



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศักยภาพของพอลิเอมีนต้านภาวะกดดันเนื่องจากแสง

ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803

โดย ดร. เสาวรัตน์ จันทะโร

กรกฎาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศักยภาพของพอลิเอมีนด้านภาวะกดดันเนื่องจากแสง

ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803

ดร.เสาวรัตน์ จันทะโร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้จัดสรรทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากทุนนี้ให้ทั้งกำลังใจและกำลังทรัพย์สำหรับอาจารย์รุ่นใหม่อย่างแท้จริง ช่วยหนุนความตั้งใจ และความมุ่งมั่นที่จะเริ่มต้นงานวิจัยที่ต้องการการพัฒนาต่อยอดต่อไปในอนาคต

ขอขอบพระคุณ นักวิจัยที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.อรรณู อินเจริญศักดิ์ ที่ได้กรุณาให้ คำปรึกษาและข้อแนะนำต่าง ๆ ในการวิจัย อีกทั้งยังเป็นต้นแบบของอาจารย์และเมธีวิจัยอาวุโสที่ ผู้วิจัยมีความมุ่งมั่นจะดำเนินรอยตาม

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้โอกาส และสถานที่ในการทำวิจัยตลอดโครงการนี้ และโครงการต่อเนื่องที่กำลังดำเนินอยู่เป็นอย่างยิ่ง

ท้ายที่สุดนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิตในความดูแล เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในภาควิชาและใน ห้องปฏิบัติการไซยาโนแบคทีเรียทุกคน ที่ให้กำลังใจและร่วมกันทำงานในสิ่งแวดล้อมที่เป็นสุข และ ที่สำคัญคือ ครอบครัวของผู้วิจัย คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้การสนับสนุนด้านกำลังใจในเรื่องการทำงาน งานวิจัย และการดำเนินชีวิต

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180101
ชื่อโครงการ : ศักยภาพของพอลิเอมีนต้านภาวะกดดันเนื่องจากแสงในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803
ชื่อนักวิจัย : ดร.เสาวรัตน์ จันทะโร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail Address : saowarath@gmail.com
ระยะเวลาโครงการ: 15 เดือน พฤษภาคม 2551 – 14 พฤษภาคม 2553

จากการศึกษาผลของภาวะกดดันเนื่องจากแสงต่อชีวสังเคราะห์ของพอลิเอมีน และศึกษาการควบคุมระดับยีนและระดับโปรตีนของเอนไซม์ที่กระตุ้นการสร้างพอลิเอมีนภายใต้ภาวะกดดันเนื่องจากแสงในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 โดยเราได้เลือกภาวะกดดันเนื่องจากแสงยูวี หรืออัลตราไวโอเล็ตเป็นหลักนั้น พบว่าเซลล์ *Synechocystis* ที่ได้รับการสัมผัสกับแสงหรือรังสียูวีเอและยูวีบีที่มีความเข้ม 11.0-13.0 วัตต์ต่อตารางเมตร และ 1.2-1.3 วัตต์ต่อตารางเมตร ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะเจริญเติบโตลดลง ในขณะที่รังสียูวีซี (1.0-1.3 วัตต์ต่อตารางเมตร) มีผลกระทบต่อเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียเพียงเล็กน้อยทั้งที่การลดลงของอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงถึงประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์สัมพันธ์จากอัตราเริ่มต้น รังสียูวีเอและยูวีบีส่งผลลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ขณะที่ยูวีซีลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ แต่ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ สำหรับปริมาณพอลิเอมีนนั้น พบว่ารังสียูวีเอไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสเปออร์มิดีนภายในเซลล์ แต่ยูวีบีและยูวีซีมีผลทำให้ปริมาณของสเปออร์มิดีน ลดลงถึง 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่สำคัญพบว่า การที่เซลล์ได้รับรังสีทั้งสามชนิดทำให้ปริมาณสเปออร์มิดีนที่ไม่สามารถละลายในกรดเปอร์คลอริกได้ (ซึ่งจัดเป็นพอลิเอมีนในรูปแบบบาวนด์ซึ่งจับกับโมเลกุลที่มีประจุลบภายในเซลล์) ลดลง ที่สำคัญคือ พิเวเทรลซินและสเปออร์มินซึ่งมีปริมาณเพียงเล็กน้อยภายในเซลล์ได้รับการกระตุ้นจากรังสียูวีบีและยูวีซีเพิ่มขึ้นประมาณ 3 และ 8 เท่า ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงปริมาณพอลิเอมีนที่ได้รับการกระตุ้นจากรังสียูวีบีและยูวีซีสอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA ของยีนอะจินีนดีคาร์บอกซิเลส แต่ไม่สอดคล้องกับระดับโปรตีน และยังพบอีกว่า ระดับทรานสคริปต์ของยีน *adc1* เพิ่มขึ้นในขณะที่ทรานสคริปต์ของยีน *adc2* ลดลงภายใต้ภาวะกดดันเนื่องจากแสงยูวีบีและยูวีซี

คำหลัก : พอลิเอมีน, รังสียูวี, *Synechocystis*

Abstract

Project Code: MRG5180101
Project Title : Potential of Polyamines against light stress in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803
Investigator : Dr.Saowarath Jantaro Chulalongkorn University
E-mail Address : saowarath@gmail.com
Project Period : 15 May 2008 –14 May 2010

This study has been focusing to understand the effect of light stress upon polyamine biosynthesis and the regulations on their transcriptional and translational levels of polyamine-biosynthetic enzyme under light stress, especially UV radiation, in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. To investigate the short term effect of ultraviolet (UV) radiations on changes in pigments and polyamine contents, *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells after exposure to UV-radiation were extracted by dimethylformamide and perchloric acid for pigments and polyamines determination, respectively. Cell growth was slightly decreased after 1 h exposure to UV-A (11.0-13.0 W.m⁻²) and UV-B (1.2-1.3 W.m⁻²) radiations. UV-C (at 1.0-1.3 W.m⁻²) had little effect on cell growth despite the decrease of photosynthetic rate by about 18%. UV-A and UV-B decreased the contents of chlorophyll a and carotenoids whereas UV-C decreased chlorophyll a but had no effect on carotenoids. Spermidine contents were unaffected by UVA, in contrast to the reduction of 25 and 50% by UV-B and UV-C, respectively. All three types of UV-radiation particularly reduced perchloric acid-insoluble spermidine (which is classified to bound polyamines associating to negatively charged-biomolecules). Importantly, putrescine and spermine which accounted for less than 1% of intracellular polyamines were increased by about three- to eight-fold by UV-B and UV-C, respectively. The changes in polyamines contents by UV-B and UV-C were consistent with the changes in transcript levels of arginine decarboxylase mRNA, but not with the protein levels. The decrease in the transcripts of *adc2* but not *adc1* was observed with UV-B and UV-C treatments.

Keywords : Polyamines, UV radiation, *Synechocystis*

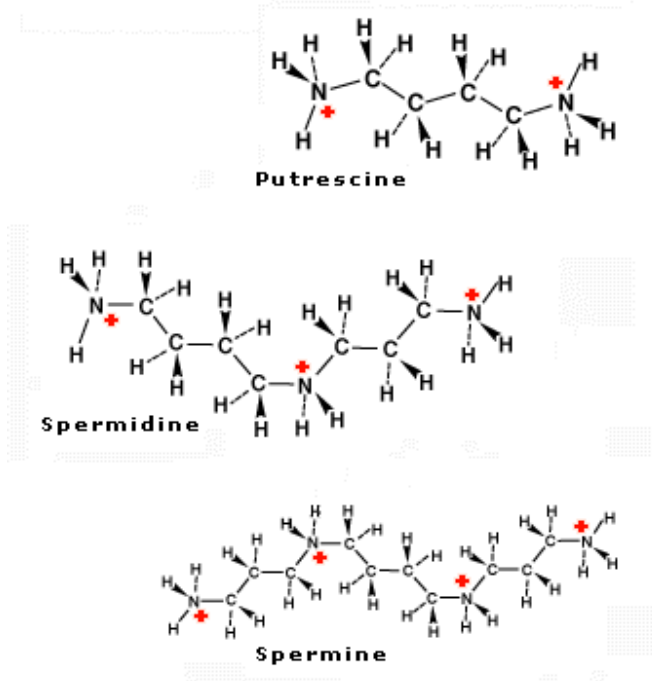
เนื้อหาทางวิจัย

1. บทนำ

1.1 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

พอลิเอมีนคือสายพอลิเมอร์ของเอมีนชนิดอะลิฟาติกที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติซึ่งถูกพบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด พอลิเอมีนส่วนใหญ่ทั่วไป มี 3 ชนิดหลัก คือ สเปอ์รมิตินซึ่งเป็นไทโรเอมีน (Spd) สเปอ์รมินซึ่งเป็นเททรามีน (Spm) และพิวเทรสซีน (Put) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นชนิดไดเอมีน (ดังรูปที่ 1) สำหรับพอลิเอมีนที่มีสายยาวมากกว่าเททรามีนนั้นมักพบในแบคทีเรีย สาหร่าย รา สัตว์ และพืชชั้นสูง อาทิเช่น ในแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงมาก *Thermus thermophilus* พบพอลิเอมีนที่หลากหลาย กล่าวคือทั้งที่เป็นเส้นตรง มีกิ่งก้านเป็นเพนทามีน เฮกซามีนและเฮปทามีน (Oshima, 1989)

The polyamines



รูปที่ 1 พอลิเอมีนสามชนิด ได้แก่ พิวเทรสซีน (Put; $H_2N(CH_2)_4NH_2$), สเปอ์รมิติน (Spd; $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$) และสเปอ์รมิน (Spm; $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$)

แหล่งข้อมูล

[:http://www.biol.lu.se/zoofysiol/Cellprolif/](http://www.biol.lu.se/zoofysiol/Cellprolif/)

Research/research_area_1.html

หลักฐานงานวิจัยในระบบของพืช ซึ่งถูกรวบรวมไว้ในหลายปีที่ผ่านมา สนับสนุนบทบาทหน้าที่ของพอลิเอมีน ว่าเป็นตัวควบคุมของการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ (Heby, 1981) เมแทบอลิซึมของพอลิเอมีนในพืชชั้นสูงจะตอบสนองในวงกว้างต่อภาวะกดดันหรือภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม (Bouchereau *et al.*, 1999) พบว่า ระดับพอลิเอมีนเป็นส่วนประกอบ

ภายในของกลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะกดดันหลายอย่าง (Santa-Cruz *et al.*, 1997) เช่น การขาดโภชนาการหรือสารอาหาร (Geny *et al.*, 1997), ออสโมซิส, ความเค็ม (Jantaro *et al.*, 2003) และความร้อน (Roy and Ghosh, 1996) เป็นต้น พอลิเอมีนเป็นโมเลกุลที่มีสมบัติเป็นเบสซึ่งถูกประจุเป็นบวกที่พีเอชทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยังพบว่า พอลิเอมีนจะยึดเหนี่ยวอย่างแข็งแรงกับกรดนิวคลีอิกซึ่งมีประจุลบ (Feurstein and Marton, 1989) หรือกับฟอสโฟลิพิดที่เป็นกรด (Tadolini *et al.*, 1985) และยึดเหนี่ยวกับโปรตีนหลายชนิดโดยรวมถึงเอนไซม์ด้วย (Carley *et al.*, 1983) ซึ่งอันตรกิริยาไอออนเหล่านี้จะมีความสำคัญยิ่งในการควบคุมบทบาทหน้าที่และโครงสร้างของชีวโมเลกุล (Jacob and Stetler, 1989) นอกจากนี้ ระดับพอลิเอมีนในพืชชั้นสูงจะเพิ่มขึ้นอย่างมากในระยะการเจริญที่มีการเพิ่มอย่างรวดเร็ว เช่น ในช่วงการงอกของเรณูและการเติบโตทางใต้ดินของมะเขือเทศ (Song *et al.*, 2002) การเจริญของเอ็มบริโอทั้งแบบไซโกติก (zygotic) และโซมาติก (somatic) ของ *Pinus radiata* (Minocha *et al.*, 1999) นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงกลไกของพอลิเอมีนยังเกี่ยวข้องกับการเจริญของดอกเช่นกัน (Aziz *et al.*, 2001) สำหรับในแบคทีเรีย *Escherichia coli* นั้นพบว่าส่วนใหญ่จะพบสเปอร์มิดีนในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสเปอร์มิดีนและ RNA (spermidine-RNA complex) และประมาณ 40% และ 50% ของพิวเทรสซีนที่มีอยู่ในรูปแบบโมเลกุลอิสระและสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพิวเทรสซีนและ RNA (putrescine-RNA complex) ตามลำดับ (Miyamoto *et al.*, 1993)

สำหรับแสง ถือว่าเป็นสัญญาณสำคัญของสิ่งแวดล้อมที่ควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาและการเจริญของพืช และยังเป็นพลังงานซึ่งเป็นส่วนสำคัญของการลดปริมาณคาร์บอนอนินทรีย์สิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้ต้องมีการปรับตัวการเปลี่ยนแปลงต่อสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะความเข้มแสง ภาวะการเปลี่ยนแปลงก่อให้เกิดความกดดันหรือความเครียดเนื่องจากแสง ได้แก่ ความเข้มแสงที่สูง (He *et al.*, 2001; Jantaro *et al.*, 2006b) เช่นเดียวกันกับการแผ่รังสียูวี (Smith *et al.*, 2001) สิ่งเหล่านี้เป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการผลิตรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (Reactive Oxygen Species, ROS) ซึ่งเป็นพิษที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูงมีผลไปดัดแปรโมเลกุลที่จำเป็น เช่น โปรตีน, ลิพิดและกรดนิวคลีอิก และในที่สุดเป็นเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ กระบวนการสะสมของสารพิษเหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของระบบการสังเคราะห์แสงซึ่งเป็นไปได้ว่าเกี่ยวข้องกับสมดุลของพลังงานเข้าและการบริโภค (Boardman, 1977) เมื่อไม่นานมานี้ Mulo และคณะ (1998) ได้แสดงผลการทำลายยีนคล้าย *spe* ที่เข้ารหัสอาร์จินีนดีคาร์บอกซิเลส (arginine decarboxylase, ADC) ซึ่งเกี่ยวข้องในชีวสังเคราะห์พอลิเอมีนและอยู่ในตำแหน่งดาว์นสตรีม (downstream) จากยีน *psbA-2* ที่เข้ารหัสโปรตีน D1 ของระบบแสงที่สอง (Photosystem II) ในโครโมโซมของเซลล์ *Synechocystis* 6803 ผลที่เกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์นี้ลดเสถียรภาพของทรานสคริปต์ *psbA-2* ในภาวะมืดทั้งนี้ยังส่งผลลดปริมาณ Spd

ภายในเซลล์เช่นกัน ดังนั้นพอลิเอมีนจึงอาจแสดงบทบาทต่อเสถียรภาพของ mRNA *psbA-2* ในทำนองเดียวกันกับงานวิจัยของเราก่อนหน้านี้ที่พบว่าระดับเอนไซม์อาร์จินีนดีคาร์บอกซิเลสและระดับทรานสคริปต์ *ADC* เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดในระยะเวลาที่สั้นประมาณ 15 นาทีภายใต้ภาวะกดดันเนื่องจากแสงความเข้มสูง (Jantaro *et al.*, 2006a) นอกจากนี้ในสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว *Scenedesmus obliquus* พบว่าปริมาณพอลิเอมีนซึ่งสัมพันธ์กับเยื่อไทลาคอยด์มีผลในการปรับความไวของเซลล์ต่อแสงยูวีบี (Sfichi *et al.*, 2004) ตั้งแต่ได้มีการศึกษาพอลิเอมีนที่สอดคล้องกับการป้องกันตัวจากภาวะกดดันของสิ่งแวดล้อม พบว่าการศึกษาความสัมพันธ์ของการควบคุมเนื่องจากพอลิเอมีนและภาวะกดดันเนื่องจากแสงยังพบไม่มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลไกที่แน่นอนของพอลิเอมีนภายในเซลล์ก็ยังไม่ทราบแน่ชัด

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวที่มีกระบวนการสังเคราะห์แสงท่ามกลางสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอตทั้งหมด สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงกว้างของแหล่งที่อยู่อาศัย ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เป็นสายพันธุ์แรกของสิ่งมีชีวิตจำพวกไฟโตโทรบที่ถูกแสดงลำดับอย่างสมบูรณ์ (Kaneko *et al.* 1996; <http://www.kazusa.or.jp/cyano>; Ikeuchi and Tabata, 2001) สิ่งสำคัญคือ *Synechocystis* sp. PCC 6803 ยังเป็นแม่แบบอย่างง่ายในการศึกษาระบบทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้ จึงเป็นทางเลือกที่ดีและเหมาะสมของการวิจัยครั้งนี้ในการเข้าสู่การศึกษาด้านพันธุวิศวกรรมและการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อศึกษาผลของภาวะกดดันเนื่องจากแสงยูวีต่อชีวสังเคราะห์ของพอลิเอมีน
- 2) เพื่อศึกษาการควบคุมระดับยีนและระดับโปรตีนของเอนไซม์ที่กระตุ้นการสร้างพอลิเอมีนภายใต้ภาวะกดดันเนื่องจากแสงยูวี

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียและการทดลองฉายรังสี เลี้ยงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ในอาหารสูตร BG11 ที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส และให้อากาศกรองภายใต้แสงขาวอย่างต่อเนื่องที่ความเข้ม 40-50 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที จากนั้นก็วัดค่า OD (Optical density) ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เพื่อติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ หลังจากนั้น จะเก็บเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลวจนถึงระยะ mid-log ซึ่งมีค่า OD730 ประมาณ 0.8-1.0 มาทำการเจือจางด้วยอาหารสูตร BG11 ให้ได้ค่า OD730 เท่ากับ 0.5 แล้วนำสารละลายเซลล์เจือจางนี้ไปทำการทดสอบแสงยูวีต่อไป โดยจะใช้หลอด

UV ที่ให้ความยาวคลื่นเดี่ยว (UVLMS-38 EL SERIES UV LAMPS, UVP) ได้แก่ UV-A ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร (ความเข้มแสงเท่ากับ 11.0-13.0 วัตต์ต่อตารางเมตร), UV-B ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร (ความเข้มแสงเท่ากับ 1.2-1.3 วัตต์ต่อตารางเมตร) และ UV-C ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ความเข้มแสงเท่ากับ 1.0-1.3 วัตต์ต่อตารางเมตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ สกัดเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บเกี่ยวได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 10^6 - 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ด้วยสารไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จากนั้นนำไปปั่นแยกในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวัดปริมาณรงควัตถุทั้งหมดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 3 ความยาวคลื่น คือ 461, 625 และ 664 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ตามสมการที่ 1 และ 2 (Chamovitz *et al.*, 1993; Moran, 1982) ตามลำดับ

$$\begin{aligned} \text{สมการที่ 1: [คลอโรฟิลล์ เอ] (หน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} \\ = 12.1 \times OD_{664} - 0.17 \times OD_{625} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{สมการที่ 2: [แคโรทีนอยด์] (หน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} \\ = (A_{461} - 0.046 \times OD_{664}) \times 4 \end{aligned}$$

2.3 การวัดค่า Oxygen evolution เก็บเกี่ยวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญจนถึงระยะ mid-log ในอาหาร BG11 แล้วนำไปปั่นแยกเพื่อเก็บส่วนตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 5,000xg เป็นเวลา 5 นาที แบ่งส่วนหนึ่งไปวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ จากนั้นแขวนลอยเซลล์ที่มีความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ประมาณ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ O₂ evolution สามารถวัดได้ด้วยอิเล็กโทรด Clark-type ที่ใช้กับเครื่องวัด oxygen evolution (YSI 5300A, YSI Inc., USA) และให้แสงขาวที่มีความเข้มสูงขณะวัด จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ลงในภาชนะเพื่อตรวจวัดกิจกรรมการขนส่งอิเล็กตรอนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงทั้งสาย (whole chain photosynthetic electron transport activities) โดยทำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.4 การสกัดและวิเคราะห์พอลิเอมีน เก็บเกี่ยวตะกอนเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย 100 มิลลิกรัม มาสกัดด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 2,790xg เป็นเวลา 20 นาที ส่วนใสคือส่วนของสารสกัดที่ละลายได้ในกรดเปอร์คลอริก และส่วนตะกอนคือส่วนของสารสกัดที่ไม่ละลายในกรดเปอร์คลอริก

ซึ่งสามารถแทนพอลิเอมีนอิสระ และพอลิเอมีนที่มีรูปแบบยาวได้ ตามลำดับ จากนั้นนำทั้งสองส่วนมาสกัดพอลิเอมีนด้วยวิธีเบนโซอิลเลชัน (Benzoylation) (Redmond and Tseng, 1979) และใช้สารมาตรฐานภายใน (internal standard) เป็น 1,6-เฮกเซนไดเอมีน จากนั้นนำสารอนุพันธ์พอลิเอมีนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ C-18 (4.6 x 150 มิลลิเมตร inertsil[®] ODS-3, 5 ไมโครเมตร i.d., GL Sciences Inc., USA) มีตัวตรวจรับเป็น UV-Vis ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และมีตัวทำลายเคลื่อนที่เป็น 60-100 เปอร์เซ็นต์ของเมทานอล:น้ำ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 25 นาที ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

2.5 การเตรียม RNA หลังจากที่ได้เก็บเกี่ยวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียด้วยการปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ 4,000xg เป็นเวลา 10 นาทีแล้ว ก็นำตะกอนเซลล์ไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นก็นำเซลล์ไปสกัด RNA ด้วยวิธี Hot Phenol (Mohamed and Jansson, 1989) แล้วนำไปบ่มกับเอนไซม์ RNase-free DNase (Invitrogen, USA)

2.6 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) การสังเคราะห์ cDNAs ทำโดยการนำ RNA รวมจากข้อ 2.5 ปริมาณ 5 ไมโครกรัม มาบ่มกับไพรเมอร์ 3' ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยใช้ชุด Kit SuperScript[™] III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA) โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์สำหรับยีน *adc1* และ *adc2* ดังตาราง

ยีน	ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาวคู่เบส
16S RNA	Forward-16S	5'-AGTTCTGACGGTACCTGATGA-3'	521
	Reverse-16S	5'-GTCAAGCCTTGGTAAGGTTCT-3'	
<i>adc1</i>	Forward- <i>adc1</i>	5'-ATATTACCTGCGACAGTGATGG-3'	315
	Reverse- <i>adc1</i>	5'-GATCAAGGCTAACTCCGTATGAC-3'	
<i>adc2</i>	Forward- <i>adc2</i>	5'-ATATTACCTGCGACAGTGATGG-3'	457
	Reverse- <i>adc2</i>	5'-TTAGCTGGTGTGGATGCCT-3'	

