp, σταθερά χρόνου: 3 ms, χρόνος σάρωσης: 200 s

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, μέσω φασματοσκοπίας EPR, για την επίδραση των αμινών στην S_2 κατάσταση, έχουν δείξει δύο θέσεις συντονισμού για την NH_3 κοντά ή πάνω στο σύμπλοκο του Mn. Η μία από αυτές είναι συγκεκριμένη για την NH_3 (Beck and Brudvig, 1986b) και την μεθυλαμίνη (Beck and Brudvig, 1988). Ο συντονισμός πραγματοποιείται στην S_1 κατάσταση και με μεγαλύτερη συγγένεια στην S_2 (Lindberg et al., 1993), ενώ σταθεροποιεί το σήμα της S_2 με $g=4,1$ σε σχέση με το πολυγραμμικό σήμα (Beck and Brudvig, 1986b; Lindberg et al., 1993). Επειδή, αύξηση της συγκέντρωσης του χλωρίου μειώνει τη πρόσδεση της αμμωνίας και της μεθυλαμίνης στη συγκεκριμένη θέση, αυτή έχει ταυτιστεί με τη θέση του Cl που είχε εντοπιστεί από τις steady state μελέτες αναστολής (Sandusky and Yocum, 1984, , 1986).

Βέβαια, υπάρχουν αρκετές δυσκολίες στο να ταυτιστεί η θέση του Cl που έχει εντοπισθεί με το EPR με αυτήν από τις μελέτες αναστολής. Πρώτον, πολύ περισσότερες αμίνες ανταγωνίζονται με το Cl στις steady state μελέτες, μεταξύ αυτών και η σπερμίνη όπως είδαμε, σε σχέση με την EPR φασματοσκοπία. Δεύτερον, η NH_3 μπορεί να σταθεροποιήσει το $g=4,1$ σήμα σε συγκεντρώσεις πολύ μικρότερες από αυτές που απαιτούνται για την αναστολή της έκλυσης οξυγόνου.

Η δεύτερη θέση που έχει εντοπισθεί μέσω φασματοσκοπίας EPR είναι ειδική για την αμμωνία και δεν προσδένει χλώριο (Beck and Brudvig, 1986a) και για το λόγο αυτόν έχει ταυτιστεί με την ειδική για την NH_3 θέση που εντοπίστηκε με steady state μελέτες αναστολής. Η πρόσδεση της αμμωνίας πραγματοποιείται στην S_2 κατάσταση και έχει σαν αποτέλεσμα

το πολυγραμμικό σήμα του EPR να έχει περισσότερες γραμμές, αλλά και μικρότερη απόσταση μεταξύ αυτών (67,5 Gauss) σε σχέση το ατροποποίητο σήμα (87,5 Gauss). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα αλλά και με πειράματα με $^{15}\text{NH}_3$ και $^{14}\text{NH}_3$ αποδείχθηκε πως ένα παράγωγο της αμμωνίας προσδένεται απευθείας στο σύμπλοκο του Mn στην S_2 κατάσταση.

Μπορεί μέχρι στιγμής, από όλες τις αμίνες που έχουν μελετηθεί, να έχει εντοπισθεί συντονισμός με το σύμπλοκο του Mn μόνο της αμμωνίας και της μεθυλαμίνης, ωστόσο η σπερμίνη παρουσιάζει κάποιες διαφορές από τις υπόλοιπες αμίνες. Πρώτον, όσον αφορά τη σπερμίνη πρόκειται για μια αμίνη η οποία βρίσκεται στους χλωροπλάστες και έχει ένα φυσιολογικό ρόλο στο κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II (Kotzabasis et al., 1993). Δεύτερον, είναι ένα μόριο με ευθεία ανθρακική αλυσίδα, που σε κάθετη διατομή είναι παρόμοιο στερεοχημικά με την NH_3 . Έτσι, αν δεν μπορούν να προσδεθούν άλλες αμίνες με το σύμπλοκο του Mn, και επομένως να ανιχνευθούν μέσω της φασματοσκοπίας EPR, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα για τη σπερμίνη. Τρίτον, η σπερμίνη είναι αρκετά δραστικότερη άλλων αμινών. Λίγα μόνο μιλιμόλαρ είναι αρκετά για να αποδιατάξουν το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (OEC) την ώρα που για να τροποποιηθεί το πολυγραμμικό σήμα της S_2 από την αμμωνία χρειάζονται περίπου 100mM NH_3 . Για τους παραπάνω λόγους θεωρείται σημαντικό να συνεχιστούν τα πειράματα που αφορούν το ρόλο της σπερμίνης στο φωτοσύστημα II, μέσω φασματοσκοπίας EPR, και ευελπιστούμε πως θα έχουμε ξεκάθαρες απαντήσεις στο άμεσο μέλλον.

