

**A NITROGÉN-MONOXID HATÁSA BORSÓLEVELEK  
FOTOSZINTETIKUS  
ELEKTRONTRANSPORTJÁRA**

**Doktori (Ph.D.) értekezés**

**Wodala Barnabás**

Témavezetők:

Dr. Horváth Ferenc, Prof. Dr. Erdei László

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Növénybiológiai Tanszék

Biológia Doktori Iskola

**Szeged, 2009**

# Tartalomjegyzék

|  |            |
|--|------------|
| <b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>  | <b>iii</b> |
| <b>1. BEVEZETÉS .....</b>  | <b>1</b>   |
| <b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>  | <b>3</b>   |
| <b>2.1. A NO mint jelátvivő molekula kémiája .....</b>   | <b>3</b>   |
| <b>2.2. A NO keletkezése, forrásai növényekben .....</b>   | <b>4</b>   |
| <i>2.2.1. Az arginin útvonal: NOS aktivitás növényekben .....</i>  | <i>4</i>   |
| <i>2.2.2. A nitrát-nitrit útvonal: enzimatis és nem enzimatis utak .....</i>                             | <i>7</i>   |
| <b>2.3. A NO mennyiségének meghatározása .....</b>   | <b>9</b>   |
| <i>2.3.1. A NO detektálása .....</i>   | <i>9</i>   |
| <i>2.3.2. A NO mennyiségének változtatása .....</i>  | <i>12</i>  |
| <b>2.4. A NO biológiai hatásai és a NO szignalizáció molekuláris<br/>mechanizmusai növényekben .....</b> | <b>17</b>  |
| <i>2.4.1. A NO biológiai hatásai .....</i>   | <i>17</i>  |
| <i>2.4.2. Fém nitrozilálás .....</i>   | <i>18</i>  |
| <i>2.4.3. S-nitrozilálás .....</i>   | <i>19</i>  |
| <i>2.4.4. Tirozin nitrálás .....</i>   | <i>19</i>  |
| <i>2.4.5. A NO és Ca<sup>2+</sup> szignalizáció .....</i>  | <i>20</i>  |
| <b>2.5. A NO hatása a fotoszintetikus elektrontranszportláncra .....</b>                                 | <b>21</b>  |
| <b>3. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>   | <b>16</b>  |
| <b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>   | <b>28</b>  |
| <b>4.1. Növénynevelés .....</b>  | <b>28</b>  |
| <b>4.2. Kezelés és kísérleti oldatok .....</b>   | <b>28</b>  |
| <b>4.3. A NO koncentráció meghatározása .....</b>  | <b>29</b>  |
| <b>4.4. Variábilis klorofill-<i>a</i> fluoreszcencia mérések .....</b>                                   | <b>29</b>  |
| <i>4.4.1. Fluoreszcencia lecsengés kinetika .....</i>  | <i>29</i>  |
| <i>4.4.2. Lassú fluoreszcencia indukciós mérések .....</i>   | <i>30</i>  |
| <b>4.5. P700<sup>+</sup> abszorpciós tranziensek mérése .....</b>  | <b>31</b>  |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>5.1. A NO donormolekulák NO produkciója nem azonos</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>5.2. A GSNO és az SNP hatásának NO-specificitása</b> .....  | <b>38</b> |
| <i>5.2.1. A NO bomlástermékei és a GSSG nem módosítja a borsó<br/>    levélkorongok fotoszintetikus paramétereit</i> ..... | <i>39</i> |
| <i>5.2.2. Az SNP fotolitikus bomlástermékei gátolják a borsó levélkorongok<br/>    fotoszintetikus aktivitását</i> .....   | <i>40</i> |
| <b>5.3. A NO (GSNO) hatása borsó levélkorongok fotoszintetikus<br/>  elektrontranszportjára</b> .....                      | <b>46</b> |
| <i>5.3.1. A NO a PSII elektrontranszport folyamatait donor és akceptor<br/>    oldalán is gátolja in vivo</i> .....        | <i>46</i> |
| <i>5.3.2. A Kautsky-görbe kinetikájának változása donor és akceptor oldali<br/>    gátlást mutat</i> .....                 | <i>48</i> |
| <i>5.3.3. A NO hatása a klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterekre</i> .....   | <i>49</i> |
| <i>5.3.4. A NO hatása a P700 abszorpciós tranziensekre</i> .....   | <i>52</i> |
| <i>5.3.5. A NO fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásai és ezek<br/>    élettani jelentősége</i> .....       | <i>55</i> |
| <b>6. KONKLÚZIÓ</b> .....  | <b>57</b> |
| <b>7. FELHASZNÁLT IRODALOM</b> .....   | <b>59</b> |
| <b>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....  | <b>71</b> |
| <b><u>DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI</u></b> .....  | <b>72</b> |
| <b><u>SUMMARY OF THE THESIS</u></b> .....  | <b>78</b> |
| <b>PUBLIKÁCIÓS LISTA</b> .....   | <b>84</b> |

## Rövidítések jegyzéke

|                      |   |
|----------------------|---|
| 4-AF-DA              | 4-aminofluoreszcein-diacetát                                    |
| ABA                  | abszcizinsav  |
| AL                   | aktinikus megvilágítás  |
| AsA                  | aszkorbinsav  |
| cGMP                 | ciklikus guanozil-monofoszfát                                   |
| DAF-2DA              | 4,5-diaminofluoreszcein-diacetát                                |
| DAF-2T               | triazolofluoreszcein  |
| DCMU                 | 3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea                            |
| DHA                  | dehidroaszkorbinsav   |
| $\Delta$ pH          | transztilakoid pH különbség                                     |
| EPR                  | elektron paramágneses rezonancia<br>spektroszkópia              |
| $\Phi_{\text{PSI}}$  | A PSI effektív kvantumhatékonysága                              |
| $\Phi_{\text{PSII}}$ | A PSII effektív kvantumhatékonysága                             |
| Fd                   | ferredoxin  |
| FR                   | távoli vörös megvilágítás                                       |
| $F_v/F_m$            | maximális kvantumhasznosítás                                    |
| GSNO                 | S-nitrozoglutation  |
| GSNOR                | GSNO-reduktáz   |
| GSSG                 | oxidált glutation   |
| Hb                   | hemoglobin  |
| MAP-kináz            | mitogén-aktivált protein kináz                                  |
| MS                   | tömegspektrometria (mass spectrometry)                          |
| MT                   | egyetlen töltésszeparációt eredményező<br>telítési fényimpulzus |
| Ni-NOR               | nitrit-NO reduktáz  |
| NiR                  | nitrit-reduktáz   |



|                        |   |
|------------------------|---|
| NO <sub>x</sub>        | 0,2 mM NaNO <sub>2</sub> és 0,2 mM NaNO <sub>3</sub> oldat        |
| NOS (eNOS, iNOS, nNOS) | NO-szintáz (és különböző formái)                                  |
| AtNOS 1                | <i>Arabidopsis thaliana</i> NOS 1                                 |
| AtNOA 1                | ( <i>Arabidopsis thaliana</i> Nitric Oxide Synthase Associated 1) |
| NPQ                    | nemfotokémiai kioltás (non-photochemical quenching)               |
| NR                     | nitrát-reduktáz   |
| NIA1, NIA2             | NR enzim formái   |
| NIP                    | NR inhibitor protein  |
| P680                   | a PSII elsődleges elektrondonora                                  |
| P700                   | a PSI elsődleges elektrondonora                                   |
| PFD                    | fotonáram-sűrűség (photon flux density)                           |
| PGR5                   | protongrádiens-reguláció-5 nevű fehérje                           |
| PQ                     | plasztokinon  |
| PQH <sub>2</sub>       | plasztokinol  |
| PSI                    | első fotokémiai rendszer  |
| PSII                   | második fotokémiai rendszer                                       |
| PTI                    | kálium-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxil                |
| PTIO                   | kálium-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxil-3-oxid         |
| Q <sub>A</sub>         | a PSII elsődleges kinon elektronakceptora                         |
| Q <sub>B</sub>         | a PSII másodlagos kinon elektronakceptora                         |
| qE                     | a nemfotokémiai kioltás energiafüggő komponense                   |
| qI                     | a nemfotokémiai kioltás fotoinhibíciós komponense                 |
| qP                     | fotokémiai kioltás  |
| Rubisco                | ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz-oxigenáz                       |
| SNAP                   | S-nitrozo-N-acetilpenicillamin                                    |
| SNP                    | nátrium pentacianonitrozil-ferrát                                 |

|                |   |
|----------------|---|
| SOD            | szuperoxid-dizmutáz   |
| ST             | több töltésszeparációt eredményező telítési<br>fényimpulzus |
| XOR            | xantin-oxidoreduktáz  |
| Y <sub>D</sub> | PSII D2 fehérjéjének tirozin-D oldallánca                   |
| Y <sub>Z</sub> | PSII D1 fehérjéjének tirozin-Z oldallánca                   |

## 1. Bevezetés

A nitrogén-monoxid (NO) szabadgyök apoláros, gáz halmazállapotú molekula, mely a növényekben többféle enzimátikus folyamatban, valamint nem enzimátikus úton is képződik. A múlt század vége óta növekvő számban jelennek meg a NO változatos növényélettani hatásait ismertető közlemények, melyek nyomán ma már ismert, hogy a NO szerepet játszik a növények legkülönbözőbb anyagcsere- és fejlődési folyamataiban, így szabályozza a sztómazáródás, a csírázás és a gyökérfejlődés menetét. Emellett részt vesz a patogén támadás elleni reakcióban, valamint számos abiotikus stresszválaszban is.

A NO kis molekulatömege, rövid féléletideje és egyéb kémiai tulajdonságainak köszönhetően ideális jelátvivő molekula. Sokoldalúságának lényeges eleme, hogy kölcsönhat számos fontos intracelluláris szignálmolekulával, illetve a kalciummal, ugyanakkor könnyen reagál vízzel, oxigénnel, hidrogén-peroxiddal, szuperoxidokkal, tiolcsoportokkal és átmeneti fémekkel is. A fotoszintetikus és mitokondriális elektrontranszportlánc egyes komplexei között sok átmenetifém-tartalmú fehérje található, és korábbi *in vitro* valamint *in vivo* kutatások alapján ismert, hogy a NO hatást gyakorol a növények fotoszintetikus apparátusára és folyamataira. Izolált tilakoid membránokon NO-gázzal végzett elektron paramágneses rezonancia spektroszkópia (EPR) és klorofill-*a* fluoreszcencia kísérletek egyértelműen kimutatták, hogy a NO a második fotokémiai rendszer (PSII) több pontjához reverzibilis módon kötődve gátolja a PSII elektronátadási folyamatait. Izolált kloroplasztiszokon valamint intakt levelekben a különböző NO donormolekulák azonban eltérő módon befolyásolták a fluoreszcencia indukciós paramétereit.

Ezt az ellentmondást részben az okozhatja, hogy a NO hatásának vizsgálatára igen gyakran alkalmazott NO donormolekulák kémiai tulajdonságai, így NO produkciójuk különbözik, sőt lebomlásuk során más biológiai aktivitással rendelkező anyag is keletkezhet. Ugyanakkor a NO pontos mennyiségi meghatározása, különösen *in vivo*, igen nehéz feladat.

## BEVEZETÉS

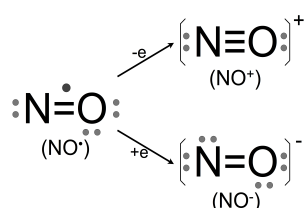
Munkánk során a NO fotoszintetikus elektrontranszportláncra gyakorolt hatását vizsgáltuk *in vivo*, intakt borsó (*Pisum sativum*) levelekben. E feladathoz három különböző NO donormolekulát (S-nitroso-N-acetilpenicillamin – SNAP, nátrium-nitroprusszid – SNP és S-nitrozoglutation – GSNO) és két NO akceptormolekulát (kálium-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid – PTIO és hemoglobin – Hb) alkalmaztunk. Az első cél annak kiderítése, hogy *in vivo* kísérleti rendszerünkben az egyes NO donormolekulák közül melyik a legalkalmasabb NO-forrás a feladathoz. Másrészt kíváncsiak voltunk arra, hogy miként módosítja a NO a PSII elektronátadási folyamatait *in vivo*, és – az ideális NO donormolekula segítségével – tisztázni kívántuk a NO fotoszintetikus paraméterekre gyakorolt hatását is. Tekintve, hogy a NO az első fotokémiai rendszer (PSI) elektrontranszport folyamataira gyakorolt hatása ismeretlen volt, munkánkban arra is kerestük a választ, hogy az exogén NO kezelés befolyásolja-e PSI aktivitását.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az állatokhoz hasonlóan a növények is reagálnak külső és belső környezetük nitrogén-monoxid (NO) szintjének változására, sőt maguk is képesek NO szintézisre enzimatis és nem enzimatis úton egyaránt (Neill és mtsai., 2007; del Río és mtsai., 2004). Az elmúlt években egyre növekvő számban jelentek meg a NO sokrétű növényélettani szerepét bizonyító tudományos közlemények, melyek egyre pontosabb és részletesebb képet festenek a NO szignalizációs szerepéről a növények fejlődési és anyagcserefolyamataiban, valamint az abiotikus és biotikus stressz elleni védekezési mechanizmusokban (Wilson és mtsai., 2008; Besson-Bard és mtsai., 2008; Qiao és mtsai., 2008; Wendehenne és mtsai., 2004; Delledonne, 2005).

### 2.1. A NO mint jelátvivő molekula kémiája

A NO kémiai tulajdonságainak köszönhetően ideális jelátvivő molekula állati és növényi rendszerekben egyaránt. Kis molekulatömege és apoláros jellege révén gyorsan diffundál a biológiai membránokon keresztül, ugyanakkor kis mértékben vízdékony is, mely biztosítja a NO szignál gyors terjedését a sejtek kompartmentjei és a szomszédos sejtek között (Stöhr és Ullrich, 2002). A jelmolekula hatása térben és időben egyaránt tág határok között mozog, hiszen NO féléletideje a saját és a vele reakcióba lépő anyagok koncentrációjának függvényében néhány másodperc és több perc között változhat (Mur és mtsai., 2006). Sokoldalúságának egyik alapja a reakciókészség: könnyen reagál vízzel, oxigénnel, hidrogén-peroxiddal, szuperoxidokkal, tiolcsoportokkal és átmeneti fémekkel. Másrészt, a szabadgyök állapotú molekula (NO<sup>•</sup>) a környezet redoxállapotának függvényében könnyen oxidálódhat nitrozónium-kationná (NO<sup>+</sup>), illetve redukálódhat nitroxil-anionná (NO<sup>-</sup>) (1. ábra; Lamattina és mtsai., 2003), melyek biológiai hatása eltérő, sőt egymással ellentétes lehet (Murgia és mtsai., 2004).



#### 1. ábra.

A NO különböző redoxformái  
(Lamattina és mtsai., 2003)

## 2.2. A NO keletkezése, forrásai növényekben

Állati rendszerekben a NO csaknem kizárólagos forrása a NO-szintáz enzim (NOS), melynek jelenleg két konstitutívan expresszáldó (endoteliális NOS – eNOS és neuronális – nNOS), valamint egy indukálható (iNOS) formája ismert (Durner és Klessig, 1999). Az enzim szubsztrátja az arginin, melyet NADPH jelenlétében az enzim citrullinná oxidál, miközben NO keletkezik (Crawford, 2006). A NOS aktivitás bemutatásának általános módszere az aktivitás gátlása specifikus állati NOS-gátlószerekkel, illetve az enzimaktivitás mérése az arginin-citrullin átalakulás radiometriás nyomonkövetése, vagy a képződő NO fluoreszcenciás meghatározása alapján. Maga a NOS fehérje jelenléte az enzimre specifikus antitestek segítségével immunhisztokémiai módszerekkel mutatható ki a különböző szövetekben. A NOS funkcióját genetikai módszerekkel, funkcióvesztéses mutánsok előállításával is igazolták (del Ríó és mtsai., 2004).

Míg az állati rendszerekben a NO produkció fő forrása az arginin NOS enzim által katalizált oxidációja, addig a növényekben a NO enzimátikus és nem enzimátikus úton is keletkezhet, és az arginin mellett a nitrit-anion ( $\text{NO}_2^-$ ) is lehet a NO szintézis prekursora (2. ábra; Yamasaki 2005).

### 2.2.1. Az arginin útvonal: NOS aktivitás növényekben

Számos tudományos közlemény számol be NOS aktivitásról, valamint immunológiai módszerekkel azonosított NOS-szerű fehérjék jelenlétéről növényekben, noha az állati NOS enzimek növényi megfelelőjét ezidáig egyetlen növényfajban sem sikerült megtalálni (Besson-Bard és mtsai., 2008; Neill és mtsai., 2007). Növényi NOS aktivitásról szóló első beszámoló után (Ninnemann és Maier, 1996) különböző növényi szövettípusokban, sőt különböző sejtorganellumokban, így a peroxiszómában, sejtmagban, kloroplasztisban és mitokondriumban is detektáltak NOS aktivitást (2. ábra; del Ríó és mtsai., 2004; Besson-Bard és mtsai., 2008). Nemrégiben két, egymástól szerkezetileg különböző arginin-oxidáz (NOS-) aktivitással rendelkező enzimet azonosítottak növényekben. Az egyik az *Arabidopsis*-ből izolált AtNOS 1 (*Arabidopsis thaliana* NOS 1; Guo és mtsai., 2003), melynek

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

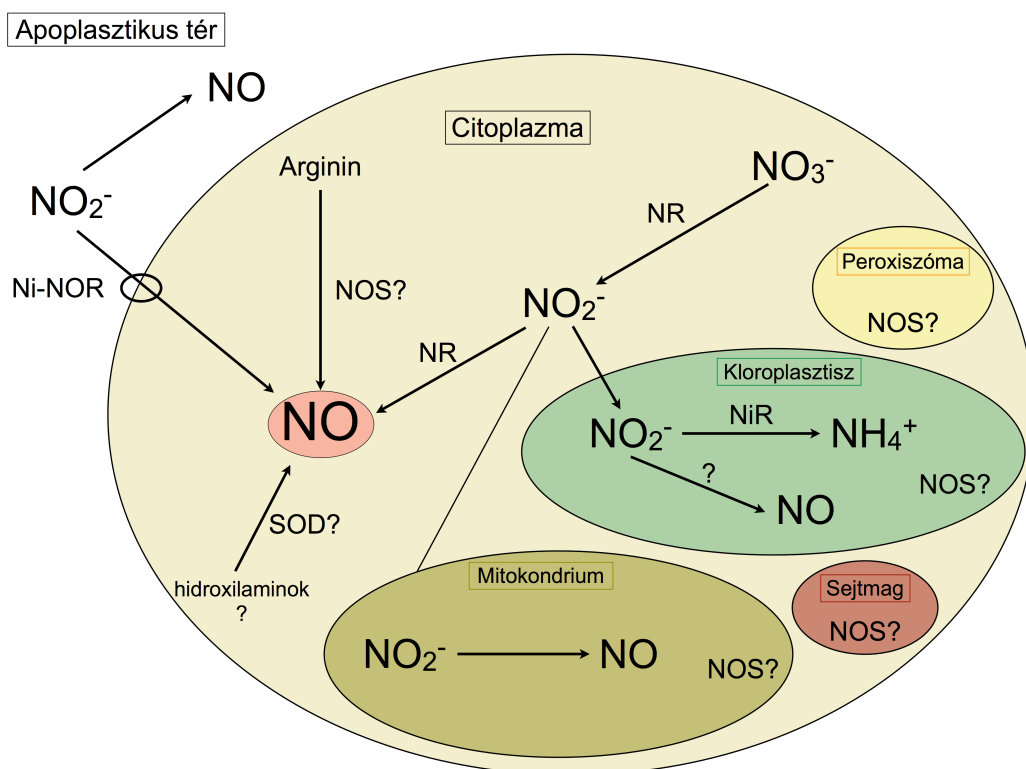
aktivitása állati NOS-inhibitorokkal gátolható, ugyanakkor működése egyes állati NOS kofaktorok – flavin, hem és tetrahydrobiopterin – hiányában is zavartalan. Szerepe van a virágzás, valamint az ABA-indukált jelátviteli folyamatokban. A másik NOS aktivitással rendelkező fehérje a patogének által indukálható iNOS, melyet *Arabidopsis* és dohány növényekben mutattak ki (Chandok és mtsai., 2003). Az enzim a mitokondriális glicin-dekarboxiláz komplex egyik elemével, az ún P-proteinnel mutat nagy hasonlóságot. Noha működéséhez az állati NOS enzimek kofaktorai szükségesek, a NOS aktivitáshoz szükséges szerkezeti elemek a fehérjemolekulán nem mind tisztán beazonosíthatók; elképzelhető tehát, hogy az iNOS NO képzése az állati analógtól eltérő (Wendehenne és mtsai., 2004). Érdekes módon egyik fehérje sem mutat szerkezeti rokonságot az állati NOS enzimekkel (Besson-Bard és mtsai., 2008).

A növényi NOS enzimekről beszámoló közlemények eredményeit komolyan megkérdőjelezték (Travis, 2004; Zemojtel és mtsai., 2006; Moreau és mtsai., 2008), bár az világosnak tűnik, hogy az *Atnos1* mutáns növények alacsonyabb NO szintet mutatnak (Guo, 2006), sőt az arginin által indukált NO szintézis mitokondriumhoz kötött (Guo és Crawford 2005). Mindazonáltal az AtNOS 1 elnevezés helyett az AtNOA 1 (*Arabidopsis thaliana* Nitric Oxyde Synthase Associated 1) javasolt (Crawford és mtsai., 2006). A növényi NOS enzimek körüli tudományos vita felhívja a figyelmet arra, hogy a NOS aktivitás bizonyításának módszerei nem tökéletesen megbízhatók (Besson-Bard és mtsai., 2008). A NOS aktivitás méréséhez használt citrullin-próba például nem feltétlenül NOS-specifikus: a radioaktívan jelölt L-arginin a NOS enzimen kívül más enzimnek is lehet szubsztrátja, így a radioaktív végtermék nem feltétlenül citrullin – ennek bizonyítása fontos feltétele a citrullin-próba megbízhatóságának (Tischner és mtsai., 2007). Ugyanez megállapítható az állati NOS-gátlószerek alkalmazásáról, melyek a NOS enzimeken kívül más, az arginin metabolizmusában rész vevő enzimek aktivitását is módosíthatják, köztük olyanokét, melyek részt vesznek a poliaminok bioszintézisében. *Arabidopsis* csíranövények különböző szöveteiben a spermidin és spermin gyors NO képződést indukál, s nem kizárt, hogy ez a NO poliamin eredetű

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

(Yamasaki és Cohen, 2006). Végül a NOS aktivitást a rendelkezésre álló szubsztrát, az L-arginin mennyisége is meghatározza, így egy esetlegesen alacsony NOS aktivitás hátterében az enzimefehérje alacsony szintje mellett argininhiány is állhat. A nitrát-reduktáz (NR) és a nitrit NO szintézisben betöltött szerepének vizsgálatára alkalmazott *nia1* és *nia2* kettős mutáns NR-hiányos *Arabidopsis* növények leveleiben Modolo és munkatársai (2006) a normál L-argininmennyiség tizedét mérték, 4,5-diaminfluoreszcein-diacetát (DAF-2DA) fluoreszcenciás mérésekkel ugyanakkor arginin eredetű NO képződést mutattak ki. Az arginin eredetű NO képződés növényekben tehát korántsem tisztázott kérdés.

Rümer és munkatársai (2009) dohánysejtekben hidroxilaminok hatására NO felszabadulást figyeltek meg. A hidroxilamin és szalicil-hidroxamát eredetű NO képződés reaktív oxigénformák jelenlétében fokozódik, s úgy tűnik, a reakciót a szuperoxid-dizmutáz enzim (SOD) katalizálja. A NO szintézis eme új formájának élettani szerepe azonban még nem világos.



**2. ábra.** NO keletkezése növényekben  
(Guo és Crawford, 2005; Neill és mtsai., 2007 nyomán)



2.2.2. A nitrát-nitrit útvonal: enzimátikus és nem enzimátikus utak

A nitrit-anion vizes oldatában semleges pH értéken is spontán NO felszabadulás figyelhető meg, melynek alapja az alábbi reakciósorozat (Yamasaki, 2000):



Ez a spontán reakciósorozat meglehetősen lassú, ezért a NO képződés mértéke még a nitrit-anion protonálódását segítő savanyú közegben is csekély. Redukálószer, például aszkorbinsav (AsA) jelenlétében a reakció már sztöchiometrikus:



A nitrit-aszkorbát rendszer a NO *in vitro* előállítására gyakorta használt módszer (Beligni és Lamattina 1999). Az aszkorbinsav ugyanakkor fontos redukálószer növényekben is, s jelenéte a kloroplasztisban és az apoplasztikus térben alacsony pH esetén nitrit-NO átalakulást indukálhat (2. ábra; Stöhr és Ullrich., 2002). *In vivo* kémiai NO szintézis figyelhető meg árpa aleuron réteg apoplasztikus terében, ahol fenolszármazékok gyorsítják a nitrit-NO átalakulást (Bethke és mtsai., 2004a), a dohánylevelekben zajló nem enzimátikus nitritredukció elektron-utánpótlását pedig a mitokondriális elektrontranszportlánc biztosítja (Planchet és mtsai., 2005). Egyes karotinoid molekulák fény hatására ugyancsak képesek nitrit-anionokat NO-dá redukálni *in vitro* (Cooney és mtsai., 1994).