จากนั้นนำไปทำ PCR ตามขั้นตอนดังนี้

- 1) Initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 5 นาที
- 2) 30 รอบของ
 - 2.1) Denaturation 95 องศาเซลเซียส 1 นาที
 - 2.2) Primer annealing
 - 2.2.1 ไพรเมอร์ *adc1* 50.7 องศาเซลเซียส 1 นาที
 - 2.2.2 ไพรเมอร์ *adc2* 64 องศาเซลเซียส 1 นาที

2.2.3 ไพรเมอร์ 16S 56 องศาเซลเซียส 1 นาที

2.3) Synthesis 72 องศาเซลเซียส 1 นาที

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจปริมาณ cDNA ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และวัดความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเครื่องมือ Syngene® Gel Documentation (Syngene, USA)

2.7 การสกัดโปรตีน นำตะกอนเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บเกี่ยวได้ไปสกัดโปรตีนโดยแขวนลอยในบัฟเฟอร์สกัด (ดัดแปลงจาก Primikirios and Roubelakis-Angelakis, 1999) ที่ประกอบด้วย สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 8.0), EDTA 1 มิลลิโมลาร์, Pyridoxal phosphate 50 ไมโครโมลาร์, DTT 5 มิลลิโมลาร์, กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) และ Triton X-100 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใส่เม็ดบีดส์ลงในหลอดทดลองในอัตราส่วน 1:1 ต่อปริมาณตะกอนเซลล์ ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบรุนแรง เป็นเวลา 20 วินาทีต่อครั้ง และทำซ้ำ 7-8 ครั้ง โดยวางบนน้ำแข็งหลังจากผ่านการเขย่าแล้ว จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดโปรตีนไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.8 Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) นำโปรตีนรวมจากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่สกัดได้จากข้อ 2.7 มาปริมาณ 10 ไมโครกรัม ผสมกับบัฟเฟอร์ของตัวอย่างในอัตราส่วน 4:1 จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เจล SDS-พอลิอะคริลาไมด์ที่ใช้คือ Separating gel 12 เปอร์เซ็นต์ และ Stacking gel 5 เปอร์เซ็นต์ และจะทำการแยกโดยเครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้าที่คงที่ 20 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นถ่ายโอนแถบโปรตีนไปยังแผ่นเมมเบรน หรือย้อมด้วยสารละลายย้อม Coomassie blue

2.9 Western Blotting เตรียมแผ่นเมมเบรน immobilon™ PVDF โดยตัดให้มีขนาดเท่ากับขนาดของเจลอะคริลาไมด์ที่ได้จากข้อ 2.8 และนำไปจุ่มในเมทานอลเป็นเวลา 30 นาที การถ่ายโอนแถบโปรตีนที่แยกได้จากข้อ 2.8 ไปยังแผ่นเมมเบรนทำที่กระแสไฟฟ้า 100 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนไปล้างด้วยสารละลาย 1XTBS และสารละลาย Blocking เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปโพรบด้วยแอนติบอดี ADC และสามารถตรวจสอบความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม GeneSnap program ของเครื่องมือ Syngene® Gel Documentation (Syngene, USA) (Jantaro *et al.*, 2010)

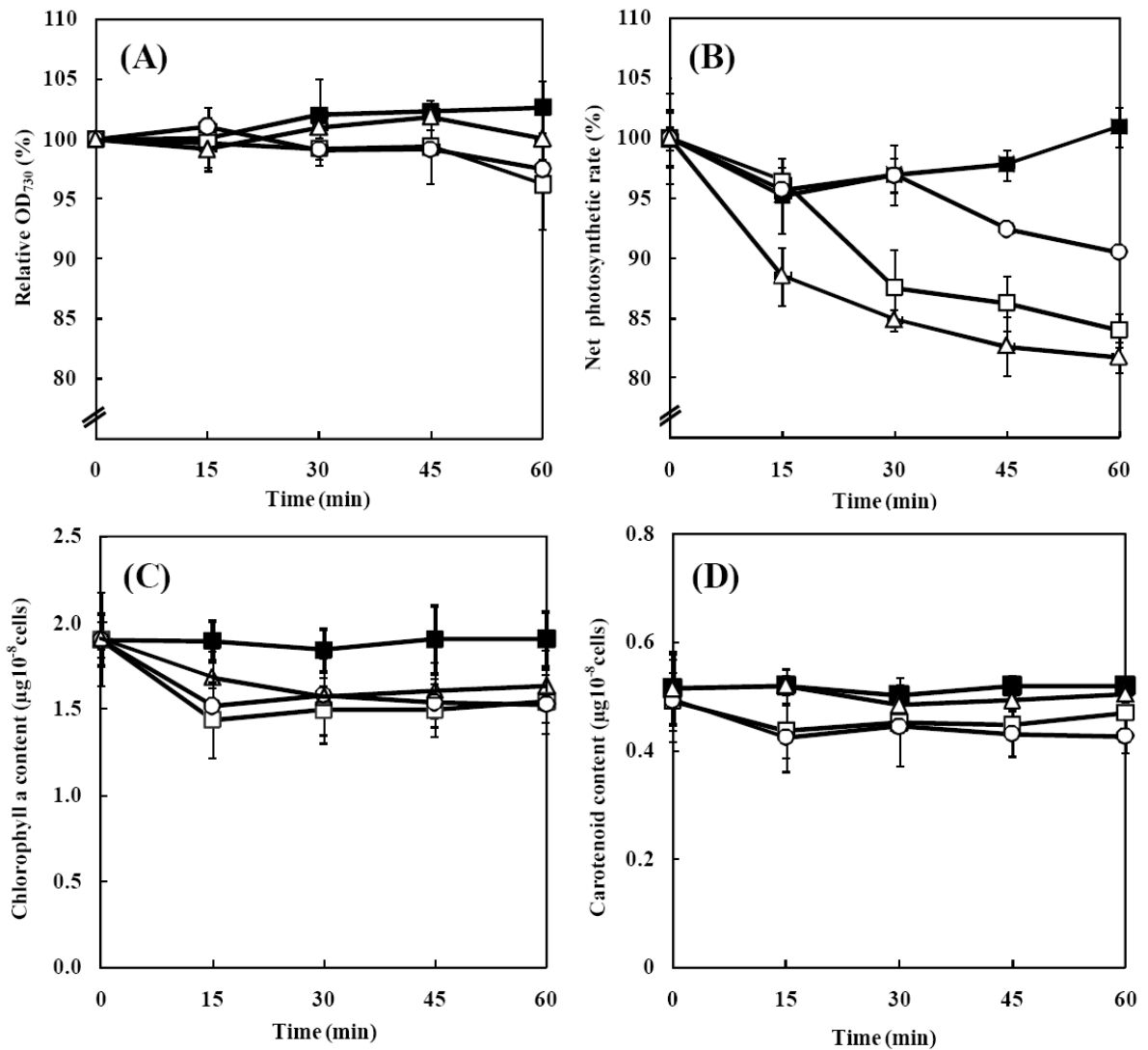
2.10 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ (ดัดแปลงจาก Jana and Choudhuri, 1981) เก็บเกี่ยวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ด้วยการปั่นแยก จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปแขวนลอยในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 6.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเม็ดบีดส์และทำการเขย่าเพื่อให้เซลล์แตก ภายหลังจากการเขย่าจะนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสไปตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยผสมสารสกัดส่วนใสปริมาตร 250 ไมโครลิตร กับ สารละลายไททาเนียมออกไซด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายอยู่ในกรดซัลฟูริก 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นบ่มหนึ่งนาทีจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และสามารถวัดความเข้มของสีเหลืองที่เกิดขึ้นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

2.11 Scanning electron microscopy (SEM) การเตรียมตัวอย่าง Specimen คือนำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียปริมาณ 10 มิลลิลิตร ไปทำให้เข้มข้นขึ้นจนได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการตรึง (fixation) โดยกลูตาโรลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7.2) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์เดิมสองครั้งเป็นเวลา 10 นาที และล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำ Specimen ที่ตรึงแล้วนั้นไปผ่านกระบวนการเอาน้ำออก (Dehydration) ด้วยเอทานอล (ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์จนถึงเข้มข้นสัมบูรณ์) จากนั้นใช้เครื่องทำให้แห้ง critical point dryer (Balzers model CPD 020) ก่อนจะหล่อและเคลือบลงบนทองคำ (Sputter coater, Balzers model SCD 040) สุดท้ายใช้เครื่องมือ scanning electron microscope (JEOL, model JSM-5410LV) ส่องดูทองคำที่มี specimen ตรึงอยู่ได้

2.12 สถิติทดสอบ ทำการทดลองอย่างเป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 ครั้ง และนำเสนอข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

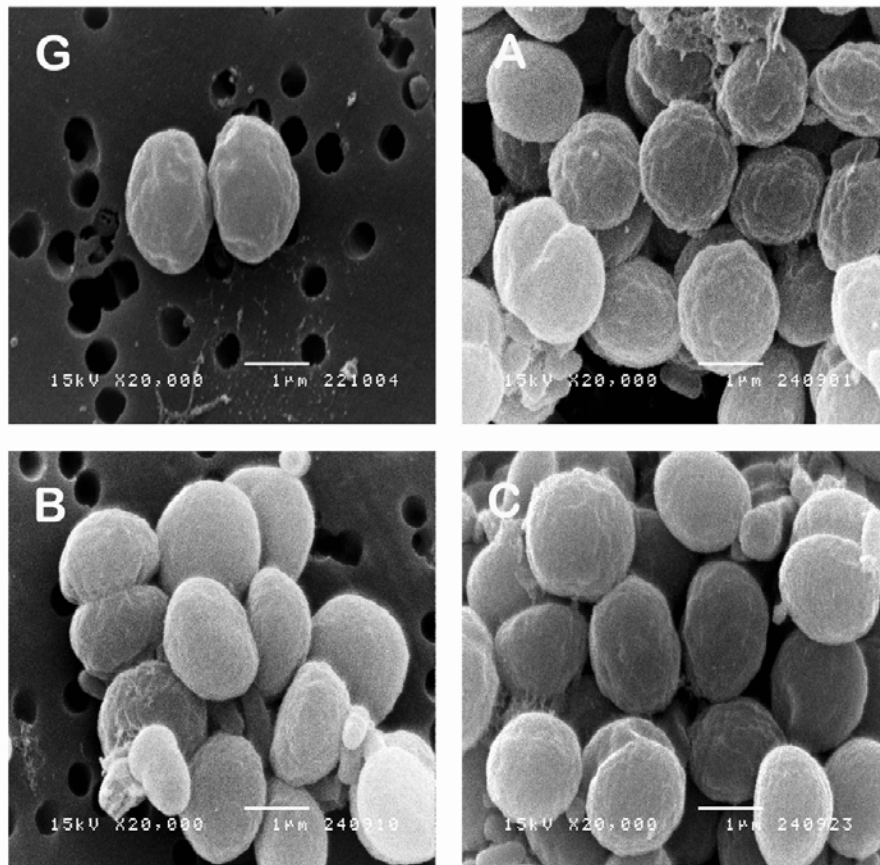
3. ผลการทดลอง

3.1 การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ภายใต้รังสียูวี เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียเจริญภายใต้แสงขาวเพิ่มขึ้นทีละน้อยภายในเวลาหนึ่งชั่วโมง ในขณะที่การเจริญของเซลล์ภายใต้แสงยูวีมีอัตราการลดลงเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 2A) แต่เมื่อทำการตรวจวัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงสุทธิ (รูปที่ 2B) พบว่า เซลล์ที่ได้รับแสงยูวีทั้งสามชนิดคือ UV-A, UV-B และ UV-C ให้กิจกรรมการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 16, 10 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



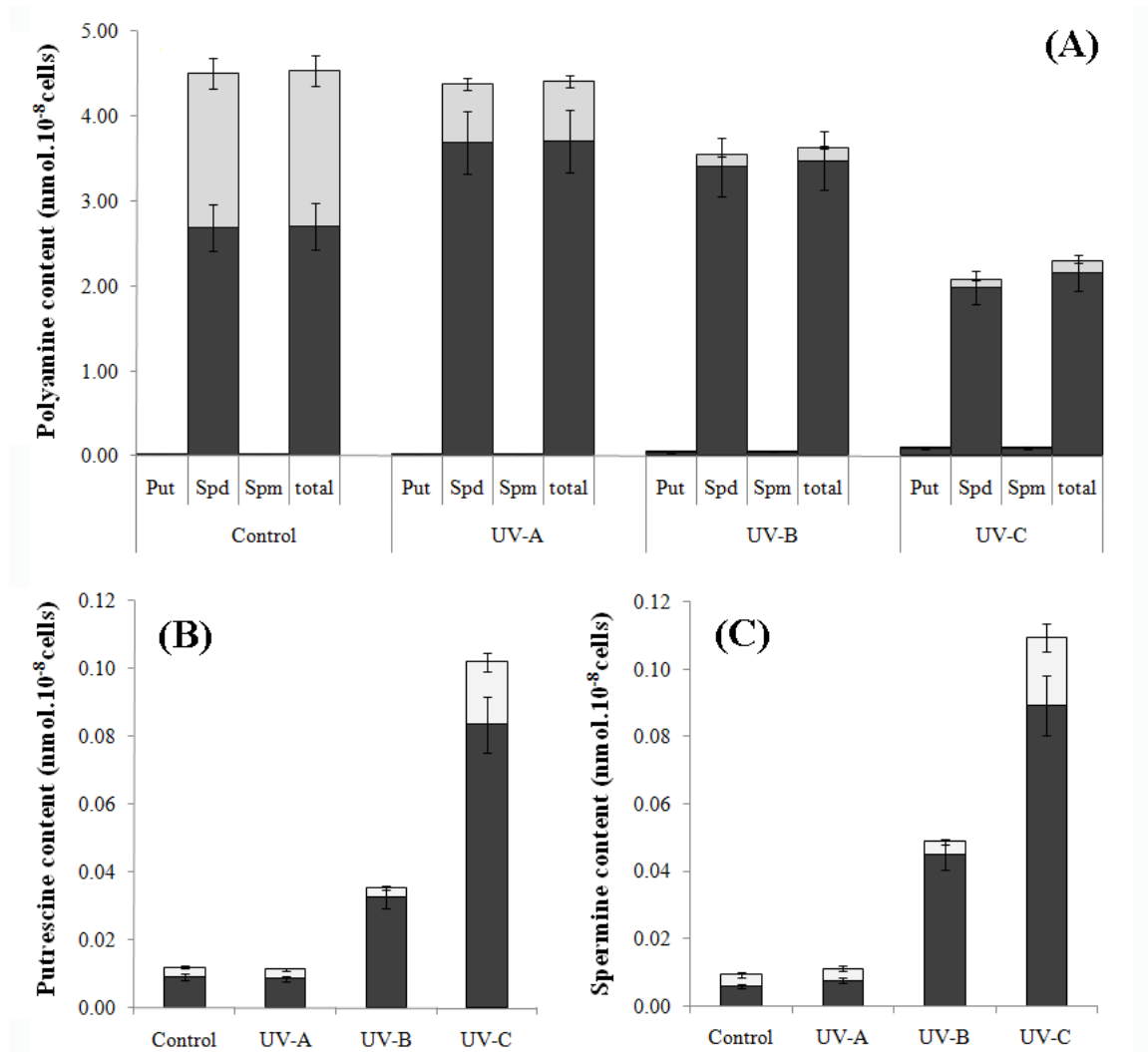
รูปที่ 2 (A) เปอร์เซ็นต์ OD₇₃₀ สัมพัทธ์, (B) เปอร์เซ็นต์ Oxygen evolution สัมพันธ์, (C) ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และ (D) ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ที่เจริญภายใต้แสงขาว (สี่เหลี่ยมปิด) และแสงยูวีแต่ละชนิด ได้แก่ UV-A (สี่เหลี่ยมเปิด), UV-B (วงกลมเปิด) และ UV-C (สามเหลี่ยมเปิด) โดย 100 เปอร์เซ็นต์ของ OD₇₃₀ และ Oxygen evolution มีค่าเท่ากับ 0.5 และ 101 ± 9 ไมโครโมลออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (Jantaro *et al.*, 2010)

3.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 2C และ 2D พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* ที่เจริญภายใต้แสงขาวปกติ มีการสะสมของคลอโรฟิลล์ เอ สูงกว่าเซลล์ที่ได้รับรังสียูวีทั้งสามชนิดโดยปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 15 นาทีแรก และหลังจาก 15 นาทีผ่านไปแล้วจะพบปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่คงที่จนกระทั่งครบหนึ่งชั่วโมง อย่างไรก็ตาม UV-A และ UV-B มีผลกระทบต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ มากกว่า UV-C สำหรับแคโรทีนอยด์นั้น พบว่า UV-A และ UV-B มีผลกระทบต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ที่ได้รับรังสียูวีทั้งสองชนิดเป็นเวลา 15 นาที และไม่พบการเปลี่ยนแปลงหลังจากนั้น และยังพบว่า UV-C ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้รับรังสียูวี



รูปที่ 3 แสดงภาพ Scanning electron microscope ของ *Synechocystis* specimens จากเซลล์ที่เจริญภายใต้แสงขาว (40-50 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (G), UV-A (A), UV-B (B) และ UV-C (C) เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง ตามลำดับ ความยาวเส้นแถบเท่ากับ 1 ไมโครเมตร

3.3 ลักษณะสัณฐานของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียเมื่อได้รับรังสียูวี จากรูปที่ 3 ภาพ SEM แสดงให้เห็นว่า รังสียูวีมีผลกระทบต่อโครงสร้างบริเวณผิวของผนังเซลล์ (รูปที่ 3A, 3B และ 3C) โดยรูปที่ 3G นั้นผิวผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียปกติเองก็ไม่ได้เรียบ แต่เมื่อเซลล์ได้รับรังสียูวี จะยิ่งย่นและหดตัวมากกว่าเดิม จากการสังเกตเห็นว่า เซลล์ที่ได้รับรังสี UV-A เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณผิวผนังเซลล์มากกว่ารังสียูวีชนิดอื่น สิ่งซึ่งเป็นที่น่าสังเกต คือเซลล์ส่วนใหญ่ที่ได้รับรังสียูวี จะเกิดการเกาะกลุ่มกัน และมีลักษณะคล้ายเยื่อเมือกปกคลุมระหว่างเซลล์ที่อยู่ติดกันได้

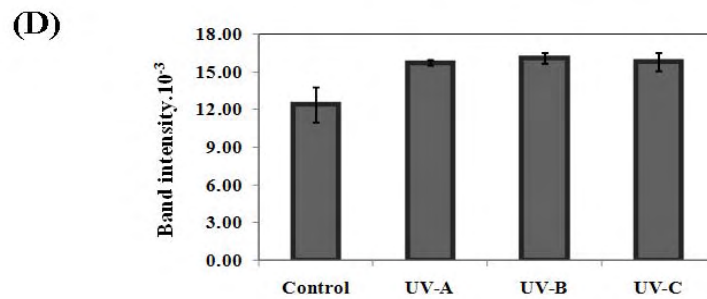
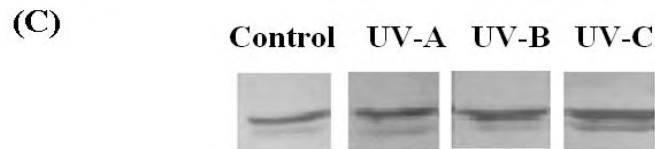
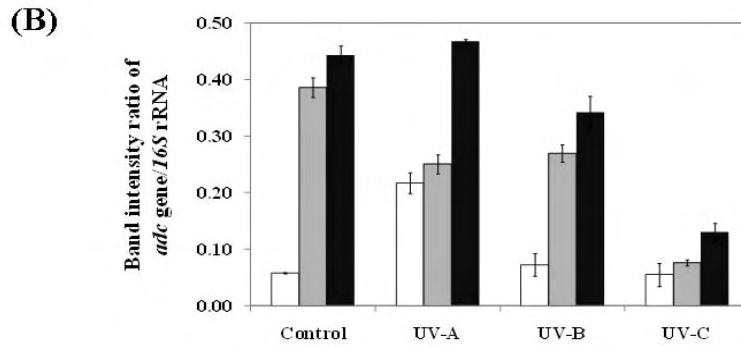
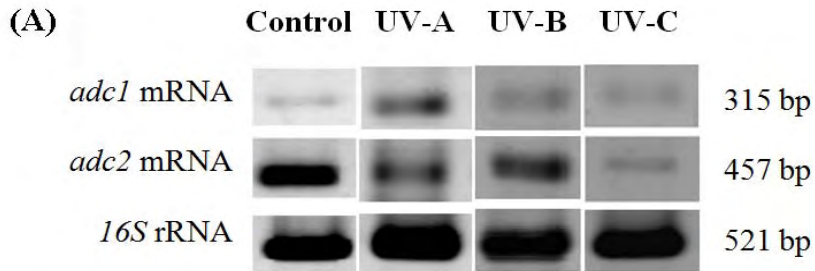


รูปที่ 4 ปริมาณพอลิเอมีนรวมที่ประกอบด้วยพิวเทรสซีน (Put), สเปอ์มิติน (Spd) และสเปอ์มีน(Spm) ภายในเซลล์ *Synechocystis* โดย (A) เป็นเซลล์ที่เจริญภายใต้รังสียูวีที่แตกต่างกันสามชนิด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับ (B) และ (C) แสดงภาพขยายของปริมาณ Put และ Spm ที่สะสมภายในเซลล์เมื่อได้รับรังสียูวีแต่ละชนิด รูปกราฟแท่งสีขาวแทนปริมาณพอลิเอมีนที่ไม่ละลายในกรดเปอร์คลอริก กราฟแท่งสีดำแทนปริมาณพอลิเอมีนที่ละลายในกรดเปอร์คลอริก (Jantaro *et al.*, 2010)

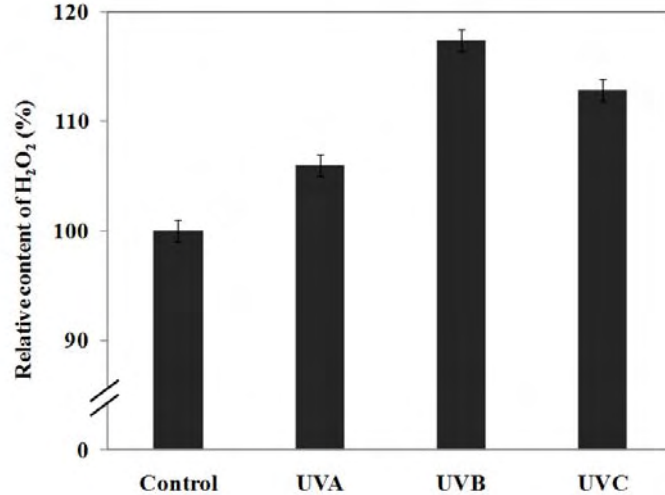
3.4 ปริมาณพอลิเอมีนที่เปลี่ยนแปลง จากรูปที่ 4 ช่างค้นพบว่า เมื่อเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* ได้รับความเสียหายเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วปริมาณพอลิเอมีนภายในเซลล์เปลี่ยนไป พบว่า UV-A ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณพอลิเอมีนรวม แต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของพอลิเอมีนภายในเซลล์ กล่าวคือ ปริมาณพอลิเอมีนอิสระเพิ่มสูงขึ้นและพอลิเอมีนรูปแบบบาวด์ลดลง ในทางกลับกัน UV-B และ UV-C มีผลทำให้ปริมาณพอลิเอมีนรวมลดลง 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่า พอลิเอมีนรวมที่ไม่ละลายในกรดเปอร์คลอริกนั้นโดยส่วนใหญ่คือ Spd ซึ่งได้รับผลกระทบจาก UV-B และ UV-C มากที่สุด สำหรับปริมาณ Put และ Spm นั้นพบน้อยมากเมื่อเทียบกับ Spd แต่เมื่อเซลล์ได้รับความเสียหาย ชนิด UV-B และ UV-C กลับพบว่าปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4B และ 4C)