4. Συμπεράσματα

Παρότι η σπερμίνη είναι η κύρια πολυαμίνη που έχει βρεθεί στο κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II (Kotzabasis et al., 1993), δεν έχει προταθεί μέχρι στιγμής ένας ικανοποιητικός μηχανισμός δράσης της. Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να κατανοήσουμε πως η σπερμίνη επηρεάζει άμεσα τη φωτοσυνθετική διαδικασία με απώτερο στόχο να βρεθεί ο ρόλος της στο φωτοσύστημα II. Τα κεντρικά συμπεράσματα της παρούσας εργασίας συνοψίζονται στα παρακάτω:

- ◆ Υψηλές συγκεντρώσεις σπερμίνης, πάνω από 100μM, προκαλούν σε μεμβράνες πλούσιες σε φωτοσύστημα II (~50μg Chl /ml) απελευθέρωση των τριών εξωτερικών πολυπεπτιδίων (17,23 και 33kDa). Η απελευθέρωση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τόσο τη μείωση του μέγιστου επαγωγικού φθορισμού όσο και τη μείωση της έκλυσης του οξυγόνου.

- ◆ Σε χαμηλές συγκεντρώσεις σπερμίνης (~10μM) έχει παρατηρηθεί μικρή αύξηση του επαγωγικού φθορισμού. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση του χρόνου που απαιτείται για να φθάσει ο φθορισμός στο μέγιστο του (F_{max}), γεγονός που δείχνει ότι με κάποιο τρόπο η σπερμίνη κρατά την Q_A οξειδωμένη, λειτουργώντας πιθανότατα ως πρωτονοφόρο.

- ◆ Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων σπερμίνης στην παραγωγή οξυγόνου, μέσω πολαρογραφικών μετρήσεων, δεν εντοπίστηκε. Εξαιρέση αποτελούν τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλή ιονική ισχύ και στα οποία 10μM σπερμίνης φάνηκε να μειώνουν ελαφρά τη παραγωγή οξυγόνου.

- ◆ Η σπερμίνη, όπως και πολλές αμίνες που έχουν μελετηθεί στο παρελθόν, σε steady state πειράματα αναστολής του φωτοσυστήματος II, ανταγωνίζεται με το χλώριο για μια θέση πρόσδεσης. Μάλιστα η σταθερά διάστασης (K_i) της πολυαμίνης από το ένζυμο, το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (OEC), υπολογίστηκε σε περίπου 130μM.

- ◆ Μέσω της φασματοσκοπίας EPR πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια για την ανίχνευση της παρουσίας της σπερμίνης στο σύμπλοκο του Mn. Φάνηκε πως παρουσία σπερμίνης εμποδίζεται η μετάβαση στην S_3 κατάσταση, πιθανότατα λόγω πρόσδεσης της πολυαμίνης στην S_2 . Ωστόσο, δεν είναι ασφαλής η εξαγωγή συμπερασμάτων από ένα μόνο πείραμα καθώς χρειάζεται να πραγματοποιηθεί συστηματικότερη μελέτη. Ευελπιστούμε πως η συγκεκριμένη τεχνική, σε συνδυασμό και με τις υπόλοιπες που έχουν χρησιμοποιηθεί, θα μπορέσει να μας δώσει ορισμένες απαντήσεις για τον φυσιολογικό ρόλο της σπερμίνης στο PSII και για το λόγο αυτό, αναμένουμε με ιδιαίτερο ενδιαφέρον τα αποτελέσματα μελλοντικών πειραμάτων.

