

A beszámolóban mindkét tématerületről - a kloroinspirációról és a stressz-hatásokról - számot adok. Mindkét témában részletesebben egy-egy kutatási területet fejtek ki: a kloroinspirációt illetően utólag is indoklandó a témamódosítást, a stressz területén pedig a környezettudományi szempontból fontos és közlésre bocsátott Cd-toxicitási eredményeinket ismertetendő. A többi eredmény ismertetése vázlatos, részletes kifejtésükre a közleményekben került sor, ill. egyes esetekben vizsgálataink a következő OTKA projekt keretében folytatjuk.

A pályázat eredményei között – a közölt cikkeken és a közlés alatt lévő kéziratokon túl – számon tartható, hogy összesen 5 PhD dolgozat részben* vagy teljes egészében** a pályázat keretében végzett kutatásokra alapult (Ezek közül kettő: Jens Kai Holm**, Physics Faculty, Roskilde University, Roskilde, Dánia és Putty-Reddy Sudhir*, Department of Biochemistry, Sri Venkateswara University, Tirupati, India, 2004-ben ill. 2005-ben sikeresen megvédésre került; a további dolgozatok védésére - Denys Pogoryelov*, ETH, Zürich, Svájc, Sashka Krumova** Institute of Plant Physiology, BAS, Sofia, Bulgária és Tóth Szilvia Zita*, Laboratory of Bioenergetics, University of Geneva, Genf, Svájc - még ebben az évben sor kerül.)

1. Kloroinspiráció

A kloroinspiráció az endogén redukáló erőknél (NAD(P)H, szukcinát), a fotoszintetikus elektrontranszportlánc egyes elemeinek közvetítésével és a molekuláris oxigén, mint végső elektron akceptor felhasználásával történő oxidációjaként definiálható.

1.1. A kloroinspirációs elektrontranszportlánc

A kloroinspiráció létére először légzésgátlóknak (cianid, CO, SHAM) a PQ redoxállapotára gyakorolt hatásából (Bennoun, 1982, Garab és mtsai. 1989, Bennoun, 1994; Buchel and Garab, 1995; Peltier and Cournac, 2002) következtek, amit az oxigén izotóp kicserélődés polarográfiás ill. tömegspektrografiás meghatározásával (Peltier et al., 1987) sikerült megerősíteni. Az első feltételezések szerint a fotoszintetikus elektrontranszportlánc intermedier komponenseit egy hipotetikus reduktáz redukálja és egy feltételezett terminális oxidáz oxidálja a molekuláris oxigén felhasználásával. Ezen megfigyelések azonban magyarázhatók a mitokondrium és a kloroplastisz közötti redox kölcsönhatésként és ezt több esetben bizonyították is (Bennoun, 1994; Peltier and Cournac, 2002). Felmerült a kérdés, hogy létezik-e egy ténylegesen a kloroplastisz tilakoid membránjában lokalizált légzési elektrontranszport, ami kölcsönhat a fotoszintetikus elektrontranszporttal, vagy ez a kölcsönhatás minden esetben a mitokondriumra vezethető vissza. Ennek tisztázására intenzív kutatások indultak a kloroinspirációs elektrontranszport tilakoid membránban elhelyezkedő hipotetikus elemeinek kimutatására.

Magasabb rendű növények kloroplastisz teljes genomjának szekvencia analízise a mitokondriális ill. bakteriális NADH dehidrogenáz komplexek alegységeivel homológ génszakaszokat találtak, melyek ténylegesen kifejeződnek és az általuk kódolt fehérjék a tilakoid membránban megtalálhatók (Peltier and Cournac, 2002). A kloroplastiszból Ndh1-nek nevezett fehérje komplexet izolálták és jellemezték (Burrows et al., 1998; Corneille et al., 1998; Guedeney et al., 1996; Sazanov et al., 1998). Az izolált komplex *in vitro* képes oxidálni a NADH-t és a gén inaktivációja dohány kloroplast genetikai transzformációja révén megszűnik vagy jelentősen csökken a PQ nem-fotokémia redukciója. Az Ndh1 komplex részvételét a PSI ciklusban szintén bizonyították dohány *ndh* mutánsaiban. Ugyanakkor a PSI ciklus egyéb Ndh1-től független biokémiai

útvonalai is potenciális jelöltjei lehetnek a klororespiratorikus PQ redukciónak, olyan fajokban, amelyek nem rendelkeznek kloroplasztiszban lokalizált NADH dehidrogenázzal, mint pl. a *Chlamydomonas reinhardtii* egysejtű zöldalga (Peltier and Cournac, 2002).

Több magasabb rendű növény kloroplasztisz genomjának teljes szekvenciája ismert, de nem sikerült a klororespiráció terminális oxidázának lehetséges jelöltet találni szekvencia homológia alapján. A magasabb rendű növények teljes nukleáris genomjainak szekvenciája a pályázat indulásakor még nem volt ismert. A kloroplasztisz endoszimbiotikus eredete alapján feltételezhető volt, hogy a klororespiráció terminális oxidáza cianobakteriális eredetű, mivel ezekben az organizmusokban a fotoszintetikus és a légzési lánc egyazon membránban helyezkedik el. A *Synechocystis PCC 6803* genomjának teljes szekvenciája ismert volt, ami lehetővé tette az ismert oxidázokkal homológiát mutató, eddig azonosítatlan terminális oxidázok keresését. Mindezek alapján a *Synechocystis* alkalmas modell organizmusnak tűnt a magasabb rendű növények klororespiratorikus terminális oxidáz feltételezett prokariotikus ortológjainak keresésére, amely alapján nagyobb esély lenne a kloroplasztisz terminális oxidáz azonosítására. A citokróom aa₃ és quinol típusú oxidázokkal való homológia alapján az ismert citokróom aa₃ oxidáz mellett két másik feltételezett oxidáz azonosítható a teljes *Synechocystis* genomban: a ctaII amely három alegységből áll: ctaDII, ctaEII, ctaCII (slr 2082, slr 2083, slr 0813) és a cyd amelyet két alegység alkotja a cydA és cydB (slr1390, slr 1380). A ctaII citokróom bo típusú, míg a cyd citokróom bd-típusú quinol oxidázként azonosítható. Különböző laboratóriumokból ellentétes eredményekről számoltak be a két oxidáz aktivitásáról és a fotoszintetikus elektrontranszporttal való kölcsönhatásáról. Howitt és Vermaas (1998) nem talált aktív ctaII génterméket *Synechocystis* sejtekben míg a Cyd fehérje ugyan aktívnak bizonyult, de nem mutatott kompetíciót a fotoszintetikus elektron transzporttal a PQ oxidációjában. Ezzel ellentétben Endo és mtsai (1997) a Cyd fehérje szerepét mutatta ki a PQ oxidációjában míg Pils és mtsai (1997) aktív CtaII fehérjéről számoltak be