A nitrát-reduktáz (NR) NO termelő képességét *in vitro* és *in vivo* kísérletekben egyaránt bemutatták (Yamasaki 2005). A NR egy molibdéntartalmú enzim, mely NADPH jelenlétében képes nitrit-aniont NO-dá redukálni, de peroxinitrit szintézisére is képes (Yamasaki és Sakihama, 2000). A NR enzim aktivitását egy kináz enzim és a 14-3-3 fehérjecsaldhoz tartozó fehérje, a NR inhibítor protein (NIP) szabályozza. A NIP jelenlétében megvalósuló foszforiláció radikálisan csökkenti az enzimaktivitást, és gyorsítja

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

a fehérjemolekula lebomlásának mértékét is (Neill és mtsai., 2003). Az enzim wolframmal is gátolható (Kolbert és Erdei, 2008), mely valószínűleg az enzim fémkötőhelyéhez kapcsolódva okoz zavart (Wilson és mtsai., 2008), s úgy tűnik a NR aktivitását maga a NO is szabályozza (Jin és mtsai., 2009a). A NR NO szintézisben betöltött szerepe wolfram mellett, NR mutáns növényekkel vizsgálható (Kolbert és mtsai., 2008a), s úgy tűnik, hogy az *Arabidopsis*-ban két NR enzim (NIA1 és NIA2) közül az alacsonyabb mértékben expresszálandó NIA1 enzimnek van nagyobb szerepe a NO szintézisben (Bright és mtsai., 2006). Enzimkinetikai vizsgálatok alapján a NR NO produkciója a normál körülmények között jellemzően alacsony nitritkoncentráció mellett igen csekély: a NR nitrit affinitása jóval alacsonyabb a nitrát affinitásnál, és az enzim NO-szintáz aktivitását a nitrát már fiziológiás koncentrációban kompetitíven gátolja (Neill és mtsai., 2003). Az enzim NO-szintáz aktivitása tehát csak afiziológiásan magas nitritkoncentráció mellett jelentős. Nitritfelhalmozódás megfigyelhető anoxia esetén (Rockel és mtsai., 2002), nitrit-reduktáz (NiR) aktivitás (Planchet és mtsai., 2005), illetve fotoszintetikus folyamatok gátlásának hatására (Lamattina és mtsai., 2003). Ennek ellenére a NR NO-szintáz aktivitásának szerepe nem csupán az alap NO koncentráció biztosítása levelekben és gyökerekben: az ABA-indukált sztómazáródás szignalizációjában fontos szerepet játszó NO bizonyítottan NR eredetű (Desikan és mtsai., 2002). A csírázás (Simontacchi és mtsai., 2004), és a patogének elleni védekezési reakciókban (Yamamoto és mtsai., 2003) részt vevő NO szintén a NR aktivitásához köthető.

A xantin-oxidoreduktáz (XOR) a NR enzimhez hasonló szerkezetű fehérje, mely a NR enzimhez hasonló módon és hasonló (anaerob) körülmények között képes nitritredukcióra, miközben NO keletkezik (Harrison, 2002). Az enzim ugyanakkor oxigén jelenlétében szuperoxid-aniont is szintetizálhat, mely NO-dal reagálva peroxinitritet képez. Az enzim tehát különböző oxigénkoncentráció mellett különböző szignálmolekulák előállítására képes (del Río és mtsai., 2004). Újabb eredmények szerint azonban a XOR NO képzése növényi szervezetekben nem számottevő (Planchet és Kaiser, 2006).

Stöhr és munkatársai (2001) dohánygyökerekben olyan nitrit eredetű NO képződésről számoltak be, mely NR-inhibitorokkal nem gátolható és független az oxigénkoncentrációtól. A reakciót katalizáló nitrit-NO-reduktáz enzim (Ni-NOR) plazmamembránkötött, elektrondonor kofaktora a citokróm-c, nem pedig NADPH. Szubsztrátutánpótlását feltételezhetően egy szintén plazmamembránkötött NR biztosítja.

### **2.3. A NO mennyiségének meghatározása**

A NO szerepének tisztázása bármely biológiai folyamatban nem könnyű feladat. A cél annak bemutatása, hogy a NO mennyiség növekedése vagy csökkenése a vizsgált biológiai folyamatban változást idéz elő. A bizonyítás alapvető eleme, hogy képesek legyünk a NO mennyiségét *meghatározni*: változtatni és mérni. Egyik sem könnyű feladat.

#### *2.3.1. A NO detektálása*

Napjainkban a NO detektálására számos direkt és indirekt módszer áll rendelkezésre, melyek komplexitása, műszeres igénye változó. Érzékenységük és NO specificitásuk szintén eltér, de függhet az alkalmazás körülményeitől is – az egyes módszerek sajátosságai ugyanakkor meghatározzák az alkalmazhatóságot is. E módszerek rövid leírását az I. táblázat tartalmazza. Az anyagi és technikai lehetőségeken túl az adott eljárás kiválasztásának lényeges szempontja tehát maga a vizsgált biológiai objektum. Részletesebben azt a két NO detektálási eljárást jellemzem, amelyet laboratóriumunk is alkalmaz.

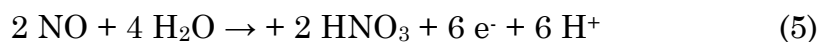
## I. táblázat. NO detektálási módszerek

| Eljárás   | Lényege   | Hivatkozás  |
|---|---|---|
| Griess módszer  | Fotometriás úton meghatározható színes azovegyületet eredményező diazotálási reakció, mely a NO <sub>2</sub> -anionnal reakcióba lépő szulfonamid és naftiletiléndiamin között zajlik le savas körülmények között.  | Archer, 1993;<br>Guo és mtsai., 2003  |
| Hemoglobin módszer                                    | A NO által indukált oxihemoglobin-methemoglobin átalakulás spektrofotometriás nyomonkövetése.   | Delledonne és mtsai., 1998;<br>Orozco-Cárdenas and Ryan, 2002                         |
| Kemilumineszcencia                                    | A NO fénykibocsátással járó reakciójának detektoros (photomultiplier) nyomonkövetése. A reakció lehet közvetett <sup>1</sup> (NO-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -reakcióból származó peroxinitrit reakciója luminollal), vagy közvetlen <sup>2</sup> (NO-O <sub>3</sub> reakció).  | <sup>1</sup> Lamattina és mtsai., (2003);<br><sup>2</sup> Planchet és mtsai., 2005    |
| Amperometria  | A NO nyomonkövetése NO-szenzitív elektród segítségével.   | Tristani-Firouzi és mtsai., 1998;<br>Yamasaki és mtsai., 2001;<br>Liu és mtsai., 2005 |
| EPR (elektron paramágneses rezonancia) spektroszkópia | Párosítatlan elektronokkal rendelkező molekulák (így a NO) párosítatlan elektronja megfelelő erejű mágneses térben, kellő energiájú (mikrohullámú tartományba eső) foton hatására magasabb energiaszintre kerülnek, melynek lecsengése karakterisztikus spektrumot ad. A lecsengés NO esetében túl gyors a detektáláshoz, ezért az EPR vizsgálat „spin-csapdák”, azaz olyan molekulák jelenlétében történik, melyek stabilizálják a gerjesztett NO-molekulát. | Archer, 1993;<br>Pagnussat és mtsai., 2002;<br>Modolo és mtsai., 2006                 |
| Lézer-fotoakusztikus spektroszkópia                   | Gázmolekulák (így a NO) fényabszorpciója során hő szabadul fel, mely zárt térben nyomásváltozást indukál. Kellően magas fényintenzitás esetén az indukált nyomásváltozások detektálható akusztikus jelet eredményeznek.   | Leshem és Pinchasov, 2000   |
| Tömegspektrometria (MS)                               | Szövetekből felszabaduló NO nem invazív, közvetlen meghatározása ionizációs módszerrel, tömegspektrometriai úton.   | Conrath és mtsai., 2004   |
| Fluoreszcens festékek DAF-2DA                         | 4,5-diaminofluoreszcein-diacetát NO hatására O <sub>2</sub> jelenlétében fluoreszcens triazolofluoreszceinné alakul.  | Kojima és mtsai., 1998;<br>Kolbert és mtsai., 2008a,b                                 |

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Több mint egy évtizedes kifejlesztésük óta (Kojima és mtsai., 1998) a fluoreszcein típusú fluorofórok a növényi minták NO detektálásának talán lesikeresebb és legelterjedtebb eszközei. A DAF-fluorofórok óriási előnye, hogy lehetővé teszik a NO *in situ* és *in vivo* detektálását kiváló térbeli és időbeli felbontással (del Río és mtsai., 2004; Kolbert és mtsai., 2008a). A DAF-2DA festék a NO és bomlásterméke, a NO<sub>2</sub> reakciója során kialakuló N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-dal reagálva triazol formává alakul, s a reakció végterméke az igen fluoreszcens triazolofluoreszcein (DAF-2T) (Kojima, és mtsai., 1998).

Az amperometriás módszer az egyik legegyszerűbb és legolcsóbb, ugyanakkor az egyik legpontosabb módszer oldatok és növényi minták NO tartalmának közvetlen és valós idejű kvantifikálására (Zhang és Broderick, 2000), mely lehetőséget ad oldatok NO koncentrációjának pontos meghatározására is (Yamasaki és mtsai., 2001; Liu és mtsai., 2005). A Clark-típusú NO elektród platina mérő- és Ag/AgCl referencia elektródja között +0,9 V feszültséget biztosítunk, melynek hatására a NO a mérőelektród felszínén oxidálódik az alábbi egyenlet szerint:



A NO detektálás kulcsa az elektrokémiai reakció által keltett redoxáram, mely arányos az oxidálódó NO koncentrációjával. Az elektródapárt az oldattól egy speciális NO-permeabilis membrán határolja el, mely biztosítja a reakció NO-specifitását más szabadgyökökkel szemben (Zhang és Broderick, 2000; Tristani-Firouzi és mtsai., 1998).

A NO kvantifikálásának nyilvánvaló nehézségei alapján nem meglepő, hogy abszolút NO mennyiségeket illetően igen kevés a rendelkezésre álló adat (Neill és mtsai., 2003). A különböző NO detektálási eljárásokkal azonban gyakran egymásnak ellentmondó eredmények születnek (Planchet és Kaiser, 2006; Wodala és mtsai., 2008), és a rendelkezésre álló módszerek sokasága is arra utal, hogy a biológiai minták NO mennyiségének pontos detektálására még nem született egységes, minden helyzetben megbízható eljárás. Az indirekt detektálási lehetőségekkel szemben megfogalmazott általános kritika az esetleges nemspecifikus reakciókból származó pontatlanság. A széles körben elterjedt (Guo és mtsai., 2003), könnyen kivitelezhető és olcsó (Dusse és

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

mtsai., 2005) Griess módszer fontos korláta, hogy a módszer során kvantifikált nitrit-anion biológiai mintákban nemcsak NO eredetű, sőt egyes NO donorok közvetlenül nitritet is kibocsátanak (Feelisch, 1998). Oxihemoglobin-methemoglobin átalakulást a NO mellett reaktív oxigéngyökök is indukálhatnak (Neill és mtsai., 2003). A DAF-2DA nem közvetlenül a NO szabadgyökkel, hanem  $N_2O_3$ -dal lép reakcióba (Nakatsubo és mtsai., 1998), a NO detektálásához tehát oxigén jelenléte szükséges, sőt a képződő  $N_2O_3$  mennyiségét csökkentheti, hogy a NO oxidációjakor keletkező  $NO_2$  más redukáló anyagokkal, például a NADH-molekulával is reakcióba léphet (Ederli és mtsai., 2009). Planchet és Kaiser (2006) dohány sejtszuszpenzióban kemilumineszcens jel hiányában is tapasztalt DAF-2DA eredetű fluoreszcenciát, ami arra utal, hogy a DAF-2DA a NO mellett más anyagokkal is reakcióba lép. Ederli és mtsai., (2009) vizsgálataikban a NO detektálására alkalmazott hemoglobin- és DAF-2DA fluoreszcenciás módszer szintén eltérő eredményeket adott. A nonspecifikus fluoreszcencia a NO-ra inszenzitív fluorofór (4-AF-DA), mint negatív kontroll alkalmazásával részben kiküszöbölhető (Wilson és mtsai., 2008), a DAF-2DA ugyanakkor a NO koncentráció változásainak pontos nyomonkövetésére nem alkalmas (Rodriguez és mtsai., 2005), hiszen nehéz a kapott fluoreszcencens jelet kvantifikálni (Neill és mtsai., 2003), és a vizsgált szövetekre bocsátott ultraibolya (UV) fény maga is indukálhat olyan folyamatokat, melyek a fluoreszcens festék nonspecifikus nitrozilációját eredményezik (Rodriguez és mtsai., 2005).

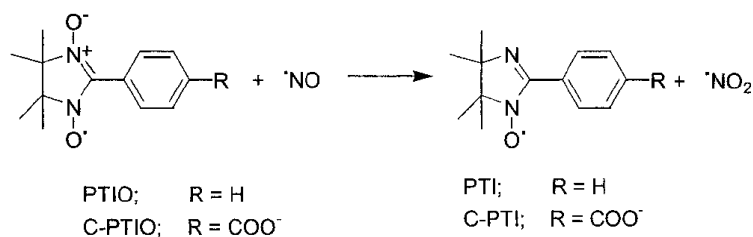
### *2.3.2. A NO mennyiségének változtatása*

A növényi endogén NO szint gátlásának elterjedt és hatásos módszere a NO enzimatis forrásainak gátlása, illetve specifikus NO akceptormolekulák alkalmazása, melyek a nem enzimatis, illetve exogén eredetű NO mennyiségét is hatékonyan csökkentik. A NO szintézisben bizonyítottan szerepet játszó NR szelektív gátlószere a wolfrám, az arginin/NOS eredetű NO pedig arginin analóg állati NOS-inhibitorokkal gátolható (Neill és mtsai., 2003). Funkciókieséses mutánsok előállítása ugyanilyen hatékony módszer, s

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

mindkét enzim esetében fontos szerepe van a NO enzimatikus forrásainak feltárásában (Guo és mtsai., 2003; Kolbert és mtsai., 2008a).

A nitronil-nitroxidok közé tartozó kálium-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid (PTIO) és karboxilált formája (karboxi-PTIO) ma a legelterjedtebb NO akceptormolekulák. A nitronil-nitroxidokat eredetileg a NO EPR detektálásához fejlesztették ki spincsapdaként (Yoshida és mtsai., 1994). A PTIO-molekulák esetében a NO akceptor kifejezés helytelen, hiszen a NO-t oxidáció útján inaktíválják, s a reakció eredményeként kálium-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid (PTI) és NO<sub>2</sub> keletkezik (3. ábra; Goldstein és mtsai., 2003). A PTIO a NO hatékony oxidálószere, de más anyagokkal is reakcióba léphet (Feelisch, 1998), illetve a PTI gátolhat bizonyos NO szignalizációs folyamatokat (Wilson és mtsai., 2008).



**3. ábra.** A (c)PTIO-NO reakció (Goldstein és mtsai., 2003)

A másik igen fontos NO akceptorként is használt molekulatípus a hemoglobin (Hb), melynek oxidált formája még a PTIO-molekuláknál is gyorsabban reagál NO-dal. A hemoglobinok emellett jól ismert természetes NO akceptorok, melyek állati és növényi szervezetekben egyaránt fontos szerepet játszanak a NO mennyiségének szabályozásában. (Perazzoli és mtsai., 2004).

A NO donormolekulák olyan vegyületek, melyek meghatározott körülmények között NO-t szabadítanak fel. Alkalmazásuk a NO biológiai szerepének tisztázására viszonylag egyszerű, de informatív eljárás. Használatuk mégis nagy körültekintést igényel, hiszen a donorok NO produkciója rendkívül sok tényezőtől függ, s részben emiatt igen széles skálán mozog (Floryszak-Wieczorek és mtsai., 2006). A NO emissziót elsődlegesen az illető donor kémiai sajátosságai szabják meg, hiszen donoronként más-más típusú reakció vezet NO felszabaduláshoz. A kísérleti elrendezés körülményei

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

(hőmérséklet, pH, redoxviszonyok, fényintenzitás stb.) komolyan befolyásolhatják ezen reakciók sebességét, mint ahogy maga a vizsgált biológiai minta is (Feelisch, 1998). Mindemellett számolni kell a NO felszabadulásának reakciója során keletkező melléktermékek, illetve maga a NO donor potenciális biológiai hatásával is (Neill és mtsai., 2003). A problémák kiküszöbölésének jó módszere, ha többféle NO donort és NO akceptort használunk a NO hatásának bizonyítására (Neill és mtsai., 2003). Célszerű lehet a donorok által NO akceptorok jelenlétében, vagy hiányában felszabadított NO mennyiségének nyomonkövetése, illetve azon donorok kizárása, melyek lebontási melléktermékei maguk is zavarhatják a vizsgált életfolyamatot.

A főbb NO donor típusokat, és fontosabb jellemzőiket, így a felszabadított NO forma típusát, a NO képzés kofaktorait, körülményeit, a II. táblázat foglalja össze.



**II. táblázat.** NO donormolekulák fontosabb jellemzői (Feelisch, 1998 nyomán) GST: glutation-S-transzferáz, Cyt *P*<sub>750</sub>: citokróm *P*<sub>750</sub>, red: redukzív körülmények, ox: oxidatív körülmények.

| Kémiai csoport        | Felszabaduló NO forma |                 |                 |                  | NO képződés<br>fiziológiai pH értéken |                                  | Érzékenység/reakciókészség<br>az alábbiakra |      |        |            | Víz-<br>oldékonyság |     |
|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------------|----------------------------------|---|------|--------|------------|---------------------|-----|
|                       | NO                    | NO <sup>-</sup> | NO <sup>+</sup> | NO <sup>2+</sup> | nem<br>enzimatis                      | enzimatis                        | tiolok                                      | fény | oxigén | hidrolízis |                     |     |
|                       |                       |                 |                 |                  |                                       |                                  |   |      |        | (pH)       |                     |     |
| Szerves nitrátok      | +                     | -               | -               | +                | +                                     | (red, egyes tiolok)              | +   | -    | -      | +          | (>7)                | +/- |
| S-nitrozotiolok       | +                     | +               | +               | -                | +                                     | (tiolok, fény, átmeneti fémek)   | +   | +    | +      | +          | (>2)                | +/- |
| Sydnoniminek (SIN-1)  | +                     | ?               | -               | -                | +                                     | (fény, ox, pH>5)                 | +   | +    | +      | +          | (>5)                | ++  |
| SIN-1A                | +                     | -               | (+)             | -                | +                                     | (ox, fény, fémek)                | ?   | +    | +      | -          | -                   | +   |
| NONOátok              | +                     | (+)             | (+)             | -                | +                                     | (savak katalizálják)             | ?   | +    | +      | +          | (<10)               | ++  |
| Nátrium-nitroprusszid | +                     | (+)             | +               | -                | +                                     | (fény, red, tiolok, nukleofilek) | +   | +    | +      | -          | -                   | ++  |

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A NO növényi szerepének kutatásában rendkívül széles körben használt donormolekula a nátrium nitroprusszid, (SNP, nátrium pentacianonitrozil-ferrát). Az SNP rozsdavörös színű kristályos molekula, mely rendkívül vízdékony. Kristályos állapotban évekig eltartható, de vizes oldata igen fotolabilis, s a NO képződése növekvő hőmérséklet és oxigéntartalom mellett tovább gyorsul (Wang és mtsai., 2002). A molekula NO felszabadítási mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, annyi bizonyos, hogy a NO produkció egyetlen elektronátmenettel járó redukció eredménye, mely akár megvilágítás hatására is bekövetkezik (Feelisch, 1998), és általában NO<sup>+</sup>-kationt eredményez (Lum és mtsai., 2005). Élő szövetekben a NO felszabadulás enzimátikus és nem enzimátikus úton is lezajlik. A molekula fotodegradációjakor NO mellett cianid (CN<sup>-</sup>) is felszabadul – maximum öt CN<sup>-</sup>-NO-molekulánként (Friederich és Butterworth, 1995). E toxikus melléktermék esetleges biológiai hatásának vizsgálata, például kálium-cianiddal (KCN) tehát mindenképpen indokolt (Feelisch, 1998).

Az SNP mellett a leggyakrabban használt NO donorok az S-nitrozotiolok csoportjába tartozó S-nitroso-N-acetilpenicillamin (SNAP) és S-nitrozoglutation (GSNO). Az S-nitrozotiolok S-nitrozilált rózsaszín primer (pl. GSNO), piros szekunder vagy zöld terciér (pl. SNAP) tiolok (Feelisch, 1998). A tiolcsoport lehet fehérjemolekula cisztein oldalláncának tiolcsoportja is (Stamler és mtsai., 1992). Az S-nitrozilált fehérjék általában sokkal stabilabbak mint az alacsony molekulatömegű S-nitrozilált származékok (pl. GSNO). S-nitrozotiolokat állati és növényi szervezetekben egyaránt kimutattak, s az S-nitroziláció a NO jelátvitel kulcsfontosságú reakciója növényekben is (Wilson és mtsai., 2008, Besson-Bard és mtsai., 2008). S-nitrozotiolok szilárd halmazállapotban viszonylag stabilak, vizes oldatban viszont rendkívül bomlékonyak, bomlásuk eredménye NO (NO<sup>•</sup>, NO<sup>+</sup> és NO<sup>-</sup> egyaránt) és egy diszulfid-híddal kapcsolt oxidált tiol (R-S-S-R). A bomlás sebességét meghatározza a hőmérséklet, a pH-érték, az oxigén parciális nyomása, nukleofil reagensek és oxidáló- illetve redukálószerrek, valamint fémionok (pl. Cu<sup>+</sup>, Fe<sup>\*\*+</sup>) akár nyomnyi mennyiségű jelenléte (Floryszak-Wieczorek és mtsai., 2006).

## **2.4. A NO biológiai hatásai és a NO szignalizáció molekuláris mechanizmusai növényekben**

### *2.4.1. A NO biológiai hatásai*

A NO biológiai hatásainak feltárása már növényekben is évtizedes múltra tekint vissza. A múlt század végén kiderült, hogy a NO nemcsak növényi stresszor (Wellburn, 1990), hanem részt vesz a növények biotikus (Wendehenne és mtsai., 2004) és abiotikus (García-Mata és Lamattina, 2001; Gould és mtsai., 2003) stresszre adott válaszreakcióiban, és napjainkban már világos, hogy a NO szerepet játszik a növények legkülönbözőbb fejlődési és általános életfolyamataiban is (del Río és mtsai., 2004). Az utóbbi néhány évben több összefoglaló publikáció foglalkozott a NO növényekben betöltött biokémiai és fiziológiai szerepével (Lamattina és mtsai., 2003; Neill és mtsai., 2003; del Río és mtsai., 2004; Wendehenne és mtsai., 2004; Delledonne 2005, Neill és mtsai., 2007, Wilson és mtsai., 2008; Qiao és mtsai., 2008; Besson-Bard és mtsai., 2008; Erdei és Kolbert, 2008). Kiderült, hogy a NO serkenti a csírázást (Beligni és Lamattina, 2000, Zhao és mtsai., 2009), illetve megtöri a magvak nyugalmi állapotát (Bethke és mtsai., 2004b, 2006a,b); szabályozza a növények érését és a szénészterifikációt (Leshem és mtsai., 1998); serkenti az oldalgökéreképződést (Pagnussat és mtsai., 2002; Kolbert és mtsai., 2008a); gátolja a virágzást (He és mtsai., 2004).

A NO ugyanakkor kulcsfontosságú jelátviteli molekula: szabályozza a ciklikus guanozil-monofoszfát (cGMP)-függő jelátviteli folyamatokat (Durner és mtsai., 1998), része többek között a mitogén-aktivált protein-kináz (MAP-kináz) szignalizációnak (Kumar és Klessig, 2000), az abszcizinsav által indukált sztómazáródás szignalizációs kaszkádjának (García-Mata és Lamattina, 2001; Neill és mtsai., 2002; García-Mata és mtsai., 2003), és egyéb  $Ca^{2+}$ -függő utaknak, hiszen emeli a citoszólikus szabad  $Ca^{2+}$  szintjét (Durner és mtsai., 1998). Emellett kölcsönhat más jelátviteli anyagokkal, így hidrogén-peroxiddal, szuperoxidgyök-anionnal, szalicilsavval, jázmonsavval (Wendehenne és mtsai., 2004), valamint génexpressziós folyamatokra is hatást gyakorol (Grün és mtsai., 2006).