5. Βιβλιογραφία

- Abramowicz, D.A., and Dismukes, G.C.** (1984). Manganese proteins isolated from spinach thylakoid membranes and their role in O₂ evolution. II. A binuclear manganese-containing 34 kilodalton protein, a probable component of the water dehydrogenase enzyme. *Biochim Biophys Acta* **765**, 318-328.
- Alabadi, D., and Carbonell, J.** (1998). Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiology* **118**, 323-328.
- Andersson, B., Critchley, C., Ryrie, I.J., Jansson, C., Larsson, C., and Anderson, J.M.** (1984). Modification of the Chloride Requirement for Photosynthetic O₂ Evolution - the Role of the 23 Kda Polypeptide. *Febs Letters* **168**, 113-117.
- Andreadakis, A., and Kotzabasis, K.** (1996). Changes in the biosynthesis and catabolism of polyamines in isolated plastids during chloroplast photodevelopment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **33**, 163-170.
- Babcock, G., T.** (1995). The oxygen-evolving complex in photosystem II as a metallo-radical enzyme. In "Photosynthesis: from Light to Biosphere", ed. by Mathis, P. **Vol II**, 209-215.
- Bagni, N., and Serafini-Fracassini, D.** (1973). The role of polyamines as growth factors in higher plants and their mechanism of action. In *Plant growth substances*. Hirikawa Publ. Co. Tokyo, 1205-1217.
- Balsera, M., Arellano, J.B., Revuelta, J.L., de las Rivas, J., and Hermoso, J.A.** (2005). The 1.49 Å resolution crystal structure of PsbQ from photosystem II of *Spinacia oleracea* reveals a PPII structure in the N-terminal region. *J Mol Biol* **350**, 1051-1060.
- Barry, B.A., and Babcock, G.T.** (1987). Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7099-7103.
- Beauchemin, R., Harnois, J., Rouillon, R., Tajmir-Riahi, H.A., and Carpentier, R.** (2007a). Interaction of polyamines with proteins of photosystem II: Cation binding and photosynthetic oxygen evolution. *Journal of Molecular Structure* **833**, 169-174.
- Beauchemin, R., Gauthier, A., Harnois, J., Boisvert, S., Govindachary, S., and Carpentier, R.** (2007b). Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: Disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from TyrZ to P680⁺ and the quinone acceptors QA- to QB. *Biochim Biophys Acta* **1767**, 905-912.
- Beck, W.F., and Brudvig, G.W.** (1986a). Binding of Amines to the O₂-Evolving Center of Photosystem-Ii. *Biochemistry* **25**, 6479-6486.
- Beck, W.F., and Brudvig, G.W.** (1986b). Effects of Amine Binding on the Manganese Site of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem-Ii. *Biophysical Journal* **49**, A485-a485.
- Beck, W.F., and Brudvig, G.W.** (1988). Resolution of the Paradox of Ammonia and Hydroxylamine as Substrate-Analogs for the Water-Oxidation Reaction Catalyzed by Photosystem-Ii. *Journal of the American Chemical Society* **110**, 1517-1523.