1.2. A klororespiráció terminális oxidáza(i)

A kloroplasztisz terminális oxidázának keresésében egy *Arabidopsis* pigment mutáns, az *Immutans* nem klororespirációs indíttatású vizsgálata hozott áttörést (Carol and Kuntz, 2001). Ebben a mutánsban a karotin bioszintézis gátolt a PDS enzim katalizálta phytoen deszaturációjánál. Maga a PDS enzimet nem érinti a mutáció, de az inaktív marad mivel az enzim közvetve oxidált állapotú PQ-t igényel kofaktorként. A mutáció hátterében egy PQ oxidáz enzim áll, amelynek hiányában a redukált PQ koncentrációja erős fényintenzitás mellett magas szinten marad, gátolva ezáltal a PQ függő PDS enzimet.

Elvégezték a PQ oxidáz enzim részletes molekuláris biológiai analizálását. Eszerint a Ptox-nak elnevezett fehérje a sejtmagban kódolt intrinsic membrán fehérje, de egy kloroplasztisz lokalizációt biztosító vezető szekvenciát tartalmaz. A fehérje a tilakoid membrán sztróma felőli oldalán helyezkedik el. A Ptox szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutat a mitokondriális alternatív oxidáz (Aox) szekvenciájával és azzal azonos géncsaládba a Dox (diiron carboxylate quinol oxidase) géncsaládba tartozik (Berthold and Stenmark, 2003). Más magasabb rendű növényfaj és a *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalga genomjában is megtalálható a Ptox fehérjének megfelelő szekvencia és azok filogenetikai analiziséből kiderül, hogy az Aox fehérjékkel való hasonlóságuk

ellenére a Dox géncsaládon belül a kloroplasztiszban elhelyezkedő Ptox és a mitokondriális alternatív oxidázok (Aox) két jól elkülönülő alcsoportot alkotnak. A fehérje klororespirációban való szerepét számos megfigyelés igazolja (Joet et al., 2002; Josse et al., 2003; Kuntz, 2004; Peltier and Cournac, 2002). *E. coli*-ban termeltetett Ptox fehérje PQ-ra specifikus quinol:oxigén oxidoreduktáz aktivitást mutat amely cianidra rezisztens, de szenzitív a tipikus Aox gátlószerekre mint a SHAM és propil-gallate. A klororespirációs oxigén fogyasztás szintén gátolható ezekkel a gátlószerekkel. Dohánynövényben kifejeztetett *Arabidopsis* Ptox jelentősen megnöveli a PQ nem-fotokémiai oxidációját. A fotoszintézis sötét-fény indukciós átmenete során az oxigénre irányuló elektron transzportot katalizál. *Chlamydomonas*-ban kimutatták, hogy az enzim aktivitása fokozódik a PQ redukáltsági fokának növekedésével. A Ptox multifunkcionális fehérje, melynek szerepe van a karotinoid deszaturációban, a kloro- és kromorespirációban, amely funkciókban közös elem a PQ redox állapotának modulációja.

A Ptox szekvenciája alapján nem hozható rokonságba az általunk javasolt *Synechocystis* terminális oxidázok (CtaII, Cyd) egyikével sem és a *Synechocystis* teljes genomja sem tartalmaz a Ptox génjével homológ szekvenciákat. Időközben más cianobaktériumok teljes genom szekvenciáját meghatározták és ezek közül négy faj esetben meg is található a Ptox prokarióta orthológja, így annak prokarióta eredete bizonyított (Atteia et al., 2004; Finnegan et al., 2003; McDonald et al., 2003). A Ptox szerepe mint klororespirációs terminális oxidáz jól megalapozott, azonban nem zárja ki más terminális oxidáz szerepét. A Ptox nem gátolható cianiddal azonban több megfigyelés is mutatja egy cianid szenzitív terminális oxidáz szerepét a klororespirációban, (köztük Büchel és mtsai, 1998; Garab és mtsai 1988; Büchel és Garab, 1995). A *Synechocystis*-ben előforduló alternatív oxidázok szintén gátolhatók cianiddal (Howitt and Vermaas, 1998), így felmerült a lehetősége hogy a CtaII vagy cyd fehérjékkel homológ terminális oxidáz is jelen lehet a Ptox mellett a tilakoid membránban, azonban az időközben elkészült teljes *Arabidopsis* genomban sem volt található egyetlen kloroplasztiszba targetált CtaII vagy cydb típusú quinol oxidáz homológ. Továbbá a cianid szenzitív klororespirációs aktivitások esetén sok esetben kiderült, hogy az valójában a mitokondriumban lezajló légzési elektrontranszportláncsal való kölcsönhatásra vezethető vissza. Az irodalomban előfordulnak további lehetséges elképzelések egy esetleges cianid szenzitív klororespiratórikus terminális oxidáz létéről, de ezen spekulatív hipotézisek nem nyújtottak elegendő kiindulási alapot a terminális oxidáz keresésére eredetileg felállított, cianobaktériális modellen alapuló stratégiánk folytatásához.

Bár a *Synechocystis* alternatív terminális oxidázai nem hozhatók összefüggésbe a magasabb rendű növények és zöldségkloroplasztiszok klororespirációs terminális oxidázával, azok szerepének vizsgálata a cianobaktériumok légzési és fotoszintetikus elektrontranszportja kölcsönhatásának más aspektusaiban továbbra is fontos marad. Ez a kérdés tehát – dacára a jelentős erőfeszítésnek - továbbra is nyitott marad.