3.6 ระดับของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ระดับของ H_2O_2 ภายในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญภายใต้รังสียูวีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเพิ่มขึ้น โดยเซลล์ที่ได้รับรังสี UV-B มีการสะสมปริมาณ H_2O_2 ภายในเซลล์สูงที่สุด (รูปที่ 6)

3.5 ระดับ mRNA ของ *adc1*, *adc2* และระดับโปรตีน ADC ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* ทรานสคริปต์ของอาร์จินีนดีคาร์บอกซิเลส คือ *adc1* และ *adc2* พบว่าทรานสคริปต์ของ *adc1* เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเซลล์ได้รับรังสี UV-A ขณะที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเซลล์ได้รับ UV-B และ UV-C (รูปที่ 5A และ 5B) ในทางกลับกัน รังสียูวีทั้งสามชนิดลดระดับทรานสคริปต์ของ *adc2* นอกจากนี้ยังพบว่า UV-C ส่งผลกระทบต่อระดับทรานสคริปต์ของ *adc* ทั้งสองชนิด ในขณะที่รังสี UV-B มีผลกระทบเล็กน้อย และไม่พบผลกระทบใด ๆ เลยเมื่อเซลล์ได้รับรังสี UV-A สำหรับระดับของโปรตีน ADC นั้นกลับพบว่า รังสียูวีทั้งสามชนิดกระตุ้นระดับของโปรตีน ADC (รูปที่ 5D)



รูปที่ 5 (A) การวิเคราะห์ RT-PCR ของระดับ mRNA ของ *adc1* และ *adc2* และ (C) การวิเคราะห์ด้วย Western Blot ของระดับโปรตีน ADC จากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญภายใต้แสงขาวและแสงยูวีเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง (B) เป็นกราฟแท่งแสดงอัตราส่วนความเข้มของแถบ โดยแท่งสีขาวคืออัตราส่วนของ *adc1/16S* rRNA แท่งสีเทาคืออัตราส่วนของ *adc2/16S* rRNA และแท่งสีดำคือ อัตราส่วนรวมของ *adc* ทั้งสองชนิด/*16S* rRNA สำหรับ (D) คือกราฟแท่งแสดงความเข้มของแถบโปรตีน ADC ที่ตรวจวัดโดยเครื่อง Syngene® Gel Documentation (Jantaro *et al.*, 2010)



รูปที่ 6 ปริมาณสัมพัทธ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญภายใต้แสงขาว (ชุดควบคุม) เปรียบเทียบรังสียูวีทั้งสามชนิดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่ารังสียูวีที่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ช่วงความยาวคลื่น คือ UV-A มีความยาวคลื่นในช่วง 320-390 นาโนเมตร, UV-B มีความยาวคลื่นในช่วง 280-320 นาโนเมตร และ UV-C มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 280 นาโนเมตร (Stapleton, 1992) โดยช่วงเวลาที่ได้รับรังสียูวีระยะสั้นคือ 1 ชั่วโมง ในการวิจัยครั้งนี้ ไม่สามารถฆ่าไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* ได้ (ดังรูปที่ 2) ซึ่งต่างจากฤทธิ์ของรังสียูวีโดยเฉพาะอย่างยิ่ง รังสี UV-C ที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ (Webb and Tuveson 1982; Bank *et al.* 1990) สำหรับการจัดเรียงตัวของผนังเซลล์นั้นมีลักษณะย่น (ดังรูปที่ 3) โดยเฉพาะกับเซลล์ที่ได้รับรังสี UV-A เนื่องจากรังสี UV-A สามารถทำให้เกิดการทำลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดย Reactive oxygen species (ROS) จะเข้าไปทำลายชีวโมเลกุลเป้าหมาย อาทิเช่น การเกิดลิพิดเพอรอกซิเดชันบริเวณเมมเบรน, โปรตีน หรือ DNA (Shimizu *et al.* 2006; He *et al.*, 2002) นอกจากนี้ ยังมีเคยมีรายงานว่า การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียได้รับผลกระทบมากด้วยรังสี UV-B (He and Häder 2002) แต่กลับพบว่าได้ผลตรงข้ามกันในการวิจัยนี้ ที่แสดงให้เห็นว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ยังสามารถอยู่รอดได้เมื่อได้รับรังสียูวีทั้งสามชนิดภายในระยะเวลาหนึ่งชั่วโมง

ระดับของคลอโรฟิลล์ เอ ภายในเซลล์ที่ได้รับรังสียูวีต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่เจริญภายใต้แสงขาว (รูปที่ 2C) ในช่วง 15 นาทีแรกพบว่า รังสียูวีสามารถทำลายคลอโรฟิลล์ เอ ภายในเซลล์ได้

แสดงให้เห็นปริมาณที่ลดลง โดยเฉพาะ UV-A และ UV-B ส่งผลกระทบต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ มากกว่า UV-C ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ในพืชชั้นสูง ที่พบว่า เมื่อพืชได้รับรังสี UV-B แล้ว ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง และประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงก็ลดลงด้วยเช่นกัน (Smith *et al.*, 2000) สำหรับรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์นั้นคล้ายกับรูปแบบของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ซึ่งลดลงในช่วง 15 นาทีแรก และคงที่หลังจากนั้นจนครบเวลาหนึ่งชั่วโมง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการรักษาสภาพการอยู่รอดของ *Synechocystis* มีแนวโน้มว่าเกี่ยวข้องกับการลดลงของปริมาณรงควัตถุด้วยเช่นกันจะเห็นได้จากผลการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ลดลงในรูปที่ 2

พอลิเอมีนชนิดสเปอร์มิดีน (Spd) เป็นพอลิเอมีนที่มีปริมาณมากที่สุดภายในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* โดยพบพิวเทรสเซิน (Put) และสเปอร์มิดีน (Spm) ในปริมาณน้อย (รูปที่ 4) และปริมาณของพอลิเอมีนภายในเซลล์จะเปลี่ยนแปลงได้ด้วยหลายเหตุปัจจัย อาทิเช่น สายพันธุ์ ภาวะกดดัน การทนต่อภาวะกดดัน และการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของเซลล์ ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่ศึกษาผลของภาวะกดดันจากสิ่งแวดล้อมต่อปริมาณพอลิเอมีนภายในเซลล์ อาทิเช่น ระดับของ Spd ในปริมาณสูงในภาวะกดดันไอออนิกและออสโมติกในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* (Jantaro *et al.*, 2003) และในใบของต้นยาสูบ *Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3 เมื่อได้รับรังสี UV-B (Lütz *et al.*, 2005) เป็นต้น นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของ Put ในเซลล์ *Synechocystis* ยังสามารถตรวจวัดได้ (ดังรูปที่ 4B) ซึ่ง Galson and Kaur-Sawhney (1995) ได้รายงานไว้ถึงความเป็นไปได้ว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณ Put เกี่ยวข้องกับการเร่งกระบวนการถ่ายแบบ (replication) ของ DNA และการแบ่งเซลล์ ดังนั้นในการเพิ่มขึ้นของ Put ภายในเซลล์เมื่อได้รับรังสียูวี โดยเฉพาะ Put ที่ละลายได้ในกรดเปอร์คลอริก (พอลิเอมีนรูปแบบอิสระ) อาจช่วยบรรเทาการทำลาย DNA โดยรังสี UV-B และ UV-C ได้ ส่วนปริมาณของ Spm (ในรูปที่ 4C) พบว่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับรังสียูวีเช่นกัน ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า Put และ Spm มีบทบาทหน้าที่ในการป้องกันเซลล์จากความเสียหายที่เกิดจากการได้รับรังสียูวี โดยจะเห็นได้ว่าบทบาทของ Spm ที่พบใน *Arabidopsis thaliana* เกี่ยวข้องกับภาวะธำรงดุลของ Ca^{2+} (Yamaguchi *et al.*, 2006) และภาวะธำรงดุลของ K^+/Na^+ ในต้นกล้าของบาร์เล่ย์ (Zhao *et al.*, 2007) นอกจากนี้ Spd ในรูปแบบบาวด์ยังมีปริมาณที่ลดลงภายในเซลล์ที่ได้รับรังสียูวี โดยเฉพาะ UV-B และ UV-C ที่น่าสนใจคือ การลดลงนี้ก็ไม่ได้เกิดการชดเชยพอลิเอมีนรูปแบบอิสระแต่อย่างใด ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการวัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ภายหลังได้รับรังสียูวีด้วยเช่นกัน (รูปที่ 6) โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงหนึ่งของการสลายพอลิเอมีนภายในเซลล์ (Yoda *et al.*, 2003) จึงเห็นว่าระดับของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเซลล์ที่ได้รับรังสี UV-B และ UV-C มีปริมาณเพิ่มขึ้น สิ่งที่น่าสนใจคือ เป็นไปได้หรือไม่ว่าพอลิเอมีนรูปแบบบาวด์จะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis*

6803 ซึ่งสังเกตได้จากผลของกิจกรรมการสังเคราะห์ด้วยแสง (รูปที่ 2B) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้ของ Sfichi และคณะ (2004) ที่พบว่าปริมาณของ Put และ Spm ที่เกี่ยวข้องกับเยื่อไทลาคอยด์จาก *Scenedesmus obliquus* ที่ได้รับรังสี UV-B เกิดการเปลี่ยนแปลงและส่งผลให้ light-harvesting complex II มีขนาดที่เปลี่ยนแปลงด้วย และยังพบว่า UV-B ยังสามารถทำลายไฟโคบิลิโซมในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* ด้วยเช่นกัน (Rinalducci *et al.*, 2006) ดังนั้นอาจเป็นไปได้หรือไม่ว่า การลดลงของ Spd รูปแบบवादในการทดลองนี้จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสูญเสียของไฟโคบิลิโซมที่ยึดจับหรือเกี่ยวข้องกับ Spd

ข้อมูลบนฐานข้อมูลจีโนมของ *Synechocystis* 6803 นั้นแสดงยีนจำนวน 2 ยีนที่เข้ารหัสอาร์จินีนดีคาร์บอกซิเลส (ADC) นั่นคือยีน *adc1* และ *adc2* ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนทั้งสองตัวภายใต้ภาวะกดดันเมื่อได้รับรังสียูวี ผลพบว่าการลดลงของระดับ mRNA รวมของ *adc* จากเซลล์ที่ได้รับรังสี UV-B และ UV-C เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง (รูปที่ 5A) ส่วน UV-A นั้นลดระดับ mRNA ของ *adc2* แต่เพิ่มระดับ mRNA ของ *adc1* ซึ่งการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของ *adc2* ส่งผลในการควบคุมการสังเคราะห์ Put ใน *Arabidopsis* (Urano *et al.*, 2004) จากผลการทดลองนี้ สามารถแนะนำได้ว่า *adc1* อาจจะมีบทบาทในการป้องกันรังสี UV-A โดยผลจะสอดคล้องกับปริมาณพอลิเอมีนในรูปที่ 4 และการลดลงของระดับ mRNA ของ *adc* รวมก็สอดคล้องกับการลดลงของปริมาณพอลิเอมีนรวมเช่นเดียวกัน แต่กลับพบว่าไม่สอดคล้องกับระดับโปรตีน ADC (รูปที่ 5B) ซึ่งเคยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานไว้ว่า การควบคุมที่แตกต่างกันของระดับการถอดรหัสและระดับการแปลรหัสนั้นสามารถเกิดขึ้นได้โดยเฉพาะในแบคทีเรีย และไซยาโนแบคทีเรียอย่างน้อยก็พบได้กับระดับของยีน *psaA* (Jantaro *et al.*, 2005) และ *potD* (Brandt *et al.*, 2010) ใน *Synechocystis* 6803

5. ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยในอนาคต

5.1 การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พอลิเอมีน เช่น *adc1* และ *adc2* โดยใช้กลวิธีพันธุวิศวกรรมเพื่อสร้างสายพันธุ์กลายของไซยาโนแบคทีเรีย และได้เข้าใจบทบาทหน้าที่และการควบคุมของยีนแต่ละชนิดที่ควบคุมภายใต้ภาวะกดดันต่าง ๆ

5.2 ศึกษาพอลิเอมีนรูปแบบवादที่เกี่ยวกับระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงในไซยาโนแบคทีเรีย โดยการสกัดและแยกสลายเยื่อไทลาคอยด์จากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียและตรวจติดตามปริมาณพอลิเอมีนที่ยึดเหนี่ยวหรือเกี่ยวข้องกับโปรตีนของระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง

5.3 การรออกแบบงานตีพิมพ์ ต้องใช้ระยะเวลา ดังนั้นจึงอาจจะทำให้เกิดการล่าช้าได้ ดังนั้นควรมีการวางแผนการขอรับทุน และคาดการณ์ช่วงเวลาในการทำวิจัย และการตีพิมพ์ผลงานอย่างดี และให้อยู่ภายในระยะเวลาที่ได้รับทุน

6. เอกสารอ้างอิง

1. Aziz, A., Brun, O. and Audran, J.C. 2001. Involvement of polyamines in the control of fruitlet physiological abscission in grapevine (*Vitis vinifera*). *Physiol. Plant.* 113 : 50-58.
2. Bank, H.L., John, J., Schmehl, M.K. and Dratch, R.J. 1990. Bactericidal effectiveness of modulated UV light. *Appl. Envi. Microbiol.* 56: 3888-3889.
3. Boardman, N.K. 1977. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28 : 355–377.
4. Bouchereau, A., Aziz, A., Larher F. and Martin-Tanguy, J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140 : 103-125.
5. Brandt, A.M., Raksajit, W., Yodsang, P. et al. 2010. Characterization of the substrate-binding PotD subunit in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Arch. Microbiol.* (in press)
6. Chamovitz, D., Sandmann, G. and Hirschberg, J. 1993. Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutants of cyanobacteria reveals that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 268 : 17348–17353.
7. Carley, E., Wolosiuk, R.A. and Hertig, C.M. 1983. Regulation of the activation of chloroplast fructose-1,6-bis phosphatase (E.C. 3.1.3.11). Inhibition by spermidine and spermine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115 : 707-710.
8. Feurstein, B.G. and Marton, L.G. 1989. Specificity and binding in polyamine/nucleic acid interactions. In: Bachrach, U., Heimer, Q.M. (Eds) *The Physiology of Polyamines*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 109-120.
9. Galston, A.W. and Kaur-Sawhney, R. 1995. Polyamines as endogenous growth regulators. In: Davies PJ (ed) *Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 158–178.
10. Geny, L., Broquedis, M., Martin-Tanguy, J., Soyer, J.P. and Bouard, J. 1997. Effects of potassium nutrition on polyamine content of various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 48 : 85-91.
11. He, Q., Dolganov, N., Björkman, O. and Grossman, A.R. 2001. The high light-inducible polyapeptides in *Synechocystis* PCC6803. *J. Biol. Chem.* 276 : 306-314.

12. He, Y-Y. and Häder, D-P. 2002. Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1: 729-736.
13. He, Y-Y., Klisch, M. and Häder, D-P. 2002. Adaptation of cyanobacteria to UV-B stress correlated with oxidative stress and oxidative damage. *Photochem. Photobiol.* 76: 188-196.
14. Heby, O. 1981. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19 : 1-12.
15. Ikeuchi, M. and Tabata, S. 2001. *Synechocystis* sp. PCC 6803 – a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosyn. Res.* 70 : 73-83.
16. Jacob, S.T. and Stetler, D.A. 1989. Polyamines and RNA synthesis. In: Bachrach, U., Heimer, Q.M. (Eds.) *The Physiology of Polyamines*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 23-40.
17. Jantaro, S., Mäenpää, P., Mulo, P. and Incharoensakdi, A. 2003. Content and biosynthesis of polyamines in salt and osmotically-stressed cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 228 : 129-135.
18. Jantaro, S., Incharoensakdi, A., Jansen, T. et al .2005. Effects of long-term ionic and osmotic stress conditions on photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Funct. Plant Biol.* 32:807–815.
19. Jantaro, S., Kidron, H., Chesnel, D., Salminen, T., Incharoensakdi, A., Mulo, P. and Mäenpää P .2006a. Structural modeling and environmental regulation of arginine decarboxylase in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* 184 : 397-406.
20. Jantaro, S., Ali, Q., Lone, A., and He., Q .2006b. Suppression of the lethality of high light to a quadruple hli mutant by the inactivation of the regulatory protein PfsR in *Synechocystis* PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 281 : 30865-30874.
21. Jantaro S, Pothipongsa A, Khanthasuwana S, Incharoensakdi A. Short-term UV-B and UV-C radiations preferentially decrease spermidine contents of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Current Microbiology*. DOI 10.007/s00284-010-9724-0.
22. Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain

- PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3: 109–136.
23. Lütz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H.K. et al .2005. Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid associated polyamine changes for UV-B protection. *Biochim. Biophys. Acta.* 1710 : 24–33
 24. Minocha, R., Smith, D.R., Reeves, C., Steele, K.D. and Minocha, S.C. 1999. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiol. Plant.* 105 : 155-164.
 25. Miyamoto, S., Kashiwagi, K., Ito, K., Watanabe, S. and Igarashi, K. 1993. Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 300 : 63-68.
 26. Mohamed, A. and Jansson, C. (1989) Influence of light in accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* 13 : 693-700.
 27. Moran, R. 1982. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-dimethylformamide. *Plant Physiol.* 69 : 1376–1381.
 28. Mulo, P., Eloranta, T., Aro, E-M. and Mäenpää, P. 1998. Disruption of a *spe*-like open reading frame alters polyamine content and *psbA-2* mRNA stability in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bot. Acta.* 111 : 71-76.
 29. Oshima, T. 1989. Polyamines in thermophiles. In: Bachrach U, Heimer YM (Eds) pp 35-46. *The Physiology of Polyamines*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
 30. Primikrios, N.I. and Roubelakis-Angelakis, K.A. 2001. Indications for post-translational regulation of *Vitis vinifera* L. arginine decarboxylase. *Plant Mol. Biol.* 45 : 669-678.
 31. Redmond JW, Tseng A (1979) High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J Chromatogr* 170:479–481.
 32. Rinalducci, S., Hideg, E., Vass, I. et al .2006. Effect of moderate UV-B irradiation on *Synechocystis* PCC 6803 biliproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341:1105–1112.
 33. Roy, M. and Ghosh, B. 1996. Polyamines, both common and uncommon, under heat stress in rice (*Oryza sativa*) callus. *Physiol. Plant.* 98 : 196-200.

34. Santa-Cruz, A., Acosta, M., Perez-Alfocea, F. and Bolarin, M.C. 1997. Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiol. Plant.* 101 : 341-346.
35. Shimizu, N., Hosogi, N., Hyon, G-S., Jiang, S., Inoue, K. and Park, P. 2006. Reactive oxygen species (ROS) generation and ROS-induced lipid peroxidation are associated with plasma membrane modifications in host cells in response to AK-toxin I from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *J. Gen. Plant Pathol.* 72: 6-15.
36. 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.
37. Smith, J.L., Burritt, D.J. and Bannister, P. 2000. Shoot dry weight, chlorophyll and UV-B-absorbing compounds as indicators of a plant's sensitivity to UV-B radiation. *Annals Bot.* 86: 1057-1063.
38. Smith, J., Burritt, D. and Bannister, P. 2001. Ultraviolet-B radiation leads to a reduction in free polyamines in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Growth Reg.* 35 : 289-294.
39. Song, J., Nada, K. and Tachibana, S. 2002. Suppression of S-adenosylmethionine decarboxylase activity is a major cause for high-temperature inhibition of pollen germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Plant Cell Physiol.* 43 : 619-627.
40. Stapleton, A.E. 1992. Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* 4: 1353-1358.
41. Tadolini, B., Cabrini, L., Varani, E. and Sechi, A.M. 1985. Spermidine binding and aggregation of vesicles of different lipid composition. *Biol. Amines* 3 : 87-92.
42. Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T. et al .2004. Arabidopsis stress inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 : 369-375.
43. Webb, R.B. and Tuveson, R.W. 1982. Differential sensitivity to inactivation of nur and nur+ strains of *Escherichia coli* at six selected wavekenghts in the UV-A, UV-B and UV-C ranges. *Photochem. Photobiol.* 36:525-530.

44. Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T. et al .2006. The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 580 : 6783–6788.
45. Yoda, H., Yamaguchi, Y. and Sano, H. 2003. Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol.* 132:1973–1981
46. Zhao, F., Song, C-P., He, J. et al .2007. Polyamines improve K⁺/Na⁺ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. *Plant Physiol.* 145:1061–1072.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

1. **Jantaro S**, Pothipongsa A, Khanthasuwana S, Incharoensakdi A. Short-term UV-B and UV-C radiations preferentially decrease spermidine contents of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Current Microbiology*. DOI 10.007/s00284-010-9724-0.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- **เชิงสาธารณะ** จากการทำวิจัยเรื่องพอลิเอมีนต่อเนื่องมา ขณะนี้เริ่มมีเครือข่ายความร่วมมือกับอาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อนำพอลิเอมีนที่ผลิตได้จากไซยาโนแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยทางด้าน Post-Harvest Technology ที่ช่วยยืดอายุการเก็บผลไม้ เป็นต้น
- **เชิงวิชาการ** งานวิจัยที่ผ่านมาและกำลังดำเนินอยู่ มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งที่จะทำให้ข้าพเจ้าสามารถสร้างบัณฑิตและมหาบัณฑิตในวงการวิจัยพอลิเอมีน และทำให้นิสิตที่จบไปได้เรียนรู้ การคิดวิเคราะห์ และเพิ่มทักษะในการทำงานวิจัยเพิ่มมากขึ้น

3. อื่น ๆ

3.1 บทความวิชาการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ จำนวน 1 เรื่อง

1. เสาวรัตน์ จันทะโร. 2552. กลไกตอบสนองของไซยาโนแบคทีเรียต้านภาวะเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูง. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 37 : 121-129.