- Bernier, M., and Carpentier, R.** (1995). The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II. *FEBS Lett* **360**, 251-254.
- Berthold, D.A., Babcock, G.T., and Yocum, C.F.** (1981). A Highly Resolved, Oxygen-Evolving Photosystem-II Preparation from Spinach Thylakoid Membranes - Electron-Paramagnetic-Res and Electron-Transport Properties. *Febs Letters* **134**, 231-234.
- Besford, R.T., Richardson, C.M., Campos, J.L., and Tiburcio, A.F.** (1993). Effect of Polyamines on Stabilization of Molecular-Complexes in Thylakoid Membranes of Osmotically Stressed Oat Leaves. *Planta* **189**, 201-206.
- Biesiadka, J., Loll, B., Kern, J., Irrgang, K., and Zouni, A.** (2004). Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3,2 Å resolution: a closer look at the Mn-cluster. *Biochimica et Biophysica Acta* **6**, 4733-4736.
- Boisvert, L., Beaumier, F., and Spino, C.** (2007). Evidence for a concerted [4 + 1]-cycloaddition between electron-rich carbenes and electron-deficient dienes. *Org Lett* **9**, 5361-5363.
- Britt, R., D.** (1996). Oxygen evolution. In *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (ed. D. R. Ort & C. F. Yocum), 137-164.
- Chapel, M., Teissie, J., and Alibert, G.** (1984). Electrofusion of Spermine-Treated Plant-Protoplasts. *Febs Letters* **173**, 331-336.
- Critchley, C., Andersson, B., Ryrie, I.J., and Anderson, J.M.** (1984). Studies on Oxygen Evolution of inside-out Thylakoid Vesicles from Mangroves - Chloride Requirement, Ph-Dependence and Polypeptide Composition. *Biochimica Et Biophysica Acta* **767**, 532-539.
- Dau, H., and Haumann, M.** (2007). Time-resolved X-ray spectroscopy leads to an extension of the classical S-state cycle model of photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth Res* **92**, 327-343.
- Debus, R.J., Barry, B.A., Babcock, G.T., and McIntosh, L.** (1988a). Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 427-430.
- Debus, R.J., Barry, B.A., Sithole, I., Babcock, G.T., and McIntosh, L.** (1988b). Directed mutagenesis indicates that the donor to P+680 in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry* **27**, 9071-9074.
- Delduca, S., Tidu, V., Bassi, R., Esposito, C., and Serafini-Fracassini, D.** (1994). Identification of Chlorophyll-a/B Proteins as Substrates of Transglutaminase Activity in Isolated-Chloroplasts of *Helianthus-Tuberosus* L. *Planta* **193**, 283-289.
- Demetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis, E., and Kotzabasis, K.** (2007). Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus--the protective role of polyamines. *Biochim Biophys Acta* **1767**, 272-280.
- Dismukes, G.C., and Siderer, Y.** (1981). Intermediates of a Polynuclear Manganese Center Involved in Photosynthetic Oxidation of Water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **78**, 274-278.
- Dornemann, D., Navakoudis, E., and Kotzabasis, K.** (1996). Changes in the polyamine content of plastidal membranes in light- and dark-grown wildtype and pigment mutants of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* and their possible role in chloroplast photodevelopment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **36**, 293-299.

- Faller, P., Pascal, A., and Rutherford, A.W.** (2001). Beta-carotene redox reactions in photosystem II: Electron transfer pathway. *Biochemistry* **40**, 6431-6440.
- Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S.** (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* **303**, 1831-1838.
- Flink, I., and Pettijohn, D.E.** (1975). Polyamines Stabilize DNA Folds. *Nature* **253**, 62-63.
- Ford, R.C., and Evans, M.C.W.** (1983). Isolation of a Photosystem-2 Preparation from Higher-Plants with Highly Enriched Oxygen Evolution Activity. *Febs Letters* **160**, 159-164.
- Galston, A.W.** (1983). Polyamines as Modulators of Plant Development. *Bioscience* **33**, 382-388.
- Ghanotakis, D.F., Topper, J.N., and Yocum, C.F.** (1984). Structural Organization of the Oxidizing Side of Photosystem-Ii - Exogenous Reductants Reduce and Destroy the Mn-Complex in Photosystems Ii Membranes Depleted of the 17 and 23 Kda. *Biochimica Et Biophysica Acta* **767**, 524-531.
- Ghanotakis, D.F., O'Malley, P.J., and Babcock, G.T.** (1983). *The Oxygen Evolving System of Green Plant Photosynthesis* (Y. Inoue et al eds.). Academic Press, Tokyo, 91-101.
- Ghirardi, M., Lutton, T., and Seibert, M.** (1996). Interactions between diphenylcarbazide, zinc, cobalt, and manganese on the oxidizing side of photosystem II. *BIOCHEMISTRY* **35**, 1820-1828.
- Goussias, C., Boussac, A., and Rutherford, A.W.** (2002). Photosystem II and photosynthetic oxidation of water: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **357**, 1369-1381.
- Green, B.R., and Durnford, D.G.** (1996). The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 685-714.
- Hamdani, S., and Carpentier, R.** (2009). Interaction of methylamine with extrinsic and intrinsic subunits of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 1223-1229.
- Hamdani, S., Yaakoubi, H., and Carpentier, R.** (2011). Polyamines interaction with thylakoid proteins during stress. *J Photochem Photobiol B* **104**, 314-319.
- Hankamer, B., Morris, E., Nield, J., Gerle, C., and Barber, J.** (2001a). Three-dimensional structure of the photosystem II core dimer of higher plants determined by electron microscopy. *J Struct Biol* **135**, 262-269.
- Hankamer, B., Morris, E., Nield, J., Carne, A., and Barber, J.** (2001b). Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. *FEBS Lett* **504**, 142-151.
- Icekson, I., and Apelbaum, A.** (1987). Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiol* **84**, 972-974.
- Ioannidis.** (2006). A comparative study of light dependent and light independent biogenesis and functional assembly of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines. Ph D thesis
- Ioannidis, N., and Petrouleas, V.** (2000). Electron paramagnetic resonance signals from the S(3) state of the oxygen-evolving complex. A broadened radical signal induced by low-temperature near-infrared light illumination. *Biochemistry* **39**, 5246-5254.