1. 3. A termolumineszcencia AG (afterglow) sávja

A fotoszintetikus és légzési elektrontranszportlánc kölcsönhatásának egyik megnyilvánulása az ún. AG (After Glow) termolumineszcencia sáv is. A termolumineszcencia a PSII reakciócentrumában alacsony hőmérsékleten történő megvilágítás során lezajló töltésszeparációt követően a pozitív és negatív töltések a PSII

különböző redoxkomponensein tárolodnak. A minta fokozatos felmelegítése közben ezen töltések egy része fény kibocsátásával járó rekombinációban vesz részt. A hőmérséklet függvényében mért fluoreszcencia intenzitás a TL görbe. A TL görbében megfigyelhető TL sávok nagyságából és azok maximumához tartozó hőmérsékleti értékéből a rekombinációban résztvevő komponensek redox állapotára következtethetünk. Intakt elektrontranszportláncsal rendelkező minták esetén a TL görbét domináló fő TL sáv az ún. B- sáv a vízbontó rendszer S_2 állapotában tárolt pozitív és a PSII másodlagos kinon akceptorán (Q_B) tárolt negatív töltés rekombinációjából ered és maximuma $32\text{ }^\circ\text{C}$ körül van. Magasabb rendű növényekben Ducruet és mtsai kimutattak és részletesen jellemeztek egy új TL sávot, az AG sávot (Miranda and Ducruet, 1995). Az AG TL a B-sávhoz hasonlóan az S_2^+/Q_B^- rekombinációjából ered, de a Q_B a tilakoid membránban felhalmozott redukált PQ-ból történik reverz elektronáramlás következtében. Termodinamikailag az előrehaladó reakció a kedvezményezett, de bizonyos körülmények között, mint a tilakoid lumenének magas proton koncentrációja és a sztróma redukáló erőiből (NAD(P)H) a PQ felé történő fokozott elektron áramlás az AG TL-t eredményező reverz reakció kellő valószínűséggel lejátszódik. A PQ feltöltődése valószínűleg a kloroinspiráció PQ redukciós lépésének egy lehetséges alternatívájával azonos módon történik. Ndh1 hiányos mutánsokban az AG jelen van, azonban az FQR (ferredoxin-PQ oxidoreduktáz) dependens PQ redukció gátlószereire (antimicin A) érzékeny, így feltehetőleg a PQ feltöltődése ezen az úton megy végbe (Havaux et al., 2005). *Chlamydomonas reinhardtii* algában a kloroinspiratorikus oxigén felvétel és a Ptox terminális oxidáz kimutatható, azonban ennek az organizmusnak a kloroplasztisza nem tartalmaz NADPH-PQ reduktázt. A kloroinspiratorikus PQ redukció ebben az algában feltételezhetően az AG képződésében is szerepet játszó FQR révén történik. Jean-Marc Ducruet-vel kooperációban vizsgáltuk az AG TL megjelenését *Chlamydomonas*-on. Intakt sejteken B-sáv mellett sikerült megfigyelnünk egy új sávot, amelyet jellemzői alapján, pH függősége, inhibitorokra való érzékenysége, a sáv amplitudójának osszcillációja a gerjesztő flashek számának függvényében, AG TL sávként azonosítottunk. Az AG TL megléte a *Chlamydomonas*-ban a kloroplasztisz stromájából kiinduló PQ redukció jelenlétét bizonyítja, ami a kloroinspiráció bevezető szakasza is lehet.

Cianobaktériumokban korábban nem sikerült AG TL-t kimutatni. Ennek egyik lehetséges oka, hogy ezekben az organizmusokban a tilakoidban jelenlévő terminális oxidázok a fotoszintetikus elektrontranszporttal kölcsönhatva megakadályozzák a redukált PQ olyan mértékű felhalmozódását, ami a PQ-ból a PSII reakciócentrumába történő reverz elektronáramlást biztosítaná. *Spirulina* kékalga egyik kémiai indukált mutánsában, az I22 mutánsában sikerült megfigyelni az AG TL-sávot. A sáv a magasabb rendű növényekhez hasonlóan $45\text{ }^\circ\text{C}$ körül jelenik meg távoli vörös vagy flash sorozattal történő megvilágítás hatására és szelektíven gátolható uncouplerekkel (FCCP, Nigericin). Ez az első eset hogy sikerült egy kékalgában az AG sávot megfigyelni.

Elektrontranszport sebesség méréseink mutatják, hogy az I22 mutánsban mind a fotoszintetikus, mind a respiratorikus elektrontranszport sebessége jelentősen lassult. P700 és citokróm f fényindukált abszorpció változásának mérésével ill. fluoreszcencia relaxáció kinetikájának mérésével sikerült meghatározni a mutáció hatóhelyét az elektrontranszport láncban. Az I22 mutáció a légzési és fotoszintetikus lánc közös elemét képező PQ redukált formájának citokróm b_6/f általi oxidációját akadályozza. Az

elektrontranszportnak a PSII által katalizált, a víz oxidációjától a PQ-ig tartó része, a fluoreszcencia indukció és termolumineszcencia méréseinkből kapott eredmények alapján, nem gátolt. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az AG TL sáv megjelenése a PQH₂ lelassult oxidációjának és az ezzel járó PQH₂ akkumulációjának köszönhető. Vad típusú *Spirulina* algában a citokróm_{b₆/f}-től közvetve függő citokróm aa₃ terminális oxidáznak köszönhetően nincs PQH₂ felhalmozódás és ennek megfelelően nincs AG TL sem. A *Synechocystis*ben feltételezett alternatív terminális oxidáz, a cyd egy quinol típusú oxidáz, amely közvetlenül képes a PQH₂-t oxidálni, így ha létezik ilyen reakció a *Spirulinában*, akkor azt az I22 mutáció nem érintené. Az AG TL megjelenése az I22 mutánsban azt valószínűsíti, hogy ilyen típusú alternatív oxidáz aktivitás nincs jelen jelentős mértékben *Spirulinában*, vagy a fotoszintetikus elektrontranszportláncról elkülönülten, csak a citoplazma membránban található meg, mint ahogy azt Vermaas és mtsai *Synechocystis* esetében is javasolták a Cyd quinol oxidáz vizsgálatából származó eredményeik magyarázatára.