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A NO szerepe meghatározó a különböző biotikus és abiotikus stresszhatások nyomán indukálódó növényi válaszreakciók kialakításában. Részt vesz a fertőzéssel, betegséggel szembeni rezisztencia (Delledonne és mtsai., 1998), ezen belül a hiperszenzitív reakció (Delledonne és mtsai., 2001), és a programozott sejthalál (Wendehenne és mtsai., 2004) kialakításában; ugyanakkor feltűnik csaknem minden abiotikus stressztényező – így az alacsony és magas hőmérséklet, szárazság, magas sótartalom, nehézfémek, mechanikai sérülés illetve UV-B sugárzás – által kiváltott válaszreakcióban (Qiao és mtsai., 2008). A NO hatása koncentrációfüggő: elsősorban alacsony koncentrációban fejt ki növekedésszabályozó és citoprotektív hatását, magas koncentrációban károsítja a membránokat, fehérjéket és nukleinsavakat (Leshem és Haramaty, 1996).

Mindezen biológiai funkciók változatossága is arra utal, hogy a NO az élőlények túlnyomó többségében előforduló közös és alapvető szignalizációs sémákra fejt ki hatását (Delledonne 2005). A NO kutatás figyelme az élettani funkciók feltárását követően a NO jelátvitel molekuláris mechanizmusai felé fordult (4. ábra).

### *2.4.2. Fém nitrozilálás*

Állati szervezetekben a hemoglobin fontos szerepet tölt be az endogén NO mennyiség szabályozásában (Gow és mtsai.,1999), melynek alapja a NO nitrozilációs reakciója a hemoglobin hem-vasával. Hem tartalmú proteinek növényekben is előfordulnak és ismert, hogy a leghemoglobinok (Herold és Puppó, 2005), illetve más növényi hemoglobinok szerepet játszanak a NO, illetve a peroxinitrit detoxifikálásában, hipoxia (Perazzolli és mtsai., 2004), vagy patogén támadás (Seregélyes és mtsai., 2004) esetén.

Állati sejtekben ugyancsak nitrozilálással aktiválódik a hem tartalmú guanilil cikláz, mely a NO jelátvitel egyik fontos eleme, a cGMP szintézisét végzi (Ahern és mtsai., 2002). A cGMP szerepét a NO szignalizációban növényekben is leírták (4. ábra; Wendehenne és mtsai., 2004), és a guanilil-cikláz aktivációjának mechanizmusa is valószínűleg azonos, bár a NO által indukált oldható guanilil-cikláz azonosítása még várat magára (Besson-Bard

és mtsai., 2008). A NO kölcsönhatásba léphet vas-kén tartalmú proteinekkel (Mur és mtsai., 2006), így reagálhat a mitokondriális és fotoszintetikus elektrontranszportláncok átmenetifém-tartalmú fehérjéivel is, többek között csökkenti a citokróm-c-oxidáz aktivitását (Millar és Day, 1996).

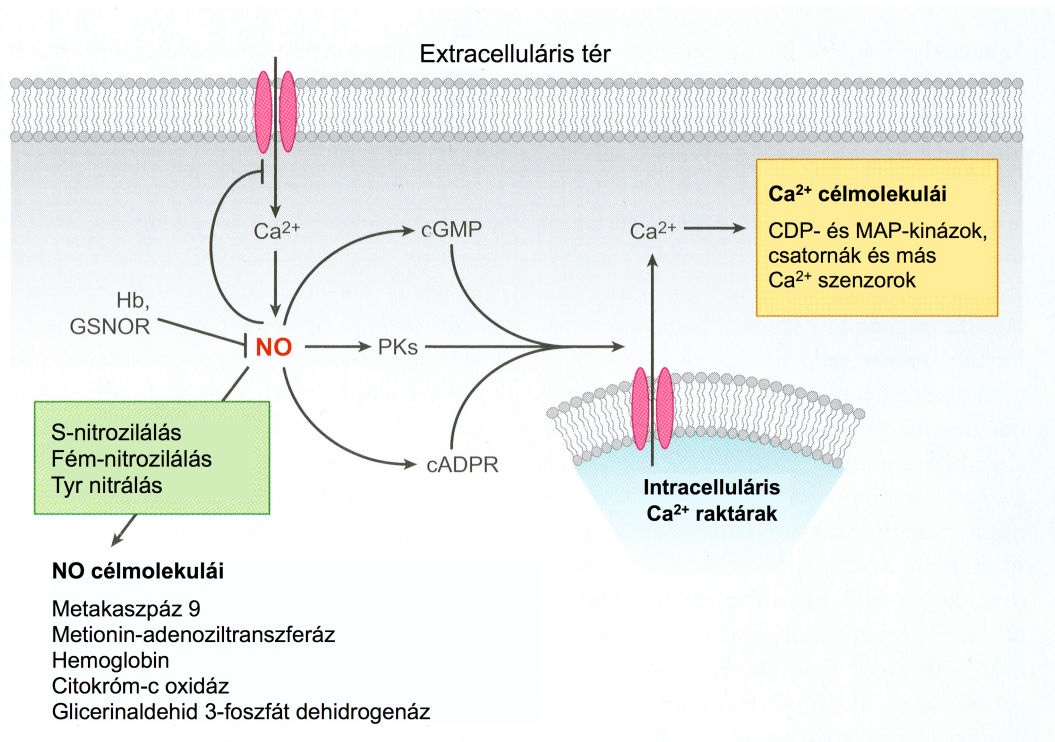
#### 2.4.3. S-nitrozilálás

A NO és a ciszteintartalmú oligopeptidek, illetve fehérjék tiolcsoportja közötti reakció eredménye az S-nitrozilálás, mely a foszforiláláshoz hasonlóan igen fontos poszttranszlációs fehérjemódosítási lehetőség. A reakció biológiai jelentőségének felméréseben nagy előrelépést jelentett a *Biotin Switch* nevű biokémiai módszer, mely S-nitrozilált fehérjék biotinizálásán keresztül lehetővé tette S-nitrozilált fehérjék *in situ* és *in vitro* azonosítását (Besson-Bard és mtsai., 2008). Lindermayr és munkatársai (2005) e módszer segítségével úttörő szerepet játszottak az S-nitrozilálás növényi célmolekuláinak azonosításában: NO-kezelt *Arabidopsis* levelek és sejtszuszpenziók fehérjekivonataiban több mint 50 – különböző anyagcserefolyamatban, fotoszintézisben, redoxegyensúlyban és stresszválaszban – szerepet játszó S-nitrozilált fehérjét azonosítottak.

Az S-nitroziláció szabályozható fehérjemódosítás, a folyamat tehát reverzibilis: a fehérjék tiol-csoportját egy transznitrozilációs reakció regenerálja redukált glutation jelenlétében. A folyamat során tehát GSNO képződik, mely önmaga is fontos természetes NO raktározó és donormolekula (Jaffrey és mtsai., 2001). A reakciót katalizáló GSNO-reduktáz enzimet (GSNOR) növényekben is azonosították (Sakamoto és mtsai., 2002).

#### 2.4.4. Tirozin nitrálás

Fehérjék tirozin oldalának nitrálása a NO-indukált oxidatív stressz egyik tünete, és általában funkcióvesztéssel jár, ugyanakkor fontos jelátviteli funkcióval rendelkezhet. Állati szervezetekben a tyr-nitrálás és tyr-foszforilálás kompetitív folyamatok (Schopfer és mtsai., 2003). A tyr-nitrálás növényekben például sóstressz esetén megfigyelhető (Valderrama és mtsai., 2007), azonban a folyamat célmolekulái és szignalizációs útvonalai javarészt felderítetlenek (Besson-Bard és mtsai., 2008).



4. ábra. NO szignalizáció növényi sejtekben (Besson-Bard és mtsai., 2008)

#### 2.4.5. A NO és Ca<sup>2+</sup> szignalizáció

A NO és Ca<sup>2+</sup> jelátviteli útjai állati sejtekben nagyon szorosan kapcsolatosak, mert a citoszolikus szabad Ca<sup>2+</sup> szintet meghatározó csaknem minden csatorna és transzporter közvetlenül – S-nitroziláció útján – vagy közvetve – másodlagos hírvivő molekulák (cGMP, ciklikus ADP ribóz), illetve protein kinázok közbeiktatásával – NO szabályozása alá esik; és a NO és Ca<sup>2+</sup> viszonya növényekben is hasonlóan tűnik (4. ábra; Besson-Bard és mtsai., 2008). A sztómazáródás egyre részletesebben feltárt szignalizációjában például a patogén elicitorok (Srivastava és mtsai., 2009), vagy ABA hatására (Neill és mtsai., 2008) megemelkedett NO a belső membránok Ca<sup>2+</sup>-csatornáinak aktiválása útján emeli a citoszolikus Ca<sup>2+</sup> szintjét. Ezt a viszonylag egyszerű képet árnyalja, hogy egyes kísérletekben a biotikus stressz elleni védekezési reakciók során tapasztalt citoszolikus Ca<sup>2+</sup>-szintemelkedés maga is NO képződést indukál, melyben kalmodulin, illetve kalmodulin-szerű fehérjék is szerepet játszhatnak (Ma és mtsai., 2008). Emellett a NO és Ca<sup>2+</sup> kölcsönhatása nyomán indukálódó szignalizációs folyamatok kimenetelét befolyásolhatja a két molekula koncentrációja is (Besson-Bard és mtsai., 2008).

## 2.5. A NO hatása a fotoszintetikus elektrontranszportláncra

A NO tehát biológiai rendszerekben reagálhat oxigénnel, hidrogén-peroxiddal, szuperoxidokkal, tiolcsoportokkal és átmeneti fémekkel; így a tiolcsoporttal, illetve átmeneti fémmel rendelkező fehérjék a NO jelátvitel fontos célmolekulái (Lamattina és mtsai., 2003). A fotoszintetikus és mitokondriális elektrontranszportlánc komplexei között bőven akad átmenetifém-tartalmú: vas- és réztartalmú fehérjék is találhatóak a mitokondriális elektrontranszportlánc citokróm *bc<sub>1</sub>* komplexében és a citokróm-*c*-oxidáz komplexben; a kloroplasztiszok elektrontranszportláncának egyik mobilis eleme, a plasztocianin rezet tartalmaz, és mindkét fotokémiai rendszerben található nem-hem vas. A NO, illetve egyik származéka, a peroxinitrit gátolja a mitokondriális elektrontranszportlánc terminális eleme, a citokróm-*c*-oxidáz enzim aktivitását (Millar és Day, 1996; Brookes és mtsai., 1999; Yamasaki és mtsai., 2001). A megemelkedett exogén NO szint fotoszintetikus aktivitásra gyakorolt hatását azonban intakt levél esetén kevesen vizsgálták, s az eredmények is ellentmondóak. Korábbi mérések ugyan bizonyították, hogy a NO-gáz csökkenti a zab és lucerna levelek szén-dioxid-fixációját (Hill és Bennett, 1970), illetve Leshem és munkatársai (1997) kísérleteiben a SNAP-kezelés hatására intakt borsólevelek zárósejteiben mérhető vörös klorofill fluoreszcencia intenzitása jelentősen megemelkedett. Ezzel szemben Jin és munkatársai (2009b) kísérleteiben a légkörbe juttatott NO-gáz jelentősen növelte spenót (*Spinacia oleracea*) növények fotoszintetikus aktivitását és biomassza-termelését.

A NO szignalizáció sejten belüli célpontjai között a mitokondrium, a peroxiszóma és a sejtmag mellett a kloroplasztiszok is szerepelnek. Lum és munkatársai (2005) megállapították, hogy az SNP befolyásolja a mungóbab több fotoszintetikus fehérjéjének mennyiségét, így csökkenti a Rubisco-aktiváz és a Rubisco alegység kötő fehérje  $\beta$ -alegységének mennyiségét. További vizsgálatokkal kimutatták, hogy 500  $\mu$ M SNP-vel való 6 órás kezelés után a levelek glükózmennyisége drasztikusan lecsökkent, bár ebben a fotoszintetikus fehérjék mennyiségének kizárólagos szerepe nem tűnik egyértelműnek. A NO ugyanakkor nemcsak a fehérjeszintézis megváltoztatása

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

révén eredményezhet fotoszintézis gátlást, hanem közvetlenül a fotoszintetikus elektrontranszportláncon keresztül is szabályozhat. NO fotoszintetikus elektrontranszportlánc működésére gyakorolt hatásának finomabb feltárásával azonban szintén kevés tanulmány foglalkozott, többnyire *in vitro* kísérleti rendszerekben, ám ezek eredményei sem konzisztensek.

A fotoszintetikus elektrontranszportláncot a fényenergia működteti. Magasabbrendű növényekben az elektronok a víztől a NADP<sup>+</sup> felé áramlanak és a gerjesztő fotonok energiája a transzportlánc két lépésében, két fotokémiai reakcióban hasznosul. Az egyik ilyen reakció színhelye a második fotokémiai rendszer (PSII), a tilakoid membránba ágyazott nagyméretű pigment-protein komplex (5. ábra). Funkciójának lényege a víz-plasztokinon-oxidoreduktáz aktivitás: a víz molekuláris oxigénné oxidálódik, s a vízbontásból származó protonok a lumenbe jutnak, az elektronok pedig több lépésben, a PSII reakcióközpont redox kofaktorainak közreműködésével kerülnek a plasztokinon (PQ) molekulára. A folyamat energiaigényét az antennapigmentek által elnyelt fotonok, s a reakcióközpontba továbbított gerjesztési energia fedezi, melyet a PSII elsődleges elektrondonora (P680) hasznosít. Gerjesztés hatására P680 redoxpotenciálja kellően negatívvá válik ahhoz, hogy redukálja közvetlen elektronakceptorát, a feofitint. Innen az elektron egy kötőhelyéhez permanensen kötött kinonmolekulára (Q<sub>A</sub>), majd egy második kinonmolekulára (Q<sub>B</sub>) kerül. A Q<sub>B</sub>-molekula két fotokémiai eseményt követően két elektront s a sztróma oldalról két protont felvéve plasztokinollá (PQH<sub>2</sub>) alakul, s kötőhelyéről leválva bekerül a mobilis PQ-készletbe, melynek tagjai az elektronokat a cirokróm *b<sub>6</sub>/f* komplex felé szállítják. A P680 első stabil donor oldali redoxpartnere a D1 fehérje redoxaktív tirozin-Z oldallánca (Y<sub>Z</sub>). A végső elektrondonor a vízbontó komplex Mn-csoportja, mely öt különböző oxidációs állapotot vehet fel (S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>) (Nugent és mtsai., 2001; Barber, 2003).

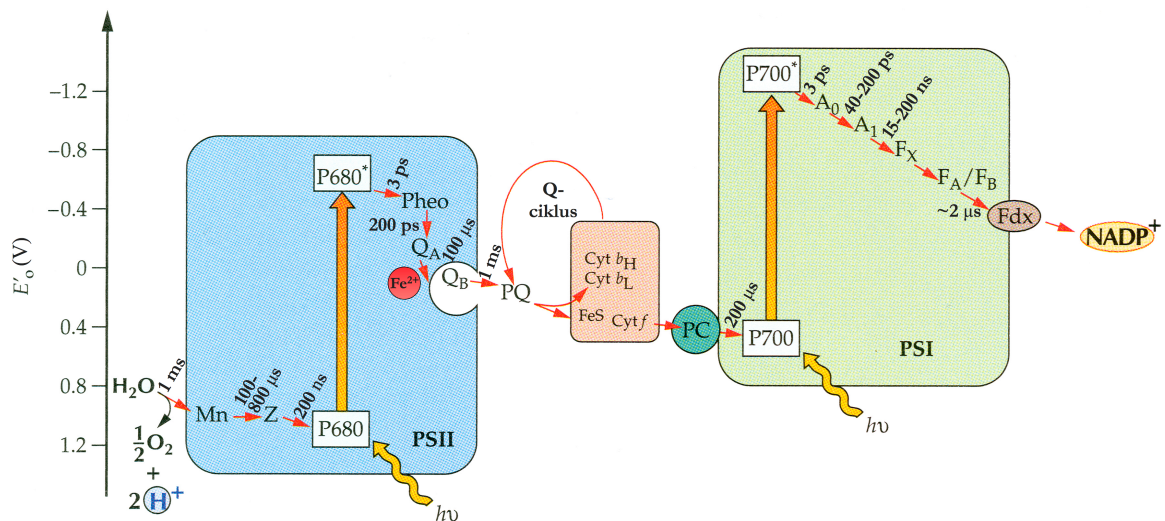
NO-gáz jelenlétében, izolált tilakoid membránokon végzett EPR és klorofill-*a* fluoreszcencia indukciós kísérletek egyértelműen kimutatták, hogy a NO a PSII több pontjához reverzibilis módon kötődhet, és az itt kötött



## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

bikarbonátot koncentráció-függő módon kiszorítja, ezzel gátolja az elektronátadást. Ilyen például a  $Q_A$  és  $Q_B$  kötőhely között található nem-hem (II) vas (Diner és Petrouleas, 1990), a vízbontó komplex melletti  $Y_D$  tirozin gyök (Sanakis és mtsai., 1997; Schansker és mtsai., 2002) és a vízbontó komplex Mn-csoportja (Schansker és mtsai., 2002).

Takahashi és Yamasaki (2002) tilakoid membránokon végzett kísérletekben kimutatták, hogy a SNAP a maximális kvantumhasznosítást ( $F_v/F_m$ ) nem befolyásolja, viszont gátolja a lineáris elektrontranszport sebességét, a transztilakoid pH különbséget ( $\Delta pH$ ), és csökkenti az ATP szintézis mértékét. A bikarbonát mennyiségét jelentősen megemelve viszont úgy találták, hogy a NO fotofoszforilációt gátló hatása megszüntethető. A fényindukált  $\Delta pH$  gátlásának az energiafüggő nemfotokémiai kioltásban ( $qE$ ) mutatkoznia kellene, ám más szerzők ezt nem figyelték meg. Yang és munkatársai (2004) kísérleteikben úgy találták, hogy intakt burgonya levelekben az SNP-kezelés hatására a nemfotokémiai kioltás (NPQ) nem változik, viszont az SNP koncentrációfüggő módon csökkenti  $F_v/F_m$  értékét.



**5. ábra.** Z-séma, Buchanan és munkatársai (2001) nyomán

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Tilakoid membránokon és izolált kloroplasztiszokban végzett EPR és fluoreszcencia indukciós mérések alapján a NO tehát gátolja PSII fotoszintetikus elektrontranszportját, ám az *in vivo* eredmények ugyancsak ellentmondásosak. Mindemellett a NO első fotokémiai rendszerre (PSI) gyakorolt hatása csaknem teljesen feltáratlan terület. PSI fotokémiai eseményei jól nyomomonkövethetők *in vivo* a PSI elsődleges elektrondonorának (P700) fényindukált abszorpcióváltozása alapján (Klughammer és Schreiber 1994). Az így kapott eredmények jól kiegészítik a fluoreszcencia indukciós mérésekből származó ismereteket, a tilakoid membránok elektrontranszport folyamatairól intakt levelekben.

Csakúgy mint a PSII, a PSI lényegében szintén egy fényenergiával működő összetett oxidoreduktáz enzimkomplex, melynek funkciója a lumenben elhelyezkedő plasztocianin oxidálása és a sztrómában elhelyezkedő ferredoxin (Fd) redukálása (5. ábra). A fényenergia közvetlenül PSI elsődleges elektrondonora (P700) és elsődleges elektronakceptora ( $A_0$ ) között lezajló elektronátadási reakcióban hasznosul. Az elektron innen a PSI akceptor oldali redox kofaktorainak közreműködésével a Fd-ra kerül, majd a Fd-NADP<sup>+</sup>-oxidoreduktáz enzim segítségével redukálja a NADP<sup>+</sup>-molekulát. A P700 közvetlen elektrondonora a plasztocianin, mely a lineáris elektrontranszportlánc citokróm *b<sub>6</sub>/f* komplexe és PSI közötti elektronforgalmat lebonyolító mobilis eleme. A PSI fő feladata tehát az elektronok biztosítása a Calvin-ciklusban hasznosuló NADPH számára (Nelson és Yocum, 2006; Buchanan és mtsai., 2001).

A PSI körül azonban ciklikus elektrontranszport is zajlik, melynek során az elektronok a redukált Fd-ról plasztokinonra kerülnek, majd a lineáris elektrontranszportlánc további elemein keresztül visszajutnak a PSI reakciócentrumba. A folyamat tehát nem jár nettó elektronkilépéssel, de a lineáris elektrontranszporttal együtt fontos szerepe van a protongrádiens kialakításában a tilakoidmembrán két oldalán; s az így felépülő protonmozgató erő ATP szintézisben hasznosul. PSI körüli ciklikus elektrontranszport első leírását követően (Arnon és mtsai., 1954) a jelenséget fiziológiai viszonyok között is megfigyelték, például szárazság vagy CO<sub>2</sub>-hiány esetén (Nelson és

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Yocum, 2006), valamint sötétadaptált növények megvilágításakor (Joliot és Joliot, 2002; Finazzi és mtsai., 2004). A PSI körüli ciklikus elektrontranszport két, egymással részben átfedő úton – a PGR5-függő és NDH-függő úton – valósul meg (Shikanai, 2007). Az első útvonal pontos mechanizmusa még vitatott: egyes megfigyelések arra utalnak, hogy a reakció a Fd-NADP<sup>+</sup>-oxidoreduktáz közreműködésével a citokróm *b<sub>6</sub>/f* komplexen keresztül valósul meg (Stroebel és mtsai., 2003; Johnson, 2005), míg mások szerint a PQ-Fd oxidoredukció közvetlen enzimkatalízis eredménye (Okegawa és mtsai., 2005) – bár a feltételezett Fd-PQ-oxidoreduktáz enzimet még nem azonosították (Rumeau és mtsai., 2007). A folyamathoz a PGR5 nevű tilakoidmembránhoz kötött fehérje jelenléte azonban biztosan szükséges (Munekage és mtsai., 2002), és antimicin-A-ra érzékeny, tehát minden bizonnyal az Arnon és munkatársai (1954) által leírt útvonallal. A másik – antimicin-A-ra kevésbé érzékeny – útvonalban az elektronok a Fd-NADP<sup>+</sup>-oxidoreduktáz közreműködésével NADPH-ra kerülnek, majd a NAD(P)H-dehidrogenáz komplex (NDH) aktivitása nyomán redukálják a PQ-készlet tagjait (Shikanai, 2007)

A PQ-készlet tagjait tehát – közvetve, vagy közvetlenül – mindkét fotokémiai rendszer képes redukálni, így a PQ-készlet a fényaktivált lineáris és ciklikus elektrontranszport folyamatoknak egyaránt kulcsfontosságú szereplője. Emellett több kísérletben igazolták, hogy a PQ-készlet endogén illetve exogén NADH, és NADPH jelenlétében sötétben is redukálható, mely a klorofill-*a* fluoreszcencia emelkedésével jól nyomonkövethető (Bukhov és Carpentier, 2004). A PQ-készlet nemfotokémiai redukcióját intakt levelekben is megfigyelték (Asada és mtsai., 1993). Az *ndh*-deficiens mutáns növényeken végzett kísérletek arra utalnak, hogy ezt a reakciót az *ndh* génnek terméke, a NAD(P)H-dehidrogenáz komplex katalizálja (Bukhov és Carpentier, 2004; Rumeau és mtsai., 2007), mely a klororespirációs folyamatokban is részt vesz (Nixon, 2000). Az enzim szubsztrátutánpotlását sztrómadonorok fedezik, melyek egyrészt a kloroplasztisz sztrómában képződő, vagy ide transzportálódó redukálható molekulák, például a kloroplasztisz keményítőbontásának termékei (Bukhov és mtsai., 2002); másrészt a

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

glikolízisből származó, kloroplasztiszba transzportálódó trióz-foszfát molekulák (Asada és mtsai., 1992). A sztróma redoxállapotát tehát a vele metabolitkapcsolatban álló mitokondrium aktivitása is meghatározza (Bukhov és Carpentier, 2004).

A PSI körüli alternatív elektrontranszport utaknak szerepük van a szén megkötéséhez szükséges ATP és NAPH arányának beállításában, és a PSII fotoprotekcióját elősegítő transztilakoid protongrádiens kialakításában. Aktivációjuk megfigyelhető egyes abiotikus stresszhatások, így a magas és alacsony hőmérséklet, illetve a sóstressz során, így minden bizonnyal szerepük van e stressztényezők elleni védekezésben is (Bukhov és Carpentier, 2004; Shikanai, 2007). A PSI működésére hatást gyakorolnak tehát olyan abiotikus stressztényezők melyek növényi válaszreakciójában a NO szerepe vitathatatlan, sőt a PSI több vas-kén proteint tartalmaz, melyek a NO potenciális célmolekulái lehetnek. Ennek ellenére a NO PSI aktivitására gyakorolt közvetlen hatásáról nincs ismeretünk.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja, hogy különböző NO donorok és NO akceptormolekulák alkalmazásával megállapítsuk az exogén NO kezelés hatását borsó levélkorongok fotoszintetikus elektrontranszportjára. E cél fontos része a NO fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásáról szóló ellentmondásos eredmények tisztázása, és a NO *in vivo* hatásterületeinek feltárása fluoreszcencia indukciós mérések segítségével. Célkitűzésünk másik fontos része a NO PSI működésére gyakorolt esetleges hatásának felderítése a P700 abszorpciós tranziensek mérésével. Vizsgálatainkkal az alábbi kérdésekre keresünk választ:

1, Méréseinkben alkalmazott NO donorok eltérő kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek: van-e különbség az egyes NO donorok NO produkciójában? A képződő NO-molekulán túl befolyásolják-e mérési eredményeket az egyes donorok egyéb fotolitikus bomlástermékei, vagy maga a NO oxidatív bomlástermékei?