3.2 การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ (ที่เกี่ยวข้องกับหัวข้อวิจัยในโครงการนี้)

1. Chaichana Piyamawadee, Orawan Sodsuyay, and **Saowarath Jantaro**. (2010) Influence of external polyamines on changes in hydrogen peroxide content, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation under UV radiations in *Synechocystis* 6803. The 18th Science Forum 2010 on 11th -12th March, 2010, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. (Poster presentation)
2. **Saowarath Jantaro**. (2010) Polyamines in cyanobacterium *Synechocystis* 6803. Cyanobacteria & Algae Biotechnology Symposium (CABS2010) on 31st March, 2010, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. (Oral presentation)

3. Apiradee Pothikongsa, Aran Incharoensaksi, and **Saowarath Jantaro**. (2009) Polyamine pattern under UV-A and osmotic stresses in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. The 3rd Botanical Conference of Thailand March 25-27, 2009. Department of Plant science, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand. (Poster presentation)
4. Apiradee Pothikongsa, Aran Incharoensaksi, and **Saowarath Jantaro**. (2008) The combination of UV-stress and moderate salinity upon intracellular pigments in *Synechocystis* 6803. The 13th Biological Sciences Graduate Congress December 15-17, 2008. National University of Singapore. (Poster presentation)
5. **Saowarath Jantaro**, Suparaporn Khanthasuwana and Aran Incharoensaksi (2008) Fluctuation of free and bound polyamines for the survival of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under UV-radiations. 20th FAOBMB Taipei Symposium October 23-25, 2008. National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan. (Poster presentation)
6. **Saowarath Jantaro**, Suparaporn Khanthasuwana, Pirkko Mäenpää, Aran Incharoensaksi. (2008) Different responses of free- and bound- polyamines under environmental stresses in *Synechocystis* 6803. The 34th Congress on Science and Technology of Thailand. 29 Oct – 2 Nov, 2008. Bangkok, Thailand. (Oral presentation)
7. Apiradee Pothikongsa, Aran Incharoensaksi, and **Saowarath Jantaro**. (2008) Alteration of intracellular pigment contents in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under UV-stress response. The 34th Congress on Science and Technology of Thailand. 29 Oct – 2 Nov, 2008. Bangkok, Thailand. (Poster presentation)
8. Kuntasuwan, S. and **Jantaro, S.** UV-radiation effects upon the polyamine content in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. The 16th Science Forum 2008 on 13rd -14th March, 2008, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (Oral and poster presentation).

3.3 หนังสือ จำนวน 1 เรื่อง

1. Incharoensakdi A, **Jantaro S**, Raksajit W et al (2010) Polyamines in cyanobacteria: biosynthesis, transport and abiotic stress response. In: Me´ndez-Vilas A (ed) Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Microbiology book series, Formatex, Spain (in press).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Short-Term UV-B and UV-C Radiations Preferentially Decrease Spermidine Contents and Arginine Decarboxylase Transcript Levels of *Synechocystis* sp. PCC 6803

Saowarath Jantaro · Apiradee Pothipongsa ·
Suparaporn Khanthasuwana · Aran Incharoensakdi

Received: 6 May 2010 / Accepted: 20 July 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract To investigate the short term effect of ultraviolet (UV) radiations on changes in pigments and polyamine contents, *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells after exposure to UV-radiation were extracted by dimethylformamide and perchloric acid for pigments and polyamines determination, respectively. Cell growth was slightly decreased after 1 h exposure to UV-A and UV-B radiations. UV-C had little effect on cell growth despite the decrease of photosynthetic rate by about 18%. UV-A and UV-B decreased the contents of chlorophyll a and carotenoids whereas UV-C decreased chlorophyll a but had no effect on carotenoids. Spermidine contents were unaffected by UV-A, in contrast to the reduction of 25 and 50% by UV-B and UV-C, respectively. All three types of UV-radiation particularly reduced perchloric acid-insoluble spermidine. Importantly, putrescine and spermine which accounted for less than 1% of intracellular polyamines were increased by about three- to eight-fold by UV-B and UV-C, respectively. The changes in polyamines contents by UV-B and UV-C were consistent with the changes in transcript levels of arginine decarboxylase mRNA, but not with the protein levels. The decrease in the transcripts of *adc2* but not *adc1* was observed with UV-B and UV-C treatments.

Abbreviations

ADC Arginine decarboxylase
PCA Perchloric acid
Put Putrescine

Spd Spermidine
Spm Spermine
UV Ultraviolet

Introduction

One widespread consequence of the global warming has led to the ozone depletion caused by the greenhouse gas chlorofluorocarbon [24] and halogens [37]. In general, UV-radiations classified into UV-C (below 280 nm), UV-B (280–320 nm), and UV-A (320–390 nm) are attenuated by the stratospheric ozone layer [41]. With the depletion of ozone layer, enhanced shortwave ultraviolet (UV)-radiations in sunlight then could penetrate directly to the Earth's surface [8]. The detrimental attack of UV radiations involves either direct DNA damage or indirect oxidative damage from potentially reactive oxygen species (ROS) [16]. Most plants are sensitive to increased UV-B radiation due to the damages on structural and functional organization of photosynthetic systems [2], electron transport capacity [6], and light-harvesting complex [32]. On the other hand, the growth and photosynthesis of most marine phytoplanktons and aquatic organisms are inhibited by UV-A radiation [10, 22]. Not only bacterial cells are stressed by UV-C radiation, but also plants which bear the morphological and anatomical changes such as leaf thickening, necrosis of leaves, and inhibition of stem leaf elongation [27, 31].

The molecular mechanisms in vivo to release the UV stresses include, but not limited to, UV-absorbing compound (mycosporine) accumulation [40], increase of antioxidant enzymes and antioxidants [33]. The plant growth regulators, polyamines, have also been widely studied

S. Jantaro · A. Pothipongsa · S. Khanthasuwana ·
A. Incharoensakdi (✉)
Laboratory of Cyanobacterial Biotechnology,
Department of Biochemistry, Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
e-mail: aran.i@chula.ac.th

against the environmental insults such as ionic and osmotic stresses [20], drought and cold temperature [5]. Recently, there were reports about the association of polyamines in response to UV-B stress in a unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* [34], and the reduction of free polyamines in *Phaseolus vulgaris* L. cv “Top Crop” under UV-B illumination which might relate to the strategy of cell adaptation [39]. Since the exact function of polyamines in relation to environmental stresses was largely unknown, polyamines were proposed experimentally to be a growth regulator in plant [13], free radical scavenger [15], and stress-related injury reducer [11].

In this study, we investigated the short-term effect of each UV class (UV-A, UV-B, and UV-C) on a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 with regard to the extent of cell growth, photosynthetic activities, cellular pigments, and especially the changes of polyamine levels including transcription and translation levels of arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for polyamines.

Materials and Methods

Culture Conditions and UV Treatments

Liquid BG₁₁ medium was employed to cultivate *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells at 30°C and bubbled with filtered air under continuous white light of 40–50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The optical density was measured at 730 nm to monitor cell growth. Cells during mid-logarithmic growth phase with OD_{730nm} of 0.8–1.0 were collected and subsequently diluted to OD_{730nm} of 0.5 for the next step of UV treatments. Cell suspensions were confined in an opened flat-bottom chamber with 1 cm depth of medium exposed under UV single lamps (UVLMS-38 EL SERIES UV LAMPS, UVP) including UV-A at 365 nm (intensity of 11.0–13.0 W m^{-2}), UV-B at 302 nm (intensity of 1.2–1.3 W m^{-2}) and UV-C at 254 nm (intensity of 1.0–1.3 W m^{-2}) at 30°C for different time intervals.

Determinations of Chlorophyll, Carotenoids Contents, and Oxygen Evolution

Intracellular pigment contents were extracted in 1 ml of dimethylformamide from *Synechocystis* cell pellets of 1 ml cell suspension culture (10^6 – 10^8 cells ml^{-1}). The extracted solution was centrifuged at 2,790g, 4°C for 10 min before transferring the supernatant to a new tube. Carotenoids and chlorophyll a contents were determined according to the methods of Chamovitz et al. [9] and Moran [26], respectively. A Clark-type oxygen electrode was employed for oxygen evolution measurement (YSI 5300A, YSI Inc., USA) at 30°C [19].

Polyamine Extraction and HPLC Detection

Perchloric acid (5%, 1 ml) was used to extract *Synechocystis* cells of 100 mg pellets. After one hour-incubation on ice, the acid extracted solution was centrifuged at 2,790g for 20 min. Both perchloric acid-soluble and insoluble fractions (hereafter, free and bound forms, respectively) were collected and the total polyamines were derivatized by benzylation [30] adapted for *Synechocystis* cells by Jantaro et al. [20] using 1,6-hexanediamine as an internal standard. The polyamine derivatives were quantified by high performance liquid chromatography using a C-18 reverse phase column (4.6 \times 150 mm inertsil[®] ODS-3, 5 μm i.d., GL Sciences Inc., USA) with a UV-Vis detector (254 nm). The elution by a gradient of methanol:water (60–100%) was performed at room temperature for 25 min at a flow rate of 0.5 ml min^{-1} .

The Analysis of RNA

The hot phenol method by Mohamed and Jansson [25] was used to isolate the total RNA from harvested *Synechocystis* cells, treated with RNase-Free DNase (Invitrogen, USA). Total RNA was reverse-transcribed into cDNAs using SuperScript[™] III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA) and 3' primer followed by PCR. The Cyanobase-designed primers for *adc1* gene were 5'-ATATTACC TGCGACAGTGATGG-3' and 5'-GATCAAGGCTAACT C-CGTATGAC-3' whereas two primers for *adc2* were 5'-ATATTACCTGCGACAGTG-ATGG-3' and 5'-TTAG CTGGTGTGGATGCCT-3'. The primers for reference gene of *16S* rRNA were also designed specifically; 5'-AGT TCTGACGGTACCTGATGA-3' and 5'-GTCAAGCCTT GGTAAGGTTCT-3'. The polymerase chain reaction was performed according to Jantaro et al. [20], except for the primer annealing at 50.7°C (*adc1* primers), 64°C (*adc2* primers) and 56°C (*16S* rRNA primers). The quantification of PCR products was done using Syngene[®] Gel Documentation (Syngene, USA).

The Analysis of Protein

Total protein was extracted from 100 ml-harvested *Synechocystis* cells. Ten milligram of total protein was loaded onto SDS-PAGE with 12% separating and 5% stacking gels. Western blot analysis was done by transferring protein bands on SDS-PAGE gel to immobilon[™] PVDF transfer membrane (Millipore Corporation, USA) and a chemiluminescence kit (BioRad) was used for immunodetection. Blots were probed with ADC antibodies raised against the N-terminus of ADC polypeptide (amino acids 652–659). Quantification was carried out using GeneSnap program of Syngene[®] Gel Documentation (Syngene, USA).

Statistics

The experiments were independently performed at least three times. The data are presented as means \pm standard deviation (SD).

Results

Growth and Pigment Contents of *Synechocystis* Cells Under UV Exposure

Cell growth under normal growth light (white light) of 40–50 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ increased gradually within 1 h while the UV-stressed cells had a slightly reduced growth rate (Fig. 1a). A short term 1 h exposure to various strong UV-irradiations did not much affect the *Synechocystis* cell growth. However, the net photosynthetic rates were decreased about 16, 10, and 18% by UV-A, UV-B and UV-C, respectively (Fig. 1b).

Under normal white light condition, *Synechocystis* cells had higher chlorophyll a content than those of cells under three types of UV-radiation (Fig. 1c). The levels of

chlorophyll a decreased rapidly within the first 15 min under UV exposures. However, after 15 min, chlorophyll a levels under either normal white light or UV exposures were apparently constant up to one hour. UV-A and UV-B exposures at the doses of 11–13 and 1.2–1.3 W m^{-2} , respectively, for 60 min showed the most pronounced decrease of chlorophyll a compared to that by UV-C at the dose of 1.0–1.3 W m^{-2} . UV-A and UV-B reduced markedly intracellular carotenoids after 15 min treatment (Fig. 1d). No apparent changes were observed after 15 min up to 60 min exposure. UV-B exposure for 60 min caused a lower level of carotenoids than by UV-A. UV-C had no effect on carotenoids contents.

UV Radiations Affect Polyamine Accumulation

UV-A had no effect on total polyamine contents although there was an increase and a decrease in PCA-soluble and PCA-insoluble polyamines, respectively (Fig. 2a). Both UV-B and UV-C reduced total polyamines by 25 and 50%, respectively. The PCA-insoluble polyamine, represented mainly by Spd, was particularly affected by UV-B and UV-C (Fig. 2a). The levels of Put and Spm were extremely

Fig. 1 Relative OD₇₃₀ (%) (a), relative oxygen evolution (%) (b), contents of chlorophyll a (c), and total carotenoids (d) of *Synechocystis* cells exposed up to 1 h to normal growth light of 40–50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (closed square) and different UV radiations including UV-A (open square), UV-B (open circle), and UV-C (open triangle). The OD₇₃₀ and oxygen evolution that corresponded to 100% was 0.5 and 101 \pm 9 $\mu\text{mol O}_2 \text{mg}^{-1} \text{chl h}^{-1}$, respectively. The data are means \pm SD, $n = 3$

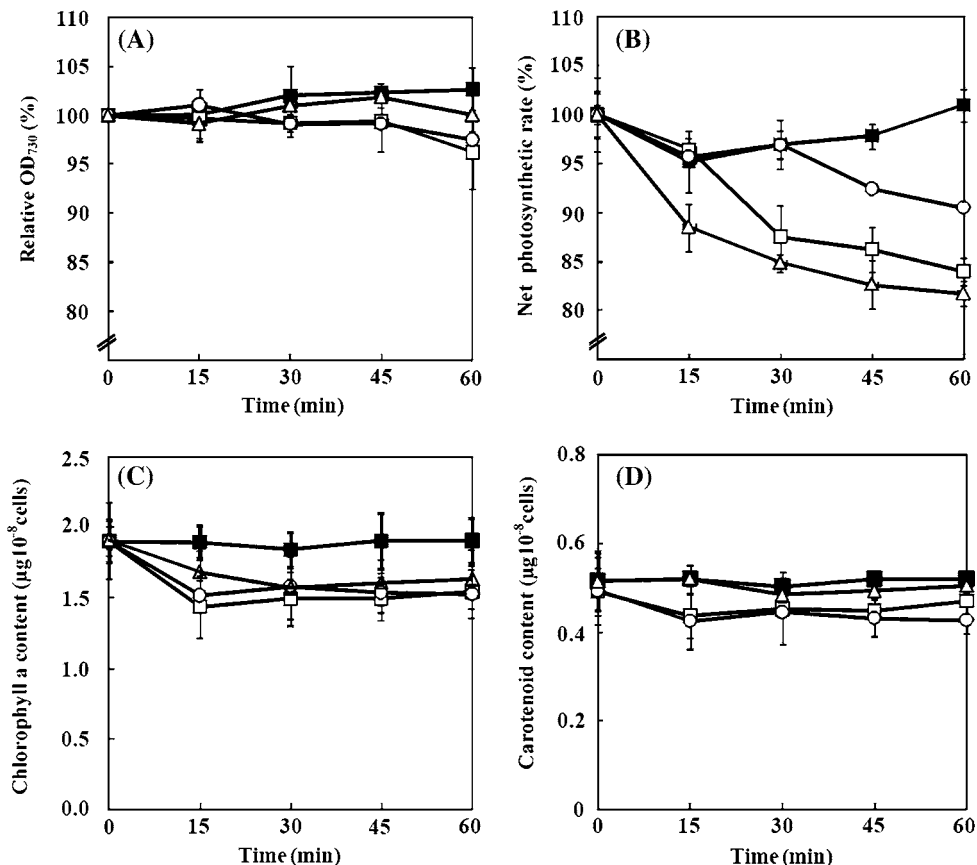
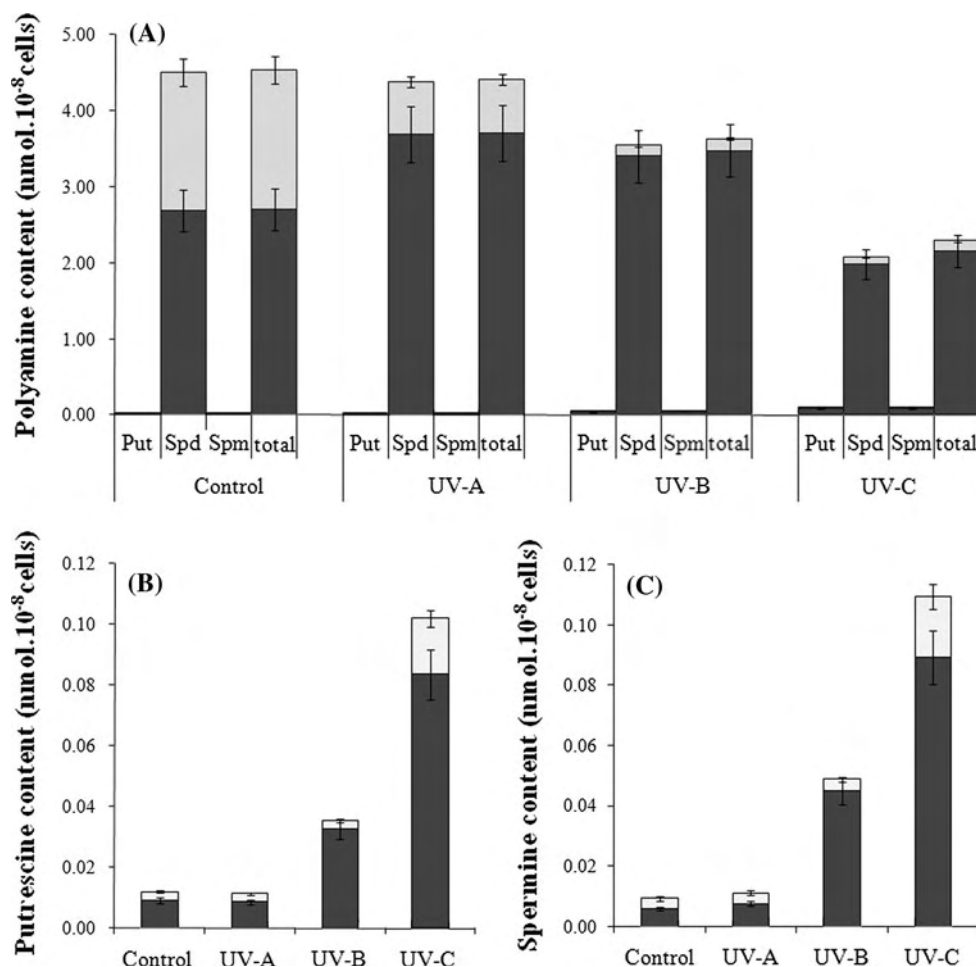


Fig. 2 The contents of polyamines including putrescine (*Put*), spermidine (*Spd*), and spermine (*Spm*) from *Synechocystis* cells (a) which were under different UV radiations for 1 h. **b, c** The enlarged scales from **a** of the trace amounts of *Put* and *Spm* accumulations under the three UV radiations, respectively. Cells grown under normal growth light represent a reference control. The *open bar* represents insoluble-PCA content of polyamines whereas the soluble-PCA content or free form of polyamines is shown in *solid bar*. The experimental data are shown as means \pm SD, $n = 3$



low, both accounting for about 0.01 nmol 10^{-8} cells (Figs. 2b, c) whereas *Spd* levels were about 450-fold higher (Fig. 2a). However, both UV-B and UV-C but not UV-A had a strong stimulatory effect on the accumulation of *Put* and *Spm*, a three-fold and eight-fold increase by UV-B and UV-C, respectively (Figs. 2b, c). This increase was particularly observed in PCA-soluble fraction.

UV Radiations Affect *adc* Transcripts and ADC Levels

Two transcripts of arginine decarboxylase, *adc1* and *adc2*, were detected by RT-PCR after 1 h exposures to either normal white light or UV radiations (Fig. 3a). The *adc1* transcript was increased significantly by UV-A while no changes were observed by UV-B and UV-C (Fig. 3b). The three UV radiations decreased *adc2* transcripts. The total *adc* transcripts were markedly decreased by UV-C followed by UV-B whereas UV-A had little or no effect. As shown in Fig. 3c, ADC protein was detected using ADC-specific antibody. All three UV radiations increased the level of ADC protein (Fig. 3d).

Discussion

Short-term exposure to all three UVs did not kill the cyanobacterial cells in this study (Fig. 1a). This was in contrast to what was observed in bacteria where UV-C illumination killed bacteria within a minute-time period [1]. The cell wall of *Synechocystis* cells showed the ruffled appearance (data not shown), mostly caused by UV-A exposure generating an indirect oxidative damage caused by reactive oxygen species (ROS)-induced lipid peroxidation of the membrane [36]. The cell wall of cyanobacteria *Synechocystis* strain was identified as gram negative-like [21] consisting of neutral sugars, amino sugars, proteins, and lipids. This suggested that the cell wall-disarrangement occurred as a result of the damage of the biochemical composition such as proteins and lipids of *Synechocystis* cell wall structure by UV-A-induced ROS. Thus, we could observe that during 60 min of UV-exposure, UV-A likely changed the physiological appearance and reduced the survival ability of *Synechocystis* cells stronger than those by other shorter wavelength-UVs.