Az I22 mutáció egy másik figyelemreméltó következménye hogy a mutációt hordozó alga sejtek nem képesek a γ -linolénsav előállítására. Az I22 mutáció pontos helye egyelőre nem ismert, de az biztosan nem érinti a γ -linolénsav szintéziséért felelős enzimek génjeit. A megfelelő enzim jelen van az I22 mutációban. A mutáció és a zsírsavszintézis közötti összefüggés nem ismert. Elképzelhető, hogy az enzim közvetve a PQ oxidált formáját mint kofaktort használja a deszaturációs reakcióban hasonlóan az *Arabidopsis* PDS enziméhez, amely a PQ-t a karotin szintéziséhez vezető telítetlen kötés kialakításához igényli. Ismert, hogy a PQ és/vagy a citokróm b₆/f redox állapota kináz enzimek közvetítésével számos fehérje működését szabályozza, így elképzelhető, hogy a szabályosan telítetlen zsírsavak szintéziséért felelős enzimek aktivitását is. A zsírsavszintézis és az elektrontranszport aktivitása közötti kapcsolatra több korábbi megfigyelés is utal. A telítetlen zsírsavak fontos szerepet játsznak a hidegstressz elleni védekezésben. Függetlenül attól, hogy az I22 mutáció és a zsírsav metabolizmus kapcsolata nem tisztázott, az I22 tanulmányozásából kapott eredmények arra utalnak, hogy a terminális oxidáz(ok) az energia termelés mellett, a fotoszintetikus elektrontranszporttal kölcsönhatásban az elektrontranszport komponensek redox állapotának modulálásán keresztül fontos szabályozó szerepet is betöltenek.

1. 4. A kloroinspiráció feltételezett serserkentése Spirulinában

Az *Athrospira (Spirulina) platensis* fonalas cianobaktérium vizsgálatával az volt a célunk, hogy kísérletet tegyünk arra, hogy ebben a cianobaktériumban, a speciális feltételek - magas pH (>10) és magas Na⁺-koncentráció (>100 mM) – miatt, ill. a sejtmembrán Na⁺/H⁺ antiport rendszeréhez kapcsolódóan működik egy terminális oxidáz. Ezt a feltételezést azonban nem támasztották alá a kísérleti eredmények, és nem sikerült közelebb kerülni így módon a terminális oxidáz azonosításához. (A magas sóhatásra vonatkozó, a stresszhatás szempontjából érdekes kísérleteinket sikeresen lezártuk (2.4.))

1.5. Plasztocianin-mutáns

A légzés és a fotoszintézis kölcsönhatásának könnyebb – tranziens spektrofotometriás – tanulmányozása érdekében létrehoztunk egy *Synechocystis sp. PCC6803* mutánst. A PC-t kódoló petE gént (CyanoBase- <http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>- referencia név: sll0199) PCR módszerrel amplifikáltuk, majd Bluescript II KS vektorba (Stratagene) klónoztuk. A petE génben található egyedi HpaI helyre erythromycin rezisztencia gént

klónoztunk. A kapott konstrukcióval transzformáltuk a PCC6803 törzset. A szegregációt PCR technikával ellenőriztük. A flash-fotometriai vizsgálatok folyamatban vannak.

2. Stresszhatások

2.1. Kadmium toxicitás

A kadmium az emberi tevékenység által az egyik legnagyobb mennyiségben a környezetbe juttatott nehézfém, amely kis mennyiségben is toxikus növényekre, állatokra és mikroorganizmusokra egyaránt. Veszélyességét fokozza, hogy a hosszú biológiai felezési ideje miatt könnyen felhalmozódik az élőlények szervezetben ill. a táplálék láncban. A Cd a toxikus hatását számos módon fejtheti ki, azonban a legtöbb ökoszisztéma alapját jelentő fotoautótrof élőlények számára létfontosságú fotoszintetikus folyamatok különösen érzékenyek erre a toxikus nehézfémre.

A Cd-nak a fotoszintézisre gyakorolt gátló hatását régóta vizsgálják, de az eredmények alapján nincsenek eddig sikerült egy egységes modellt alkotni a Cd hatásmechanizmusára (Das et al., 1997, Prasad et al. 2001). A Cd egyaránt befolyásolja a fotoszintézis fény- és sötétreakcióit. Gátolja a CO₂ fixációt a Calvin-ciklusban, a primer fotokémiai folyamatokat és a fotoszintetikus elektrontranszportot, változásokat indukál a kloroplasztisz és tilakoid membránok finomszerkezetében, gátolja a klorofill bioszintézisét, elősegítheti az oxidatív stresszt az enzimatikus és nem enzimatikus antioxidánsok koncentrációjának csökkentésével, megváltoztatja a fotoszintézis számára is létfontosságú mikroelemek összetételét.

Egyelőre nem tisztázott, hogy ezek közül melyik hatások tekinthetők primer hatásnak, és melyek a másodlagos, indirekt hatások. Egyes eredmények azt mutatják, hogy a Cd direkt módon befolyásolja a PS II működését, míg más eredmények azt a nézetet erősítik, hogy a Cd elsődlegesen a CO₂ redukciót gátolja a Calvin-ciklus enzimeinek gátlásával és az ezáltal kiváltott feed-back reguláció csökkenti a PS II aktivitását. Az ellentmondások egyik fő oka, hogy az *in vitro* végzett kísérletek más eredményt adnak mint az *in vivo* vizsgálatok. Az *in vivo* körülmények között azonban a magasabb rendű növényeknél a Cd felvétele ill. transzportja a fotoszintetikus szövetekbe és a kloroplasztiszokba annyi ideig tart, hogy közben a másodlagos hatások, mint például a vas hiány, tünetei is kialakulnak és időben átfednek az elsődleges hatásokkal.

Szemben a magasabb rendű növényekkel az egysejtű algák és cianobakteriumok gyorsan felveszik és akumulálják a kadmiumot ami alkalmasabbá teszi őket a Cd hatásának vizsgálatára. A cianobaktériumok nagy Cd megkötő képessége nemcsak a Cd hatásának vizsgálata szempontjából jelentős, hanem ez a tulajdonságuk alkalmassá teszi őket Cd-mal szennyezett vizek és talajok tisztítására is. Az ilyen irányú felhasználásukat segíti a Cd hatásmechanizmusának tisztázása ezekben a szervezetekben.

Fotoszintetikus aktivitás méréseink megmutatták, hogy a Cd 40 µM koncentrációban, rövid időn belül drasztikusan csökkenti az intakt sejtek fotoszintetikus aktivitását, az oxigén fejlődés sebessége 10-20 percen belül csaknem teljesen megszűnik. Ugyanakkor a Cd kezelést követően izolált tilakoidokon mesterséges elektronakceptorok segítségével mérve sem az első, sem a második fotokémiai rendszer aktivitásában nem látunk akkora változást, amivel a teljes fotoszintetikus aktivitásban megfigyelt gátlás magyarázható lenne. Ezeket az eredményeket sikerült *in vivo* körülmények között végzett mérésekkel is megerősíteni. A PS II-t *in vivo* termolumineszcencia segítségével jól vizsgálhatjuk. A termolumineszcencia a PS II reakciócentrumában végbemenő töltésszétválasztást követően, a PS II különböző redox komponensein tárolt pozitív és negatív töltések

rekombinációjából származik és így információkat szolgáltat a PS II működésére. Az egyetlen flash-sel gerjesztett termolumineszcencia görbe Cd kezelés után több órával mérve is változatlan marad, vagyis a PS II ezen idő alatt még teljesen funkcióképes, annak ellenére hogy ekkorra a fotoszintetikus aktivitás már megszűnt. A PS II aktivitása csak kb. 8 óra inkubálás után kezd csökkenni és 24 h múlva teljesen megszűnik.