- Ioannidis, N., Nugent, J.H., and Petrouleas, V.** (2002). Intermediates of the S(3) state of the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Biochemistry* **41**, 9589-9600.
- Ioannidis, N.E., and Kotzabasis, K.** (2007). Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane in vivo and in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1767**, 1372-1382.
- Kakkar, R.K., Rai, V.K., and Nagar, P.K.** (1998). Polyamine uptake and translocation in plants. *Biologia Plantarum* **40**, 481-491.
- Kautsky, H., and Hirsch, A.** (1931). Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* **19**, 964-1931.
- Kern, J., and Renger, G.** (2007). Photosystem II: Structure and mechanism of the water : plastoquinone oxidoreductase. *Photosynthesis Research* **94**, 183-202.
- Kohoutova, J., Kuta Smatanova, I., Brynda, J., Lapkouski, M., Revuelta, J.L., Arellano, J.B., and Ettrich, R.** (2009). Crystallization and preliminary crystallographic characterization of the extrinsic PsbP protein of photosystem II from *Spinacia oleracea*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65**, 111-115.
- Kotzabasis, K., Fotinou, C., Roubelakisangelakis, K.A., and Ghanotakis, D.** (1993). Polyamines in the Photosynthetic Apparatus - Photosystem-II Highly Resolved Subcomplexes Are Enriched in Spermine. *Photosynthesis Research* **38**, 83-88.
- Kotzabasis, K., Strasser, B., Navakoudis, E., Senger, H., and Dornemann, D.** (1999). The regulatory role of polyamines in structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **50**, 45-52.
- Kramer, G.F., Krizek, D.T., and Mirecki, R.M.** (1992). Influence of Photosynthetically Active Radiation and Spectral Quality on Uv-B-Induced Polyamine Accumulation in Soybean. *Phytochemistry* **31**, 1119-1125.
- Krieger, A., Weis, E., and Demeter, S.** (1993). Low-Ph-Induced Ca²⁺ Ion Release in the Water-Splitting System Is Accompanied by a Shift in the Midpoint Redox Potential of the Primary Quinone Acceptor-Q(a). *Biochimica Et Biophysica Acta* **1144**, 411-418.
- Laemml, U.K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-&.
- Lazar, D.** (1999). Chlorophyll a fluorescence induction1. *Biochim Biophys Acta* **1412**, 1-28.
- Lindberg, K., Vanngard, T., and Andreasson, L.E.** (1993). Studies of the Slowly Exchanging Chloride in Photosystem-II of Higher-Plants. *Photosynthesis Research* **38**, 401-408.
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., and Biesiadka, J.** (2005). Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* **438**, 1040-1044.
- Losada, M., Roncel, M., and Ortega, J.M.** (2001). Factors determining the special redox properties of photosynthetic cytochrome b559. *European Journal of Biochemistry* **268**, 4961-4968.
- Mayers, S.R., Dubbs, J.M., Vass, I., Hideg, E., Nagy, L., and Barber, J.** (1993). Further characterization of the psbH locus of *Synechocystis* sp. PCC 6803: inactivation of psbH impairs QA to QB electron transport in photosystem 2. *Biochemistry* **32**, 1454-1465.