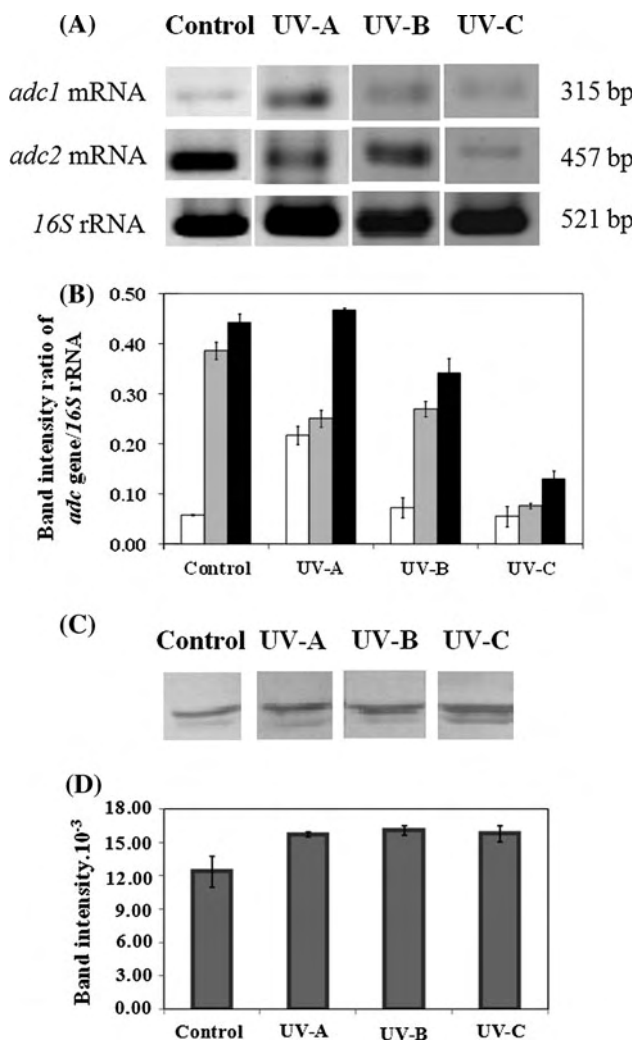


Fig. 3 RT-PCR analyses (a) of *adc1* and *adc2* mRNA levels and western blot analysis (c) of ADC protein levels in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under different UV radiations for 1 h. **a** RT-PCR from cells under control (normal growth light) and different UV radiations. **b** The ratio of *adc* mRNA/16S rRNAs \pm SD is shown; *adc1* mRNA/16S rRNAs (open bar), *adc2* mRNA/16S rRNAs (shaded bar) and total *adc1,2* mRNAs/16S rRNAs (solid bar). **c** Western blot analysis with cells under control (normal growth light) and various UV-radiations. Total protein (10 μ g) from each sample was loaded onto SDS-PAGE gel, and later transferred to PVDF membrane to be probed with the ADC antibody. **d** Band intensity was quantified using Syngene[®] Gel Documentation. The data represent means \pm SD, $n = 3$

Chlorophyll a levels were lowered by all UVs treatments as compared to that by white light treatment (Fig. 1c). In particular during the first 15 min, UV radiations attacked *Synechocystis* cells with the resultant loss of about 20–25% chlorophyll a from the initial level. This indicated that UV radiations, especially UV-A and UV-B quickly target the intracellular pigment chlorophyll a of *Synechocystis*. These results are in agreement with the reduction of chlorophyll content and photosynthetic efficiency in chloroplast of

higher plants in response to UV-B radiation [2, 3, 38]. The pattern of the changes of carotenoids contents in response to UV radiations was similar to that observed for chlorophyll, a rapid decrease in the first 15 min and remained relatively unchanged up to 60 min (Fig. 1d). This indicated that under UV radiations the maintenance of both chlorophyll and carotenoids levels was crucial for the survival of *Synechocystis*. The slight reduction of growth rate under UV treatments observed in Fig. 1a supports this contention.

Spermidine is a dominant polyamine in *Synechocystis* cells whereas only trace amounts of Put and Spm were observed (Fig. 2). However, the dominant polyamine in each organism can be either the same or different pattern depending on strains, stress tolerance, and their changing environments. Our results are in line with a previous report showing an outstanding level of Spd in *Synechocystis* cells under ionic and osmotic stresses [20], and also with that from the leaves of *Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3 but not with Bel B in response to 7-day exposure to UV-B radiation [23]. On the contrary, high Put level was found in UV-B treated plant *Phaseolus vulgaris* L. [39], and in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana*) callus cultures under UV-C stress [46]. This indicated that the change of total polyamines in response to environmental stress reflected the change of each dominant polyamine in vivo [5, 14, 17]. The level of Put (Figs. 2a, b) though present in trace amount, was remarkably induced after exposing to UV-B and UV-C for 1 h. Drastic increase in Put level was also observed for isolated thylakoids of *Nicotiana tabacum* L. cv Bel B after 3-day exposure to UV-B radiation [23]. Galson and Kaur-Sawhney [12] previously reported that the increased Put level was possibly related with the acceleration of DNA replication and cell division. Thus, the increased Put level, in particular PCA-soluble Put, in our study may probably help alleviate the DNA damage by both UV-B and UV-C. Moreover, the addition of external Put was found to stimulate the growth of *Synechocystis* cells under moderate salt stress [29]. Spermine contents in both PCA-soluble and insoluble fractions were enhanced apparently by UV-C, similar results to those observed for Put (Figs. 2b, c). Therefore, both Put and Spm might play a role in the protection of cells against UV-C irradiation. Under salt stress, cells lacking Spm developed the imbalance of Ca^{2+} homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [44] and K^+/Na^+ homeostasis in barley seedlings [47] or even showed up-regulation of Put and Spm contents in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [20]. Interestingly, though the level of PCA-insoluble bound form of Spd was decreased by all types of UVs, the level of total Spd under UV-A radiation remained unchanged due to the compensation by the increase of the free form of Spd. This was not the case for the effect exerted by UV-B and UV-C. The decrease in the bound-Spd was not compensated by the increase in the

free-Spd suggesting the transformation of bound-Spd to other metabolites in response to UV-B and UV-C radiations. In this respect, it should be mentioned that the increased level of H₂O₂, a degradation product of polyamine [45], was found in *Synechocystis* after one hour exposure to UV-B and UV-C radiations (data not shown). Studies in a green alga *Scenedesmus obliquus* showed a twofold increase in thylakoid-associated Spm after 3-h exposure to UV-B which was due to the polyamination of PSII antenna [35]. It is worth investigating the effect of UV-radiation on the regulation of transglutaminase, the enzyme responsible for covalent conjugation of polyamines to proteins [18] in *Synechocystis*. Further experiments are under way to explore how polyamination of thylakoid or plasma membrane proteins can account for the changes of bound polyamines in *Synechocystis* under UV-stress. The decrease of photosynthetic activities after 1 h exposures to the three UV-radiations (Fig. 1b) was in line with the decrease of bound Spd (Fig. 2a). On the other hand, the increase in the free Spd by UV-A and UV-B had no protective effect against the irradiation-induced reduction in photosynthetic activities. This raises the possibility that Spd in the bound form rather than the free form has a role in the regulation of photosynthesis in *Synechocystis*. Changes in the thylakoid-associated Put and Spm were reported for UV-B treated *Scenedesmus obliquus* which led to changes in the size of light-harvesting complex II with consequent amplification of UV-B effects on the photosynthetic apparatus [34]. UV-B radiation was shown to induce damages to phycobilisomes of *Synechocystis* cells by causing the degradation of phycobiliproteins [32]. At present, it is not known to what extent that polyamines inside *Synechocystis* are bound to phycobilisomes through polyamination of phycobiliproteins. The decrease of bound Spd by UV-B treatment observed in Fig. 2a might be partly attributed to the loss of Spd-bound phycobiliproteins.

Our findings demonstrated the decrease of total *adc* mRNA level under 1 h UV-B and UV-C exposures compared to that of cells grown under normal growth light (Fig. 3b). UV-A also decreased *adc2* but increased *adc1* transcript levels. The *adc2* was responsive to all three classes of UV-radiation, with marked effect by UV-C (Fig. 3b). The biosynthesis of Put under stress conditions in *Arabidopsis* was controlled by the induction of *adc2* but not *adc1* gene [42]. In *Synechocystis*, the transcript of *adc1* was insensitive to UV-B and UV-C but was increased by UV-A indicating differential regulation of *adc* genes under different UV subtypes. This suggests that *adc1* may play a protective role against UV-A radiation due to an increase in polyamine biosynthesis which is consistent with an increase in free polyamine by UV-A as shown in Fig. 2a. The decrease of total *adc* mRNA levels by UV-B and UV-C (Fig. 3b) was correlated with the decrease of total

polyamine contents in vivo (Fig. 2a), but not with the ADC protein levels (Fig. 3d). The different regulation of transcriptional and translational mechanisms was previously reported for *psaA* [19] and *potD* [7] genes in *Synechocystis* under various abiotic stresses. *Synechocystis* cells harbor two genes, *adc1* and *adc2* coding for ADC based on Cyanobase but there are no putative genes for spermidine synthase, spermine synthase and S-adenosylmethionine decarboxylase [17]. The distribution of both ADC and ornithine decarboxylase (ODC) enzymes in different organism species is regulated in a developmental and tissue specific manner [28]. ODC in animals and plants is localized in both cytoplasm and nucleus [43] whereas ADC appears localized in chloroplasts [4]. However, at present, the localization of ADC in *Synechocystis* is still unclear.

Acknowledgments The ADC antibody was provided by Dr. Nanthika Kongcharoenporn, The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University. This work was supported by TRF-CHE Research Grant for New Scholar, the Thailand Research Fund (TRF) in conjunction with the Commission on Higher Education (CHE), Ministry of Education, Thailand, and start-up fund provided by Chulalongkorn University to S.J. The support from CHE (university staff development consortium) and from the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK 2555) under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture (PER FECTA) to A.I. are also acknowledged.

References

1. Bank HL, John J, Schmehl MK et al (1990) Bactericidal effectiveness of modulated UV light. *Appl Environ Microbiol* 56: 3888–3889
2. Barbato R, Bergo E, Szabò I et al. (2000) Ultraviolet B exposure of whole leaves of barley affects structure and functional organization of photosystem II. *J Biol Chem* 275:10976–10982
3. Bavcon J, Gaberščik A, Batič F (1996) Influence of UV-B radiation on photosynthetic activity and chlorophyll fluorescence kinetics in Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings. *Trees* 10:172–176
4. Borrell A, Culiañez-Macià FA, Altabella T et al (1995) Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. *Plant Physiol* 109: 771–776
5. Bouchereau A, Aziz A, Larher F et al (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140: 103–125
6. Brandle JR, Campbell WF, Sisson WB et al (1977) Net photosynthesis, electron transport capacity, and ultrastructure of *Pisum sativum* L. exposed to ultraviolet-B radiation. *Plant Physiol* 60: 165–169
7. Brandt AM, Raksajit W, Yodsang P et al. (2010) Characterization of the substrate-binding PotD subunit in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Arch Microbiol* (in press)
8. Caldwell MM, Teramura AH, Tevini M (1989) The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends Ecol Evol* 4:363–367
9. Chamovitz D, Sandmann G, Hirschberg J (1993) Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutants of cyanobacteria reveals that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis. *J Biol Chem* 268:17348–17353

10. Cullen JJ, Neale PJ, Lesser MP (1992) Biological weighting function for the inhibition of phytoplankton photosynthesis by ultraviolet radiation. *Science* 258:646–650
11. Evans PT, Malmberg RL (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 235–529
12. Galston AW, Kaur-Sawhney R (1995) Polyamines as endogenous growth regulators. In: Davies PJ (ed) *Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 158–178
13. Garcia-Jimenez P, Rodrigo M, Robaina RR (1998) Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol interaction on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia* cultured in vitro. *J Appl Phycol* 10:95–100
14. Groppa MD, Benavides MP (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34:35–45
15. Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P et al (1998) The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11140–11145
16. He Y-Y, Häder D-P (2002) Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochem Photobiol Sci* 1:729–736
17. Incharoensakdi A, Jantaro S, Raksajit W et al (2010) Polyamines in cyanobacteria: biosynthesis, transport and abiotic stress response. In: Méndez-Vilas A (ed) *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Microbiology book series, Formatex, Spain (in press)
18. Ioannidis NE, Ortigosa SM, Veramendi J et al (2009) Remodeling of tobacco thylakoids by over-expression of maize plastidial transglutaminase. *Biochim Biophys Acta* 1787:1215–1222
19. Jantaro S, Incharoensakdi A, Jansén T et al (2005) Effects of long-term ionic and osmotic stress conditions on photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Funct Plant Biol* 32:807–815
20. Jantaro S, Mäenpää P, Mulo P et al (2003) Content and biosynthesis of polyamines in salt and osmotically stressed cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett* 228:129–135
21. Jürgens U, Golecki JR, Weckesser J (1985) Characterization of the cell wall of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Arch Microbiol* 142:168–174
22. Kim D-S, Watanabe Y (1993) The effect of long wave ultraviolet radiation (UV-A) on the photosynthetic activity of natural population of freshwater phytoplankton. *Ecol Res* 8:225–234
23. Lütz C, Navakoudis E, Seidlitz HK et al (2005) Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. *Biochim Biophys Acta* 1710:24–33
24. McFarland M, Kaye J (1992) Chlorofluorocarbons and ozone. *Photochem Photobiol* 55:911–929
25. Mohamed A, Jansson C (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol Biol* 13:693–700
26. Moran R (1982) Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with *N,N*-dimethylformamide. *Plant Physiol* 69:1376–1381
27. Rahmatzadeh S, Khara J (2007) Anatomical and morphological changes caused by interaction between UV-C radiation and colonized wheat by some species of arbuscular mycorrhizas. *J Biol Sci* 7:1001–1004
28. Regunathan S, Reis DJ (2000) Characterization of arginine decarboxylase in rat brain and liver: distinction from ornithine decarboxylase. *J Neurochem* 74:2201–2208
29. Raksajit W, Mäenpää P, Incharoensakdi A (2006) Putrescine transport in a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biochem Mol Biol* 39:394–399
30. Redmond JW, Tseng A (1979) High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J Chromatogr* 170:479–481
31. Ries G, Buchholz G, Frohnmeyer H et al (2000) UV-damage mediated induction of homologous recombination in *Arabidopsis* is dependent on photosynthetically active radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13425–13429
32. Rinalducci S, Hideg É, Vass I et al (2006) Effect of moderate UV-B irradiation on *Synechocystis* PCC 6803 biliproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 341:1105–1112
33. Santos I, Fidalgo F, Almeida JM et al (2004) Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. *Plant Sci* 167:925–935
34. Sfichi L, Ioannidis N, Kotzabasis K (2004) Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complex II changes. *Photochem Photobiol* 80:499–506
35. Sfichi-Duke L, Ioannidis NE, Kotzabasis K (2008) Fast and reversible response of thylakoid-associated polyamines during and after UV-B stress: a comparative study of the wild type and a mutant lacking chlorophyll *b* of unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. *Planta* 228:341–353
36. Shimizu N, Hosogi N, Hyon G-S et al (2006) Reactive oxygen species (ROS) generation and ROS-induced lipid peroxidation are associated with plasma membrane modifications in host cells in response to AK-toxin I from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *J Gen Plant Pathol* 72:6–15
37. Simpson WR, von Glasow R, Riedel K et al (2007) Halogens and their role in polar boundary-layer ozone depletion. *Atmos Chem Phys* 7:4375–4418
38. Smith JL, Burritt DJ, Bannister P (2000) Shoot dry weight, chlorophyll and UV-B-absorbing compounds as indicators of a plant's sensitivity to UV-B radiation. *Ann Bot* 86:1057–1063
39. Smith JL, Burritt DJ, Bannister P (2001) Ultraviolet-B radiation leads to a reduction in free polyamines in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Growth Regul* 35:289–294
40. Sommaruga R, Libkind D, van Broock M et al (2006) Mycosporine-glutaminol-glucoside, a UV-absorbing compound of two *Rhodotorula* yeast species. *Yeast* 21:1077–1081
41. Stapleton AE (1992) Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* 4:1353–1358
42. Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T et al (2004) *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem Biophys Res Commun* 313:369–375
43. Voigt J, Deinert B, Bohley P (2000) Subcellular localization and light-dark control of ornithine decarboxylase in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol Plant* 108:353–360
44. Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T et al (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 580:6783–6788
45. Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H (2003) Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol* 132:1973–1981
46. Zacchini M, de Agazio M (2004) Spread of oxidative damage and antioxidative response through cell layers of tobacco callus after UV-C treatment. *Plant Physiol Biochem* 42:445–450
47. Zhao F, Song C-P, He J et al (2007) Polyamines improve K⁺/Na⁺ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. *Plant Physiol* 145:1061–1072

ภาคผนวก ข
บทความวิชาการในวารสารวิชาการในประเทศ

กลไกตอบสนองของไซยาโนแบคทีเรียต้านภาวะเครียด จากแสงที่มีความเข้มสูง

Responsive Mechanisms of Cyanobacteria against Intense Light Stress

เสาวรัตน์ จันทะโร ^{1*}

บทนำ

ในหลายปีที่ผ่านมา ผลกระทบของภาวะเครียดจากแสง ซึ่งได้แก่ ปริมาณความเข้มแสงที่สูงขึ้น และปริมาณรังสีอัลตราไวโอเลตหรือรังสียูวีที่เพิ่มขึ้น บริเวณผิวโลก (Stapleton, 1992) มีอิทธิพลอย่างเห็นได้ชัดต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสง เช่น พืชและไซยาโนแบคทีเรีย การได้รับพลังงานแสงที่มากเกินไปต่อการใช้งานในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ (Melis, 1999) โดยผ่านภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่สร้างอนุมูลอิสระในรูปแบบของชนิดออกซิเจนที่ไวปฏิกิริยา (reactive oxygen species หรือ ROS) ขึ้นในระบบแสง (photosystem) ที่สามารถทำลายชีวโมเลกุลสำคัญภายในเซลล์ และเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Halliwell and Gutteridge, 1999) โดยปกติแล้วสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงมีกลไกการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากแสงหลายกลไก อาทิเช่น การซ่อมแซมและการสังเคราะห์โปรตีนในระบบแสง (Aro *et al.*, 1993) การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารประกอบเชิงซ้อนที่เก็บเกี่ยว

แสง (light-harvesting complex) (Lao and Glazer, 1996) การสังเคราะห์สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ภายในเซลล์ และการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านออกซิเดชัน เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) และคาตาเลส (catalase) (Hertwig *et al.*, 1992) เป็นต้น การตอบสนองของพืชต่อภาวะเครียดจากแสงเหล่านี้ ประกอบด้วยกลไกการตอบสนองทั้งในระยะสั้นและระยะยาว (Anderson *et al.*, 1995) แต่การตอบสนองหรือการปรับตัวของพืชดังกล่าวก็ยังมีขีดจำกัด ล้วนแล้วแต่ทำให้เกิดปัญหาทางด้านเกษตรกรรมและแหล่งอาหารหลักของโลกที่ลดลงตามมา ด้วยเหตุที่ไซยาโนแบคทีเรียจัดว่าเป็นสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอตที่มีสมบัติพิเศษคือ สามารถเจริญเติบโตง่ายและปรับตัวได้ในช่วงกว้างท่ามกลางภาวะเครียดทางชีวภาพและกายภาพของสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังสามารถสังเคราะห์แสงได้คล้ายพืชชั้นสูง จึงมักนิยมใช้เป็นตัวแทนในการวิจัยเกี่ยวกับระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้ การศึกษาการตอบสนองและการปรับตัวภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตภายใต้ภาวะเครียดเหล่านี้ยังดำเนินต่อไป หลายกลุ่มวิจัย

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

* E-mail: saowarath.j@chula.ac.th

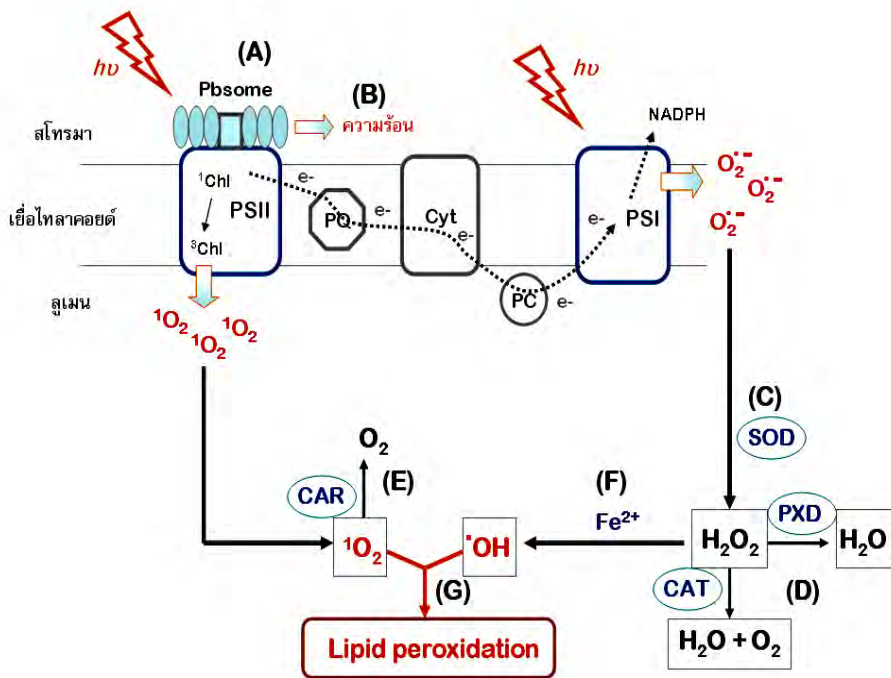
มุ่งพัฒนางานวิจัยพื้นฐานทางชีวเคมีและเทคโนโลยีชีวภาพให้เกิดประโยชน์ในการรักษาแหล่งอาหารของโลก การสร้างพลังงานทดแทนและการปรับปรุงพันธุ์พืชให้อยู่รอดได้ภายใต้ภาวะเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อมในอนาคต

ไซยาโนแบคทีเรีย หรือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria หรือ blue green algae) จัดอยู่ในอาณาจักรโปรคาริโอตา (prokaryota kingdom) division ไซยาโนไฟตา (division of cyanophyta) (Woese *et al.*, 1990) ซึ่งไม่มีออร์แกเนลล์ที่สำคัญเหล่านี้ อาทิ เช่น ไมโทคอนเดรีย แวกิวโอล เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม เยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์และเยื่อหุ้มนิวเคลียส เป็นต้น ดังนั้น ออร์แกเนลล์สำคัญในการสังเคราะห์ด้วยแสงในไซยาโนแบคทีเรีย คือ เยื่อไทลาคอยด์ (thylakoid membranes) ซึ่งกระจายตัวอยู่ในส่วนของไซโทพลาซึม จากที่กล่าวมาข้างต้น ไซยาโนแบคทีเรียมีสมบัติที่พิเศษ คือ สามารถสังเคราะห์แสงและผลิตออกซิเจนออกมาเหมือนพืชชั้นสูง (oxygenic photosynthesis) ในปัจจุบัน นักวิจัยจึงนิยมใช้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นต้นแบบในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ *Synechocystis sp. PCC 6803* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเซลล์เดี่ยวตัวแรกที่ทราบจีโนมแล้ว ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 (Kaneko *et al.*, 1996) นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียยังสามารถเติบโตได้ภายใต้ภาวะความเครียดจากสิ่งแวดล้อมในช่วงที่กว้าง (Joset *et al.*, 1996) อาทิ เช่น ความเค็ม ออสโมซิส (Jantaro *et al.*, 2003; Jantaro *et al.*, 2005) แสงที่มีความเข้มสูง (He *et al.*, 2001) และภาวะแห้งแล้ง (Williams *et al.*, 2008) เป็นต้น

แสง (light) ในเชิงฟิสิกส์ เป็นรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในทุกช่วงความยาวคลื่น ซึ่งแหล่งกำเนิดของแสงมาจากหลายแหล่ง ได้แก่ ดวงอาทิตย์ หลอดไฟฟ้า และไฟ เป็นต้น แหล่งกำเนิดหลัก คือ แสงจากดวงอาทิตย์ ซึ่งมีสเปกตรัมของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่สามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วนตามการเพิ่มของความยาวคลื่น นั่นคือ ช่วงรังสียูวี (100-400 นาโนเมตร) ช่วงแสงที่มองเห็นได้ (400-700 นาโนเมตร) และช่วงอินฟราเรด