2, Tilakoid membránokon végzett EPR mérések igazolták, hogy a NO gátolja PSII elektronátadási folyamatait, és azonosították a gátlás helyét. Vajon ezek a hatások és célterületek *in vivo* környezetben is igazolhatók?

3, Az exogén NO fotoszintetikus paraméterekre gyakorolt hatását több NO donormolekulával is vizsgálták, ám izolált kloroplasztiszokon és intakt leveleken végzett mérések eredményei egymással ellentmondanak. A kapott különbségek mennyiben magyarázhatók az alkalmazott NO donormolekulák, és mennyiben a kísérleti elrendezés különbségeivel? Milyen hatást gyakorol az exogén NO borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereire?

4, A NO PSI elektronátadási folyamataira kifejtett hatását eddig nem vizsgálták. Befolyásolja-e az exogén NO a PSI fotoszintetikus elektrontranszportját?

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Növénynevelés

Kísérleteinket *Pisum sativum* L. cv Rajnai Törpe növényekkel végeztük. A sterilizált borsómagvakat három napig csíráztattuk 22 °C fokon, majd két hétig, 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség (photon flux density, PFD) és 10-12-órás sötétperiódus mellett módosított Hoagland-tápoldatban neveltük, mely az alábbi összetevőkből állt: 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 mM  $\text{KCl}$ , 0,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; valamint a mikroelemek: 1  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ , 5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0,1  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ , és 20  $\mu\text{M}$  Fe-EDTA. A kísérletekhez a növények legfiatalabb, teljesen kiterült leveleiből vágott 15 mm átmérőjű levélkorongokat használtuk fel.

### 4.2. Kezelés és kísérleti oldatok

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD mellett, nem légmentesen lezárt tetejű Petri-csészében úsztattuk 4 ml kísérleti oldatban, majd a levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltuk.

A kísérleti oldatok az alábbi NO donor- és NO akceptormolekulák különböző koncentrációjú vizes oldatai: S-nitrozoglutation (GSNO), nátrium-nitroprusszid (SNP) és S-nitroso-N-acetilpenicillamin (SNAP); illetve kálium-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid (PTIO) és hemoglobin (Hb). Egyes kísérleteket DCMU (3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea) jelenlétében végeztünk, mely gátolja az elektrontranszportot PSII  $\text{Q}_A$  és  $\text{Q}_B$  kötőhelyei között. A DCMU-kezelés során a levélkorongokat sötétben 0,1 mM DCMU oldattal vákuum-infiltráltuk közvetlenül a sötétadaptáció előtt.

A kísérleti körülmények között vizsgáltuk NO oxidatív bomlástermékei, a  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ -ionok hatását 0,2 mM  $\text{NaNO}_2$  és 0,2 mM  $\text{NaNO}_3$  tartalmú oldattal. Az SNP NO-specifikus hatásainak kiszűréséhez kálium-cianid (KCN) oldatot használtunk. Végül ellenőriztük a GSNO fotolitikus bomlástermékének, az oxidált glutation molekulának (GSSG) a hatását is.

Az SNP, GSNO és SNAP törzsoldatokat közvetlenül a mérések előtt készítettük el, és az oldatokat felhasználásig sötétben, jégen tároltuk, hogy megakadályozzuk a NO donorok idő előtti fotodegradációját (Feelisch, 1998).

A növénynevelés és a kísérletek során felhasznált összes vegyszer analitikai tisztaságú, beszerzési forrásuk: Sigma-Aldrich, illetve ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA (DCMU).

### 4.3. A NO koncentráció meghatározása

A kísérleti oldatainkból a NO donorok fotodegradációja nyomán felszabaduló NO mennyiségét NO-elektrod (ISO-NOP, World Precision Instruments, USA) segítségével követtük nyomon. A NO-elektrodot SNAP oldattal kalibráltuk, melyet kénsavval pH 4 értékre állított rézszulfát oldatba adagoltunk, a gyártó kalibrálási utasításai szerint.

### 4.4. Variábilis klorofill-*a* fluoreszcencia mérések

#### 4.4.1. Fluoreszcencia lecsengés kinetika

A klorofill-*a* fluoreszcencia flash-indukált növekedését, majd lecsengését kettős modulációjú fluoriméterrel követtük nyomon (PSI Instruments, Brno, Csehország) Vass és munkatársai (1999) nyomán. A lecsengési kinetika gyors, néhány száz mikroszekundumos lecsengési komponense tájékoztat az előre irányuló elektrontranszportot eredményező  $Q_A^-$ -reoxidációról a  $Q_B$  kötőhelyen oxidált, vagy szemikinin PQ-t tartalmazó centrumokban. A középső, néhány milliszekundumos fázis a szintén előre irányuló elektrontranszportot okozó  $Q_A^-$ -reoxidációról ad információt azokban a centrumokban, melyek  $Q_B$ -kötőhelye a flash pillanatában üres. Végül a lassú, néhány másodperces fázis azokról a centrumokról tájékoztat, melyekben a  $Q_A^-$  az  $S_2$  állapotú vízbontó komplexszel rekombinálódik, és ezzel a  $Q_A^-Q_B \leftrightarrow Q_AQ_B^-$  egyensúlyon keresztül visszafelé irányuló elektrontranszportot okoz. A gyors és a középső fázis egy-egy exponenciális komponenssel írható le. A  $Q_A^-$  töltés-rekombinációval járó lassú lecsengése ezzel szemben hiperbolikus lecsengési kinetikát mutat, amely másodrendű folyamatra utal (Vass és mtsai., 1999). Így a mért görbék többkomponensű felbontásához használt illesztés két exponenciális és egy

hiperbolikus komponensből áll:

$$F_{v, \text{ korr}} = A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2) + A_3/(1 + t/\tau_3) + A_0 \quad (6)$$

ahol  $F_{v, \text{ korr}}$  a nemlinearitás miatt korrigált változó fluoreszcencia,  $A_1$ - $A_3$  amplitúdó értékek,  $\tau_1$ - $\tau_3$  időállandók, amelyekből a féléletidőket az exponenciális komponensek esetén a  $t_{1/2} = \ln 2 \cdot \tau$ , a hiperbolikus komponens esetén a  $t_{1/2} = \tau$  összefüggéssel számítottuk.

#### 4.4.2. Lassú fluoreszcencia indukciós mérések

A borsó levelek klorofill-*a* fluoreszcenciáját impulzus amplitúdó modulált (PAM) fluoriméterrel (PAM-2000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Németország) követtük nyomon. A konstans alapfluoreszcencia ( $F_0$ ) meghatározását követően a maximális fluoreszcencia ( $F_m$ ) meghatározásához  $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD, 0,8 s hosszúságú telítési fényimpulzust alkalmaztunk. A változó fluoreszcenciát ( $F_v$ ) az  $F_v = F_m - F_0$  képlet alapján számítottuk. A maximális kvantumhasznosítást ( $F_v/F_m$ ) Kitajima és Butler (1975) leírása alapján határoztuk meg. A lassú fluoreszcencia kinetika felvétele során a maximális fluoreszcencia kioltott értékeit ( $F_m'$ )  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD aktinikus megvilágítás (AL) mellett mértük. A 30 perces AL kikapcsolása után a steady-state fluoreszcencia minimumát ( $F_0'$ ) távoli vörös fény (FR) alkalmazásával állapítottuk meg. A fotokémiai kioltást (qP) Schreiber és munkatársai (1986) módszere szerint, a nemfotokémiai kioltást (NPQ) az  $(F_m - F_m')/F_m'$  összefüggés alapján számítottuk (Bilger és Björkman, 1990). A PSII effektív kvantumhatékonyságát a  $\Phi_{\text{PSII}} = \Delta F/F_m'$  összefüggés szerint kalkuláltuk (Genty és mtsai., 1989), ahol  $\Delta F = F_m' - F_s$ , és  $F_s$  a fluoreszcencia steady-state szintje. A nemfotokémiai kioltás (NPQ) energiatartó komponensét (qE) az NPQ relaxációs kinetikájából határoztuk meg, melyhez az AL kikapcsolása után, 60 s időközönként adtunk telítő fényimpulzusokat. A fénykezelést követő sötét periódus első 5 percében a qE komponens relaxálódik, amelyet a  $qE = (F_m/F_m') - (F_m/F_m'')$  összefüggés alapján számítottunk ki, ahol  $F_m''$  a megvilágítás utáni sötét relaxáció 5. percében mért maximális fluoreszcencia (Thiele és mtsai., 1997). A qI fotoinhibíciós komponensét a sötét periódus 15. percében határoztuk meg.



A Kautsky-görbét a sötétadaptációt követő  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD, 3 s hosszúságú AL mellett rögzítettük.

#### 4.5. P700<sup>+</sup> abszorpciós tranziensek mérése

A PSI elektrontranszport folyamatai spektrofotometriai módszerrel jól nyomonkövethetők a 810-840 nm hullámhossztartományban, a PSI elsődleges elektrondonorának (P700) fényindukált abszorpciós tranziensei alapján (Klughammer and Schreiber 1994). Ebben a hullámhossztartományban az abszorpciós tranzienshez az oxidált állapotú P700 (P700<sup>+</sup>) mellett a plasztocianin a Fd is hozzájárul, és a regisztrált jelet a fénytörés is módosíthatja: borsólevelekben a 820 nm jelben a P700<sup>+</sup> : plasztocianin aránya 1 : 1, a Fd abszorpciója elhanyagolható (5%) (Schansker és mtsai., 2003). Egy újabb, 870 nm körüli csúccsal rendelkező referencia mérőfény alkalmazásával egy differenciajel nyerhető (például  $\Delta I_{875-830}$ ), mely lényegesen specifikusabb P700 abszorpciójára, mert a referencia mérőfény segítségével kiszűrhetők a fénytörés és a 800-900 nm tartományban csaknem változatlan abszorpcióval rendelkező plasztocianin által okozott változások. A kapott differenciajel tehát közvetlen információt ad PSI fotokémiai eseményeiről. Megfelelő megvilágítási ciklus alkalmazásával a P700 abszorpciós tranziensek alapján megbecsülhető a PSII és PSI közötti lineáris elektrontranszportláncban lévő elektronok és a sztrómadonoroktól származó elektronok száma (Asada és mtsai., 1992); kiszámítható PSI effektív kvantumhatásfoka ( $\Phi_{\text{PSI}}$ ) (Klughammer és Schreiber 1994; 2008); valamint elkülöníthetők a PSI felé vezető lineáris, ciklikus és sztrómadonoroktól kiinduló elektrontranszport utak (Chow és Hope 2004).

A lineáris elektrontranszportláncban lévő, valamint a sztrómadonoroktól származó elektronok számának meghatározásához a P700<sup>+</sup> fényindukált abszorpciós tranzienseket egy kettős hullámhosszú emitter-detektor egységgel (ED-P700DW, Walz) felszerelt PAM fluoriméter (PAM-101, Walz, Effeltrich, Németország) segítségével követtük nyomon. Az emitter-detektor egység két, 810 és 870 nm csúcsokkal rendelkező mérőfényforrásának abszorpció-különbségéből származó differenciajelet a berendezés adatfelvevő egységével (PDA-100, Walz) számítógépre rögzítettük, a mintavételi sűrűséget

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

10 ms/pont értékre állítottuk be. A mérések során a levélkorongokat a 6. A ábrán bemutatott megvilágítási ciklus szerint az alábbi fényforrásokkal világítottuk meg: távoli vörös fény (FR, =  $735 \pm 40$  nm,  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD, 102-FR, Walz), aktinikus fehér fény (AL,  $220 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD, KL 1500 LCD, Schott, Mainz, Németország), egyetlen töltésszeparációt (ST flash, a maximális fényintenzitás feléhez tartozó csúcsszélesség =  $1,5 \mu\text{s}$ , XE-STL/XE-STC, Walz) valamint több töltésszeparációt eredményező (MT flash, csúcsszélesség = 50 ms, XF-103/XMT-103, Walz) telítési ( $> 8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD) fényimpulzusok.

A 6. A ábrán egy tipikus, kontroll levélkorongból származó P700 abszorpciós tranziens látható. FR megvilágítás jelenlétében ST és MT telítési fényimpulzusok hatására az oxidált P700 átmenetileg redukálódik, majd visszaoxidálódik az eredeti, impulzus előtti állapotba. Az ST- és MT-területeket a P700 abszorpciós tranziens fényimpulzust követő 10, illetve 20 s időtartamú szakaszaihoz tartozó területekből számítottuk (6. A ábra). Az ST-impulzus egyetlen töltésszeparációt idéz elő a két fotokémiai rendszerben, így az impulzust követő abszorpciós tranziens-változáshoz tartozó ST-terület megközelítőleg megfeleltethető a PSII felől a PSI felé áramló egyetlen elektronnak, mely felelős a P700 redukálásáért. A megfeleltetés nem pontos, mert az impulzust követő töltésszeparáció után a töltés az abszorpciós tranziens időbeli febontásánál nagyságrendekkel gyorsabban rekombinálódik P700 és közvetlen elektronakceptorai között. Az 50 ms időtartamú MT-impulzus a két fotokémiai rendszert összekötő elektrontranszportlánc teljes feltöltéséhez elegendő számú töltésszeparációt eredményez. Ezek az elektronok szintén redukálják a P700 központokat, így az MT-terület megfeleltethető a két fotokémiai rendszert összekötő elektrontranszportlánc teljes elektronkészletének. Az ST/MT hányados tehát közelítőleg megadja a lineáris elektrontranszportláncban lévő elektronok számát (Asada és mtsai., 1992). Az AL-területet a P700 abszorpciós tranziens aktinikus megvilágítást követő 40 s időtartamú szakaszához tartozó területe adja FR jelenlétében (6. ábra, inzert). Ez a terület arányos az aktinikus megvilágítás alatt felhalmozódó elektronok számával, melyek redukálhatják a P700-at. Az egy PSI reakciócentrumra eső sztróma elektronkészlet mennyisége a fenti

területek arányaiból Asada és munkatársai (1992) szerint az alábbi összefüggés alapján számolható:  $(MT \text{ terület} / ST \text{ terület}) \times [(AL \text{ terület} / MT \text{ terület}) - 1]$ .

$\Phi_{PSI}$  értékek meghatározásához, valamint a PSI felé áramló elektrontranszport utak elkülönítéséhez az abszorpciós tranziensek pontosabb, nagyobb időbeli felbontású nyomkövetése szükséges, így a klorofill fluoreszcencia és P700 abszorpció egyidejű mérésére képes Dual-PAM-100 mérőműszert alkalmaztuk. A műszer a PAM-101 készülék továbbfejlesztett változata, mely egyrészt nagyobb részletgazdagsággal képes rögzíteni az abszorpciós tranzienseket, másrészt integrált fényforrásai és adatvevő egysége, valamint korszerűbb meghajtóprogramja segítségével nagymértékben megkönnyíti a mérések pontos technikai kivitelezését is. Az abszorpciós tranziensek a berendezés 830 nm és 875 nm csúcsokkal rendelkező mérőfényforrásainak abszorpció-különbségéből származó differenciajelek; a mintavételi sűrűség 5 ms/pont. A mérések során a levélkorongokat a 6. B ábrán bemutatott megvilágítási ciklus szerint az alábbi fényforrásokkal világítottuk meg: távoli vörös fény (FR, = 720 nm, 128  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD), aktinikus fehér fény (AL, 339  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD), telítési fényimpulzus (SP, 10000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD).

A  $\Phi_{PSI}$  értékek meghatározásának alapja Klughammer és Schreiber (1994; 2008) megállapítása, mely szerint a PSI reakciócentrumok egy nyitott (P700 A) és két zárt – a donor oldal oxidált állapotából (P700<sup>+</sup> A) illetve az akceptor oldal redukált állapotából (P700 A<sup>-</sup>) fakadó – állapotban lehetnek. Ezen állapotok az aktinikus illetve távoli vörös megvilágítás jelenlétében alkalmazott telítési impulzusok segítségével a 6. B ábrán jelölt módon azonosíthatók, és  $\Phi_{PSI}$  értékét a nyitott állapotú reakciócentrumok összes reakciócentrumhoz viszonyított aránya adja.

Távoli vörös fény (> 700 nm) jelenlétében a P700 oxidálódik, mivel ebből a fényből PSI lényegesen többet abszorbeál mint PSII. Távoli vörös fényel történő megvilágítás befejeztével a P700 redukálódik, s a redukciót kísérő abszorpciós tranziensek két, illetve három exponenciális komponenssel jól illeszthetők. A többfázisú kinetika hátterében egyesek szerint a PSI populáció

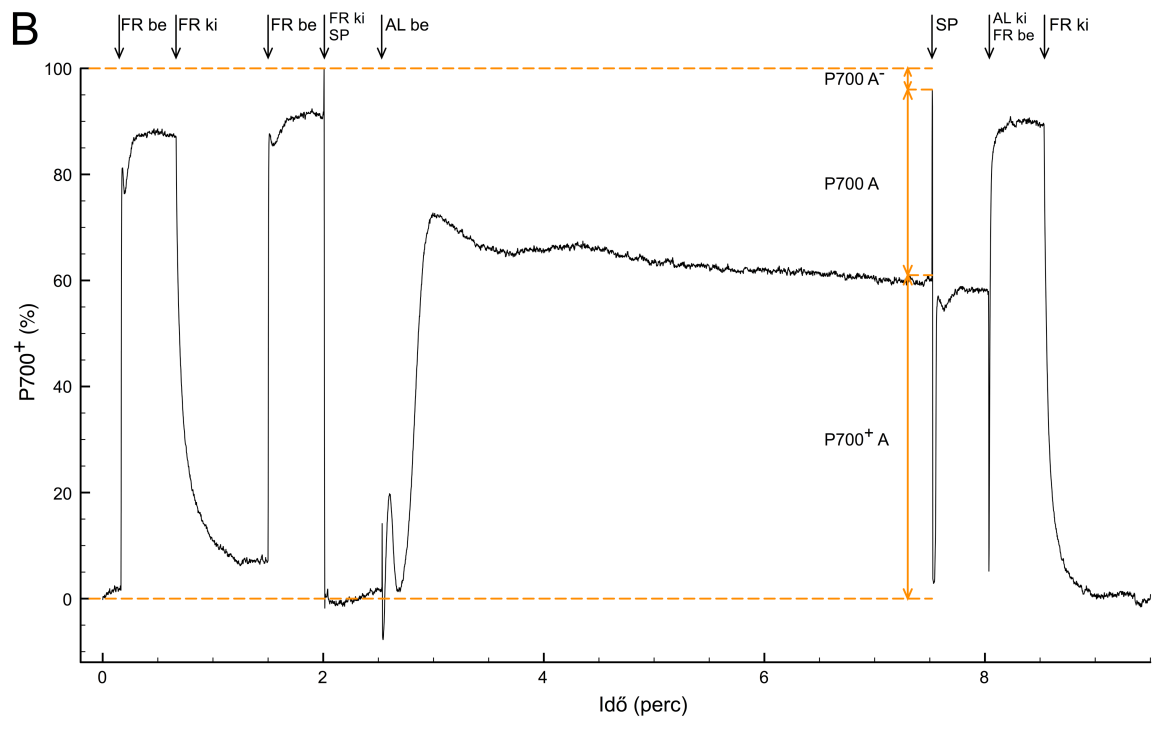
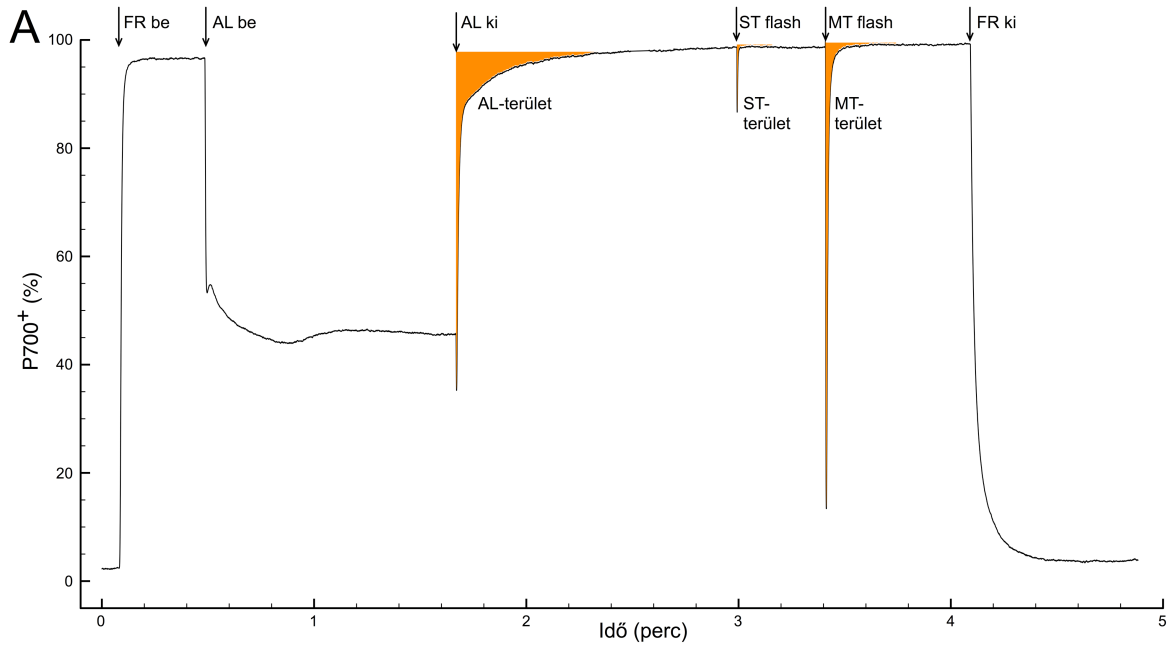
heterogenitása állhat (Bukhov és mtsai., 2002), más szerzők szerint azonban a jelenség a PSI felé irányuló különböző elektrontranszport utak eredménye. Chow és Hope (2004) kísérleteikben uborkalevelek távoli vörös fényvel való gerjesztésével vizsgálták a P700 abszorbanciaváltozásait, és azt tapasztalták, hogy a megvilágítás végén a P700 redukcióját kísérő abszorpciós tranziens kinetikája három exponenciális komponenssel illeszthető jól. DCMU jelenlétében az első, gyors fázis gátlódik, míg a Fd-függő ciklikus elektrontranszport folyamatát gátló metilviologén jelenlétében a középső fázis gátlható. Mindkét fotoszintetikus gátlószer egyidejű alkalmazásával a P700 redukciós kinetika egyfázisúvá válik. Arra következtettek tehát, hogy a gyors fázis a PSII reakcióközpontból származó lineáris elektrontranszport állapotáról, a középső fázis a ciklikus elektrontranszportról, végül a lassú fázis a sztróma donoroktól kiinduló elektrontranszportról ad tájékoztatást. A P700 redukcióját kísérő abszorpciós tranziens kinetikáját sötét- és fényadaptált mintákon egyaránt vizsgáltuk: a sötétadaptált minták esetében vizsgált abszorpciós tranziens a 6. B ábra szerinti megvilágítási ciklus első 30 s időtartamú FR megvilágítást követő 50 s időtartamú görbeszakasza, míg a fényadaptált mintához tartozó tranziens az aktinikus megvilágítást követő utolsó 30 s időtartamú FR megvilágítást követő görbeszakasza, szintén 50 s időintervallumban.

Minden mérést legalább 4 alkalommal ismételtünk. A kontroll és a kezelt átlagok közötti eltérés szignifikanciáját t-próbával határoztuk meg.

#### **6. ábra.** Kezeletlen (kontroll) borsó levélkorongok P700 abszorpciós tranziensei

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD alá helyezve, Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben. A mérés során alkalmazott fényforrásokat a görbe feletti nyilak és rövidítések jelzik. **(A)** *AL-terület*: a FR jelenlétében alkalmazott AL kikapcsolását követő 40 s időtartamú görbeszakaszhoz tartozó terület. *ST-terület*: FR jelenlétében alkalmazott ST impulzust követő 10 s időtartamú görbeszakaszhoz tartozó terület. *MT-terület*: FR jelenlétében alkalmazott MT impulzust követő 20 s időtartamú görbeszakaszhoz tartozó terület (Asada és mtsai., 1992). **(B)** *P700 A*: nyitott reakciócentrum. *P700<sup>+</sup> A*: donor oldali oxidáció által zárt reakciócentrum. *P700 A*: akceptor oldali redukció által zárt reakciócentrum (Klughammer és Schreiber 1994; 2008).

# ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK



## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

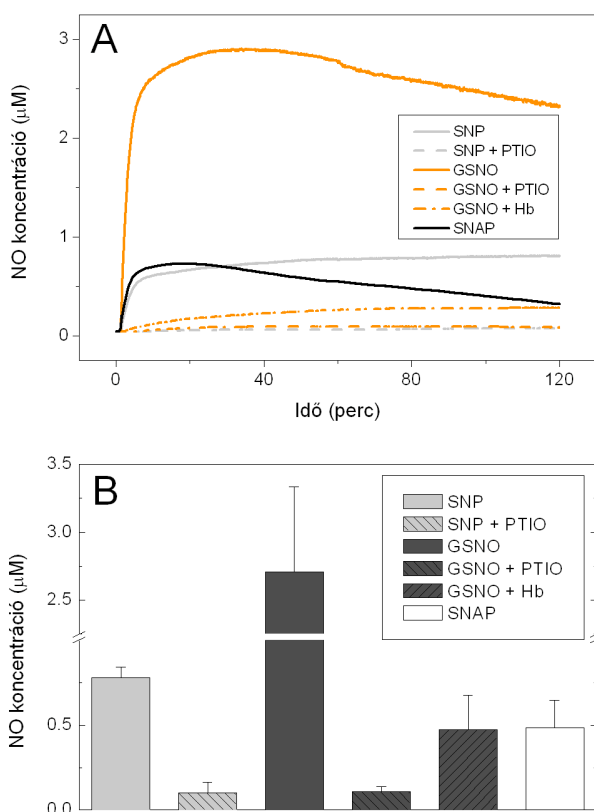
### 5.1. A NO donormolekulák NO produkciója nem azonos

A NO donormolekulák fényaktivált lebomlása során felszabaduló NO mennyiségét NO elektróddal követtük nyomon a két órás,  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fényel történt inkubáció során. A három NO donor NO produkciójának kinetikája az inkubációs idő alatt eltérő (7. ábra): a GSNO tartalmú oldatban végig lényegesen magasabb a NO koncentráció, mint a másik két donor esetében, annak ellenére, hogy a GSNO a NO produkciójának maximumát már az inkubációs idő első felében eléri. Az SNP oldat kezdeti NO termelése a legalacsonyabb, ám végig növekvő tendenciát mutat, így az oldatban mérhető NO koncentráció a GSNO oldathoz hasonlóan két óra elteltével is jelentős. A SNAP oldat NO termelése alacsony, s már az inkubációs idő első 20 percétől kezdve meredeken csökkenő tendenciát mutat. A kísérleti rendszerben mindkét NO akceptormolekula hatékonynak bizonyult (7. ábra): a PTIO csaknem teljes mértékben eliminálta a NO-ot a GSNO és SNP oldatokban, és a Hb is jelentősen csökkentette a GSNO által termelt NO mennyiségét. A Hb kisebb mértékű NO eliminációjának oka lehet, hogy a Hb hem-vasa maga is gyorsíthatta a GSNO fotodegradációját.

Floryszak-Wieczorek és munkatársai (2006) korábbi amperometriás méréseiben, melynek során a fenti NO donormolekulák NO produkcióját  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitás mellett foszfátpufferben vizsgálták, a NO termelés kinetikája hasonló, de mennyisége csaknem egy nagyságrenddel nagyobb. A fenti eredmények azonban nemcsak kinetikában, de a NO képződés mennyiségében is egybevágnak Ederli és munkatársai (2009) mérési eredményeivel, mely esetben a GSNO és az SNP NO produkciójának vizsgálata szintén foszfátpufferben, de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD mellett történt a hemoglobin módszer segítségével. Úgy tűnik tehát, hogy kísérleti rendszerünkben alkalmazott amperometriás NO mérési módszer megbízható, más csoportok eredményeivel is összevethető adatokat produkál.

Az inkubáció során a SNAP tartalmú oldatból szabadult fel a legkevesebb mennyiségű NO; kíváncsiak voltunk tehát, hogy gyakorol-e hatást

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELES



### 7. ábra. A NO donorok NO produkciója

A  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fényvel történő 2 órás megvilágítás során az alábbi összetételű 4 ml térfogatú oldatok NO produkcióját követtük nyomon:

1 mM SNP (SNP),

1 ml SNP és 1 mM PTIO (SNP + PTIO),

1 mM GSNO (GSNO),

1 mM GSNO és 1 mM PTIO (GSNO + PTIO),

1 mM GSNO és  $4 \text{ g l}^{-1}$  Hb (GSNO + Hb).

(A) Az oldatok NO produkciójának kinetikája ( $n = 1$ ).

(B) Az oldatokban mért NO koncentráció az inkubáció végén ( $n = 3$ ).

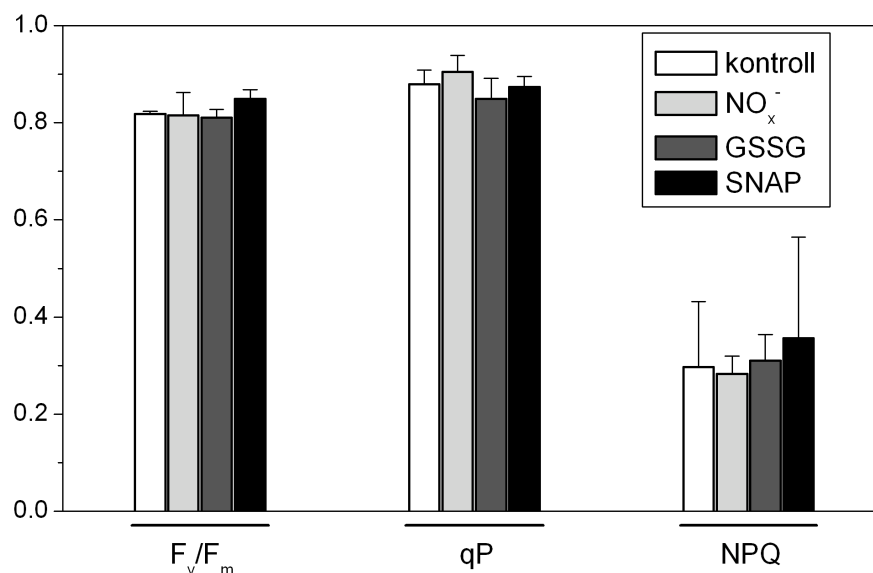
a SNAP-kezelés a borsó levélkorongok fluoreszcencia indukciós paramétereire. A két órás inkubáció  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fényvel megvilágított 1 mM SNAP oldatban nem okozott változást a borsó levélkorongok  $F_v/F_m$ ,  $qP$ , és  $NPQ$  paramétereiben (8. ábra). Ismert tény, hogy a három vizsgált NO donormolekula közül a SNAP a legkevésbé stabil (Feelisch, 1998); s ezt a donormolekulákon végzett amperometriás méréseink is jól alátámasztják (7.B ábra). Irodalmi adatok tanúsága szerint a SNAP biológiai rendszerekben is gyorsabban degradálódik (Floryszak-Wieczorek és mtsai., 2006). Valószínű tehát, hogy a SNAP a két órás inkubáció időtartamának végén nemcsak az oldatban, de a levélkorongok szöveteiben is alacsony NO koncentrációt eredményezett, így nem indukált változásokat a vizsgált fotoszintetikus paraméterekben. A kísérleti rendszerünkben alkalmazott két órás inkubáció célja, hogy biztosítsa a levélkorongok egységes fénykezelését, „fénytörténetét” a fluoreszcencia indukciós és a P700 abszorpciós tranziensek mérése előtt. Ez az időtartam a SNAP számára azonban túl hosszúnak bizonyult: a SNAP tehát nem alkalmas donormolekula a NO fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásának vizsgálatához.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELES

Az SNP és a GSNO oldatok az inkubáció végén is  $\mu\text{M}$ -körüli koncentrációban tartalmaznak NO-ot. Vanin és munkatársai (2004) ESR spektroszkópiás úton  $18 \text{ nM g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  alap NO termelést mértek *Vicia faba* és *Arabidopsis thaliana* leveleiben, Delledonne és munkatársai (1998) kísérleteiben a gombaelicitorral kezelt szójasejt-szuszpenziókban a NO koncentráció elérte a  $2 \mu\text{M}$  értéket is. Stresszhatás esetén tehát a növényi sejtekben a NO koncentrációja a nM-os tartományból a  $\mu\text{M}$ -os tartományba emelkedhet, mely azonos nagyságrendű a két órás inkubáció végén, a NO donoroldatokban mért NO koncentrációjával.

### 5.2. A GSNO és az SNP hatásának NO-specifitása

Az SNP és GSNO NO termelése tehát lényegesen magasabb, s mindkét NO donor szignifikáns változásokat indukált a borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereiben. A NO specifikus hatásának bizonyításához megvizsgáltuk a NO bomlástermékeinek és a GSNO fotolízisekor keletkező GSSG-nek a levélkorongokra gyakorolt hatását.



### 8. ábra. NO oxidatív bomlástermékei, GSSG és SNAP hatása borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereire

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PFD fehér fény alá helyezve, Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben (kontroll), 0,2 mM  $\text{NaNO}_2$  és 0,2 mM  $\text{NaNO}_3$  oldatban ( $\text{NO}_x$ ), 0,5 mM GSSG oldatban (GSSG), 1 mM SNAP oldatban (SNAP), majd a levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltuk. (n = 4).



*5.2.1. A NO bomlástermékei és a GSSG nem módosítja a borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereit*

Oxigéntartalmú vizes oldatokban a NO donorok által felszabadított NO vízzel és oxigénnel reakcióba lépve gyorsan NO<sub>2</sub><sup>-</sup>- és NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-anionná alakul (Takahashi és Yamasaki, 2002). A levegő oxigénjével reagálva a NO NO<sub>2</sub>-gázzá oxidálódik, mely ismert fotoszintetikus gátlószer (Yamasaki 2000). Hatását valószínűleg nitrition formájában fejt ki, hiszen a növényi szövetek vizes közegébe lépve NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-ionná alakul (Wellburn, 1990). A 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> intenzitású fehér fényvel megvilágított 0,2 mM NaNO<sub>2</sub> és 0,2 mM NaNO<sub>3</sub> tartalmú oldatban két órán át inkubált levélkorongok fotoszintetikus paramétereiben azonban nem történt változás (8. ábra). Emellett az 1 mM SNAP is hatástalannak bizonyult, noha a molekulából felszabaduló NO szintén NO<sub>2</sub><sup>-</sup>- és NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-anionná alakulhatott. E két kísérlet bizonyítja, hogy a NO oxidatív bomlástermékei nem gyakoroltak hatást a borsó levélkorongok vizsgált fotoszintetikus folyamataira a vizsgált koncentrációtartományban.

A GSNO fotolitikus bomlásakor NO mellett GSSG is keletkezik az alábbi reakció szerint:



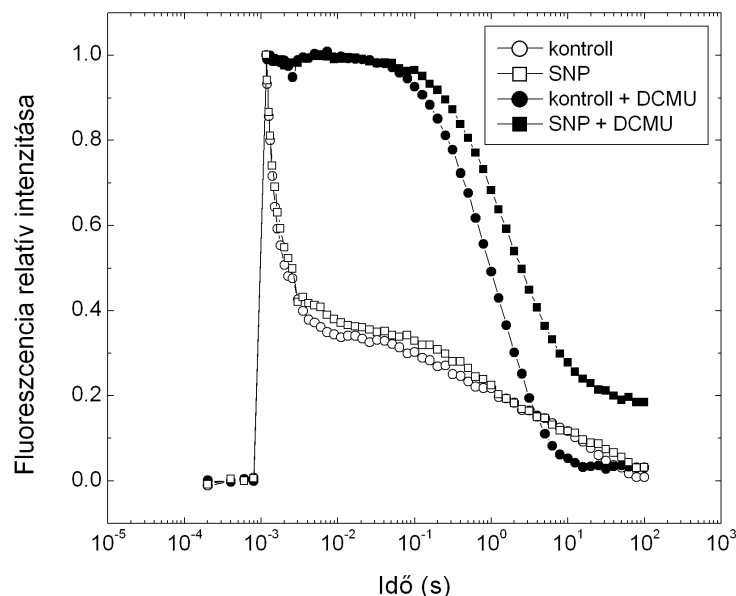
A GSSG redoxaktív molekulaként befolyásolhatja a kloroplasztisz redox szignalizációs folyamatait, például a ferredoxin-tioredoxin rendszert, mely fontos szerepet játszik a Calvin-ciklus egyes enzimjeinek szabályozásában. Michelet és mtsai., (2005) bemutatták, hogy 5 mM GSSG 5 órás inkubáció során glutationálja a Calvin-ciklus enzimjeinek szabályozásában kulcsszerepet játszó tioredoxin-f molekulát. Ez a reakció gátolja a Calvin-ciklus fényaktivációját, mely befolyásolhatja a fluoreszcencia indukciós paramétereiket. A GSSG emellett a violaxantin de-epoxidáció gátlásán keresztül hatással lehet az NPQ folyamatokra is, noha a hatás gyengének mondható, hiszen a redukált glutation még 2,5 mM koncentrációban sem okozott jelentős gátlást (Xu és mtsai., 2000). Kísérleteinkben a sztöchiometrikus, 0,5 mM koncentrációban alkalmazott GSSG a két órás inkubáció során 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> intenzitású fehér fény jelenlétében nem okozott változást a vizsgált fluoreszcencia indukciós paraméterekben (8. ábra).

### 5.2.2. Az SNP fotolitikus bomlástermékei gátolják a borsó levélkorongok fotoszintetikus aktivitását

Az SNP PSII elektrontranszport folyamataira gyakorolt hatásának *in vivo* vizsgálatához összehasonlítottuk a desztillált vízben, 1 mM SNP-oldatban, valamint 1 mM SNP és 1 mM PTIO tartalmú oldatban két órán át  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fehér fényvel megvilágított borsó levélkorongok  $\text{Q}_\text{A}^-$  reoxidációját. A mérés során a flash-indukált  $\text{Q}_\text{A}$ -redukció hatására a klorofill fluoreszcencia hozam hirtelen megemelkedik, majd az azt követő sötét szakaszban a  $\text{Q}_\text{A}^-$  reoxidációja miatt lecseng. A fluoreszcencia relaxációját egy gyors ( $\approx 800 \mu\text{s}$ ), egy középső ( $\approx 190 \text{ms}$ ) és egy lassú (10 s) fázis jellemzi (9. ábra). Az SNP-kezelés eredményeként a gyors fázisban sem az időállandókban, sem az amplitúdókban nem tapasztalható különbség. A középső fázisban az 1 mM SNP kezelés hozzávetőlegesen 548 ms-ra növelte az időállandót, mely a specifikus NO akceptor, a PTIO jelenléte mellett gyakorlatilag változatlan maradt (III. táblázat). A középső fázis amplitúdója 1 mM SNP kezelés hatására megemelkedett, ám ezt a hatást a PTIO csak részben csökkentette.

A DCMU (3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea) a  $\text{Q}_\text{B}$ -kötőhelyre kapcsolódva blokkolja a  $\text{Q}_\text{A}^-$  lineáris elektrontranszporttal való reoxidációját, így DCMU jelenlétében a fluoreszcencia többkomponensű relaxációja egykomponensűvé válik, mely 1-2 másodperces időállandóval jellemezhető, és a  $\text{Q}_\text{A}^-$  vízbontó komplex  $\text{S}_2$  állapotával való rekombinációját mutatja. Az SNP-vel kezelt, majd DCMU-val vákuum-infiltrált levelekben a kontrollhoz képest a fluoreszcencia lecsengése nem volt teljes (9. ábra), de ezt a hatást a NO-donorhoz adott PTIO csaknem teljesen megszüntette (III. táblázat).

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELES

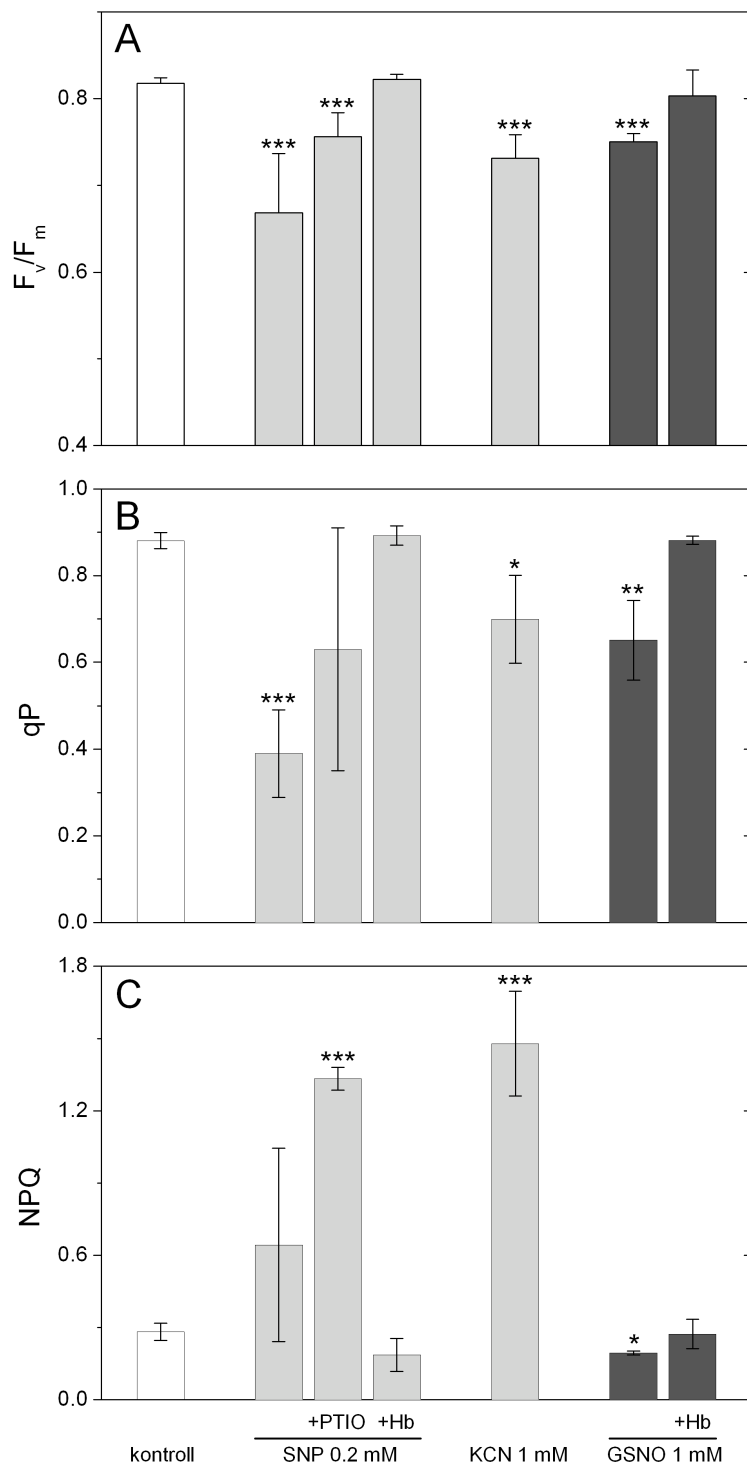


**9. ábra.** SNP hatása a fluoreszcencia lecsengés kinetikára

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fény alá helyezett Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben (kör), 1 mM SNP oldatban (négyzet), majd a levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltuk (fehér szimbólumok), esetenként  $100 \mu\text{M}$  DCMU-val infiltráltuk (fekete szimbólumok). A görbéket azonos magasságra normalizáltuk, minden görbe 4 mérés átlagát mutatja.

A  $0,2 \text{ mM}$  SNP-kezelés komoly változást okozott a borsó levélkorongok fluoreszcencia indukciós paramétereiben is (10. ábra). Korábbi tanulmányok szerint a maximális kvantumhasznosítást a NO-donorok közül a SNAP nem befolyásolja (Takahashi és Yamasaki, 2002), az SNP pedig csökkenti (Yang és mtsai., 2004). Az SNP-molekula öt  $\text{CN}^-$  és egy nitrozil ligandummal rendelkezik, melyek fotolabilitása hullámhossz-függő (Shishido és de Oliveira, 2001). Ha a gerjesztő fény hullámhossza ( $\lambda_{\text{irr}}$ )  $> 480 \text{ nm}$ , a molekula fotolízise során  $\text{CN}^-$  nem, csak NO szabadul fel, viszont  $\lambda_{\text{irr}} < 480 \text{ nm}$  esetén a NO mellett  $\text{CN}^-$  is megjelenik. Korábbi klorofill fluoreszcencia indukciós vizsgálatokban az SNP fotolízisének hullámhosszfüggését nem vették figyelembe, így NO és a  $\text{CN}^-$  együttes hatását vizsgálták. A  $0,2 \text{ mM}$  SNP-kezelés cianidhatásának ellenőrzéséhez kísérleteinkben az SNP-t sztöchiometrikus mennyiségű ( $1 \text{ mM}$ ) KCN-dal helyettesítettük.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS



**10. ábra.** SNP, KCN és GSNO hatása borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereire

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fény alá helyezve, Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben (Kontroll), SNP, KCN és GSNO tartalmú oldatban. A PTIO és a Hb koncentrációját 1 mM és 4  $\text{mg ml}^{-1}$  értékre állítottuk.

A levélkorongok  $F_v/F_m$  (A) értékeit az inkubáció után, 15 perc sötétadaptálást követően határoztuk meg. A qP (B) és NPQ (C) értékeket  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású vörös AL fényvel történő 30 perces megvilágítás végén határoztuk meg.

Az oszlopok mérési átlagok a szórás feltüntetésével ( $n \geq 4$ ). A csillagok az alábbi szignifikanciaszinteket jelölik:

\* $P < 0,05$ ;

\*\* $P < 0,01$ ;

\*\*\* $P < 0,001$ .

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

Az SNP, KCN és GSNO borsó levélkorongok fluoreszcencia indukciós paramétereire gyakorolt hatását a 10. ábra összesíti. Jól látszik, hogy a háromféle anyag mindegyike csökkenti az  $F_v/F_m$  és a  $qP$  értékeket. A legmarkánsabb hatást mindkét paraméter esetében a 0,2 mM SNP-kezelés éri el, melyet az SNP jelenlétében alkalmazott Hb teljes mértékben eliminál. A PTIO, mely specifikus NO akceptormolekula és CN<sup>-</sup>-dal nem reagál (Bethke és mtsai., 2006b), azonban csak részben ellensúlyozza az SNP hatását: az SNP és PTIO jelenlétében megfigyelhető  $F_v/F_m$ - és  $qP$ -csökkenés elmékeztet az 1mM KCN által előidézett változásokra. Ezek az eredmények világosan mutatják, hogy az SNP fotolízisekor a NO mellett CN<sup>-</sup> is felszabadul, s az SNP mindkét fotolitikus terméke redukálja a PSII fotokémiai aktivitását *in vivo*. Az adatokból az is kiderül, hogy a Hb nem specifikus NO akceptor: a NO mellett a CN<sup>-</sup>-ot is eliminálja, hiszen az oxidált állapotú Hb NO jelenlétében methemoglobinná alakul (Feelisch, 1998), mely CN<sup>-</sup>-dal reagálva cianmethemoglobint képez (Cannan, 1955).

Érdekes módon a levélkorongok steady-state nemfotokémiai kioltása 1 mM GSNO hatására csökken, 0,2 mM SNP hatására viszont a kétszeresére emelkedik, sőt, a KCN-kezelés többszörös NPQ emelkedést idéz elő. Az SNP és PTIO jelenlétében az NPQ paraméter értéke a KCN által kiváltott szintre emelkedik, ha viszont az SNP mellé Hb-t adunk, az NPQ a kontroll szintjére esik vissza. Az eredmények alapján tehát a CN<sup>-</sup> emeli, a NO pedig csökkenti az NPQ szintjét. A PTIO, illetve Hb jelenlétében végzett SNP-kezelés szintén az SNP cianid- és NO-produkcióját igazolja.

Kísérleteinkben alkalmazott 0,2 mM SNP tehát drasztikusan módosította a borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereit. Az SNP fényaktivált bomlása során a NO mellett felszabaduló CN<sup>-</sup> megnehezíti a NO hatásának pontos kiértékelését, hiszen a fotoszintézis folyamatát több ponton is gátolja. A CN<sup>-</sup> már kis mennyiségben gátolja a Rubisco enzimet (Wishnick és Lane, 1969), és az aszkorbát-peroxidáz enzim gátlásával hidrogén-peroxid felhalmozódást okozhat (Forti és Gerola, 1977), mely kölcsönhatva a Calvin-ciklus egyes enzimjeinek fényaktivációjában szerepet játszó szabad tiol-csoportokkal kölcsönhatva késlelteti a Calvin-ciklus aktiválódását (Kaiser,

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

1979). A  $\text{CN}^- \approx 1 \text{ mM}$  koncentrációban közvetlenül gátolja a klororespirációban szerepet játszó PQ-oxidázt is (Garab és mtsai., 1989). Kísérleteinkben a PTIO csak részben ellensúlyozta az SNP-kezelés hatását, és az SNP-kezelés nyomán fellépő  $\text{CN}^-$ -hatás közvetlen KCN-kezeléssel is reprodukálható. Az SNP a járulékos  $\text{CN}^-$ -felszabadulás miatt tehát – a SNAP-molekulához hasonló módon – szintén nem alkalmas NO donor a NO fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásána *in vivo* feltárásához.