- Mayfield, S.P., Bennoun, P., and Rochaix, J.D.** (1987). Expression of the Nuclear Encoded Oe1 Protein Is Required for Oxygen Evolution and Stability of Photosystem-Ii Particles in *Chlamydomonas-Reinhardtii*. *Embo Journal* **6**, 313-318.
- McCauley, S.W., Melis, A., Tang, G.M.S., and Arnon, D.I.** (1987). Protonophores Induce Plastoquinol Oxidation and Quench Chloroplast Fluorescence - Evidence for a Cyclic, Proton-Conducting Pathway in Oxygenic Photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8424-8428.
- McEvoy, J.P., and Brudvig, G.W.** (2006). Water-splitting chemistry of photosystem II. *Chem Rev* **106**, 4455-4483.
- Metha, R.A., S., G.W., S., and A.K, M.** (1991). Translational modification of an 18 kDa polypeptide by spermine in rice cell suspension cultures. *Plant Physiol* **95**, 1294-1297.
- Miyao, M., and Murata, N.** (1984). Effect of Urea on Photosystem-Ii Particles - Evidence for an Essential Role of the 33 Kilodalton Polypeptide in Photosynthetic Oxygen Evolution. *Biochimica Et Biophysica Acta* **765**, 253-257.
- Murray, J.W., and Barber, J.** (2007). Structural characteristics of channels and pathways in photosystem II including the identification of an oxygen channel. *J Struct Biol* **159**, 228-237.
- Nakatani, H.Y.** (1984). Photosynthetic oxygen evolution does not require the participation of polypeptides of 16 and 24 kilodaltons. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 299-304.
- Navakoudis, E., Lutz, C., Langebartels, C., Lutz-Meindl, U., and Kotzabasis, K.** (2003). Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochim Biophys Acta* **1621**, 160-169.
- Nelson, N., and Yocum, C.F.** (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 521-565.
- Neubauer, C., and Schreiber, U.** (1987). The Polyphasic Rise of Chlorophyll Fluorescence Upon Onset of Strong Continuous Illumination .1. Saturation Characteristics and Partial Control by the Photosystem-Ii Acceptor Side. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **42**, 1246-1254.
- Nield, J., and Barber, J.** (2006). Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 353-361.
- Paschalidis, K.A., and Roubelakis-Angelakis, K.A.** (2005). Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. Correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiol* **138**, 142-152.
- Pospisil, P., and Dau, H.** (2000). Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth Res* **65**, 41-52.
- Poulson, M., Samson, G., and Whitmarsh, J.** (1995). Evidence That Cytochrome B(559) Protects Photosystem-Ii against Photoinhibition. *Biochemistry* **34**, 10932-10938.
- Primikiriou, N.I., and Roubelakis-Angelakis, K.A.** (2001). Indications for post-translational regulation of *Vitis vinifera* L. arginine decarboxylase. *Plant Molecular Biology* **45**, 669-678.

- Putrenko, I.I., Vasil'ev, S., and Bruce, D.** (1999). Modulation of flash-induced photosystem II fluorescence by events occurring at the water oxidizing complex. *Biochemistry* **38**, 10632-10641.
- Rothschild, L.J.** (2008). The evolution of photosynthesis...again? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**, 2787-2801.
- Sandusky, P.O., and Yocum, C.F.** (1984). The Chloride Requirement for Photosynthetic Oxygen Evolution - Analysis of the Effects of Chloride and Other Anions on Amine Inhibition of the Oxygen-Evolving Complex. *Biochimica Et Biophysica Acta* **766**, 603-611.
- Sandusky, P.O., and Yocum, C.F.** (1986). The Chloride Requirement for Photosynthetic Oxygen Evolution - Factors Affecting Nucleophilic Displacement of Chloride from the Oxygen-Evolving Complex. *Biochimica Et Biophysica Acta* **849**, 85-93.
- Seidler, A.** (1996). The extrinsic polypeptides of Photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1277**, 35-60.
- Seidler, A., and Rutherford, A.W.** (1996). The role of the extrinsic 33 kDa protein in Ca²⁺ binding in photosystem II+. *Biochemistry* **35**, 12104-12110.
- Sfakianaki, M., Sfichi, L., and Kotzabasis, K.** (2006). The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature. *J Photochem Photobiol B* **84**, 181-188.
- Sfichi, L., Ioannidis, N., and Kotzabasis, K.** (2004). Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complex II changes. *Photochem Photobiol* **80**, 499-506.
- Sharp, R.R., and Yocum, C.F.** (1981). Factors influencing hydroxylamine inactivation of photosynthetic water oxidation. *Biochim Biophys Acta* **635**, 90-104.
- Slocum, R.D., Kaur-Sawhney, R., and Galston, A.W.** (1984). The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch Biochem Biophys* **235**, 283-303.
- Smith, T.A.** (1985). Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **36**, 117-143.
- Strasser, B.J., and Strasser, R.J.** (1995). Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test. In Mathis, P. (ed.P): *Photosynthesis: from light to Biosphere Vol.V*, 977-980.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., and Govindjee.** (1995). Polyphasic Chlorophyll-Alpha Fluorescence Transient in Plants and Cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology* **61**, 32-42.
- Styring, S., and Rutherford, A.W.** (1987). In the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem-II the S₀ State Is Oxidized to the S₁ State by D⁺ (Signal-Iislow). *Biochemistry* **26**, 2401-2405.
- Styring, S., Miyao, M., and Rutherford, A.W.** (1987). Formation and Flash-Dependent Oscillation of the S₂-State Multiline Electron-Paramagnetic-Res Signal in an Oxygen-Evolving Photosystem-II Preparation Lacking the 3 Extrinsic Proteins in the Oxygen-Evolving System. *Biochimica Et Biophysica Acta* **890**, 32-38.
- Tavladoraki, P., Schinina, M.E., Cecconi, F., Di Agostino, S., Manera, F., Rea, G., Mariottini, P., Federico, R., and Angelini, R.** (1998). Maize polyamine oxidase: primary structure from protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett* **426**, 62-66.