(700-106 นาโนเมตร) ตามลำดับ โดยปกติแล้วสิ่งมีชีวิตจำพวกโฟโตออโตโทรป (photoautotroph) เช่น พืช สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย จะใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน แต่เมื่อใดที่เซลล์ได้รับแสงที่มีความเข้มสูงมากเกินไปที่จะนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ก็อาจส่งผลกระทบต่อที่รุนแรง จนทำให้เซลล์ถึงแก่ความตายได้ (Melis, 1999)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ภายใต้ภาวะเครียดจากแสง เป็นภาวะที่เซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระในรูปแบบของชนิดออกซิเจนที่ไวปฏิกิริยา (reactive oxygen species หรือ ROS) ขึ้นในระบบแสง (photosystem) โดย ROS ที่เกิดขึ้นรวมถึง อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) อนุมูลไฮดรอกซิล (OH) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และออกซิเจนซิงเกิลต (1O_2) เป็นต้น (Foyer *et al.*, 1994) จากรูปที่ 1 ผลของแสงที่มีความเข้มสูงต่อการเกิด ROS ในไซยาโนแบคทีเรีย เห็นได้ชัดเจนว่าเมื่อแสงที่มีความเข้มสูงตกกระทบบริเวณเยื่อไทลาคอยด์ (thylakoid membranes) ของไซยาโนแบคทีเรีย ไฟโคบิลิโซม (คำย่อ Pbsome) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เก็บเกี่ยวแสงจะดูดกลืนพลังงานที่มากเกินไปและปล่อยออกมาในรูปของความร้อน นอกจากนี้ คลอโรฟิลล์ ซึ่งเป็นรงควัตถุในระบบแสงที่ 2 (PSII) จะดูดกลืนพลังงานที่มากเกินไปพอด้วยเช่นกัน แล้วส่งผลให้เกิดอนุมูลออกซิเจนซิงเกิลต (1O_2) ออกมา โดยอนุมูลออกซิเจนซิงเกิลตเป็นผลิตภัณฑ์ของการถ่ายโอนพลังงานมากกว่าการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งมีการใช้ออกซิเจนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ปฏิกิริยาที่รุนแรงอันหนึ่งจะเกิดขึ้นเมื่ออนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาฮาเบอร์-เวสส์ (Haber-Weiss reaction) ที่ถูกเร่งด้วยโลหะ จนก่อกำเนิดอนุมูลออกซิแดนต์ที่มีฤทธิ์รุนแรง (รูปที่ 1 F และ G) นั่นคือ อนุมูลไฮดรอกซิลที่สามารถเข้าไปทำลายชีวโมเลกุลจำพวกลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอภายในเซลล์ โดยเกิดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันและกรดอะมิโน เป็นต้น (Scandalios, 1997)



รูปที่ 1 ระบบการป้องกันและการปรับตัวของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูง (ตัวย่อ Pbsome คือไฟโคบิลิโซม Chl คือคลอโรฟิลล์ PSII คือระบบแสงที่สอง PQ คือ พลาส-โทควิโนน Cyt คือไซโทโครม PSI คือระบบแสงที่หนึ่ง PC คือพลาสโทไซยานิน SOD คือซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส PXD คือเปอร์ออกซิเดส CAT คือคาทาลาส และ CAR คือแคโรทีนอยด์) (ดัดแปลงจาก Foyer *et al.*, 1994)

กลไกในการตอบสนองเพื่อความอยู่รอดในไซยาโนแบคทีเรียต่อภาวะเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูง สามารถแบ่งออกได้หลักๆ ดังนี้

1. กระบวนการซ่อมแซมในระบบแสงศูนย์กลางปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงของระบบแสงที่ 2 (PSII) ประกอบด้วยโปรตีน D1 และ D2 ซึ่งจับไขว่กันเป็นลักษณะเสเทอโรไดเมอร์ ในขณะที่เซลล์ได้รับพลังงานมากเกินไปของแสงที่มีความเข้มสูง พบว่าโปรตีน D1 ที่มีขนาด 32 กิโลดาลตัน ถูกทำลายด้วยออกซิเจนเชิงกลตที่เกิดขึ้นได้ไวกว่าโปรตีน D2 (Kyle *et al.*, 1984; Melis, 1999; Aro *et al.*, 1993) อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากนั้นจะเกิดการคืนสภาพกลับมายังโปรตีน D1 ได้ไวเช่นเดียวกัน (Melis, 1999) ซึ่งกระบวนการซ่อมแซมในระบบแสงดังกล่าวที่เกิดขึ้น

(Aro *et al.*, 1993; Melis, 1999, Yokthongwattana and Melis, 2006) จะประกอบด้วยขั้นตอนตามลำดับดังต่อไปนี้ คือ

- การสลายของโปรตีน D1 ซึ่งถูกทำลาย
 - การสังเคราะห์โปรตีน D1 ขึ้นมาใหม่
 - การสอดแทรกโปรตีน D1 ซึ่งถูกสังเคราะห์ใหม่เข้าไปในเยื่อไทลาคอยด์
 - การจับตัวกับคลอโรฟิลล์และโปรตีน D2 บริเวณศูนย์กลางปฏิกิริยา
 - และการรวมกลุ่มกับโปรตีนภายในระบบแสงที่ 2 ตัวอื่น ๆ
- สำหรับการเกิดภาวะการยับยั้งด้วยแสง (photoinhibition) ในขณะที่เซลล์ได้รับแสงที่มีความเข้มสูงนานเกินไป พบว่ามีสาเหตุมาจากการทำลายเนื่องจาก

ภาวะเครียดจากออกซิเดชันนั้นเกิดได้รวดเร็วกว่ากระบวนการซ่อมแซมในระบบแสง จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของเซลล์ลดลงไปในที่สุด (Powles, 1984; Aro *et al.*, 1993)

2. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารประกอบเชิงซ้อนที่เก็บเกี่ยวแสง (Light-harvesting complex) ไฟโคบิลิโซม (phycobilisomes หรือ PBS) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เก็บเกี่ยวแสงหลักในไซยาโนแบคทีเรีย (Glazer, 1985) โดยอยู่บริเวณรอบนอกเยื่อเมมเบรน ที่สามารถเก็บเกี่ยวพลังงานแสงและถ่ายโอนพลังงานแบบทิศทางเดียว (unidirectional energy flow) ไปยังศูนย์กลางปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง (ดูภาพที่ 1 A) PBS จะประกอบด้วยโครโมโปรตีนจำพวกอัลโล-ไฟโคไซยานิน (allophycocyanin หรือ AP) ไฟโค-ไซยานิน (phycocyanin หรือ PC) ไฟโคอีริทริน (phycoerythrin หรือ PE) หรือไฟโคอีริโทรไซยานิน (phycoerythrocyanin) ซึ่งรงควัตถุเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับคุณภาพของแสงที่มันได้รับ (Grossman *et al.*, 2001) โดยอาศัยกระบวนการ Complementary Chromatic Adaptation หรือ CCA ที่เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบโปรตีนใน PBS นั้นเอง (Bennett and Bogorad, 1973; Grossman and Kehoe, 1997) นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของ PBS อาทิเช่น ความเข้มแสง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และปริมาณสารอาหาร เป็นต้น (Tandeau de Marsac and Houmard, 1993; Grossman *et al.*, 1993) โดยในปี ค.ศ. 1997 Tandeau de Marsac ได้แบ่งไซยาโนแบคทีเรียตามกระบวนการ CCA ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่ม 1 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตทั้ง PE และ PC แต่ไม่เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของไฟโคบิลิโปรตีนเหล่านี้เมื่อคุณภาพแสงเปลี่ยนไป

กลุ่ม 2 สายพันธุ์ที่สามารถผลิต PE ได้เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับแสงสีเขียว แต่ปริมาณ PC ไม่เปลี่ยนแปลง

กลุ่ม 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตทั้ง PE และ PC เมื่อคุณภาพแสงเปลี่ยนไป โดยไซยาโนแบคทีเรีย *Fremyella diplosiphon* เป็นต้นแบบเด่นของกลุ่มนี้ที่มีการศึกษามากที่สุดในชีววิทยาเชิงแสง (Photobiology) และชีววิทยาเชิงโมเลกุล (Molecular Biology) (บททบทวน, ดู Grossman *et al.*, 2001; Stowe-Evans and Kehoe, 2004)

3. การจัดกระจายขึ้นใหม่ของพลังงานการเร้าระหว่างระบบแสง (Redistribution of excitation energy) หรือ State transitions การปรับเปลี่ยนปริมาณสัมพันธของระบบแสง (photosystem stoichiometry) ในไซยาโนแบคทีเรีย จะเกิดขึ้นเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงของเซลล์ให้มีความเหมาะสมเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะแสงที่เปลี่ยนไป (Fujita, 1997) ในปี ค.ศ. 1987 Fujita และ Murakami ได้ทำการศึกษาปริมาณของระบบแสงที่ 1 (PSI) ระบบแสงที่ 2 (PSII) ไฟโคบิลิโซม (PBS) และสารประกอบเชิงซ้อน Cyt b_6-f ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* PCC 6714 ภายใต้ภาวะที่แตกต่างกันของการเลี้ยงแบบ Autotroph และ Heterotroph พบว่าปริมาณสัมพันธของ PSI ต่อ PSII เปลี่ยนแปลงไปขึ้นกับคุณภาพของแสง ในขณะที่ปริมาณสัมพันธของ PSII ต่อ Cyt b_6-f และ PBS ต่อ PS II ค่อนข้างคงที่ในการเลี้ยงทั้งสองแบบ ดังนั้น ผลจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสัมพันธในระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง จึงขึ้นอยู่กับปริมาณของ PSI ที่เปลี่ยนไป ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นได้เนื่องจากกลไกการตอบสนองต่อสภาวะรีดอกซ์ (redox state) ของแหล่งรวมอิเล็กตรอนระหว่างสองระบบแสง (Fujita, 1997) อย่างไรก็ตาม กลไกการตอบสนองต่อความเข้มแสงที่สูงเป็นระยะเวลานานอาจส่งผลไปยังการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกทั้งในระดับยีนและระดับโปรตีนของสิ่งมีชีวิตได้เช่นกัน (บททบทวน ดู Scheibe *et al.*, 2005)

4. การรักษาเสถียรภาพของเยื่อเมมเบรนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงด้วยการปลดปล่อยความร้อน (ตั้งรูปที่ 1B) โดยปกติในพืชชั้นสูงจะมีระบบหนึ่งเพื่อ

รักษาสมดุลภายใต้ภาวะแสงที่มีความเข้มต่ำหรือสูงผ่านทางวัฏจักรซีเอแซนทิน (zeaxanthin cycle) แต่ในไซยาโนแบคทีเรียมีระบบที่แตกต่างออกไปเนื่องจากมีองค์ประกอบของโปรตีนเก็บเกี่ยวแสงที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ปฏิกริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้นในขณะที่ได้รับแสงความเข้มสูงหรือเหมาะสม โดยคลอโรฟิลล์บริเวณที่เก็บเกี่ยวแสงดูดซับพลังงานควอนตัมของแสงและใช้ประโยชน์พลังงานทั้งหมดในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง สำหรับพลังงานของโมเลกุลคลอโรฟิลล์ ซึ่งเกิดที่ถูกเร่งจะเคลื่อนย้ายไปยังคลอโรฟิลล์ของศูนย์กลางปฏิกิริยาของระบบแสงที่ 1 และ 2 แล้วเกิดการแยกประจุขึ้น เรียกว่า Photochemical quenching (qP) ดังนั้น ระบบป้องกันและการปรับตัวอันหนึ่งของไซยาโนแบคทีเรียในช่วงแรกเมื่อได้รับแสงที่มีความเข้มสูงหรือมีพลังงานเพิ่มมากขึ้น คือ การปลดปล่อยโมเลกุลคลอโรฟิลล์ซึ่งเกิดซึ่งถูกเร้าออกมาเป็นฟลูออเรสเซนซ์ (qF) (บททบทวน ดู Karapetyan, 2007) ทั้งนี้หากระบบการปรับตัวนี้ไม่สามารถควบคุมปริมาณพลังงานที่มากเกินไปได้ พลังงานที่ดูดซับไว้แต่แรกจะถูกส่งผ่านออกมาเป็นความร้อน เรียกว่า Nonphotochemical quenching (NPQ) ในรูปแบบ High-energy-state quenching (qE) (บททบทวน ดู Holt *et al.*, 2004) ส่งผลให้เกิดสภาวะทริเปต (triplet state) ของคลอโรฟิลล์ได้ โดยอันตรกิริยาระหว่างคลอโรฟิลล์ทริเปตกับออกซิเจนจะสร้างออกซิเจนซิงเกต (singlet oxygen) ออกมาทำลายระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง (บททบทวน ดู Karapetyan, 2007)

5. การเหนี่ยวนำชีวสังเคราะห์ของพอลิเปปไทด์ภายในระบบแสง ในกลุ่มของโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับแสงที่มีความเข้มสูง เรียกว่า Early light-inducible proteins หรือ ELIPs (Adamska *et al.*, 1992; Pötter and Kloppstech, 1993) หรือเรียกว่า High light-inducible proteins (HLIPs) (He *et al.*, 2001; Dolganov *et al.*, 1995) โดยในฐานข้อมูลของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803

(Kaneko *et al.*, 1996) พบว่า ยีนที่เข้ารหัสโปรตีนเหล่านี้มี 5 ชนิดด้วยกัน นั่นคือ HliA HliB HliC HliD และ HemH (ยีนของโปรตีนที่เกิดจากการรวมของพอลิเปปไทด์ที่คล้าย Hli กับเฟอร์โรคลิลา-เทส) โดยเฉพาะยีนจำนวน 4 ยีน (HliA-D) มีความคล้ายคลึงกับพอลิเปปไทด์ของสารประกอบเชิงซ้อนที่เก็บเกี่ยวแสงในพีชชั้นสูง ในขณะที่ไซยาโนแบคทีเรียได้รับแสงที่มีความเข้มสูง พบว่า เกิดการเหนี่ยวนำปริมาณพอลิเปปไทด์ Hli ให้มีการสร้างสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ชนิดของพอลิเปปไทด์ Hli ก็มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน เช่น ปริมาณ HliC เพิ่มอย่างรวดเร็วเมื่อเซลล์ได้รับแสงนานถึง 24 ชั่วโมง ในขณะที่ HliA และ HliB เพิ่มอย่างรวดเร็วเฉพาะในช่วง 1-9 ชั่วโมงแรกที่ได้รับแสงที่มีความเข้มสูงเท่านั้น (He *et al.*, 2001) ซึ่งพบว่า กลไกที่เกิดขึ้นนี้มีอิทธิพลต่อความอยู่รอดของไซยาโนแบคทีเรียในภาวะดังกล่าวอย่างชัดเจน เนื่องจากการสร้างสายพันธุ์กลายของไซยาโนแบคทีเรียโดยการยับยั้งการทำงานของยีน HliA-D แล้ว ไซยาโนแบคทีเรียไม่สามารถอยู่รอดได้ภายใต้ความเข้มแสงที่สูง พอลิเปปไทด์ Hli จึงอาจทำหน้าที่สำคัญส่วนหนึ่งเกี่ยวกับการลดการเกิดออกซิเดชันภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย (Jantaro *et al.*, 2006) และต่อมายังค้นพบว่า HLIPs มีหน้าที่ในการรักษาเสถียรภาพของสารประกอบเชิงซ้อนของระบบแสงที่ 1 ในภาวะเครียดเนื่องจากแสงที่มีความเข้มสูงด้วยเช่นกัน (Wang *et al.*, 2008)

6. การสังเคราะห์สารต้านออกซิเดชัน แคลโรทีนอยด์ในไซยาโนแบคทีเรีย นอกจากจะทำหน้าที่เป็นรงควัตถุในการสังเคราะห์ด้วยแสงแล้วยังทำหน้าที่ในการกระจายพลังงานส่วนเกินที่เกิดขึ้นเนื่องจากคลอโรฟิลล์ซึ่งถูกเร้า และลดการเกิดอนุมูลอิสระในรูปแบบของชนิดออกซิเจนที่วปฏิกิริยา (ROS) ได้ (Adams *et al.*, 1993) อาทิเช่น โดยการเปลี่ยนรูปของออกซิเจนซิงเกตให้เป็นออกซิเจน (Foyer *et al.*, 1994) (ดังรูปที่ 1 E) โดยปกติแล้วในไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยแคลโรทีนอยด์หลายชนิด ได้แก่ บีทา-

แคโรทีน (β -carotene) ซีเอแซนทิน (zeaxanthin) เอไชนนोन (echinenone) แคน-ทาแซนทิน (canthaxanthin) และไมโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) เป็นต้น ซึ่งแตกต่างกันไปในไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม มีการพบว่าปริมาณของแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นภายใต้ภาวะเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูง ดังนั้นเป็นไปได้ว่าแคโรทีนอยด์ทำหน้าที่เพิ่มความสามารถในการป้องกันระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงนั่นเอง (Schagerl and Müller, 2006) จากที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่าไซยาโนแบคทีเรียไม่มีวัฏจักรซีเอแซนทินในการปรับตัวภายใต้แสงที่มีความเข้มสูงเหมือนพืช ดังนั้น ปริมาณซีเอแซนทินที่พบภายในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย จึงเป็นผลผลิตจากบีทา-แคโรทีนเท่านั้น (Demmig-Adams, 1990)

7. การสังเคราะห์เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ด้านออกซิเดชัน การสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการต้านออกซิเดชันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ได้แก่ การสังเคราะห์เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) (รูปที่ 1 C) ที่สามารถเปลี่ยนอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) การสังเคราะห์เอนไซม์คาตาเลส (catalase) และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ที่สามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน (รูปที่ 1 D) (Tytler et al, 1984; Foyer et al., 1994) เป็นต้น ในกรณีที่ระบบของเอนไซม์ที่ต้านออกซิเดชันไม่สามารถควบคุมสถานการณ์ได้จะส่งผลให้ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลงเหลือในระบบ และสามารถทำปฏิกิริยากับอะตอมเหล็ก (II) หรือเหล็กเฟอร์รัส (ferrous iron) ที่เป็นผลมาจากการที่สารประกอบเชิงซ้อนจำพวกฮีม (heme) เหล็กที่ไม่ใช่ฮีมหรือกลุ่มเหล็ก-ซัลเฟอร์ (iron-sulfur clusters) ถูกทำลายโดยแสงที่มีความเข้มสูง และสร้างอนุมูลอิสระที่ร้ายแรงกว่าตัวอื่น ๆ คือ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลออกไซด์ (รูปที่ 1 F) (Abdul-Tehrani et al., 1999) ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น

สรุป

ในภาวะของโลกที่เปลี่ยนไป ณ ปัจจุบัน ส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงและการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ภาวะความเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูงก็มีผลเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสงที่เป็นแหล่งอาหารของโลก การศึกษาและเข้าใจระบบป้องกันและปรับตัวภายใต้ภาวะเครียดจากแสงที่มีความเข้มสูงของพืชและไซยาโนแบคทีเรียจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ด้วยวิทยาการสมัยใหม่ทางชีวเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพ ในการแก้ไขหรือบรรเทาปัญหาการขาดแคลนแหล่งอาหารของโลกในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A.J., Chang, Y-S., Timms, A.R., Hawkins, C., Williams, J.M., Harrison, P.M., Guest, J.R., and Andrews, S.C. (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* 181: 1415-1428.
- Adams III, W.W., Demmig-Adams, B. and Lange, O.L. (1993) Carotenoid composition and metabolism in green and blue-green algal lichens in the field. *Oecologia* 94: 576-584.
- Adamska, I., Ohad, I. and Kloppstech, K. (1992) Synthesis of the early light-inducible protein is controlled by blue light and related to light stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 2610-2613.
- Anderson, J.M., Chow, W.S., and Park, Y.-I. (1995). The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth. Res.* 46: 129-139.

- Aro, E.M., McCaffery, S., and Anderson, J.M. (1993). Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiol.* 103: 835-843.
- Bennett, A., and Bogorad, L. (1973) Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.* 58: 419-435.
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photo-protection in plants: a role for the xanthophylls seaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020: 1-24.
- Dolganov, N.A.M., Bhaya, D. and Grossman, A.R. (1995) Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants: evolution and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 636-640.
- Foyer, C.H., Descourvières, P. And Kunert, K.J. (1994) Protection against oxygen radicals : an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507-523.
- Fujita, Y (1997) A study on the dynamic features of photosystem stoichiometry: Accomplishment and problems for future studies. *Photosynth. Res.* 53: 83-93.
- Fujita, Y. and Murakami, A. (1987) Regulation of electron transport composition in cyanobacterial photosynthetic system: Stoichiometry among Photosystem I and II complexes and their lightharvesting antennae and Cyt b₆-f complex. *Plant Cell Physiol.* 28: 1547-1553.
- Glazer, A. N. (1985) Light harvesting by phycobilisomes. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 14: 47-77.
- Grossman, A. R. , Schaefer, M. R., Chiang, G. G., and Collier, J.L. (1993) Environmental effects on the light-harvesting complex of cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 175: 575-582.
- Grossman, A. R., and Kehoe, D. M. (1997) Phosphorelay control of phycobilisome biogenesis during complementary chromatic adaptation. *Photosynth. Res.* 53: 95-108.
- Grossman, A.R., Bhaya, D. and He, Q. (2001) Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting. *J. Biol. Chem.* 276:11449-11452.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine, pp. 1-104, Oxford University Press Inc., New York.
- He, Q., Dolganov, N., Bj_rkman, O, and Grossman, A.R. (2001) The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC6803. *J. Biol. Chem.* 276: 306-314.
- Hertwig, B., Streb, P., and Feierabend, J. (1992) Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol.* 100: 1547-1553.
- Holt, N.E., Fleming, G.R. and Niyogi, K.K. (2004) Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. *Biochemistry* 43: 8281-8289.
- Jantaro, S., Mäenpää, P., Mulo, P. and Incharoensakdi, A. (2003) Content and biosynthesis of polyamines in salt and osmotically-stressed cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 228: 129-135.
- Jantaro, S., Incharoensakdi, A., Jans_n, T., Mulo, P. and Mäenpää, P. (2005) Effects of long-term ionic and osmotic stress conditions on

- photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Functional Plant Biol.* 32: 807-815.
- Jantaro, S., Ali, Q., Lone, A., and He, Q. (2006) Suppression of the lethality of high light to a quadruple hli mutant by the inactivation of the regulatory protein PfsR in *Synechocystis* PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 281: 30865-30874.
- Joset, F., Jeanjean, R. and Hagemann, M. (1996) Dynamics of the response of cyanobacteria to salt stress: Deciphering the molecular events. *Physiol. Plant.* 96: 738-744.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3:109-136.
- Karapetyan, N.V. (2007) Non-photochemical quenching of fluorescence in cyanobacteria. *Biochemistry (Moscow)* 72: 1385-1395.
- Kyle, D.J., Ohad, I., and Arntzen, C. J. (1984) Membrane protein damage and repair: selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 4070-4074.
- Lao, K. and Glazer, A.N. (1996) Ultraviolet-B photodestruction of a light-harvesting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5258-5263.
- Melis, A. (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends Plant Sci.* 4: 130-135.
- P_tter, E. and Kloppstech, K. (1993) Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *Eur. J. Biochem.* 214: 779-786.
- Powles, S.B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 15-44.
- Scandalios, J.G. (1997) Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. *Free Radical Biol. Med.* 3: 471-172.
- Schagerl, M. and Müller, B. (2006) Acclimation of chlorophyll a and carotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria. *J. Plant Physiol.* 163: 709-716.
- Scheibe, R., Backhausen, J.E., Emmerlich, V. and Holtgreffe, S. (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *J. Exp. Bot.* 56: 1481-1489.
- Stapleton, A.E. (1992) Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* 4: 1353-1358.
- Stowe-Evans, E.L. and Kehoe, D.M. (2004) Signal transduction during light-quality acclimation in cyanobacteria: a model system for understanding phytochrome-response pathways in prokaryotes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3: 495-502.
- Tandeau de Marsac, N. (1997) Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 130: 82-91.