Az exogén NO-kezelés a NO élettani hatásainak feltérképezésére széles körben alkalmazott eljárás. NO források között a NO-gáz alternatívájaként gyakran esik a választás a különböző NO donormolekulákra, hiszen használatuk viszonylag egyszerű, ugyanakkor a kísérleti rendszerek igen széles skáláján alkalmazhatók. Ám a forgalomba kerülő donormolekulák NO termelését számos tényező befolyásolhatja, így NO termelésük általában eltérő. Emellett a NO kvantifikálása, különösen *in vivo* körülmények között, nem könnyű feladat, s a mért eredmények pontosságát gyakorta vitatják (Planchet és Kaiser, 2006). Mindezek tükrében nem meglepő, hogy az egyes NO donorok által produkált NO mennyisége hivatkozásokként más és más (Delledonne, és mtsai., 1998; 2001; Lum és mtsai., 2005). A helyzetet nehezíti, hogy a NO donormolekulákból a NO esetenként különböző redoxformában képződik, melyek hatása eltérő, sőt ellentétes is lehet (Murgia és mtsai., 2004). Bomlásuk során a NO mellett más anyag is felszabadulhat: az SNP bomlásakor például  $\text{CN}^-$  is felszabadul, mely megzavarhatja az eredmények kiértékelését. A fenti eredmények tükrében világos, hogy az SNP fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásában például NO és  $\text{CN}^-$  is szerepet játszik. A  $\text{CN}^-$  hatása ugyanakkor nem érvényesül az SNP indukált sztómazárás folyamatában (Wilson és mtsai., 2008). Indokolt tehát az érdemi vizsgálatok előtt a kísérleti körülményeinkhez leginkább megfelelő NO donor kiválasztása, kémiai tulajdonságainak megismerése.

A fenti kísérletek világosan bemutatják, hogy kísérleti céljainknak a SNAP az alacsony NO termelésű és az SNP járulékos  $\text{CN}^-$ -termelés miatt nem megfelelő NO donor. A GSNO viszont ideális, hiszen a GSNO-kezelések hatásáért kizárólag a molekula bomlásakor felszabaduló NO a felelős.

### III. táblázat. Fluoreszcencia lecsengés kinetika analízise

A 9. és 11. ábrához hasonló módon, a mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fény alá helyezve, Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben (kontroll), illetve NO donor- és akceptormolekulák 1 mM koncentrációjú oldatában, majd a levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltuk, esetenként DCMU-val infiltráltuk. A mért többkomponensű görbék felbontásához használt illesztés két exponenciális (gyors és közepes fázis) és egy hiperbolikus komponensből (lassú fázis) áll. Az értékek az illesztés eredményeképpen kapott időállandók ( $\tau$ ) és szórásértékek. A zárójelben lévő értékek a változó fluoreszcencia maximális értékére vonatkoztatott százalékos értékek (A) a szórás feltüntetésével.

|                        | Gyors fázis $\tau$ ( $A_1$ [%])<br>$\mu\text{s}$ | Középső fázis $\tau$ ( $A_2$ [%])<br>ms | Lassú fázis $\tau$ ( $A_3$ [%])<br>s | $A_0$<br>%    |
|------------------------|--|---|--------------------------------------|---------------|
| DCMU hozzáadása nélkül |  |   |                                      |               |
| kontroll               | $800 \pm 40$ ( $51 \pm 1,4$ )                    | $194 \pm 31$ ( $14 \pm 0,9$ )           | $10,5 \pm 0,8$ ( $35 \pm 0,8$ )      | - (0)         |
| GSNO                   | $790 \pm 50$ ( $45 \pm 1,4$ )                    | $430 \pm 62$ ( $18 \pm 1,4$ )           | $11,7 \pm 2,1$ ( $35 \pm 1,3$ )      | $1,8 \pm 1,4$ |
| SNP                    | $910 \pm 50$ ( $48 \pm 1,3$ )                    | $548 \pm 73$ ( $20 \pm 1,4$ )           | $15,4 \pm 3,6$ ( $30 \pm 1,4$ )      | $2,4 \pm 1,6$ |
| GSNO+PTIO              | $720 \pm 40$ ( $45 \pm 1,5$ )                    | $312 \pm 44$ ( $17 \pm 1,1$ )           | $9,4 \pm 0,8$ ( $38 \pm 1,1$ )       | - (0)         |
| SNP+PTIO               | $890 \pm 50$ ( $45 \pm 1,3$ )                    | $220 \pm 31$ ( $18 \pm 1,1$ )           | $6,7 \pm 0,6$ ( $37 \pm 1,1$ )       | - (0)         |
| DCMU hozzáadásával     |  |   |                                      |               |
| kontroll               | - (0)  | - (0)                                   | $1,6 \pm 0,0$ ( $100 \pm 0,4$ )      | 0             |
| GSNO                   | - (0)  | - (0)                                   | $1,2 \pm 0,1$ ( $49 \pm 0,6$ )       | $51 \pm 0,5$  |
| SNP                    | - (0)  | - (0)                                   | $2,7 \pm 0,1$ ( $71 \pm 0,7$ )       | $29 \pm 0,6$  |
| GSNO+PTIO              | - (0)  | - (0)                                   | $2,5 \pm 0,1$ ( $73 \pm 0,7$ )       | $27 \pm 0,6$  |
| SNP+PTIO               | - (0)  | - (0)                                   | $2,7 \pm 0,1$ ( $94 \pm 0,7$ )       | $5,7 \pm 0,6$ |

### 5.3. A NO (GSNO) hatása borsó levélkorongok fotoszintetikus elektrontranszportjára

#### 5.3.1. A NO a PSII elektrontranszport folyamatait donor és akceptor oldalon is gátolja *in vivo*

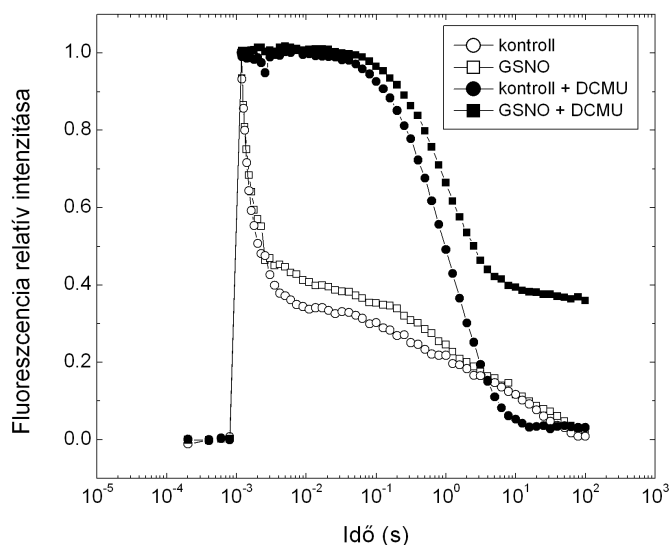
A PSII terminális elektronakceptora két kinon, melyek között egy nem-hem (II) vas helyezkedik el. A  $Q_A$  egy, a  $Q_B$  két elektron fogadására képes. A két kinon közötti elektronátadás sebessége függ a nem-hem (II) vas koordinációs környezetétől, melyben a D1 és D2 fehérje alegység két-két hisztidinje mellett az ötödik és a hatodik koordinációs hely valamelyikén a bikarbonát található (Petrouleas és Diner, 1990; Kern és mtsai., 2005). A NO és más kis molekulák, így a  $CN^-$  és  $F^-$  a nem-hem (II) vashoz a bikarbonáttal kompetitív módon, reverzibilisen kötődnek (Goussias és mtsai., 2002). Izolált tilakoidokon végzett kísérletekben bizonyították, hogy a NO kötődése után a kinonmolekulák közötti elektronátadás sebessége lelassul (Diner és Petrouleas, 1990). A NO a  $Q_A^-$  redukált akceptor jelenléte mellett is képes a vashoz kötődni, ugyanis a  $Q_A$  redukciója a bikarbonát és a vas közötti kötést gyengíti (Goussias és mtsai., 2002). Az elektronátadás sebessége a NO hozzáadása után nem csak az akceptor oldalon, de a donor oldalon is csökkenhet: *in vitro* kísérletek bizonyítják a NO tirozin  $Y_D^-$  gyökkel és a vízbontó komplex Mn-csoportjával való kölcsönhatását. Ez utóbbit a NO  $S_2$  állapotúvá redukálja, melyet oxigén elektródos, klorofill fluoreszcenciás és EPR kísérletekkel igazoltak (Schansker és mtsai., 2002).

A NO a PS II donor és akceptor oldali gátlásának *in vivo* bizonyítására GSNO-val kezelt borsó levelek  $Q_A^-$  reoxidációját kezeletlen, és a GSNO mellett PTIO-val kezelt levelek reoxidációs kinetikájával hasonlítottuk össze. A GSNO-kezelés a gyors fázisban sem az időállandókban ( $\tau$ ), sem az amplitúdókban (A) nem okozott változást, ami összhangban van Diner és Petrouleas (1990) eredményeivel, ahol csak a második flash után tapasztaltak lassulást. A középső fázisban az 1 mM GSNO-kezelés hozzávetőlegesen 430 ms-ra növelte az időállandót, mely a specifikus NO-donor, PTIO jelenléte mellett 310 ms-ra csökken (III. táblázat). A középső fázis amplitúdója 1mM



## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

GSNO-kezelés után megemelkedett, s ezt a változást 1 mM PTIO jelenléte csak kis mértékben ellensúlyozta. A középső fázis lassulása arra utal, hogy a NO a PQ-molekulák  $Q_B$ -kötőhelyre való kötődését gátolja, az amplitúdó növekedése pedig azt jelzi, hogy a NO donorokkal való előkezelés után a flash pillanatában csak kevés  $Q_B$ -kötőhely tartalmazott PQ-molekulát. Mérési eredményeink szerint a NO tehát csökkenti az elektrontranszport sebességét  $Q_A$  és  $Q_B$  között, mely alapján erősen valószínűsíthető, hogy a NO *in vivo* is kompetitíven kötődik a nem-hem (II) vashoz (11. ábra, III. táblázat).



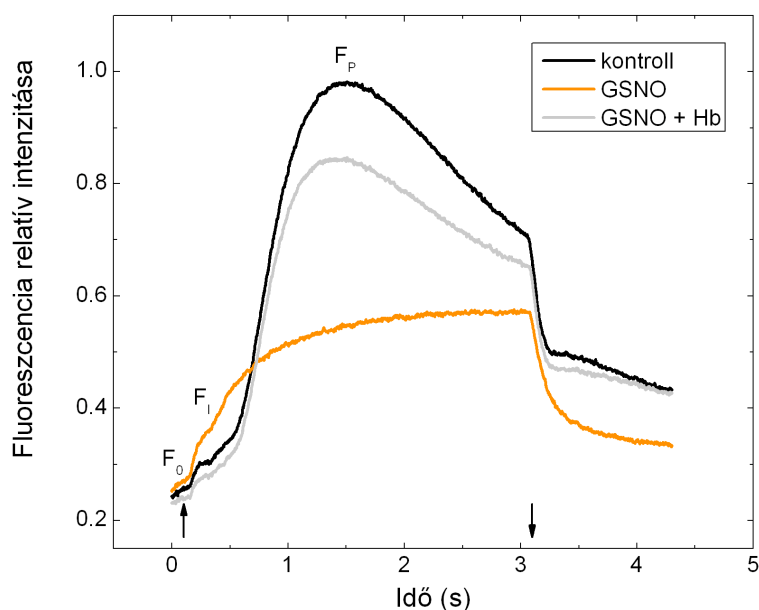
### 11. ábra. GSNO hatása a fluoreszcencia lecsengés kinetikára

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fény alá helyezett Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben (kör), 1 mM GSNO oldatban (négyzet), majd a levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltuk (fehér szimbólumok), esetenként  $100 \mu\text{M}$  DCMU-val infiltráltuk (fekete szimbólumok). A görbéket azonos magasságra normalizáltuk, minden görbe 4 mérés átlagát mutatja.

DCMU jelenlétében a fluoreszcencia relaxációja a  $Q_A^-$  vízbontó komplex  $S_2$  redoxállapotával való rekombinációját tükrözi. A GSNO-kezelés után DCMU-val infiltrált levelekben a fluoreszcencia lecsengése a kontrollhoz képest elmarad (11. ábra), amely a GSNO-hoz adott PTIO esetében sokkal kisebb mértékű volt (III. táblázat). Ez a növekedés korrelál Schansker és munkatársai (2002) korábbi eredményével, amely szerint a NO a vízbontó komplexek túlnyomó többségének Mn-klaszterét  $S_2$  redoxállapotúvá redukálja. Mérési eredményeink arra utalnak tehát, hogy a  $Q_A^-$  azért nem képes az  $S_2$  állapottal rekombinálódni, mert a NO redukálja, vagy inaktiválja a Mn-csoportot, esetleg redukálja a  $Y_D^-$  tirozin gyököt.

### 5.3.2. A Kautsky-görbe kinetikájának változása donor és akceptor oldali gátlást mutat

A donor és akceptor oldali gátlást Kautsky-görbék felvételével is megvizsgáltuk. Sötétadaptált borsó leveleket  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású vörös fényel 3 másodpercre megvilágítva jellegzetes Kautsky-görbét kaptunk (Lichtenthaler, 1992), melynek során a klorofill-*a* fluoreszcencia egy minimális ( $F_0$ ) szintről egy lokális ( $F_I$ ) maximumon keresztül ( $F_P$ ) maximális értéket ér el (12. ábra). 1 mM GSNO-kezelés hatására közel kétszeresére emelkedett az  $F_I$ , ami arra utal, hogy az előrefelé mutató elektrontranszport gátlódik a  $Q_B$ -t lassabban redukálni képes reakciócentrumok arányának növekedése miatt. Az  $F_P$  szint a kontroll érték 43%-ára csökkent, az  $F_0$  fluoreszcenciában viszont jelentős eltérést nem tapasztaltunk. Az  $F_I$ - $F_P$  görbe maximális meredeksége 1 mM GSNO alkalmazásával szintén jelentősen csökkent, ami  $4 \text{ mg ml}^{-1}$  Hb hozzáadásával megakadályozható volt. Az  $F_P$  szint csökkenése és az  $F_I$ - $F_P$  görbe csökkenő meredeksége az elektronátadás donor oldali gátlására utal.



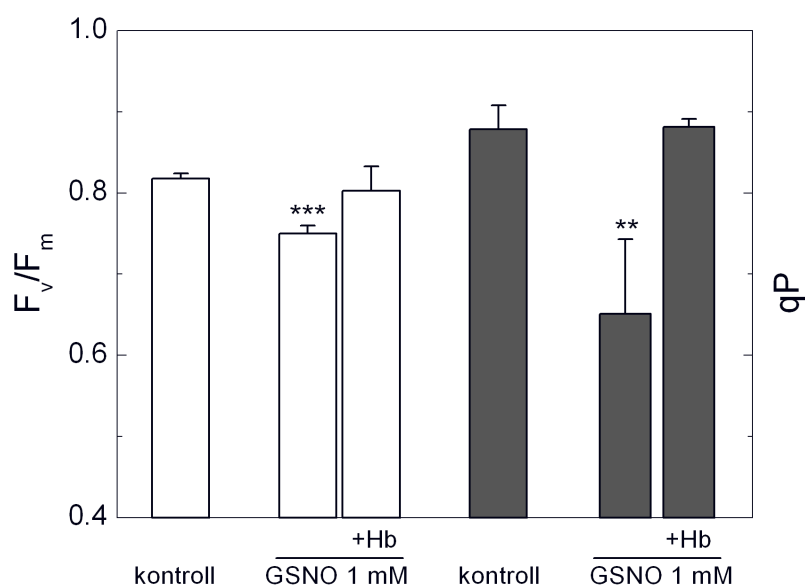
**12. ábra.** A NO hatása a Kautsky-görbe kinetikájára

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fény alá helyezve, Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben (kontroll), 1 mM GSNO (GSNO) és 1mM GSNO +  $4 \text{ mg ml}^{-1}$  Hb oldatban (GSNO + Hb), majd a levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltuk. A kezelés után gyors fluoreszcencia görbét  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD, 3 s hosszúságú vörös fény mellett rögzítettük. A megvilágítás kezdetét és végét nyilak jelzik. Mindhárom görbe 5 mérés átlagát mutatja.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELES

### 5.3.3. A NO hatása a klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterekre

Borsó levélkorongok fluoreszcencia indukciós paramétereinek –  $F_v/F_m$ , qP és NPQ értékek – meghatározása előtt a levélkorongokat 2 órán át inkubáltuk 1 mM GSNO oldatban, esetenként Hb jelenlétében. A GSNO-kezelés hatására csökkent az  $F_v/F_m$  hányados és qP értéke is, azaz a NO növeli a zárt PSII reakciócentrumok arányát. A csökkenés azonban Hb jelenlétében nem tapasztalható. (13. ábra). Az eredmények megerősítik a fluoreszcencia lecsengés kinetikájából nyert adatokat, amelyek a  $Q_A^-$  (zárt reakcióközpontok) felhalmozódására utalnak.

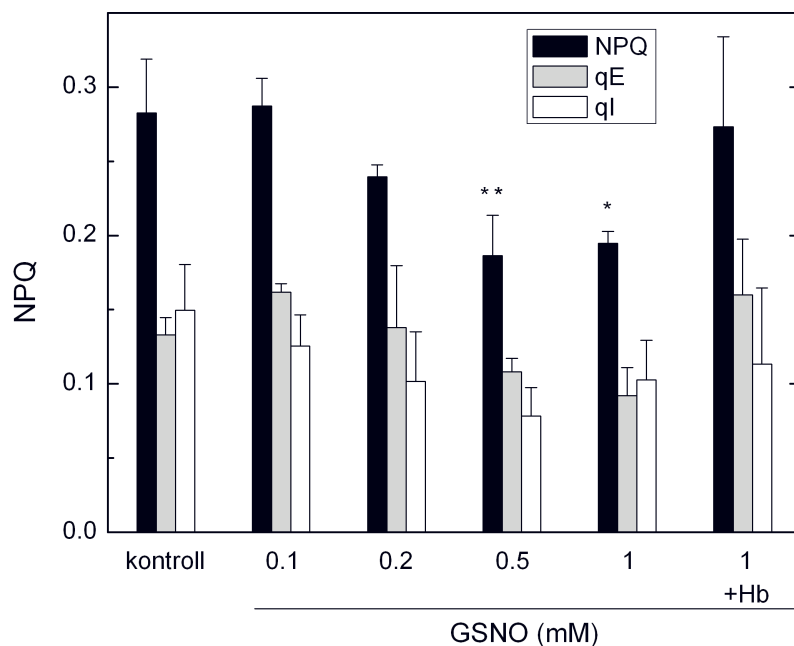


**13. ábra.** A NO hatása  $F_v/F_m$  és qP paraméterre

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fény alá helyezve, Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben (Kontroll), 1 mM GSNO oldatban, majd a levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltuk. A Hb koncentrációját  $4 \text{ mg ml}^{-1}$  értékre állítottuk. A qP és NPQ értékeket  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású vörös AL fényvel történő 30 perces megvilágítás végén határoztuk meg. Az oszlopok mérési átlagok a szórás feltüntetésével ( $n \geq 4$ ). A csillagok az alábbi szignifikanciaszinteket jelölik:  $**P < 0,01$  és  $***P < 0,001$ .

A transztilakoid  $\Delta\text{pH}$  mértékét meghatározza a lineáris elektrontranszportlánc sebessége és az ATP-szintáz aktivitása is. A NO hatására lassuló elektrontranszport lánc miatt a tilakoid lumen kevésbé lesz savanyú, így az energiafüggő kioltáson (qE) keresztül NPQ értéke csökkenhet. Kísérleteinkben a GSNO koncentráció-függő módon csökkentette a NPQ, a qE és a qI értékeit, a hatás Hb hozzáadásával eliminálódott (14. ábra).

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS



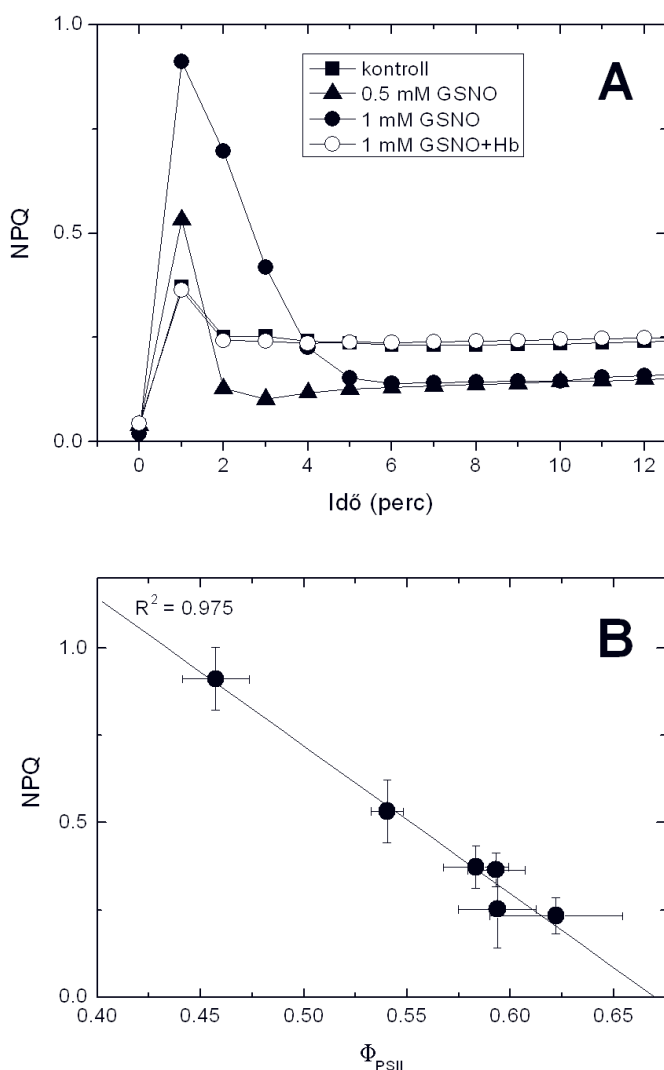
**14. ábra.** A NO hatása az NPQ paraméter és a qE, qI komponensek értékére

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fény alá helyezve, Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben (Kontroll), GSNO különböző koncentrációjú oldataiban, majd a levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltuk. A Hb koncentrációját  $4 \text{ mg ml}^{-1}$  értékre állítottuk. A NPQ értékeket  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású vörös AL fényvel történő 30 perces megvilágítás végén határoztuk meg. Az oszlopok mérési átlagok a szórás feltüntetésével ( $n \geq 4$ ). A csillagok az alábbi szignifikanciaszinteket jelölik:  $*P < 0,05$  és  $**P < 0,01$ .

A GSNO azonban nem csak az NPQ mértékét befolyásolta, de a tranziens NPQ kinetikáját is megváltoztatta (15. A ábra), ám a hatás Hb jelenlétében megszűnik. Ez az NPQ tranziens kinetikájában hasonlít a Finazzi és munkatársai (2004) által árpa levelekben leírt reakciócentrum-típusú nemfotokémiai kioltásra. A jelenség sötétadaptált növények gyenge megvilágításának első perceiben lép fel, s oka a lineáris elektrontranszport gyors aktivációjából fakadó átmeneti túlsavanyodás a tilakoid lumenben, melyet feltételezésük szerint tovább fokozhat a ciklikus és pseudociklikus elektron transzport (Mehler-reakció). A kioltást végül az elektrontranszportnál lassabban aktiválódó Calvin-ciklus szünteti meg, csökkentve a protonakkumulációt és a redoxnyomást. A növekvő koncentrációban alkalmazott GSNO hatására az NPQ amplitúdók emelkedése és az aktuális kvantumhasznosítás ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) csökkenése között lineáris az összefüggés (15. B

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELES

ábra), mely igazolhatja, hogy a megvilágítás kezdetén a reakciócentrumok nagyobb hányada kapcsol át hődisszipáló állapotba a fotokémiai munkavégzés helyett. Noha a NO Calvin-ciklus aktivációjára gyakorolt fékező hatása jól magyarázná a NO hatására bekövetkező változást a tranziens NPQ kinetikában, a NO jelenlétében tapasztalható kontroll értékek alatti NPQ szint alapján nem valószínű, hogy a NO csökkenti a Calvin-ciklus maximális sebességét. A tranziens NPQ módosításának háttérében álló okok tisztázása tehát további kísérletek feladata.



**15. ábra.** A NO hatása az NPQ tranziensre

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fény alá helyezve, Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben (kontroll), 0,5 és 1 mM GSNO oldatban, majd a levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltuk. A Hb koncentrációját  $4 \text{ mg ml}^{-1}$  értékre állítottuk. A mérés alatt a levélkorongokat  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású vörös AL fényel világítottuk meg. Az értékek mérési átlagok a szórás feltüntetésével ( $n \geq 4$ ).