A PS I *in vivo* aktivitását a PS I reakciócentrumának a P700-nak a fényindukált abszorpcióváltásával vizsgáltuk. Sötétadaptált mintákban megvilágítás hatására a P700 oxidálódik, ami abszorpcióváltozással jár. A P700 oxidációja folyamatos több másodperces megvilágítás alatt jellegzetes oszcilláló kinetikát követ, míg eléri a végleges értékét. Először egy gyors oxidáció megy végbe, majd a PS I akceptor oldalának átmeneti telítettsége miatt a PS I válik az elektrontranszport limitáló lépésévé és a PS II-ből származó elektronokkal újra redukálódik. A Calvin ciklus enzimeinek aktiválása után a PS I akceptor oldala ismét képes elektronokat fogadni a P700-tól, a sebességhatározó lépés újra a PS I donor oldala lesz és a P700 tartósan oxidált állapotba kerül. A fény kikapcsolása után a P700 redukált állapotba kerül. Cd kezelés után fél órával a P700 oxidációs kinetikája megváltozik. Csak átmeneti oxidációt figyelhetünk meg, és még a megvilágítás alatt a P700 újra teljesen redukált állapotba kerül és a folyamatos fény ellenére is redukált marad. A megvilágítást követő sötét periódus alatt sem figyelhető meg további redukció. Mindez arra utal, hogy a Cd kezelés hatására az elektrontranszport a PS I akceptor oldala vagy az elektrontranszport által termelt redukáló erőket felhasználó Calvin ciklus által limitáltak, a Cd elsődleges hatóhelyét is valahol itt kell keresni. A hosszú távon megfigyelhető PS II inaktiváció a csökkent fotoszintetikus kapacitás miatti feed-back reguláció eredménye lehet.

A Cd elsődleges hatóhelyének meghatározásához szükséges azokat a fehérjéket azonosítani amelyek a primer hatás idején belül képesek Cd-ot kötni. Először ¹⁰⁹Cd-es izotóp jelöléssel vizsgáltuk a Cd sejten belüli megoszlását. Rövid, 10-20 perces *in vivo* jelölés után a sejt által megkötött Cd 65%-a a sejtfallban található. Ez a Cd EDTA és Ca²⁺- mosással eltávolítható. A sejt belsejében felhalmozott kadmium 67%-át a tilakoid membrán köti meg. A különböző frakciókból megpróbáltuk gélelektroforézissel elválasztani a Cd kötő fehérjéket. A futtatáshoz szükséges teljes szolubilizálás során azonban a fehérjék elvesztették a Cd-jelölést. Tilakoid membránok részleges szolubilizálásával 20-30 kDa régióban sikerült kimutatni kadmium kötő fehérjét, de a feloldás itt sem volt elegendő ahhoz, hogy a kadmium kötő fehérjét egyértelműen azonosítsuk.

A kadmiumnak van egy olyan gamma sugárzó izotópja, a ^{111m}Cd amely lehetőséget ad a kadmium kötő fehérjék PAC (Perturbed Angular Correlation of gamma ray) spektroszkópiás jellemzésére natív állapotban. Ez a technika olyan fémtartalmú vagy fémkötő fehérjék vizsgálatára alkalmas, amelyben a fémion olyan izotóppal helyettesíthető, amely két gamma foton egymás utáni kibocsátásával bomlik. Az egyazon bomlásból származó két gamma foton iránya kvantummechanikai okokra visszavezethetően nem tetszőleges, azok egymáshoz viszonyított iránya meghatározott. A Cd által kibocsátott fotonok térbeli eloszlásából határozható meg a PAC spektrum (Hemmingsen et al. 2004). A szabad kadmium atomhoz képest egy fehérje által kötött Cd esetén a két gamma foton egymáshoz viszonyított kibocsátási iránya módosul a Cd-ot kötő ligandok által képzett erőtér hatására, ami a PAC spektrum megváltozását okozza. Az izotóp atommagja ill. az izotópot körülvevő elektromos tér közötti hiperfinom

kölcsönhatás ujjlenyomat szerűen jellemzi az izotópot körülvevő elektromosan töltött csoportokat. Mivel ezeket az izotópot koordináló ligandok határozzák meg, így azok kémiai természetére és a koordináció geometriai viszonyaira következtethetünk a PAC spektrumból. A Cd atommag és az azt körülvevő erőtér közötti kölcsönhatás erősségére jellemző ω_0 és az elektromos tér szimmetria viszonyait leíró η paramétereket a mért spektrumokból Fourier transzformációval határozhatjuk meg. A PAC spectrumokban megfigyelhető sávok szélessége a koordinációs geometria flexibilitását jellemzi. A keskeny sávok rigid konformációra utalnak, míg a széles sávok flexibilis, több lokális konformációs minimummal rendelkező strukturára utalnak. A molekula rotációs diffúziója az izotrópia osszcillációjának exponenciális csillapodását okozza, így a csillapodási időállandóból ill. annak megváltozásából a molekula dinamikáját, más fehérrje molekulákhoz való kötődését vizsgálhatjuk.

A koppenhágai Állatorvosi Egyetemen PAC spektroszkópiával vizsgáltuk a Cd fehérjékhez való kötődését intact *Synechocystis* sejtekben ill. izolált tilakoid membránokon. Intact sejteket 10-20 percig inkubáltunk ^{111}Cd izotóp jelenlétében, majd a sejtfalhoz kötődött Cd-ot mossással eltávolítottuk, majd felvettük a Cd PAC spektrumát. A PAC spektrum egyértelműen jelezi a Cd specifikus kötődését valamely fehérjéhez ($\omega_0 = 84 \pm 2.6$ és $\eta = 0.36 \pm 0.05$). Feltűnő a sáv nagy félérték szélessége és az osszcilláció gyors csillapodása.