- Theg, S.M., Jursinic, P.A., and Homann, P.H.** (1984). Studies on the Mechanism of Chloride Action on Photosynthetic Water Oxidation. *Biochimica Et Biophysica Acta* **766**, 636-646.
- Torrigiani, P., Serafinifracassini, D., Biondi, S., and Bagni, N.** (1986). Evidence for the Subcellular-Localization of Polyamines and Their Biosynthetic-Enzymes in Plant-Cells. *Journal of Plant Physiology* **124**, 23-29.
- Tyystjarvi, E., and Pospisil, P.** (1999). Molecular mechanism of high-temperature-induced inhibition of acceptor side of Photosystem II. *Photosynthesis Research* **62**, 55-66.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R., and Kamiya, N.** (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* **473**, 55-60.
- Velthuys, B.R.** (1975). Binding of Inhibitor NH_3 to Oxygen-Evolving Apparatus of Spinach-Chloroplasts. *Biochimica Et Biophysica Acta* **396**, 392-401.
- Whitmarsh, J., Pakrasi, H., B.** (1996). Form and function of cytochrome b-559. In *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (ed. D. R. Ort & C. F. Yocum) 249-264.
- Yamamoto, Y., Doi, M., Tamura, N., and Nishimura, M.** (1981). Release of Polypeptides from Highly-Active O₂-Evolving Photosystem-2 Preparation by Tris Treatment. *Febs Letters* **133**, 265-268.
- Yamamoto, Y., Shinkai, H., Isogai, Y., Matsuura, K., and Nishimura, M.** (1984). Isolation of an Mn-Carrying 33-Kda Protein from an Oxygen-Evolving Photosystem-Ii Preparation by Phase Partitioning with Butanol. *Febs Letters* **175**, 429-432.
- Yano, J., and Yachandra, V.K.** (2007). Oxidation state changes of the Mn₄Ca cluster in photosystem II. *Photosynth Res* **92**, 289-303.
- Yano, J., and Yachandra, V.K.** (2008). Where water is oxidized to dioxygen: structure of the photosynthetic Mn₄Ca cluster from X-ray spectroscopy. *Inorg Chem* **47**, 1711-1726.
- Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M.J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Saenger, W., Messinger, J., Zouni, A., and Yachandra, V.K.** (2006). Where water is oxidized to dioxygen: structure of the photosynthetic Mn₄Ca cluster. *Science* **314**, 821-825.
- Yano, J., Kern, J., Irrgang, K.D., Latimer, M.J., Bergmann, U., Glatzel, P., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Sauer, K., Messinger, J., Zouni, A., and Yachandra, V.K.** (2005). X-ray damage to the Mn₄Ca complex in single crystals of photosystem II: a case study for metalloprotein crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12047-12052.
- Zahariou, G., Petrouleas, V., Ioannidis, N., and Sioros, G.** (2007). The collapse of the tyrosine Z(center dot)-Mn spin-spin interaction above similar to 100 K reveals the spectrum of tyrosine Z(center dot). An application of rapid-scan EPR to the study of intermediates of the water splitting mechanism of photosystem II. *Biochemistry* **46**, 14335-14341.