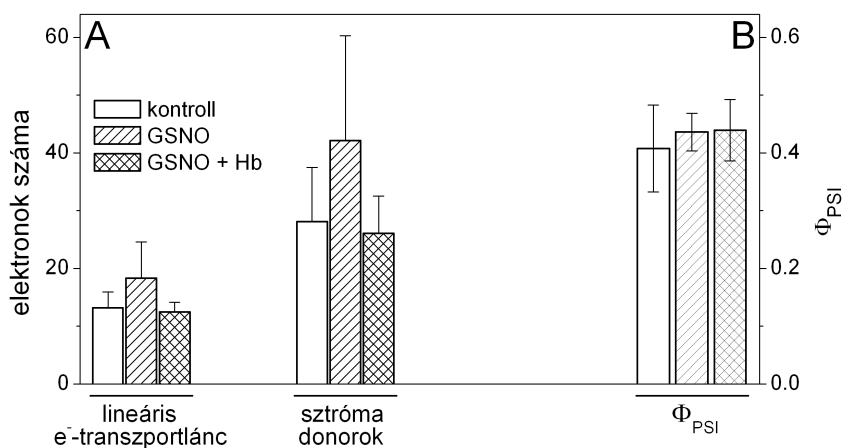
**(A)** NPQ időfüggő változása.

**(B)** A NPQ és  $\Phi_{PSII}$  közötti összefüggés.

5.3.4. A NO hatása a P700 abszorpciós tranziensekre

A NO PSI elektrontranszport folyamataira gyakorolt hatásának vizsgálatához a 6. ábra szerinti megvilágítási ciklusok alatt nyomonkövettük a levélkorongok P700 abszorpciós tranzienseit, és összevetettük a görbékből számítható PSI paramétereket (16. ábra). A PSII-ben tapasztalt gátlással szemben a GSNO-kezelés nem módosítja a PSI effektív kvantumhasznosítását ( $\Phi_{\text{PSI}}$ ), ám kismértékben emeli az egy PSI-re eső elektronok számát a két fotokémiai rendszert összekötő elektron-transzportláncban, és a sztrómában is. Ez utóbbi hatások Hb jelenlétében eliminálódnak.

Meglepő, hogy a NO enyhén ugyan, de emeli a lineáris elektrontranszportlánc elektronkészletét, hiszen a NO PSII elektronátadási folyamataira gyakorolt gátló hatása lassítja a PQ-készlet redulálódását, és a csökkenő steady-state NPQ értékek is lassuló elektrontranszportra utalnak. A PSI zavartalan működését jelzi a változatlan  $\Phi_{\text{PSI}}$  érték, mely szintén az elektrontranszportlánc elektronkészlet-csökkenésének kedvez. A PQ-készlet tagjait azonban a PSII felől érkező elektronok mellett a Fd-függő ciklikus



**16. ábra.** A NO hatása  $\Phi_{\text{PSI}}$  értékére, illetve a lineáris elektrontranszportlánc és sztrómadonorok elektronszámára

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD (A), illetve  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD (B) fehér fény alá helyezve, Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben (kontroll), 1 mM GSNO (GSNO) és 1mM GSNO és  $4 \text{ mg ml}^{-1}$  Hb oldatban (GSNO + Hb), majd a levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltuk. **(A)** A lineáris elektrontranszportlánc és sztrómadonorok elektronszámát az AL-, ST- illetve MT-területek alapján számítottuk Asada és munkatársai (1992) alapján (6. A ábra). **(B)**  $\Phi_{\text{PSI}}$  értékét a 6. B ábrán jelölt megvilágítási ciklus alatt rögzített abszorpciós tranziens nevezetes pontjai alapján határoztuk meg Klughammer és Schreiber (1994; 2008) módszere szerint. Az oszlopok mérési átlagok a szórás feltüntetésével ( $n \geq 4$ ).

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELES

elektrontranszport révén a PSI-ből származó elektronok, valamint a sztrómadonorok is redukálhatják. Méréseinkből kiderül, hogy a GSNO a sztrómadonorok PSI redukciójára fordítható elektronkészletében is enyhe emelkedést okoz. Ezért megvizsgáltuk a GSNO-kezelés hatását a P700 redukcióját kísérő abszorpciós tranziensek többfázisú kinetikájára, hogy lássuk, a NO a PSII-eredetű lineáris elektrontranszport csökkentése mellett befolyásolja-e a PSI-ből kiinduló ciklikus illetve sztóma donoroktól származó elektrontranszport utakat, valamint ezek egymáshoz viszonyított arányát.

A GSNO-kezelés nem okozott jelentős változásokat P700 redukciós kinetikájában sem (IV. táblázat). A kezelés a sötétadaptált minták esetében a gyors fázis amplitúdójának kis mértékű csökkenésével és a középső fázis amplitúdójának enyhe emelkedésével járt. Ezek a kis változások azonban jól tükrözik a lineáris elektrontranszportlánc elektronkészletének enyhe emelkedését, bár a GSNO Hb jelenlétében is növeli középső fázis amplitúdóját. Az eredmények összeegyeztethetők a NO PSII elektrontranszportjára gyakorolt hatásával is: a NO hatására lassuló lineáris elektrontranszport aránya enyhén csökken a ciklikus elektrontranszport javára. A fényadaptált minták P700 redukciós kinetikái három exponenciális helyett csupán kettővel illeszthetők: a gyors fázis eltűnik és a lassú fázis időállandói csökkennek. A GSNO-kezelés a fényadaptált mintákban csökkenti a középső és lassú fázis időállandóját, mely a ciklikus és sztrómadonoroktól kiinduló elektrontranszport utak élénkülésére utal, azaz a lineáris elektrontranszportlánc elektronkészletének növekedése (16. A ábra) ciklikus elektrontranszport eredetű lehet.

Schansker és munkatársai (2003) nem két hullámhossz különbségéből származó differenciajelet, hanem a 820 nm hullámhosszon kapott abszorpciós tranzienseket vizsgálták. Véleményük szerint a gyors fázis háttérében P700 és közvetlen elektronakceptorai közötti töltésrekombináció, míg a lassú fázis háttérében a plasztocianin redukciója állhat. Az aktinikus megvilágítás eredményeképpen a sötétadaptált növényekben a Fd-NADP<sup>+</sup>-oxidoreduktáz, vagy a Calvin-ciklus inaktivitása nyomán tapasztalható akceptor oldali PSI limitáció (Schansker és mtsai., 2003) megszűnhet, mely eredményezheti a redukciós kinetika gyorsabb lecsengését és a gyors fázis eltűnését is.

#### IV. táblázat. P700 redukció kinetikájának analízise

A mérések előtt a levélkorongokat 2 órán keresztül  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fehér fény alá helyezve, Petri-csészében inkubáltuk 4 ml desztillált vízben (kontroll), 1 mM GSNO oldatban (GSNO), illetve 1 mM GSNO és  $4 \text{ mg ml}^{-1}$  Hb oldatban (GSNO + Hb), majd a levélkorongokat 15 percig sötétadaptáltuk. A többkomponensű görbék felbontásához használt illesztés három (a fényadaptált minták esetében két) exponenciális komponensből (gyors, középső, és lassú fázis) áll. Az értékek az illesztés eredményeképpen kapott időállandók ( $\tau$ ) és szórásértékek. A zárójelben lévő értékek az abszorpciós tranziensek maximális értékére vonatkoztatott százalékos értékek (A) a szórás feltüntetésével. A sötétadaptált mintához tartozó illesztési paraméterek a 6. B ábra szerinti megvilágítási ciklus első 30 s időtartamú FR megvilágítást követő 50 s időtartamú görbeszakaszhoz tartoznak, míg a fényadaptált mintához tartozó illesztés az aktinikus megvilágítást követő utolsó 30 s időtartamú FR megvilágítást követő görbeszakaszon történt, szintén 50 s időintervallumban.

|           | Gyors fázis $\tau$ ( $A_1$ [%])  | Középső fázis $\tau$ ( $A_2$ [%]) | Lassú fázis $\tau$ ( $A_3$ [%])  |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|           | s                                | s                                 | s                                |
|           | sötétadaptált minták             |                                   |                                  |
| kontroll  | $0,28 \pm 0,10$ ( $26 \pm 10$ )  | $1,34 \pm 0,48$ ( $39 \pm 7,4$ )  | $10,2 \pm 2,80$ ( $31 \pm 3,7$ ) |
| GSNO      | $0,22 \pm 0,07$ ( $20 \pm 7,4$ ) | $1,28 \pm 0,42$ ( $43 \pm 4,0$ )  | $9,20 \pm 1,35$ ( $33 \pm 5,7$ ) |
| GSNO + Hb | $0,20 \pm 0,11$ ( $23 \pm 8,8$ ) | $0,93 \pm 0,39$ ( $43 \pm 7,6$ )  | $7,92 \pm 2,46$ ( $31 \pm 2,0$ ) |
|           | fényadaptált minták              |                                   |                                  |
| kontroll  | – (0)                            | $1,34 \pm 0,60$ ( $65 \pm 8,2$ )  | $6,93 \pm 2,23$ ( $37 \pm 6,1$ ) |
| GSNO      | – (0)                            | $0,93 \pm 0,27$ ( $64 \pm 6,2$ )  | $5,25 \pm 1,51$ ( $36 \pm 4,0$ ) |
| GSNO + Hb | – (0)                            | $1,20 \pm 0,35$ ( $61 \pm 5,9$ )  | $6,57 \pm 2,27$ ( $39 \pm 4,8$ ) |



### 5.3.5. A NO fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásai és ezek élettani jelentősége

GSNO jelenlétében végzett  $Q_A$ -reoxidációs kísérletek eredményei szerint a NO egyrészt csökkenti az elektrontranszport sebességét  $Q_A$  és  $Q_B$  között valószínűleg azáltal, hogy *in vivo* is kompetitíven kötődik a nem-hem (II) vashoz; másrészt akadályozza a töltésrekombinációt  $Q_A^-$  és az  $S_2$  állapotú vízbontó komplex között, mert redukálja, vagy inaktiválja a Mn csoportot, esetleg redukálja a  $Y_D$  tirozin gyököt. Ezek az eredmények igazolják NO korábbi, *in vitro* rendszerben megfigyelt gátlóhatását PSII elektrontranszport folyamataira, és megerősítik a NO *in vitro* azonosított gátlóhelyeit *in vivo* kísérleti rendszerben is.

Izolált kloroplasztiszokban és intakt levelekben végzett korábbi mérésekben a különböző NO donorok eltérően módosították a fluoreszcencia indukciós paramétereket, így nem adtak egyértelmű választ a NO fotoszintetikus paraméterekre gyakorolt hatásával kapcsolatban (Takahashi és Yamasaki, 2002; Yang és mtsai., 2004). Eredményeink alapján megállapítható, hogy a NO donormolekulák eltérő kémiai tulajdonságai és a különböző kísérleti elrendezések együtt okozzák a fenti ellentmondásokat, ugyanakkor bizonyítják, hogy a NO *in vivo* csökkenti az  $F_v/F_m$  értéket, és a steady-state qP csökkenés hátterében minden bizonnyal a  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti elektrontranszport lassulása áll. A NO emellett csökkenti a steady-state NPQ értékét, ami szintén a lineáris elektrontranszport lassulására utal; ám a tranziens NPQ növekedése a megvilágítás kezdetén működő elektronforgalom mérsékelt serkentését jelzi.

Kísérleti körülményeink között a GSNO kezelés nem módosította jelentősen a PSI fotokémiai aktivitását, bár kis mértékben növeli a lineáris elektrontranszportlánc elektronkészletét. A P700 redukciós kinetika alapján feltételezhető, hogy ez a növekmény ciklikus elektrontranszport eredetű. A P700 lecsengési kinetikájában okozott egyéb változások azonban nem számottevők.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

A GSNO jelenlétében végzett kísérletek eredményei világosan mutatják, hogy a NO közvetlenül befolyásolja PSII fotoszintetikus elektronforgalmát. A GSNO-kezelés viszonylag hosszú, két 2 órás időtartama miatt azonban nem zárható ki a NO által előidézett közvetett hatások, melyek szintén a fotoszintetikus paraméterek csökkenéséhez vezetnek. Indirekt hatásént értékelhető a Calvin-ciklus esetleges gátlása: NO csökkenti a Rubisco-aktiváz és a Rubisco alegységkötő fehérje  $\beta$ -alegységének mennyiségét (Lum és mtsai., 2005), sőt, a Rubisco enzim közvetlenül és reverzibilisen gátolható S-nitroziáció által is (Abat és mtsai., 2008). A NO emellett a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működése során termelődő szuperoxid-anionnal reakcióba lépve peroxinitritet képezhet, mely gátolhatja a fotoszintetikus elektrontranszportot, ugyanakkor membránkárosító hatása is van (Jasid és mtsai., 2006).

A NO közvetlen hatásának élettani szerepe lehet a nitrogén- és szénanyagcsere összehangolása stresszhatás, például hipoxia esetén (Takahashi és Yamasaki, 2002). A növényekben a nitrogén- és a szénasszimilációs folyamatok szorosan összefüggnek. Optimális körülmények között a citoplazmában a NR aktivitása során a  $\text{NO}_3^-$ -ből redukálódó  $\text{NO}_2^-$  a kloroplasztiszbba transzportálódik, s a NiR aktivitása nyomán képződő  $\text{NH}_4^+$  aminocsoport formájában aminosavakba épül. A nitrittranszporthoz transztilakoid  $\Delta\text{pH}$ , a nitritredukcióhoz pedig redukáló ágens szükséges: mindkét feltételt a fotoszintetikus elektrontranszport teremti meg (Yamasaki, 2000). Kedvezőtlen viszonyok, például hipoxia esetén a NR  $\text{NO}$ -t szintetizálhat, mely transzmembrán effektormolekulaként leszabályozhatja PSII fotoszintetikus aktivitását a nitrogénanyagcsere zavara alatt (Takahashi és Yamasaki, 2002). A PSI körüli alternatív elektrontranszport utak zavartalan működése ugyanakkor megelőzi PSI fotoinhibícióját, esetleg megelőzheti a sztróma túlredukálódását is. Emellett a transztilakoid  $\Delta\text{pH}$  létrehozásában betöltött szerepe révén biztosíthatja a PSII védelmét is a nemfotokémiai kioltómechanizmus energiatülszórásának indukálásán keresztül.

## 6. KONKLÚZIÓ

Munkánk során különböző NO donor és akceptormolekulák segítségével vizsgáltuk a NO intakt levelek fotoszintetikus elektrontranszportjára gyakorolt hatását és az alábbi következtetéseket vontuk le.

### 1. A NO donorok NO produkciója eltér

Kísérleti elrendezésünkben alkalmazott két órás inkubáció során a SNAP oldat NO produkciója volt a legalacsonyabb, míg az SNP és a GSNO oldatok NO termelése még két óra elteltével is jelentős. Megállapítottuk, hogy a NO oxidatív bomlástermékei, a GSNO bomlásterméke (GSSG) és a SNAP nem okozott változást a borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereiben, és az SNP által indukált változások részben a NO mellett felszabaduló cianidnak köszönhetőek. A GSNO-kezelés hatásáért azonban kizárólag a NO felel. Ez az eredmény hangsúlyozza a megfelelő NO donormolekula megválasztásának fontosságát, illetve igazolja a GSNO alkalmasságát a NO *in vivo* fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásának vizsgálatára.

### 2. A NO a PSII elektrontranszport folyamatait donor és akceptor oldalon is gátolja *in vivo*

GSNO-val kezelt borsó levélkorongokon végzett  $Q_A^-$ -reoxidációs mérések segítségével feltérképeztük a NO kötőhelyeit PSII-ben. Megállapítható, hogy a NO az intakt levelekben gátlást okoz PSII donor és akceptor oldalán: egyrészt csökkenti az elektrontranszport sebességét  $Q_A$  és  $Q_B$  között valószínűleg azáltal, hogy *in vivo* is kompetitíven kötődik a nem-hem (II) vashoz; másrészt akadályozza a töltésrekombinációt  $Q_A^-$  és az  $S_2$  állapotú vízbontó komplex között, mert redukálja, vagy inaktiválja a Mn csoportot, esetleg redukálja a  $Y_D'$  tirozin gyököt. A donor és akceptor oldali gátlást a Kautsky-görbék kinetikái is alátámasztják.

## KONKLÚZIÓ

### 3. A NO módosítja a fotoszintetikus paramétereket

Fluoreszcencia indukciós mérésekből kiderül, hogy a GSNO-kezelés hatására csökkent a borsó levélkorongok  $F_v/F_m$  hányadosa, a qP és NPQ értéke is, azaz a NO növeli a zárt PSII reakciócentrumok arányát és gátolja a fotoszintetikus elektrontranszportot *in vivo*. A NO ugyanakkor a reakciócentrum típusú nemfotokémiai kioltást is módosítja, vélhetően a ciklikus elektrontranszport fokozása illetve a Calvin-ciklus aktivációjának késleltetése útján.

### 4. A NO nem befolyásolja PSI elektrontranszportját

Noha a NO nem módosította a  $\Phi_{PSI}$  értékét, kis mértékben emeli a lineáris elektrontranszportlánc elektronkészletét, melynek háttérében a PSI körüli ciklikus elektrontranszport mérsékelt serkentése állhat.

Munkánk eredményei összességében megerősítik és új eredményekkel egészítik ki a korábbi *in vitro* eredményeket, így hozzájárulnak a NO fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásának tisztázásához. A NO fotoszintetikus elektrontranszportban betöltött potenciális reguláló szerepe azonban korántsem feltérképezett terület. Bízunk benne, hogy a további ígéretes kutatási lehetőségek kijelölésében, kérdések megfogalmazásában talán ez a munka is segítséget nyújt.

## 7. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Abat JK, Mattoo AK, Deswal R** (2008) S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata*- ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. *FEBS J* **275**: 2862-72
- Ahern G, Klyachko V, Jackson M** (2002) cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci* **25**: 510-7
- Archer S** (1993) Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* **7**: 349-60
- Arnon D, Allen, M, Whatley F** (1954) Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature* **174**: 394-6
- Asada K, Heber U, Schreiber U** (1993) Electron flow to the intersystem chain from stromal components and cyclic electron flow in maize chloroplasts, as detected in intact leaves by monitoring redox change of P700 and chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Physiol* **34**: 39-50
- Asada K, Heber U, Schreiber U** (1992) Pool size of electrons that can be donated to P700<sup>+</sup> as determined in intact leaves: donation to P700<sup>+</sup> from stromal components via the intersystem chain. *Plant Cell Physiol* **33**: 927-32
- Barber J** (2003) Photosystem II: the engine of life. *Q Rev Biophys* **36**: 71-89
- Beligni MV, Lamattina L** (1999) Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. *Nitric Oxide Biol Chem* **3**: 199-208
- Beligni MV, Lamattina L** (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**: 215-21
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 21-39
- Bethke P, Badger M, Jones R** (2004a) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**: 332-41
- Bethke P, Gubler F, Jacobsen J, Jones, R** (2004b) Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* **219**: 847-55
- Bethke P, Libourel I, Jones R** (2006a) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **57**: 517-26
- Bethke P, Libourel I, Reinöhl V, Jones R** (2006b) Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* **223**: 805-12

- Bilger W, Björkman O** (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* **25**: 173-185
- Bright J, Desikan R, Hancock J, Weir I, Neill S** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *Plant J* **45**: 113-22
- Brookes P, Bolaños J, Heales S** (1999) The assumption that nitric oxide inhibits mitochondrial ATP synthesis is correct. *FEBS Lett* **446**: 261-3
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds)** (2001) Biochemistry & molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA*.
- Bukhov N, Carpentier R** (2004) Alternative photosystem I-driven electron transport routes: mechanisms and functions. *Photosynth Res* **82**: 17-33
- Bukhov N, Egorova E, Carpentier R** (2002) Electron flow to photosystem I from stromal reductants *in vivo*: the size of the pool of stromal reductants controls the rate of electron donation to both rapidly and slowly reducing photosystem I units. *Planta* **215**: 812-20
- Cannan RK** (1955) Proposal for the distribution of a certified standard for use in hemoglobinometry. *Clin Chem* **1**: 151-6
- Chandok M, Ytterberg A, van Wijk K, Klessig D** (2003) The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell* **113**: 469-82
- Chow W, Hope A** (2004) Electron fluxes through photosystem I in cucumber leaf discs probed by far-red light. *Photosynth Res* **81**: 77-89
- Conrath U, Amoroso G, Köhle H, Sültemeyer D** (2004) Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry. *Plant J* **38**: 1015-22
- Cooney R, Harwood P, Custer L, Franke A** (1994) Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ Health Perspect* **102**: 460-2
- Crawford NM** (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot* **57**: 471-8
- Crawford NM, Galli M, Tischner R, Heimer Y, Okamoto M, Mack A** (2006) Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci* **11**: 526-7
- Delledonne M** (2005) NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 390-6

- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-8
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13454-9
- del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB** (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**: 783-92
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill SJ** (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16314-8
- Diner BA, Petrouleas V** (1990) Formation by NO of nitrosyl adducts of redox components of the Photosystem II reaction center. II: evidence that HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> binds to the acceptor-side non-heme iron. *Biochim Biophys Acta* **1015**: 141-9
- Durner J, Klessig D** (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 369-74
- Durner J, Wendehenne D, Klessig D** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10328-33
- Dusse L, Silva R, Vieira L, Carvalho M** (2005) Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? *Clin Chim Acta* **362**: 195-197
- Ederli L, Reale L, Madeo L, Ferranti F, Gehring C, Fornaciari M, Romano B, Pasqualini S** (2009) NO release by nitric oxide donors *in vitro* and *in planta*. *Plant Physiol Biochem* **47**: 42-8
- Erdei L, Kolbert Z** (2008) Nitric oxide as a potent signalling molecule in plants. *Acta Biol Szegediensis* **52**: 1-5
- Feelisch M** (1998) The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **358**: 113-22
- Finazzi G, Johnson GN, Dall'Osto L, Joliot P, Wollman FA, Bassi R** (2004) A zeaxanthin-independent nonphotochemical quenching mechanism localized in the photosystem II core complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12375-80
- Floryszak-Wieczorek J, Milczarek G, Arasimowicz M, Ciszewski A** (2006) Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* **224**: 1363-72
- Forti G, Gerola P** (1977) Inhibition of photosynthesis by azide and cyanide and the role of oxygen in photosynthesis. *Plant Physiol* **59**: 859-62

- Friederich JA, Butterworth JF** (1995) Sodium nitroprusside: twenty years and counting. *Anesth Analg* **81**: 152-162
- Garab G, Lajkó F, Mustárdy L, Márton L** (1989) Respiratory control over photosynthetic electron transport in chloroplasts of higher-plant cells: evidence for chlororespiration. *Planta* **179**: 349-358
- García-Mata C, Lamattina L** (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* **126**: 1196-204
- García-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L., Blatt M** (2003) Nitric oxide regulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11116-21
- Genty B, Britantais JM, Baker NR** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* **990**: 87-92
- Goldstein S, Russo A, Samuni A** (2003) Reactions of PTIO and Carboxy-PTIO with ·NO, ·NO<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub>·-. *J Biol Chem* **278**: 50949-55
- Gould K, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D** (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ* **26**: 1851-62
- Goussias C, Deligiannakis Y, Sanakis Y, Ioannidis N, Petrouleas V** (2002) Probing subtle coordination changes in the iron-quinone complex of photosystem II during charge separation, by the use of NO. *Biochemistry* **41**: 15212-23
- Gow A, Luchsinger B, Pawloski J, Singel D, Stamler J** (1999) The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9027-32
- Guo FQ** (2006) Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: AtNOS1 is just the beginning. *Trends Plant Sci* **11**: 527-8
- Guo FQ, Crawford NM** (2005) *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**: 3436-50
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM** (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**: 100-3
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J** (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* **53**: 507-16
- Harrison R** (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* **33**: 774-97



- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo FQ, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei ZM** (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**: 1968-71
- Herold S, Puppo A** (2005) Oxyleghemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxynitrite: a possible role in functioning nodules? *J Biol Inorg Chem* **10**: 935-45
- Hill AC, Bennett JH** (1970) Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. *Atmos Environ* **4**: 341-8
- Jaffrey S, Erdjument-Bromage H, Ferris C, Tempst P, Snyder S** (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* **3**: 193-7
- Jasid S, Simontacchi M, Bartoli CG, Puntarulo S** (2006) Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiol* **142**: 1246-55
- Jin C, Du S, Zhang Y, Lin X, Tang C** (2009a) Differential regulatory role of nitric oxide in mediating nitrate reductase activity in roots of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Annals Bot Preview* doi: 10.1093/aob/mcp087
- Jin C, Du S, Zhang Y, Tang C, Lin X** (2009b) Atmospheric nitric oxide stimulates plant growth and improves the quality of spinach (*Spinacia oleracea*). *Annals of Applied Biology* (published online) doi: 10.1111/j.1744-7348.2009.00327.x
- Johnson GN** (2005) Cyclic electron transport in C3 plants: fact or artefact? *J Exp Bot* **56**: 407-16
- Joliot P, Joliot A** (2002) Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10209-14
- Kaiser WM** (1979) Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* **145**: 377-82
- Kern J, Loll B, Zouni A, Saenger W, Irrgang KD, Biesiadka J** (2005) Cyanobacterial photosystem II at 3.2 Å resolution – the plastoquinone binding pockets. *Photosynth Res* **84**: 153-9
- Kitajima M, Buttler WL** (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim Biophys Acta* **376**: 105-15