Az intakt sejteken kapott spektrumokat összehasonlítottuk a korábban már PAC spektroszkópiával vizsgált fehérjék spektrumaival ill. a brookhaven-i fehérje adatbázisból kikerestük azoknak a fehérjéknek a háromdimenziós szerkezetét, amelyekről feltételezhető volt hogy képesek Cd kötésre. Elsősorban olyan fémtartalmú fehérjéket, amelyek cinket vagy rezet tartalmaznak, mert ezek viszonylag könnyen helyettesíthetők Cd-mal. A háromdimenziós szerkezet ismeretében kiszámolhatók azok az ω_0 és η értékek amelyeket kadmiummal való helyettesítés esetén kapnánk. Az általunk mért spektrum nagyfokú hasonlóságot mutatott az alfa és gamma típusú szénsav anhidrázok ismert vagy számolt spektrumaival. Ezek az enzimek cinket tartalmaznak a katalitikus centrumaikban és azt három hisztidin és egy vízmolekula koordinálja. Az alfa szénsav anhidrázok közül az emberi alfa szénsav anhidráz II isoformjának Cd-mal helyettesített változatát részletesen vizsgálták PAC spektroszkópiával és a *Synechocystisben* kapotthoz nagyon hasonló spektrumot mutat. Nem csak az ω_0 és η értékek, de a nagy sáv szélesség és nagyon gyors csillapodás is közös vonás a *Synechocystis* fehérjéjével. A humán szénsav anhidráz esetén kimutatták, hogy a PAC spektruma pH függő, mivel magas pH-n a ligand kötésben résztvevő vízmolekulát hidroxil ion helyettesíti, ami befolyásolja a Cd és a ligandok közötti kölcsönhatást és a sáv csúcsát a nagyobb frekvenciák irányába tolja el. Ugyanilyen hatást figyeltünk meg a *Synechocystisből* izolált tilakoid membránokon is amelyeket különböző pH-jú pufferekben szuszpendáltunk fel. Az imidazol a szénsav anhidrázok inhibitora, mivel a CO_2 kompetitoraként képes bekötödni az enzim aktív centrumában. Az imidazol bekötődése szintén megváltoztatja a Cd és ligandok közötti kölcsönhatást és az alacsonyabb frekvenciák felé tolja el a sávokat. Ez a hatás különösen magas pH-n jelentős. Ezt az eltolódást szintén sikerült kimutatni a *Synechocystisből* származó mintáinkon.

A szénsav anhidrázok és a fotoszintézis kapcsolata jól ismert (Villaraje et al. 2002). Algákban, cianobaktériumokban és a magasabb rendű növények közül a C4-es típusoknál szénsav anhidrázok vesznek részt a CO_2 sejten belüli akkumulációjában és eszenciális

szerepük van abban, hogy a Calvin-ciklus kulcs enzime, a RUBISCO számára a kellően magas lokális CO₂ koncentrációt biztosítsák. Ezen enzimek hiányában a kéalgák természetes légköri CO₂ koncentráció mellett nem életképesek. Az ismert szénsav anhidrázok többsége azonban a citoszolban helyezkedik el, de borsóban és *Chlamydomonasban* bizonyították, kéalgákban pedig feltételezik egy tilakoid membránhoz asszociált szénsav anhidráz létezését is (Hanson et al. 2003). Ennek az enzimnek a funkciója még nem tisztázott, de a hiánya szintén a CO₂ Calvin-ciklus általi redukcióját gátolja.

Synechocystis PCC6803 teljes genomját tartalmazó adatbázisban, ismert szénsav anhidrázokkal való homológiák keresése 2 béta és 2 gamma szénsav anhidráz homológ szekvenciát mutatott ki. A két béta szénsav anhidráz ismert és karakterizált fehérjék. Az EcaB (slr 0051) egy periplazmatikus, a CccA (slr 1347) egy karboxisomában lokalizálódó béta típusú szénsav anhidráz. A béta szénsav anhidrázok katalitikus centrumában a Zn atomot két hisztidin, egy szerin aminosav oldallánc valamint egy vízmolekula koordinálja. Az ezekből számolható ω_0 és η értékek alapján kizárható, hogy a PAC segítségével detektált Cd kötő fehérjével volnának azonosak. A két feltételezett gamma szénsav anhidráz azonban jó jelölt lehet mint Cd kötő fehérjék. Ezek közül a CcmM (sll 1031) egy részlegesen jellemzett fehérje. *Synechococcus* mutánsokon végzett vizsgálatok arra utalnak hogy a CcaA-val együtt a karboxiszomában lokalizálódik, de funkciója nem tisztázott. A ccmM géntermék szükséges az alga optimális növekedéséhez. A másik feltételezett gamma szénsav anhidráz homológ (slr 1084) egy még karakterizálatlan fehérje, de génszekvenciája tartalmazza mindazokat a konzervált aminosavakat, amelyek az ismert gamma szénsav anhidrázokban kivétel nélkül megtalálhatók és az enzim aktivitásáért felelősek: Zn-kötő ligandok (His-81, His-117 és His-122), a proton kötés és transzferben szerepet játszó aminosavak (Gln-75, Glu-62, Glu-84) ill. egyéb nem tisztázott funkcióju, de a gamma szénsav anhidrázokban tökéletesen konzervatív aminosavak (Arg-59, Asp-61 és Gln-75).

A PAC spektroszkópiai méréseink alapján feltételezzük, hogy a kadmium in vivo a sejtbe jutva rövid időn belül egy még nem azonosított tilakoidhoz asszociált, gamma típusú szénsav anhidráz enzimhez kötődik, helyettesíti annak Zn ionját és ezáltal inaktíválja az enzimet és ennek következményeként gátolja a Calvin ciklust (Iverson et al. 2000). Ennek a szénsav anhidráz karakterisztikával rendelkező fehérjének az azonosítása és részletes jellemzése még további vizsgálatokat igényel. Az azonosítás egyik lehetséges módja a feltételezett gamma szénsav anhidrázban hiányos mutánsok létrehozása és ezen mutánsok Cd kötésének vizsgálata PAC spektroszkópiával ill. biokémiai analízissel valamint Cd kötő fehérjék izolálása és jellemzése vad típusú *Synechocystis* tilakoid membránjából Cd-ra szelektív affinitás kromatografiával.