- Tandeau de Marsac, N. and Houmard, J. (1993) Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli, new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 119-190.
- Tytler, E.M., Wong, T, and Codd, G.A. (1984) Photoinactivation in vivo of superoxide dismutase and catalase in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 23: 239-242.
- Williams, W.J., Eldridge, D.J. and Alchin, B.M. (2008) Grazing and drought reduce cyanobacterial soil crusts in an Australian *Acacia* woodland. *J. Arid Envi.* 72: 1064-1075.
- Wang, Q., Jantaro, S., Lu, B., Majeed, W., Bailey, M. and He, Q. (2008) The high light-inducible polypeptides (HLIP) stabilize trimeric photosystem I complex under high light conditions in *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol.* 147: 1239-1250.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 4576-4579.
- Yokthongwattana, K. and Melis, A. (2006) Photoinhibition and recovery in oxygenic photosynthesis: mechanism of a photosystem-II damage and repair cycle, In Demmig-Adams B, Adams III WW, Mattoo AK (eds) *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment*. Advances in Photosynthesis Series, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 175-191.



ภาคผนวก ค
บทความในหนังสือ

Polyamines in cyanobacteria: biosynthesis, transport and abiotic stress response

Aran Incharoensakdi^{1*}, Saowarath Jantaro¹, Wuttinun Raksajit^{1,2}, and Pirkko Mäenpää³

¹Laboratory of Cyanobacterial Biotechnology, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Present address: Department of Veterinary Technology, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

³Department of Biochemistry and Food Chemistry, Laboratory of Molecular Plant Biology, University of Turku, FIN-20014 Turku, Finland

*Corresponding author: e-mail:aran.i@chula.ac.th

This review discusses recent advances on polyamines in cyanobacteria regarding their biosynthetic and transport aspects together with their responses to abiotic stress. Polyamines are ubiquitous and positively charged compounds which are essential constituents in all living organisms including cyanobacteria. There are three main naturally occurring polyamines namely putrescine, spermidine and spermine. The accumulation of these three classes of polyamines under various types of abiotic stress has been well documented in higher plants but not in cyanobacteria. Recent studies in a fresh-water cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 demonstrate the stimulatory effect by salt and osmotic stresses on the contents of the three polyamines as well as on the activity of arginine decarboxylase, the enzyme catalyzing the formation of putrescine. Other abiotic stresses such as high temperature and UV-irradiation also have an effect on polyamine metabolism. For instance, short-term irradiation with UV-A, B and C can drastically decrease the content of perchloric acid-insoluble (the bound form) spermidine. Polyamine transport system is also affected by abiotic stress. Both salt and osmotic stresses enhance the uptake of putrescine and spermidine. In the review, we will also discuss the involvement of a periplasmic polyamine-binding protein PotD. The role of PotD in the transport of polyamine has been confirmed using the *Synechocystis potD* knockout mutant.

Keywords polyamines; cyanobacteria; *Synechocystis*; biosynthesis; transport; abiotic stress

1. Introduction

Polyamines, the major polycationic compounds inside the cells, are present in all living organisms. These include kingdoms of “Plantae”; higher plants [1, 2], “Animalia”; animals, such as mouse [3] and human [4], “Fungi”; filamentous fungi [5] and yeast [6], “Protista”; green algae [7] and “Prokaryota”; bacteria, such as *Escherichia coli* [8], and cyanobacteria [9–11]. The most common polyamines in most living cells are triamine spermidine (1,8-diamino-4-azaoctane), tetramine spermine (1,12-diamino-4,9-diazadodecane) and their diamine precursor putrescine (1,4-diaminobutane). These three common polyamines are found in a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (hereafter *Synechocystis*), with spermine representing a minor content [9]. The polyamine localization inside the cells seems related to their positive charges at physiological pH. This allows polyamines to function in different forms such as free, conjugated or bound form *in vivo*.

The roles of polyamines are not only in the regulation of cell division and morphogenesis in plants, but they are also known to affect the folds of DNA by their binding [12], protein synthesis, membrane stability, and stress responses of plants and cyanobacteria [1]. Arginine decarboxylase (ADC) activity increases have been reported for cell growth and embryogenesis, DNA synthesis and stress responses. On the other hand, ornithine decarboxylase (ODC) has been reported to be associated with growth proliferation and fruit development [13]. Moreover, a role of hydroxycinnamic acid amide conjugates in defence mechanism against biotic and abiotic stress has been reported in higher plants [2]. In addition, there have been reports that the number of polyamine linkages occurring in the chloroplast is enhanced in the presence of light [14]. Spermine is thought to be bound intimately with chromatin [15]; consequently, spermine might have a direct role as a free radical scavenger in protecting DNA from free radical attack caused by oxidative stress [16]. Moreover, polyamines may contribute to the osmotic and excess ion adaptation by maintaining a proper cation-anion balance and by stabilizing membranes at high external salinity. Polyamine oxidation has been reported to be important in the oxidative burst which induces programmed cell death [17]. Although the known mechanisms and functions of polyamines have not been completely elucidated, they strongly act in a number of cellular processes including the responses toward environmental stresses. During the last decade very few studies on polyamines in cyanobacteria have been reported. Here we review the

current knowledge on some aspects of the metabolism of polyamines in cyanobacteria with particular emphasis on *Synechocystis*.

2. Polyamine Biosynthesis

2.1 Current understanding of biosynthesis pathway of polyamines

In plants and bacteria, putrescine is formed either by direct decarboxylation of L-ornithine by the enzyme ornithine decarboxylase (ODC; EC 4.1.1.17), or by decarboxylation of arginine by arginine decarboxylase (ADC; EC 4.1.1.19) via agmatine and *N*-carbamoylputrescine intermediates (Fig. 1a). In mammals and fungi, only one pathway (ODC reaction) leads to putrescine formation [18]. The synthesis of spermidine and spermine is accomplished by the sequential addition of an aminopropyl group onto putrescine and spermidine, respectively, in reactions catalyzed by the enzyme spermidine synthase (EC 2.5.1.16) and spermine synthase (EC 2.5.1.22). The aminopropyl group is donated by decarboxylated *S*-adenosylmethionine (SAM), which is produced by *S*-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC; EC 4.1.1.50). Until now, a large number of genes for polyamine biosynthesis have been isolated from *Arabidopsis* (<http://www.arabidopsis.org/>) in contrast to only a limited number of genes for cyanobacteria (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>) (Table 1).

Although *Arabidopsis* genes are identified with strong homology to those in the photosynthetic bacterium *Synechocystis* [19], only four separate genes are found that correlate to polyamine biosynthesis in *Synechocystis*, as well as two related genes in *Anabaena* 7120 (Table 1). So far, the genetic information of *Synechocystis* reveals that the dominant pathway to produce putrescine is via the decarboxylation of arginine by ADC with agmatine as an intermediate (Fig. 1b). Recent studies on arginine catabolism in cyanobacteria have found the existence of ADC in all 24 strains of cyanobacteria including *Synechocystis* [20]. Even though ornithine can be detected by the action of arginase on arginine, the conversion of ornithine to putrescine is unlikely due to the lack of ODC in cyanobacteria. Polyamines and the activity of ADC are detectable in *Synechocystis*. SAMDC activity is also detectable in *Synechocystis*; however, its corresponding gene is not found in the genome sequence. Similarly, no gene sequences for spermidine and spermine synthases are found despite the detectable spermidine and spermine contents in *Synechocystis* [9]. This indicates that both spermidine and spermine are synthesized by some other enzymes or these two polyamines arise from the degradation of some related metabolites.

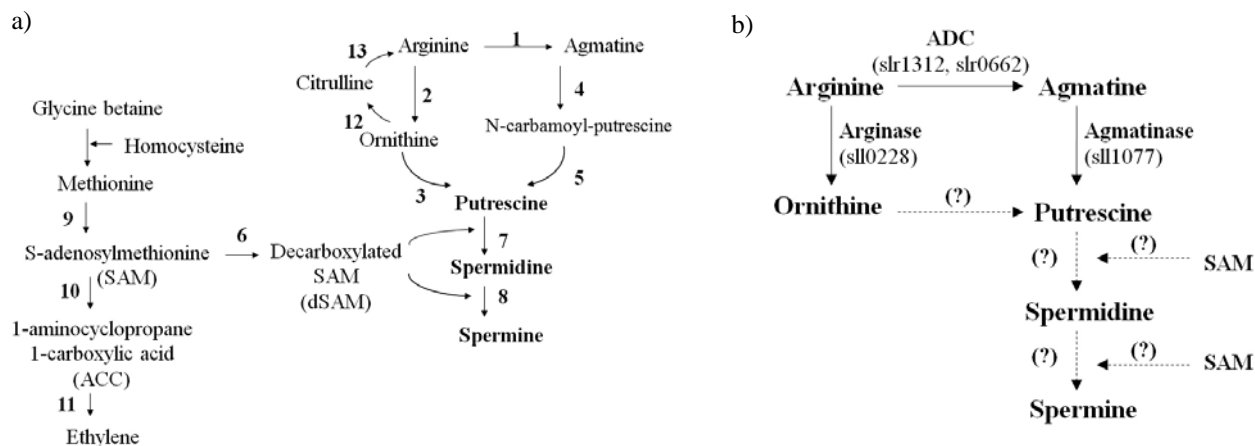


Fig. 1 (a) The pathway of polyamine synthesis in higher plants (modified from [1]). **1**, Arginine decarboxylase (ADC); **2**, Arginase; **3**, Ornithine decarboxylase (ODC); **4**, Agmatine iminohydrolase; **5**, *N*-carbamoyl putrescine amidohydrolase; **6**, *S*-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC); **7**, Spermidine synthase; **8**, Spermine synthase; **9**, SAM synthase; **10**, ACC synthase; **11**, ACC oxidase; **12**, Ornithine transcarbamylase; **13**, Arginine synthase. (b) The pathway of polyamine synthesis in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.

From Table 1 and Fig. 1b together with all available data until now, ADC seems to be the most important enzyme for polyamine biosynthetic pathway in cyanobacteria. Based on structural modeling, *Synechocystis* ADCs have a putative extra

domain, which might be involved in the posttranslational regulation of ADC activity in *Synechocystis*. Moreover, two symmetric inter-subunit disulfide bonds seem to stabilize the dimeric structure of ADCs [21].

Table 1 Genes related to polyamine biosynthesis in plant [75] and cyanobacteria based on Cyanobase

	<i>Arabidopsis</i> [75]	<i>Synechocystis</i> 6803	<i>Anabaena</i> 7120
Arginine decarboxylase	<i>adc1, adc2</i>	<i>adc1</i> (slr1312), <i>adc2</i> (slr0662)	all3401
Arginase	<i>aqrgah1, argah2</i>	<i>speB1</i> (sll0228)	-
Agmatinase	-	<i>speB2</i> (sll1077)	alr2310
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Agmatine iminohydrolase	<i>aih</i>	-	-
<i>N</i> -carbamoyl putrescine amidohydrolase	<i>cpa</i>	-	-
<i>S</i> -adenosylmethionine decarboxylase	<i>samdc1, samdc2</i>	-	-
Spermidine synthase	<i>spds1, spds2</i>	-	-
Spermine synthase	<i>spms, acl5</i>	-	-
SAM synthase	-	-	-
Ornithine transcarbamylase	-	-	-
Arginine synthase	-	-	-

On the other hand, the mammalian ADC differs from ADC isoforms expressed in plants, bacteria, or *Caenorhabditis elegans* and is distinct from ODC [22]. The distribution of both ADC and ODC enzymes in different organism species is regulated in a developmental and tissue specific manner [23]. The location of ODC enzyme in animals and plants is observed in both cytoplasm and nucleus [24] whereas ADC is localized in chloroplasts associated with the thylakoid membrane [25]. In plants, SAM, aside from participating in numerous transmethylation reactions, as it does in other organisms, is also a precursor of the plant hormone ethylene. A variety of other related compounds have been found in plants, including cadaverine. Cadaverine diamine is synthesized predominantly as the result of lysine decarboxylase (LDC; EC 4.1.1.18) activity. This diamine is not as widely distributed as putrescine and is mainly found in Leguminosae and in the flowers of Arum lilies [26]. However, recently we have found cadaverine in *Synechocystis* cells under either ionic or osmotic stress conditions. This is consistent with the presence of a gene encoding lysine decarboxylase (sll1683) in Cyanobase. Moreover, some uncommon polyamines including branched pentamines, hexamines and heptamines have been detected in the extreme thermophilic bacteria [2].

Specific inhibitors for each of these enzymes have been used in many tissues to manipulate cellular polyamine metabolism. DL- α -difluoromethylornithine (DFMO) is a highly effective inhibitor of all animal ornithine decarboxylases while its effectiveness for plant ornithine decarboxylases is quite variable. DMFO also exerts an inhibitory effect on the expression of ADC in *Synechocystis*. The *adc* transcripts decrease in cells grown in the presence of DMFO. Moreover, the increased *adc* transcripts observed in cells under osmotic stress is abolished upon addition of DMFO.

In most plant tissues, DL- α -difluoromethylarginine (DFMA) and methylglyoxal bis-guanylhydrazone (MGBG) are generally quite effective in inhibiting the activities of arginine decarboxylase and *S*-adenosylmethionine decarboxylase, respectively. *S*-adenosylmethionine decarboxylase activity and transcript levels are known to increase in actively dividing tissues. On the other hand, due to its ability to inhibit cell division, MGBG has been widely used both in animal and plant cells for basic studies as well as for therapeutic applications in cancer treatment [27].

2.2 Polyamine forms existing inside the cells

Since the molecules of polyamines are basic with positive charges at physiological pH, they may not only occur as free molecules but also as conjugates to small molecules [2] like phenolic acids (conjugated forms) and also to various

macromolecules like proteins (bound forms) [28]. Spermidine is the most abundant free forms of polyamines in most organisms including cyanobacteria [9] and it is present predominantly in the cytosolic fraction [29].

2.2.1 Conjugated forms

Conjugated polyamines are the most commonly found forms of polyamines in plants. Polyamines are conjugated by the formation of an amide linkage, utilizing esters of CoA for the provision of the activated carboxyl groups [30]. The most common conjugated polyamines are those that are covalently linked to cinnamic acids. The levels of conjugated polyamines, such as hydroxycinnamic acid amides, are correlated with developmental phenomena. They accumulate in roots and shoots, upon floral initiation in tobacco. Polyamine content increases during all three organogenic programs, especially during meristemoid formation and up to the protrusion of the first organs [27]. Putrescine mainly forms monomers (perchloric acid-soluble fraction) with coumaric acid, caffeoyl acid or feruloyl acid. These conjugates are of particular importance both for the regulation of polyamine concentration inside the cell, and for their interaction. In fact hydroxycinnamic acid bridges, through ester-ester linkages, different cell wall polymers, essentially hemicellulose and lignin [2]. During all developmental programs, there is a possibility that the balance between the levels of free and conjugated polyamines may contribute to growth regulation and play a role during morphogenesis. Aliphatic amines (putrescine, spermidine and spermine) appear as water-soluble forms, whereas conjugated forms with aromatic and aliphatic amines that use each terminal amino group to bind cinnamic acid are water-insoluble [28]. It has been reported that only polyamines in the free form are translocated from one organ to another organ of plant and that conjugated polyamines have no effect on cell division process [2].

2.2.2 Bound forms

The delocalized positive charges of polyamines can provide the electrostatic linking to charged proteins and/or phospholipids and nucleic acids making their effect more complicated. Thus polyamines can bridge elements of membrane and cytoskeletal network and impart rigidity to biological membranes. Polyamine-binding proteins have been identified in a wide range of organisms including mammals, yeasts, and bacteria. The interaction between polyamines and membranes is suggested to be an intermediate in cellular membrane fusion [31]. The peptidoglycans, which are essential for both cell surface integrity and normal cell growth, form covalent linkage to polyamines in *Anaerovibrio lipolytica* [32]. The post-translational covalent linkage of polyamines to proteins is catalyzed by a class of enzymes known as transglutaminase (EC 2.3.2.13), which have been localized both intra- and extra-cellularly [33]. Transglutaminases are calcium-dependent enzymes capable of linking polyamines to glutamine residues and may thus cross-link proteins. Having an active site cysteine, transglutaminases change activity upon treatment with *N*-ethylmaleimide. The cross-linking of proteins through covalently attached polyamines makes tissues more stable and resistant to both proteolysis and physical degradation [34].

3. Polyamine transport

3.1 Proteins involved in polyamine transport

Despite the fact that *de novo* synthesis is the major source of polyamines, transport in and out of the cell, also contributes to polyamine homeostasis. Organisms are equipped with a well-organized transport system for exogenous polyamines uptake. Indeed, there is only a single transporter or, individual transport systems for the various polyamines, capable of transporting all the polyamine molecules. In mammalian cells, two polyamine transport systems have been suggested [35]. In one model, polyamines are transported through unidentified membrane transporters driven by a membrane potential. The second model proposes a role for the heparin sulfate side chains of recycling glypican-1 (GPC-1). For higher plant cells a model for a polyamine transport system has not yet been available. However, some early studies on long-distant polyamine transport suggest the existence of a nonpolar translocation within the plant which occurs mainly via the xylem vessels [36]. In *E. coli* and yeast polyamine transport systems have been well investigated. In *E. coli*, six systems, (1) spermidine preferential uptake system (PotABCD), (2) putrescine specific uptake system (PotFGHI), (3) putrescine/ornithine exchanger (PotE), (4) cadaverine/lysine exchanger (CadB), (5) spermidine excretion system (MdtJI) and (6) putrescine transporter (PuuP), have been identified [37]. In yeast, nine proteins have been identified as polyamine transport proteins [38]. TPO1-5 are efflux-pumps for polyamines. UGA4 takes up putrescine along with γ -aminobutyric acid. GAP takes up polyamines into cytoplasm along with amino acids. DUR3 and SAM3 also carry polyamines into the cytoplasm.

There are a few scattered reports on putrescine transport in cyanobacteria. The earliest one was the study in *Anacystis nidulans* where the mechanism of putrescine transport was passive diffusion and ion trapping within the cells [39]. Polyamine transport in *Synechocystis* has been characterized for the first time by our research group. This polyamine uptake

system is very rapid and energy-dependent driven by proton-gradient and membrane potential. The K_m values for putrescine and spermidine in the *Synechocystis* uptake system are 92 and 67 μM , respectively [40]. The exogenous spermidine was found to be metabolized rapidly to diaminopropane in *Anacystis nidulans* [41]. Most of the known details of polyamine transport in prokaryotes have been characterized in *E. coli*. The uptake systems which belong to ATP binding cassette (ABC) polyamine transporters are typically composed of the substrate-binding protein (PotD), two transmembrane proteins (PotB and PotC) and a membrane-associated ATPase (PotA); of these only PotD has been annotated in *Synechocystis* based on sequence similarity to *E. coli* PotD [42]. The homology model of *Synechocystis* PotD was verified based on the structural comparison with *E. coli* PotD and PotF, the three amino acids that are known to be crucial for polyamine binding [43, 44] were totally conserved in *Synechocystis* PotD (Glu209, Trp267 and Asp295) indicating a polyamine binding capacity. The overall sequence identity between *E. coli* PotD and *Synechocystis* PotD is 24 %, but the residues within 8 Å radius from the active site are more conserved and share a sequence identity of 38 %. Based on this analysis, the active site of *Synechocystis* PotD is more similar to the active site of *E. coli* spermidine-preferential PotD than to putrescine-specific *E. coli* PotF. Binding studies using recombinant PotD overexpressed in *E. coli* showed that *Synechocystis* PotD binds specifically to polyamines but not to other amino acids and prefers spermidine over putrescine. This is in line with results from the uptake experiment using radioactively labeled spermidine, which revealed that the K_i value of putrescine is about 4-fold higher than the K_m of spermidine transport in *Synechocystis* suggesting spermidine preferential binding for the transport system [40]. Machius et al. [45] have recently solved the crystal structure of *Treponema pallidum* PotD (TpPotD, PDB: 2V84), which binds putrescine stronger than spermidine but does not bind spermine at all, and summarized some structural features that might be used to predict the specificity of polyamine binding. The *in vivo* transport assays with *potD* knockout mutant confirm that the PotD homolog in *Synechocystis* has a physiological role in polyamine transport [43]. The mutants showed a 50% lower spermidine uptake than the wild type. More experiments are needed to clarify the properties of transmembrane protein (PotB and PotC) and membrane-associated ATPase (PotA). For example, there are possibilities that polyamine transport system in *Synechocystis* might have its own transmembrane and ATPase subunits (Fig. 2a) or it might share the channel-forming proteins (PotB and PotC) and ATPase (PotA) with another ABC transport system (Fig. 2b). The outcome of such investigation would improve our understanding of the mechanism of polyamine transport in cyanobacteria.

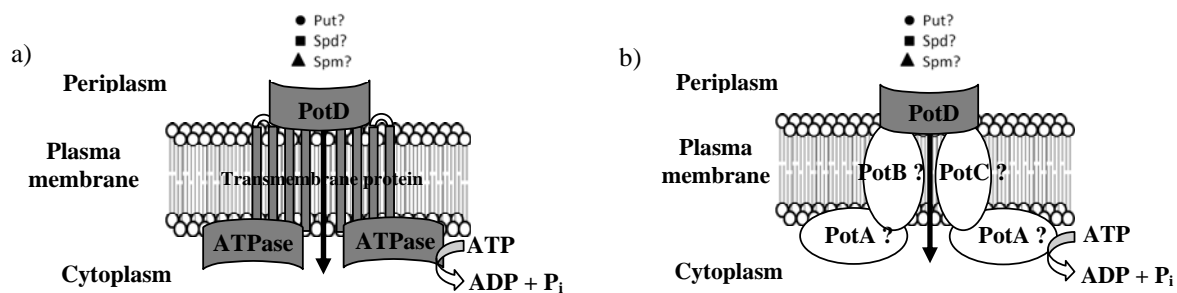


Fig. 2 The proposed polyamine transport system in *Synechocystis* sp. PCC 6803. (a) PotD is substrate-binding protein which might have its own transmembrane and ATPase subunits, (b) PotD is substrate-binding protein which might share the channel-forming proteins (PotB and PotC) and ATPase (PotA) with another ABC transport system.