Az utóbbi időben tengeri algákból újfajta szénsav anhidrázt izoláltak, amelynek érdekessége, hogy Zn helyett kadmiumot tartalmaz a katalitikus centrumában. Ez az alga tartalmaz Zn típusu szénsav anhidrázokat is, de ha a környezet Cd tartalma megnövekszik a Zn szénsav anhidráz termelése leáll és helyette a Cd tartalmú szénsav anhidráz szintetizálódik. Amellett hogy ez az első információ arra nézve, hogy ez az általában toxikus nehéz fém biogén elem is lehet, ez a felfedezés elvi lehetőséget mutat arra, hogy genetikai módosítással növeljük a kéalgák Cd-mal szembeni toleranciáját. A kéalgák nagy Cd akkumulációs képességük miatt potenciálisan felhasználhatók kadmiummal szennyezett vizek és talajok tisztítására, de az ilyen irányú biotechnológiai

felhasználásukhoz ezen mikroorganizmusok Cd toleranciájának továbbnövelésére van szükség.

2.2. Termo-optikai szerkezetváltozások

Legfontosabb eredményünk egy korábban biológiai rendszerekben nem ismert, általunk korábban azonosított ún. termo-optikai mechanizmus részletes jellemzése ill. a változások azonosítása volt. A termo-optikai mechanizmus értelmében spontán termikus instabilitást mutató rendszerekben az elnyelt fény fotokémiailag nem hasznosuló gerjesztési energiájából származó ultragyors, kis térfogatelemre kiterjedő hőcsomagok, a disszipáció közvetlen környezetében elemi szerkezetváltozásokat hoznak létre. Differenciálkolorimetriai és spektroszkópiai mérések alapján megállapítottuk, hogy magasabb rendű növények kloroplasztiszainak tilakoid membránjaiban a termo-optikai eredetű szerkezetváltozások három egymást követő fázisa különböztethető meg: a tapadt membránok szétválása, a makrodomének laterális dezorganizációja és a fő fénybegyűjtő komplex triméereinek monomerizációja.

Mindezen vizsgálatokban külön figyelmet szenteltünk a kloroplasztisz stabil háromdimenziós, gránumos szerkezetére, és – termo-optikailag is indukálható – szerkezeti flexibilitására. Megvilágítás hatására magasabb rendű kloroplasztiszokban – amint ezt eddig még csak Jens K. Holm doktori értekezésében és konferencia absztraktokban közölt, de a kísérleti szakaszt illetően lezárt eredményeink mutatják – kisszögű röntgen (SAXS) és neutron (SANS) szórás segítségével jól azonosítható szerkezetváltozások mennek végbe a multilamelláris tilakoid membrán szerkezetében. Ezek értelmezéséhez és modellezéséhez (is) felhasználtuk a gránumos membránszerkezet 3D modelljét.

Cianobakteriális sejteken végzett vizsgálataink megmutatták, hogy a sejtekben a fikobiliszóma antenna – magas hőmérsékleten és magas fényen – energetikailag 'lekapcsolható' a membránról. A részletes vizsgálatokra – más termo-optikai változásokkal együtt - a 2006-ban induló OTKA projekt keretében kerül sor.

2.3. Magas hőmérséklet

A magas hőmérsékleti stressz hatásmechanizmusának vizsgálatához 1 hetes árpa csíranövények levelein magas hőmérsékletű pulzusokat (50 °C, 20 vagy 40 mp) alkalmaztunk. Ezek – amint eredményeink mutatják – jól modellezik a hosszabb idejű de alacsonyabb (35-45 °C) hőmérsékletű stressz hatásokat. Előnyük, hogy ezzel a kezeléssel a hatások szinte pillanatszerűen kiválthatók, és ezért azok a másodlagos hatásoktól jól elkülöníthetők. Az így kezelt növényeken jól tanulmányozható a helyreállítás (recovery) folyamata is.

Vizsgálatainkkal tisztáztuk, hogy a hőstressz a második fotokémiai rendszer vízbontó oldalán okozott inaktiváláson túl a membrán permeabilitás megnövekedésével indul; ezt követően néhány óra alatt bontódnak le a károsodott reakciócentrumok; ezek 'pótlása', de novo szintézise – fényen – 1-2 nap alatt történik meg; ugyanezen időszakban áll helyre a tilakoid membránok impermeabilitása is, de ez sötétben is bekövetkezik. A kezelt növényeken a második napot követően elváltozás nem mérhető.

2.4. Magas só és magas pH

Az *Athrospira (Spirulina) platensis* fonalas cianobaktérium optimális növekedéséhez mind magas pH-ra (≥ 10) mind pedig magas Na^+ -koncentrációra (≥ 100 mM) szükség van. Ezen körülmények mindegyike gátolja a fotoszintézist ill. erős stressz tényezőnek minősíthető. Ugyanezen szervezet izolált tilakoid membránjai valóban működésképtelenek a fenti körülmények között. Sejten belüli működésük annak

köszönhető, hogy a sejtmembrán Na^+/H^+ antiport rendszere biztosítja a pH homeosztázist.

Ezen sejtekben tanulmányoztuk a magas só-stressz hatását (ami itt 800 mM NaCl mellett lép fel markánsan). Megállapítottuk, hogy a só-stressz a PSII ill. a D1 károsításán túlmenően jelentősen befolyásolja a tilakoid membrán összetételét. A még további megerősítésre szoruló eredményeink azt valószínűsítik, hogy a só-stressz jelentősen befolyásolja a fotoinhibíciós válaszreakciót is, a fénygátlás a szokásosnál jóval alacsonyabb fényintenzitáson következik be, mint a stressznek nem kitett sejtneknél.

2.5. A lipidek fizikai állapotának változásai

^31P -NMR mérések segítségével részletes vizsgálat alá vetettük, miként befolyásolja a magas hőmérséklet és a magas fényintenzitás a tilakoid membránok lipidjeinek fázisállapotait. Ismeretes, hogy a tilakoid membránok lipidjeinek hozzávetőlegesen 50 %-a monogalaktozil diacilglicerol, mely nagyfokú nem-lamella-képző hajlamot mutat. Az ilyen lipidek szerepe biológiai membránokban nem ismert kellő mélységben.

Vizsgálatainkkal elsősorban azt a korábban közölt hipotézisünket kívántuk tesztelni, mely szerint ezen lipidek szegregációs képessége fontos szerepet játszik a membránok dinamikus sajátságainak kialakításában.

Megállapítottuk, hogy nem-lamelláris fázisok - a korábban ismert alacsony pH és magas hőmérsékleti kezeléseken túl – kiválthatók a membránok fénykezelésével is. Vizsgálatainkkal megerősítettük azt is, hogy a korábban más módszerekkel detektált nem-lamelláris fázisok kimutatására NMR-es mérések kitűnően megfelelnek. Ezek nagy előnye, hogy – szemben pl. a röntgen-szórással – kisméretű, hosszú-távú rendezettséggel nem bíró struktúrák detektálását is megengedik. Fontos új eredmény, hogy a lipidek nem-lamelláris szerkezeteinek hőmérséklettől és fénytől együttesen függő kialakulása összhangban van a termo-optikai mechanizmussal.

Hivatkozások

- Atteia, A., R.van Lis, J.J.van Hellemond, A.G.M.Tielens, W.Martin, and K.Henze. 2004. Identification of prokaryotic homologues indicates an endosymbiotic origin for the alternative oxidases of mitochondria (AOX) and chloroplasts (PTOX). *Gene* 330:143-148.
- Bennoun P. 1982. Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79:4352-4356.
- Bennoun, P. 1994. Chlororespiration Revisited - Mitochondrial-Plastid Interactions in *Chlamydomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1186:59-66.
- Berthold, D.A. and P.Stenmark. 2003. Membrane-bound diiron carboxylate proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54:497-517.
- Büchel, C. and G.Garab. 1995. Evidence for the Operation of A Cyanide-Sensitive Oxidase in Chlororespiration in the Thylakoids of the Chlorophyll-C-Containing Alga *Pleurochloris-Meiringensis* (Xanthophyceae). *Planta* 197:69-75.
- Büchel C. Zsiros O. Garab G. 1998 Alternative Cyanide-Sensitive Oxidase Interacting with Photosynthesis in *Synechocystis Pcc6803* - Ancestor of the Terminal Oxidase of Chlororespiration. *Photosynthetica* 35:223-231. .

- Burrows, P.A., L.A.Sazanov, Z.Svab, P.Maliga, and P.J.Nixon. 1998. Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *Embo Journal* 17:868-876.
- Carol, P. and M.Kuntz. 2001. A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends in Plant Science* 6:31-36.
- Corneille, S., L.Cournac, G.Guedeney, M.Havaux, and G.Peltier. 1998. Reduction of the plastoquinone pool by exogenous NADH and NADPH in higher plant chloroplasts - Characterization of a NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase activity. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1363:59-69.
- Das, P., Samantaray, S., and Rout, G. R. (1997) Studies on cadmium toxicity in plants: A review, *Environmental Pollution* 98, 29-36.
- Endo T. Mi H. Shikanai T. Asada K. 1997 Donation of electrons to plastoquinone by NAD(P)H dehydrogenase and by ferredoxin-quinone reductase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 38:1272-1277.
- Finnegan, P.M., A.L.Umbach, and J.A.Wilce. 2003. Prokaryotic origins for the mitochondrial alternative oxidase and plastid terminal oxidase nuclear genes. *Febs Letters* 555:425-430.
- Garab G. Lajko F. Mustardy L. Márton L. 1989 Respiratory control over photosynthetic electron transport in chloroplast of higher plant cells: evidence for chlororespiration. *Planta*. 179:349-358.
- Guedeney, G., S.Corneille, S.Cuine, and G.Peltier. 1996. Evidence For an association of *ndh B*, *ndh J* gene products and ferredoxin-NADP-reductase as components of a chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex. *Febs Letters* 378:277-280.
- Hanson, D. T., Franklin, L. A., Samuelsson, G., and Badger, M. R. (2003) The *Chlamydomonas reinhardtii* *cia3* mutant lacking a thylakoid lumen-localized carbonic anhydrase is limited by CO₂ supply to rubisco and not photosystem II function in vivo, *Plant Physiology* 132, 2267-2275.
- Havaux, M., D.Rumeau, and J.M.Ducruet. 2005. Probing the FQR and NDH activities involved in cyclic electron transport around Photosystem I by the 'afterglow' luminescence. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1709:203-213.
- Hemmingsen, L., Sas, K. N., and Danielsen, E. (2004) Biological applications of perturbed angular correlations of gamma-ray spectroscopy, *Chemical Reviews* 104, 4027-4061.
- Howitt, C.A. and W.F.J.Vermaas. 1998. Quinol and cytochrome oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 37:17944-17951.
- Iverson, T. M., Alber, B. E., Kisker, C., Ferry, J. G., and Rees, D. C. (2000) A closer look at the active site of gamma-class carbonic anhydrases: High-resolution crystallographic studies of the carbonic anhydrase from *Methanosarcina thermophila*, *Biochemistry* 39, 9222-9231.
- Joet, T., B.Genty, E.M.Josse, M.Kuntz, L.Cournac, and G.Peltier. 2002. Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* 277:31623-31630.
- Josse, E.M., J.P.Alcaraz, A.M.Laboure, and M.Kuntz. 2003. In vitro characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX). *European Journal of Biochemistry* 270:3787-3794.

- Kuntz, M. 2004. Plastid terminal oxidase and its biological significance. *Planta* 218:896-899.
- McDonald, A.E., S.Amirsadeghi, and G.C.Vanlerberghe. 2003. Prokaryotic orthologues of mitochondrial alternative oxidase and plastid terminal oxidase. *Plant Molecular Biology* 53:865-876.
- Miranda, T. and J.M.Ducruet. 1995. Characterization of the Chlorophyll Thermoluminescence Afterglow in Dark-Adapted Or Far-Red-Illuminated Plant-Leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 33:689-699.
- Peltier, G. and L.Cournac. 2002. Chlororespiration. *Annual Review of Plant Biology* 53:523-550.
- Peltier, G., J.Ravenel, and A.Vermeglio. 1987. Inhibition of A Respiratory Activity by Short Saturating Flashes in Chlamydomonas - Evidence for A Chlororespiration. *Biochimica et Biophysica Acta* 893:83-90.
- Pils, D., W.Gregor, and G.Schmetterer. 1997. Evidence for in vivo activity of three distinct respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium Synechocystis sp strain PCC6803. *Fems Microbiology Letters* 152:83-88.
- Prasad, M. N. V., Malec, P., Waloszek, A., Bojko, M., and Strzalka, K. (2001) Physiological responses of Lemna trisulca L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation, *Plant Science* 161, 881-889.
- Sazanov, L.A., P.A.Burrows, and P.J.Nixon. 1998. The plastid ndh genes code for an NADH-specific dehydrogenase: Isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:1319-1324.