3.2 Regulation of polyamine uptake

Intracellular polyamine levels are actively maintained by their synthesis, degradation, and transport [46, 47]. In mouse embryonic fibroblast cells the uptake rate is negatively regulated by an antizyme, a small protein of 227 amino acid residues, which is known to be induced by polyamines [48]. In *E. coli*, transcription of the spermidine-preferential transporter genes is down-regulated by the PotD protein and the inhibition is enhanced by spermidine [49]. In *Saccharomyces cerevisiae*, Tpo1 transporters are regulated at the post-transcriptional level by activation of serine/threonine protein kinases [46]. None of these mechanisms have been yet described in cyanobacteria. However, we have initially characterized the basic function of polyamine transport in *Synechocystis*. We found that *Synechocystis* can regulate the polyamine uptake according to the environmental conditions including extracellular pH, salinity and osmotic fluctuation [11, 40]. The putrescine transport operates optimally at pH 7.0, whereas the spermidine transport is at pH 8.0. The different pattern of uptake of putrescine and spermidine, especially at alkaline pH, suggests that these two polyamines might bind at distinct sites on the transporter. This is substantiated by the results showing noncompetitive inhibition of spermidine

transport by putrescine [40]. The dependence of polyamine uptake on the extracellular pH has also been reported in *Anacystis nidulans* [50] and a sea water red alga *Ulva rigida* [51]. Upshift of the external osmolality generated by either NaCl or sorbitol causes an increase in putrescine and spermidine transport in *Synechosystis* with about 1.5-2.0 fold increase at 10-20 mosmol/kg upshift [11, 40]. This suggests that cells require polyamines to better thrive against osmotic upshift. Furthermore, it is concluded that the increase in polyamine uptake due to NaCl or sorbitol is caused by an osmotic rather than an ionic effect. This conclusion is drawn from the results showing that sorbitol with no ionic effect has a similar pattern of stimulated uptake seen for NaCl. The polyamine uptake appears to be dependent on *de novo* synthesis of a transport protein or protein(s) regulating the activity of preexisting transport protein(s) because it can be inhibited by chloramphenicol. In fact PotD is an important subunit for polyamine transport in bacteria and parasites [37, 52]. Moreover, PotD has been shown to contribute to virulence in both a murine sepsis model and a pneumonia model with capsular type 3 pneumococci [53].

4. Effect of abiotic stress on cellular polyamines

Polyamine metabolism is responsive to wide arrays of environmental stress conditions [1]. The levels of polyamines are an integral part of the response mechanisms of living organisms to various stresses such as osmotic [54, 55], salinity [9, 20, 56-59], heat, drought, and light [60, 61], as well as chilling temperature [62] and UV radiation [63, 64]. One possible mechanism of salt resistance in cyanobacteria is due to the highly increased contents of spermidine and spermine against the small increase in putrescine content [9]. Alternatively, the salt sensitivity in plants is due to a large increase of putrescine and incapacity to maintain high levels of spermidine and spermine [65]. In general, putrescine accumulation is very often characteristic of a stress response. Although this accumulation could play a protective role in the cell, it has also been reported that putrescine excess may have some negative effects [66]. The endogenous levels of polyamines may serve as markers for different phases of the growth response under NaCl concentrations [65]. However, no clear relationship is observed between the mean levels of salinity resistance and the endogenous concentrations of spermidine or spermine [67]. Table 2 shows the effect of various abiotic stresses on ADC and PotD in terms of transcript, activity and protein levels. The transcriptional levels of *adc1* (slr1312) in *Synechocystis* is highly induced under ionic stress whereas another *adc* gene, namely *adc2* (slr0662) is not affected, showing constant levels after ionic-stress treatment (Pothipongsa *et al.*, unpublished). The uncharacterized environmental regulation of the functionally active *Synechocystis potD* gene at the transcript and protein levels has been studied [43]. The steady-state transcript amounts of the *potD* gene are under regulation by a wide spectrum of environmental factors including light, osmolarity, temperature and nutrient availability and the PotD protein amount also shows regulation but its direction cannot be predicted from the transcript levels.

The levels of perchloric acid-soluble and -insoluble polyamines show a dynamic change in response to ionic, osmotic and UV stresses. UV radiations (UV-A, UV-B and UV-C) decrease the perchloric acid-insoluble polyamine contents, under short term stress of one hour [64]. Putrescine and spermine are increased under UV-B and UV-C. UV-A increases the free form of spermidine as opposed to the decrease in the bound form of spermidine. Osmotic stress highly regulates the perchloric acid-insoluble levels whereas ionic stress has no effect on the bound form of polyamines [68]. In a green alga *Scenedesmus obliquus*, high CO₂ concentrations cause an increase in the levels of thylakoid-bound putrescine which leads to an increase of the active reaction center density with a decrease in the light harvesting complex II size [7].

The osmotica with widely different assimilation routes, such as sorbitol [69], mannitol, sucrose, glycerol [71], polyethylene glycol [67, 70], all induce a rise in putrescine. These changes are associated with measurable signs of stress, such as wilting and protein loss [1]. On the basis of osmotic strength, NaCl, KCl, sucrose, or glycerol can induce similar decreases in cellular homospermidine content in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* P220. Homospermidine, an analog of spermidine, is an organic polycation detected ubiquitously in the soil environment and its occurrence has been demonstrated in a wide variety of microorganisms. Subsequently, the cellular levels of homospermidine in strain P220 may be regulated by mechanisms related to their pH and osmotic tolerance [71]. In a highly salt-tolerant strain, Mg²⁺ and homospermidine, a major polyamine in *Rhizobium*, might be closely associated with osmoregulation, since the cellular levels of Mg²⁺ and homospermidine are also regulated critically in response to the external medium osmolarity [71]. The decline of spermidine and spermine levels beyond 30 min of stress in tolerant rice callus, indicates a shift towards the production and accumulation of the higher molecular mass rare polyamines, norspermidine and norspermine. The pattern of accumulation of uncommon polyamines under heat stress in the tolerant cultivar's callus is consistent with that observed in heat-tolerant cotton [72]. Recent studies in a bacterium *Yersinia pestis* have shown that polyamines are required for the formation of biofilm. When the genes for ADC and ODC were mutated; both putrescine and spermidine levels were hardly detectable and this led to a loss of biofilm formation. This situation was reversed by the addition of putrescine [73]. The biofilm formation renders a valuable protective mechanism against various detrimental conditions such as pH, UV stress as well as the host defence mechanism [74]. These indicate that the changes of polyamine forms and contents might be the adaptation mechanism for the survival under insulting environments in all organisms.

Table 2 Changes in ADC and PotD in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under different abiotic stresses

Stress conditions	ADC		PotD	
	Transcript	Activity	Transcript	Protein
Short-term treatment^a				
Darkness	± [21]	± [21]	± [43]	ND
High light intensity	+ [21]	+ [21]	ND	ND
UV B irradiation	- [64]	+ [64]	ND	ND
Low temperature	+ [21]	- [21]	± [43]	ND
High temperature	+ [21]	+ [21]	± [43]	ND
Salt stress	+ [21]	+ [21]	+ [43]	ND
Salt stress + High light intensity	+ [21]	+ [21]	ND	ND
Long-term treatment^b				
Darkness	± [21]	± [21]	± [43]	- [43]
Low temperature	ND	ND	+ [43]	± [43]
High temperature	ND	ND	- [43]	- [43]
Salt stress	+ [9]	± [9]	+ [43]	- [43]
Osmotic stress	+ [9]	+ [9]	+ [43]	± [43]

^a: incubation time from 15 min to 18 h

^b: incubation time from 3 d to 10 d

The symbols +, - and ± indicate an increased, a decreased and an unchanged level, respectively, based on data from references shown in the brackets. ND: not determined.

5. Concluding remarks and future perspectives

The overall picture of polyamine metabolism in cyanobacteria is still far from clear, encompassing the biosynthesis, transport and catabolism. This should encourage more researchers to unveil the mechanism governing the regulation and function of polyamines *in vivo*. Although ADC has been shown to play a role in the adaptation of cells under various stress conditions [2, 9, 20]; the localization of the enzyme still remains obscure. SAMDC activity is found in *Synechocystis* cells [9] although its gene has not been found. Two other enzymes, spermidine synthase and spermine synthase, which are involved in the addition of the propylamine group onto putrescine to produce spermidine and onto spermidine to produce spermine, still remain elusive in cyanobacteria. New biochemical approaches such as gene walking technique, bioinformatic tools and appropriate mutant construction are recommended as a research tool for further study on polyamine metabolism in cyanobacteria. Importantly, the forms of polyamines which can influence the function and regulation of polyamines *in vivo* are still mysterious. Polyamines bound with proteins or enzymes have impacts on the intracellular processes and actions. Membranes are also one target of polyamine binding inside the cell based on the positive charges of polyamine molecules. On the other hand, the actual mechanism of polyamine in response to environmental stress is also another important topic. The aspect regarding polyamine catabolism is also worth studying. There are many findings confirming that polyamine oxidation is involved in the induction of programmed cell death. The study on polyamine catabolism in cyanobacteria, may help us to better understand how programmed cell death occurs in living organism.

The properties of the polyamine transport systems in *Synechocystis* sp. PCC 6803 have been presently studied in detail. However, many characteristics still remain unknown or poorly understood. This is especially true for the membrane-associated proteins such as ATPase and transmembrane proteins. The polyamine uptake and its binding study defines the characteristics of the polyamine binding sites on PotD proteins. It is known that a sequence comparison with *Synechocystis* PotD and *E. coli* PotD revealed several amino acid residues crucial for polyamine binding. We expect that the polyamine transporter in *Synechocystis* is structurally similar to the polyamine transporter in *E. coli*. Analyses of knockout strain of *Synechocystis* lacking PotD and other subunits are vital for the insight into the mechanism of polyamine transport in

cyanobacteria. Last but not least, the possibility that PotD might also be involved in the excretion of polyamines to overcome the toxicity problems inside the cells cannot be overlooked.

Acknowledgements The support from CHE (university staff development consortium) and from the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK 2555) under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture (PERFECTA) to A.I. are acknowledged. Most of the research on polyamine received financial support from the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. program and the Frontier Research (CU-CLUSTER-FOOD) Program from Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund.

References

- [1] Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*. 1999;140:103-125.
- [2] Bagni N, Tassoni A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids*. 2001;20:301-317.
- [3] Berger FG, Szymanski P, Read E, Watson G. Androgen-regulated ornithine decarboxylase mRNAs of mouse kidney. *Journal of Biological Chemistry*. 1984;259:7941-7946.
- [4] Heby O. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation*. 1981;19:1-12.
- [5] Nickerson KW, Dunkle LD, Van Etten JL. Absence of spermine in filamentous fungi. *Journal of Bacteriology*. 1977;129:173-176.
- [6] Toth C, Coffino P. Regulated degradation of yeast ornithine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:25921-25926.
- [7] Logothetis K, Dakanali S, Ioannidis N, Kotzabasis K. The impact of high CO₂ concentrations on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines. *Journal of Plant Physiology*. 2004;161:715-724.
- [8] Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamine modulator in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines. *Journal of Biochemistry*. 2006;139:11-16.
- [9] Jantaro S, Mäenpää P, Mulo P, Incharoensakdi A. Content and biosynthesis of polyamines in salt and osmotically stressed cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters*. 2003;228:129-135.
- [10] Hosoya R, Hamana K, Isobe M, Yokota A. Polyamine distribution profiles within cyanobacteria. *Microbiology Culture Collection*. 2005;21:3-8.
- [11] Raksajit W, Mäenpää P, Incharoensakdi A. Putrescine transport in a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2006;39:394-399.
- [12] Flink I, Pettijohn DE. Polyamines stabilise DNA folds. *Nature* 1975;253:62-63.
- [13] Yoshida I, Hirasawa W. Photoinduction of arginine decarboxylase activity in leaves of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*. 1998;49:2255-2259.
- [14] Dondini L, Bonazzi S, Serafini-Fracassini D. Recovery of growth capacity and of chloroplast transglutaminase activity induced by polyamines in a polyamine-deficient variant strain of *Dunaliella salina*. *Journal of Plant Physiology*. 2000;157:473-480.
- [15] Feuerstein BG, Pattabiraman N, Marton LJ. Molecular mechanics of the interactions of spermine with DNA: DNA bending as a result of ligand binding. *Nucleic Acids Research*. 1990;18:1271-1282.
- [16] Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero Jr RA. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1998;95:11140-11145.
- [17] Yoda H, Hiroi Y, Sano H. Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiology*. 2006; 142: 193-206.
- [18] Bey P, Danzin C, Jung M. Inhibition of basic amino acid decarboxylase involved in polyamine biosynthesis. In: McCann PP, Pegg A, Sjoerdsma A, (Eds.) *Inhibition of Polyamine Metabolism*. San Diego, CA: Academic Press; 1987:1-31.
- [19] Allen KD. Assaying gene content in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2002;99:9568-9572.
- [20] Schriek S, Ruckert C, Staiger D, Pistorius EK, Michel KP. Bioinformatic evaluation of L-arginine catabolic pathways in 24 cyanobacteria and transcriptional analysis of genes encoding enzymes of L-arginine catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Genomics*. 2007;8:437.
- [21] Jantaro S, Kidron H, Chesnel D, Salminen T, Incharoensakdi A, Mulo P, Mäenpää P. Structural modeling and environmental regulation of arginine decarboxylase in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Archives of Microbiology*. 2006;184:397-406.
- [22] Regunathan S, Reis DJ. Characterization of arginine decarboxylase in rat brain and liver: distinction from ornithine decarboxylase. *Journal of Neurochemistry*. 2000;74:2201-2208.
- [23] Robie CA, Minocha SC. Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. I. The effects of difluoromethylornithine and difluoromethylarginine. *Plant Science*. 1989;65:45-54.
- [24] Voigt J, Deinert B, Bohley P. Subcellular localization and light-dark control of ornithine decarboxylase in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plantarum*. 2000;108:353-360.
- [25] Borrell A, Culiñez-Macia FA, Altabella T, Besford RT, Flores D, Tiburcio AF. Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. *Plant Physiology*. 1995;109:771-776.
- [26] Smith TA, Meeuse BJD. Production of volatile amines in some Arum lily species. *Plant Physiology*. 1976;41:343-347.
- [27] Casero Jr RA, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nature Reviews*. 2007;6: 373-390.

- [28] Martin-Tanguy JE. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiologia Plantarum*. 1997;100:657-688.
- [29] Kurata HT, Nichols CG. Polyamine block of Kir channels: toward a molecular picture. In: Wang J-Y, Casero Jr RA, eds. *Polyamine Cell Signaling: Physiology, Pharmacology, and Cancer Research*. New Jersey: Human Press Inc.; 2006: 383-429.
- [30] Negrel J. The biosynthesis of cinnamoylputrescines in callus tissue cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*. 1989;28:477-481.
- [31] Schuber F. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochemical Journal*. 1989;260:1-10.
- [32] Hirao T, Sato M, Shirahata A, Kamio Y. Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in *Anaerovibrio lipolytica*. *Journal of Bacteriology*. 2000;182:1154-1157.
- [33] Folk JE. Transglutaminases. *Annual Review of Biochemistry*. 1980;49:517-531.
- [34] Votyakova TV, Wallace HM, Dunbar B, Wilson SB. The covalent attachment of polyamines to proteins in plant mitochondria. *European Journal of Biochemistry*. 1999;260:250-257.
- [35] Belting M, Mani K, Jonsson M, Chang F, Sandgren S, Jonsson S, Ding K, Delcros J-G, Fransson LA. Glycan-1 is a vehicle for polyamine uptake in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:47181-47189.
- [36] Bagni N, Pitocchi R. Uptake and transport of polyamines and inhibitors of polyamine metabolism in Plants. In: Slocum RD, Flores HE, eds, *Biochemistry and Physiology of polyamine in plants*. Boca Raton: CRC Press; 1991:105-118.
- [37] Igarashi K, Kashiwagi K. Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010;doi: 10.1016/j.plaphy.2010.01.017.
- [38] Igarashi K. Physiological functions of polyamines and regulation of polyamine contents in cells. *Yakugaku Zasshi* . 2006;126: 455-471 in Japanese.
- [39] Guarino LA, Cohen SS. Mechanism of toxicity of putrescine in *Anacystis nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1979;76:3660-3664.
- [40] Raksajit W, Yodsang P, Mäenpää P, Incharoensakdi A. Characterization of spermidine transport system in a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009;19:447-454.
- [41] Ramakrishna S, Guarino LA, Cohen SS. Polyamines of *Anacystis nidulans* and metabolism of exogenous spermidine and spermine. *Journal of Bacteriology*. 1978;134:744-750.
- [42] Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochemical Journal*. 1999;344:633-642.
- [43] Brandt AM, Raksajit W, Yodsang P, Mulo P, Incharoensakdi A, Salminen T, Mäenpää P. Characterization of the substrate-binding PotD subunit in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Archives of Microbiology*. 2010;192:791-801.
- [44] Vassilyev DG, Tomitori H, Kashiwagi K, Morikawa K, Igarashi K. Crystal structure and mutational analysis of the *Escherichia coli* putrescine receptor. Structural basis for substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:17604-17609.
- [45] Machius M, Brautigam CA, Tomchick DR, Ward P, Otwinowski Z, Blevins JS, Dekka RK, Norgard MV. Structural and biochemical basis for polyamine binding to the Tp0655 lipoprotein of *Treponema pallidum*: putative role for Tp0655 (TpPotD) as a polyamine receptor. *Journal of Molecular Biology*. 2007;373: 681-694.
- [46] Urdiales JL, Medina MA, Sanchez-Jimenez F. Polyamine metabolism revisited. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2001;13:1015-1019.
- [47] Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochemical Journal*. 2003;376:1-14.
- [48] Hoshino K, Momiyama E, Yoshida K, Nishimura K, Sakai S, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K. Polyamine transport by mammalian cells and mitochondria: role of antizyme and glycosaminoglycans. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:42801-42808.
- [49] Antognoni FS, Del Duca A, Kuraishi E, Kawabe T, Fukuchi-Shimogori K, Igarashi K. Transcriptional inhibition of the operon for the spermidine uptake system by the substrate-binding protein PotD. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:1942-1948.
- [50] Guarino LA, Cohen SS. Uptake and accumulation of putrescine and its lethality in *Anacystis nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1979;76: 3184-3188.
- [51] Badini L, Pistocchi R, Bagni N. Polyamine transport in the seaweed *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*. 1994;30:599-605.
- [52] Ware D, Lin JY, Swiatlo E. Involvement of PotD in *Streptococcus pneumoniae* polyamine transport and pathogenesis. *Infection and Immunity*. 2006; 74:352-361.
- [53] Shah P, Swiatlo E. Immunization with polyamine transport protein PotD protects mice against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 2006;74: 5888-5892.
- [54] Flores HE, Galston AW. Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. *Plant Physiology*. 1984;75:102-109.
- [55] Fujihara S, Yoneyama T. Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993;59:1104-1109.
- [56] Botella MA, Amor FD, Amoros A, Serrano M, Martinez V, Cerda A. Polyamine, ethylene and other physico-chemical parameters in tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits as affected by salinity. *Physiologia Plantarum*. 2000;109:428-434.
- [57] Santa-Cruz A, Acosta M, Perez-Alfocea F, Bolarin MC. Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiologia Plantarum*. 1997;101:341-346.
- [58] Lovett DL, Watts SA. Changes in polyamine levels in response to acclimation salinity in gills of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1995;110:115-119.
- [59] Aziz A, Martin-Tanguy J, Larher F. Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. *Physiologia Plantarum*. 1998;104:195-202.
- [60] Kaur-Sawhney R, Shih L, Galston AW. Relation of polyamine biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tubers. *Plant Physiology*. 1982;69:411-415.

- [61] Moysset L, Trull O, Santos MA, Simon E, Torne JM. Effect of end-of-day irradiations on polyamine accumulation in petal cultures of *Araujia sericifera*. *Physiologia Plantarum*. 2002;114:135-141.
- [62] Szalai G, Janda T, Bartok T, Paldi E. Role of light in changes in free amino acid and polyamine contents at chilling temperature in maize (*Zea mays*). *Physiologia Plantarum*. 1997;101:434-438.
- [63] Smith J, Burritt D, Bannister P. Ultraviolet-B radiation leads to a reduction in free polyamines in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Growth Regulation*. 2001;35:289-294.
- [64] Jantaro S, Pothipongsa A, Khanthasuwana S, Incharoensakdi A. Short-term UV-B and UV-C radiations preferentially decrease spermidine contents of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Current Microbiology*. DOI 10.007/s00284-010-9724-0.
- [65] Krishnamurthy R, Bhagwat KA. Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. *Plant Physiology*. 1989;91:500-504.
- [66] Walladino L, Camara T, Boget N, Claparols I, Santos M, Torne JM. Polyamine and free amino acid variations in NaCl-treated embryogenic maize callus from sensitive and resistant cultivars. *Journal of Plant Physiology*. 1996;149:179-185.
- [67] Lefevre I, Gratia E, Lutts S. Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). *Plant Science*. 2001;161:943-952.
- [68] Jantaro S. Effects of ionic and osmotic stresses on polyamine biosynthesis and photosynthetic systems in a cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. 2003:PhD Thesis, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 150 pages.
- [69] Tiburcio AF, Masdeu MA, Dumortier FM, Galston AW. Polyamine metabolism and osmotic stress. I. Relation to protoplast viability. *Plant Physiology*. 1986;82:369-374.
- [70] Erdei L, Szegletes Z, Barabas K, Pestenacz A. Responses in polyamine titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 1996;147:599-603.
- [71] Fujihara S, Yoneyama T. Response of *Rhizobium fredii* P220 to osmotic shock : interrelationships between K⁺, Mg²⁺, glutamate and homospermidine. *Microbiology*. 1994;140:1909-1916.
- [72] Roy M, Ghosh B. Polyamines, both common and uncommon, under heat stress in rice (*Oryza sativa*) callus. *Physiologia Plantarum*. 1996;98:196-200.
- [73] Petel CN, Wortham BW, Lines JL, Fetherston JD, Perry RD, Oliveira, MA. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *Journal of Biotechnology*. 2006; 188: 2355-2363.
- [74] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Review Microbiology*. 2004; 2: 95-108.
- [75] Alcázar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters*. 2006; 28: 1867-1876.