- Klughammer C, Schreiber U** (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700<sup>+</sup>-absorbance changes at 830 nm. *Planta* **192**: 261-8
- Klughammer C, Schreiber U** (2008) Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I. *PAM Application Notes* **1**: 11-4
- Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T** (1998) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull* **46**: 373-5
- Kolbert Z, Bartha B, Erdei L** (2008a) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *J Plant Physiol* **165**: 967-75
- Kolbert Z, Bartha B, Erdei L** (2008b) Osmotic stress- and indole-3-butyric acid-induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum*. *Physiol Plant* **133**: 406-16
- Kolbert Z, Erdei L** (2008) Involvement of nitrate reductase in auxin-induced NO synthesis. *Plant Signal Behavior* **12**: 1-2
- Kumar D, Klessig D** (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 347-51
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G** (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 109-36
- Leshem Y, Haramaty E** (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J Plant Physiol* **148**: 258-263
- Leshem YY, Pinchasov Y** (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *J Exp Bot* **51**: 1471-3
- Leshem YY, Haramaty E, Iluz D, Malik Z, Sofer Y, Roitman L, Leshem Y** (1997) Effect of stress nitric oxide (NO): interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenase activity. *Plant Physiol Biochem* **35**: 573-9
- Leshem YY, Wills RBH, Ku VVV** (1998) Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide (NO) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem.* **36**: 825-33
- Lichtenthaler HK** (1992) The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Photosynthetica* **27**: 45-55

- Liu X, Liu Q, Gupta E, Zorko N, Brownlee E, Zweier J** (2005) Quantitative measurements of NO reaction kinetics with a Clark-type electrode. *Nitric Oxide Biol Chem* **13**: 68-77
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J** (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**: 921-30
- Lum HK, Lee CH, Butt YK, Lo SC** (2005) Sodium nitroprusside affects the level of photosynthetic enzymes and glucose metabolism in *Phaseolus aureus* (mung bean). *Nitric Oxide Biol Chem* **12**: 220-30
- Ma W, Smigel A, Tsai Y, Braam J, Berkowitz G** (2008) Innate immunity signaling: cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol* **148**: 818-28
- Michelet L, Zaffagnini M, Marchand C, Collin V, Decottignies P, Tsan P, Lancelin J-M, Trost P, Miginiac-Maslow M, Noctor G, Lemaire SD** (2005) Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 16478-83
- Millar AH, Day DA** (1996) Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* **398**: 155-8
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IMG, Pinto-Maglio CAF, Oliveira HC, Seligman K, Salgado I** (2006) Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci* **171**: 34-40
- Moreau M, Lee GI, Wang Y, Crane BR, Klessig DF** (2008) AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **283**: 32957-67
- Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T** (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* **110**: 361-71
- Mur L, Carver T, Prats E** (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J Exp Bot* **57**: 489-505
- Murgia I, Concetta de Pinto M, Delledonne M, Soave C, De Gara L** (2004) Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. *J Plant Physiol* **161**: 777-83
- Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T** (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diamino fluoresceins. *FEBS Lett* **427**: 263-6

- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Riberio D, Wilson I** (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot* **59**: 165-76
- Neill S, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Wilson I** (2007) Nitric oxide evolution and perception. *J Exp Bot* **59**: 25-35
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT** (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol* **159**: 11-35
- Neill S, Desikan R, Clarke A, Hancock J** (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* **128**: 13-6
- Nelson N, Yocum CF** (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 521-65
- Ninnemann H, Maier J** (1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem Photobiol* **64**: 393-8
- Nixon P** (2000) Chlororespiration. *Phil Trans R Soc Lond B* **355**: 1541-7
- Nugent JHA, Rich AM, Evans MCW** (2001) Photosynthetic water oxidation: towards a mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1503**: 138-146
- Okegawa Y, Tsuyama M, Kobayashi Y, Shikanai T** (2005) The pgr1 mutation in the Rieske subunit of the cytochrome b6f complex does not affect PGR5-dependent cyclic electron transport around photosystem I. *J Biol Chem* **280**: 28332-6
- Orozco-Cárdenas M, Ryan C** (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol* **130**: 487-93
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L** (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* **129**: 954-6
- Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas M, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M** (2004) *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**: 2785-94
- Petrouleas V, Diner BA** (1990) Formation by NO of nitrosyl adducts of redox components of the photosystem II reaction center. I: NO binds to the acceptor-side non-heme iron. *Biochim Biophys Acta* **1015**: 131-40
- Planchet E, Kaiser W** (2006) Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *J Exp Bot* **57**: 3043-55
- Planchet E, Gupta KJ, Sonoda M, Kaiser W** (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* **41**: 732-43

- Qiao W, Fan LM** (2008) Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *J Integr Plant Biol* **50**: 1238-46
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser W** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Bot* **53**: 103-10
- Rodriguez J, Specian V, Maloney R, Jourd'heuil D, Feelisch M** (2005) Performance of diamino fluorophores for the localization of sources and targets of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* **38**: 356-68
- Rumeau D, Peltier G, Cournac L** (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ* **30**: 1041-51
- Rümer S, Gupta KJ, Kaiser W** (2009) Plant cells oxidize hydroxylamines to NO. *J Exp Bot* **60**: 2065-72
- Sakamoto A, Ueda M, Morikawa H** (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett* **515**: 20-4
- Sanakis Y, Goussias C, Mason RP, Petrouleas V** (1997) NO interacts with the tyrosine radical Y<sub>D</sub><sup>•</sup> of photosystem II to form an iminoxyl radical. *Biochemistry* **36**: 1411-7
- Schansker G, Goussias C, Petrouleas V, Rutherford AW** (2002) Reduction of the Mn cluster of the water-oxidizing enzyme by nitric oxide: Formation of an S<sub>2</sub> state. *Biochemistry* **41**: 3057-64
- Schansker G, Srivastava A, Govindjee, Strasser RJ** (2003) Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll a fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Funct Plant Biol* **30**: 785-796
- Schopfer F, Baker P, Freeman B** (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci* **28**: 646-54
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W**, (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulated fluorometer. *Photosynth Res* **10**: 51-62
- Seregélyes C, Igamberdiev A, Maassen A, Hennig J, Dudits D, Hill R** (2004) NO-degradation by alfalfa class 1 hemoglobin (Mhb1): a possible link to PR-1a gene expression in Mhb1-overproducing tobacco plants. *FEBS Lett* **571**: 61-6
- Shikanai T** (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 199-217

**Shishido SM, de Oliveira MG** (2001) Photosensitivity of aqueous sodium nitroprusside solutions: nitric oxide release versus cyanide toxicity. *Prog React Kinet Mech* **26**: 239-261

**Simontacchi M, Jasid S, Puntarulo S** (2004) Nitric oxide generation during early germination of *Sorghum* seeds. *Plant Sci* **167**: 839-47

**Srivastava N, Gonugunta V, Puli M, Raghavendra A** (2009) Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta* **229**: 757-65

**Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P** (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *J Exp Bot* **53**: 2293-303

**Stöhr C, Ullrich W** (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J Exp Bot* **53**: 2293-303

**Stamler J, Simon D, Osborne J, Mullins M, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J** (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 444-8

**Stroebel D, Choquet Y, Popot JL, Picot D** (2003) An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature* **426**: 413-8

**Takahashi S, Yamasaki H** (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett* **512**: 145-8

**Thiele A, Krause GH** (1994) Xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in photosystem II: relationship between zeaxanthin formation, energy-dependent fluorescence quenching and photoinhibition. *J Plant Physiol* **144**: 324-32

**Tischner R, Galli M, Heimer Y, Bielefeld S, Okamoto M, Mack A, Crawford NM** (2007) Interference with the citrulline-based nitric oxide synthase assay by argininosuccinate lyase activity in *Arabidopsis* extracts. *FEBS J* **274**: 4238-45

**Travis J** (2004) NO-making enzyme no more: Cell, PNAS papers retracted. *Science* **306**: 960

**Tristani-Firouzi M, DeMaster EG, Quast BJ, Nelson DP, Archer SL** (1998) Utility of a nitric oxide electrode for monitoring the administration of nitric oxide in biologic systems. *J Lab Clin Med* **131**: 281-5

**Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Colmenero-Varea P, del Río LA, Barroso JB** (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* **581**: 453-61

- Vanin AF, Svistunenko DA, Mikoyan VD, Serezhenkov VA, Fryer MJ, Baker NR, Cooper, CE** (2004) Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves. *J Biol Chem* **279**: 24100-7
- Vass I, Kirilovsky D, Etienne A-L** (1999) UV-B radiation-induced donor- and acceptor-side modifications of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **38**: 12786-94
- Wang PG, Xian M, Tang X, Wu X, Wen Z, Cai T, Janczuk AJ** (2002) Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem Rev* **102**: 1091-134
- Wellburn AR** (1990) Why are atmospheric oxides of nitrogen usually phytotoxic and not alternative fertilizers? *New Phytol* **115**: 395-429
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF** (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 449-55
- Wilson I, Neill S, Hancock J** (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ* **31**: 622-31
- Wishnick M, Lane MD** (1969) Inhibition of ribulose diphosphate carboxylase by cyanide. *J Biol Chem* **244**: 55-9
- Wodala B, Deák Z, Vass I, Erdei L, Altorjay I, Horváth F** (2008) *In vivo* target sites of nitric oxide in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves. *Plant Physiol* **146**: 1920-27
- Xu CC, Li L, Kuang T** (2000) The inhibited xanthophyll cycle is responsible for the increase in sensitivity to low temperature photoinhibition in rice leaves fed with glutathione. *Photosynth Res* **65**: 107-14
- Yamamoto A, Katou S, Yoshioka H, Doke N Kawakita K** (2003) Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals. *J Gen Plant Pathol* **69**: 218-29
- Yamasaki H** (2000) Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. *Phil Trans R Soc Lond B* **355**: 1477-88
- Yamasaki H** (2005) The NO world for plants: achieving balance in an open system. *Plant Cell Environ* **28**: 78-84
- Yamasaki H, Cohen MF** (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci* **11**: 522-4
- Yamasaki H, Sakihama Y** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* **468**: 89-92

**Yamasaki H, Shimoji H, Ohshiro Y, Sakihama Y** (2001) Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide Biol Chem* **5**: 261-70

**Yang JD, Zhao HL, Zhang TH, Yun JF** (2004) Effects of exogenous nitric oxide on photochemical activity of photosystem II in potato leaf tissue under non-stress condition. *Acta Bot Syn* **46**: 1009-14

**Zemojtel T, Fröhlich A, Palmieri M., Kolanczyk M Mikula I, Wyrwicz LS, Wanker EE, Mundlos S, Vingron M, Martasek P, Durner J** (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci* **11**: 524-5

**Yoshida M, Akaike T, Wada Y, Sato K, Ikeda K, Ueda S, Maeda H** (1994) Therapeutic effects of imidazolineoxyl N-oxide against endotoxin shock through its direct nitric oxide-scavenging activity. *Biochem Biophys Res Commun* **202**: 923-30

**Zhang X, Broderick M** (2000) Amperometric Detection of Nitric Oxide. *Mod. Asp. Immunbiol.* **1**: 160-5

**Zhao MG, Liu RJ, Chen L, Tian QY, Zhang WH** (2009) Glucose-induced inhibition of seed germination in *Lotus japonicus* is alleviated by nitric oxide and spermine. *J Plant Physiol* **166**: 213-8



## 8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni *Prof. Dr. Erdei László Tanár Úr* kiváló tanszék- és témavezetői munkáját, mely biztosította a doktori szintű kutatási munka feltételeit a Növénybiológiai Tanszéken jómagam és sok társam számára.

Köszönet illeti a tanszék *tudományos fokozattal nem rendelkező munkatársait*, akik a munkámban az elméleti tudással értékben vetekedő gyakorlati tapasztalataikkal és hasznos tanácsaikkal segítették laboratóriumi munkámat mind az oktatás, mind a kutatás területén.

Köszönöm a tanszék *összes „doktorának”* az inspiráló beszélgetéseket, az értékes elméleti útmutatást és praktikus tanácsokat, valamint a nyugodt és vidám munkahelyi légkört, melyek pótolhatatlan módon járultak hozzá doktori munkám elkészítéséhez.

Külön köszönöm *Dr. Vass Imrének*, hogy munkacsoportjában lehetőséget teremtett a munka fontos részét kitevő kísérletsorozat elvégzésére; köszönöm bátorítását és értékes tanácsait, hozzájárulását e munkát megalapozó publikáció megírásához. Hálás vagyok *Dr. Deák Zsuzsannának* a kísérletek lebonyolításában és az eredmények kiértékelésében nyújtott odaadó segítségért; valamint *Dr. Nagy Lászlónak* és *Dr. Tóth Szilviának* a dolgozat színvonalát növelő opponensi minőségű kritikai megjegyzésekért.

Végül, de elsősorban; név szerint, külön is köszönetet kívánok mondani *Dr. Horváth Ferencnek* aki az első oldattól, oldaltól és ioncsatornától az utolsó fluoreszcencia lecsengésig és bekezdésig szakmailag és barátilag is önzetlenül és fáradhatatlanul segített a TDK dolgozatom, diplomamunkám és e doktori értekezés elkészítésében. Barátsága felbecsülhetetlen érték tudományos és tudománytalan életemben egyaránt.

Köszönettel s talán viszonzhatatlan hálával tartozom feleségemnek, *Dr. Hevesi Tóth Beatrixnak* aki tudja, és két gyermekemnek, *Grétinek* és *Petinek*, akik nem is sejtik, hogy a boldog, vidám és mozgalmas családi otthon megteremtésével milyen szüntelenül megújuló erőforrást és elszántságot biztosítanak – nemcsak e dolgozat megírásához.

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A NITROGÉN-MONOXID HATÁSA BORSÓLEVELEK  
FOTOSZINTETIKUS ELEKTRONTRANSPORTJÁRA**

**Wodala Barnabás**

Témavezetők:

Dr. Horváth Ferenc, Prof. Dr. Erdei László

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Növénybiológiai Tanszék

**BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS**

A nitrogén-monoxid (NO) szabadgyök apoláros, gáz halmazállapotú molekula, mely a növényekben többféle enzimátikus folyamatban, valamint nem enzimátikus úton is képződik. Sokrétű élettani szerepét növényekben tudományos közlemények sora bizonyítja, melyek nyomán ismert, hogy a NO szerepet játszik a növények legkülönbözőbb anyagcsere- és fejlődési folyamataiban, valamint az egyes biotikus stresszorok elleni védekezési reakciókban és számos abiotikus stresszválaszban is.

A NO kis molekulatömege, rövid féléletideje és egyéb kémiai tulajdonságainak köszönhetően ideális jelátvivő molekula. Sokoldalúságának lényeges eleme, hogy kölcsönhat számos fontos intracelluláris szignálmolekulával, köztük a kalciummal, ugyanakkor könnyen reagál oxigénnel, hidrogén-peroxiddal, szuperoxidokkal, tiolcsoportokkal és átmeneti fémekkel is. A fotoszintetikus és mitokondriális elektrontranszportlánc egyes komplexei között sok átmenetifém-tartalmú fehérje található, és korábbi *in vitro* valamint *in vivo* kutatások bizonyítják, hogy a NO hatást gyakorol a növények fotoszintetikus apparátusára és folyamataira. Izolált tilakoid

## TÉZISEK

membránokon NO-gázzal végzett EPR és klorofill-*a* fluoreszcencia kísérletek egyértelműen kimutatták, hogy a NO a PSII több pontjához reverzibilis módon kötődve gátolja PSII elektronátadási folyamatait. Izolált kloroplasztiszokon valamint intakt levelekben a különböző NO donormolekulák azonban eltérő módon befolyásolták a fluoreszcencia indukciós paramétereiket.

Ezt az ellentmondást részben az okozhatja, hogy a NO hatásának vizsgálatára igen gyakran alkalmazott NO donormolekulák kémiai tulajdonságai, így NO produkciójuk különbözik, sőt lebomlásuk során más biológiai aktivitással rendelkező anyag is keletkezhet. Ugyanakkor a NO pontos kvantifikálása, különösen *in vivo* igen nehéz feladat.

Munkánk célja, hogy különböző NO donorok (SNAP, SNP és GSNO) és NO akceptormolekulák (PTIO és Hb) alkalmazásával vizsgáljuk az exogén NO kezelés hatását borsó levélkorongok fotoszintetikus elektrontranszportjára. E cél fontos része a NO fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásáról szóló ellentmondásos eredmények tisztázása, és a NO *in vivo* hatásterületeinek feltárása fluoreszcencia indukciós mérések segítségével. Célkitűzésünk másik fontos része a NO PSI működésére gyakorolt esetleges hatásának vizsgálata a P700 abszorpciós tranziensek mérésével. Vizsgálatainkkal az alábbi kérdésekre keresünk választ:

1, Méréseinkben alkalmazott NO donorok eltérő kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek: van-e különbség az egyes NO donorok NO produkciójában? A képződő NO-molekulán túl befolyásolják-e mérési eredményeket az egyes donorok egyéb fotolitikus bomlástermékei, vagy maga a NO oxidatív bomlástermékei (nitrit- és nitrátionok)?

2, Tilakoid membránokon végzett EPR mérések igazolták, hogy a NO gátolja PSII elektronátadási folyamatait az alábbi helyeken: a  $Q_A$  és  $Q_B$  kötőhely között található nem-hem (II) vas, a vízbontó komplex melletti  $Y_D$ -tirozin gyök és a vízbontó komplex Mn-csoportja. Vajon ezek a hatások és célterületek *in vivo* környezetben is igazolhatók?

3, Az exogén NO fotoszintetikus paraméterekre gyakorolt hatását több NO donormolekulával izolált kloroplasztiszokon és intakt levelekben is

## TÉZISEK

vizsgálták: a SNAP tilakoid membránokban nem befolyásolja az  $F_v/F_m$  értéket, viszont csökkenti a fényindukált  $\Delta pH$  mértékét. Ám intakt burgonya levelekben az SNP csökkenti az  $F_v/F_m$  értéket és nem befolyásolja a  $\Delta pH$ -függő NPQ mértékét. A kapott különbségek mennyiben magyarázhatók az alkalmazott NO donormolekulák, és mennyiben a kísérleti elrendezés különbségeivel? Milyen hatást gyakorol az exogén NO borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereire?

4, A NO PSI elektronátadási folyamataira gyakorolt hatását eddig nem vizsgálták. Befolyásolja-e az exogén NO PSI fotoszintetikus elektronforgalmát?

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

**Növényi anyag:** két hetes *Pisum sativum* L. cv Rajnai Törpe növények legfiatalabb, teljesen kiterült leveleiből vágott 15 mm átmérőjű levélkorongok.

**Kezelés:** mérések előtt a levélkorongokat Petri-csészébe helyeztük és 2 órán keresztül inkubáltuk  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD fényintenzitáson, desztillált vízben, vagy NO donorok és akceptorok különböző koncentrációjú oldatában. A levélkorongokat ezután 15 percig sötétadaptáltuk.

**A NO koncentráció meghatározása** amperometriás úton, NO elektród segítségével (ISO-NOP, World Precision Instruments, USA).

**$Q_A$ -reoxidáció vizsgálata** a klorofill-*a* fluoreszcencia flash-indukált lecsengésének nyomonkövetésével kettős modulációjú fluoriméter (PSI Instruments, Brno, Csehország) segítségével.

**Fluoreszcencia indukciós paraméterek meghatározása** a különböző megvilágítás nyomán indukálódó fluoreszcencia mérésével PAM fluoriméter (PAM-2000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Németország) segítségével.

**PSI fotoszintetikus aktivitásának vizsgálata** a P700 abszorpciós tranziensek nyomonkövetésével, egy kettős hullámhosszú emitter-detektor egységgel (ED-P700DW, Walz) felszerelt PAM fluoriméter (PAM-101, Walz, Effeltrich, Németország) és egy Dual-PAM-100 (Walz, Effeltrich, Németország) segítségével.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKEELÉS

### 1. A NO donorok NO produkciója eltér

Munkánk során alkalmazott három NO donormolekula fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásának vizsgálata előtt fontosnak tartottuk kideríteni, hogy ezek a kémiaiilag különböző NO donorok kísérleti rendszerünkben milyen NO emissziós sajátságokkal rendelkeznek, illetve bomlástermékeik, vagy a NO oxidatív bomlástermékei befolyásolják-e a borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereit.

A kísérleti kezelésünkben alkalmazott két órás megvilágítás során a SNAP oldat NO produkciója volt a legalacsonyabb, és fluoreszcencia indukciós mérésekben nem okozott változást a borsó levélkorongok fotoszintetikus paramétereiben sem. A SNAP tehát nem bizonyult alkalmas donormolekulának kísérleti elrendezésünkben.

A fennmaradó két donor – az SNP és a GSNO – oldatainak NO koncentrációja még két óra elteltével is jelentős, s ezt a NO mennyiséget mindkét általunk alkalmazott NO akceptormolekula hatékonyan csökkentette. A NO specifikus hatásának bizonyításához megvizsgáltuk a nitrit- és nitrát-ionok, valamint a GSNO fotolízisekor keletkező GSSG hatását. Kiderült, hogy a nitrit- és nitrátkezelés, valamint a GSSG szintén nem okoznak változást a levélkorongok  $F_v/F_m$ , qP, és NPQ paramétereiben, ám az SNP által indukált változások részben cianidnak köszönhetőek, mely a NO mellett szintén felszabadul a donormolekulából. A GSNO-kezelés hatásáért azonban kizárólag a NO felel.

Ezek az eredmények hangsúlyozzák a megfelelő NO donormolekula megválasztásának fontosságát, illetve igazolják a GSNO alkalmasságát a NO *in vivo* fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásának vizsgálatára.

## 2. A NO PSII elektrontranszport folyamatait donor és akceptor oldalon is gátolja *in vivo*

GSNO-val kezelt borsó levélkorongokon végzett  $Q_A$ -reoxidációs mérések segítségével feltérképeztük a NO kötőhelyeit PSII-ben. A GSNO-kezelés emeli a lecsengési kinetika középső fázisának amplitúdóját és növeli időállandóját ami azt jelzi hogy a NO csökkenti az elektrontranszport sebességét  $Q_A$  és  $Q_B$  között, így valószínűsíthető, hogy a NO *in vivo* is kompetitíven kötődik a nem-hem (II) vashoz. A GSNO DCMU jelenlétében gátolja a fluoreszcencia teljes lecsengését, azaz akadályozza a töltésrekombinációt  $Q_A$  és az  $S_2$  állapotú vízbontó komplex között, mert redukálja, vagy inaktiválja a Mn csoportot, esetleg redukálja a  $Y_D$  tirozin gyököt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a NO gátolja PSII donor és akceptor oldali elektronátadási folyamatait intakt levelekben is.

A donor és akceptor oldali gátlást a Kautsky-görbe kinetikája is alátámasztja: GSNO-kezelés hatására a Kautsky-görbe  $F_I$  pontja emelkedik, az  $F_P$  szint és  $F_I$ - $F_P$  görbe maximális meredeksége viszont jelentősen csökken.

## 3. A NO módosítja a fotoszintetikus paramétereket

Fluoreszcencia indukciós mérésekből kiderül, hogy a GSNO-kezelés hatására csökkent a borsó levélkorongok  $F_v/F_m$  hányadosa, a  $q_P$ , azaz a NO növeli a zárt PSII reakciócentrumok arányát. Az eredmények megerősítik a fluoreszcencia lecsengés kinetikájából és a gyors fluoreszcencia indukciós mérésekből nyert adatokat, amelyek a  $Q_A$ -molekula (zárt reakcióközpontok) felhalmozódására utalnak. A GSNO emellett az NPQ értékét is csökkenti, ami jelzi, hogy a NO gátolja a fotoszintetikus elektrontranszportot *in vivo*. A közvetlen gátlás mellett közvetett hatások sem zárhatók ki: a NO gátolhatja a Rubisco aktiválódását és aktivitását; emellett szuperoxid-anionnal reakcióba lépve peroxinitritet képezhet, mely szintén gátolhatja a fotoszintetikus elektrontranszportot, ugyanakkor membránkárosító hatása is van.

## TÉZISEK

A GSNO-kezelés növeli a sötétadaptált levelek megvilágításának első perceiben jelentkező reakciócentrum típusú nemfotokémiai kioltást, vélhetően a ciklikus elektrontranszport fokozása illetve a Calvin-ciklus aktivációjának késleltetése útján.

### **4. A NO kismértékben serkenti PSI elektronforgalmát**

Noha a NO nem módosította a  $\Phi_{PSI}$  értékét, kis mértékben emeli a lineáris elektrontranszportlánc elektronkészletét, melynek háttérében a PSI körüli ciklikus elektrontranszport mérsékelt serkentése állhat.

Munkánk eredményei összességében megerősítik és új eredményekkel egészítik ki a korábbi *in vitro* eredményeket, így hozzájárulnak a NO fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásának tisztázásához. A NO fotoszintetikus elektrontranszportban betöltött potenciális reguláló szerepe azonban korántsem feltérképezett terület. Bízunk benne, hogy a további ígéretes kutatási lehetőségek kijelölésében, kérdések megfogalmazásában talán ez a munka is segítséget nyújt.

## Summary of the Thesis

# THE EFFECT OF NITRIC OXIDE ON THE PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSPORT OF PEA LEAVES

**Barnabas Wodala**

Supervisors:

Dr. Ferenc Horváth, Prof. Dr. László Erdei

University of Szeged

Faculty of Science and Informatics

Department of Plant Biology

## INTRODUCTION AND AIMS OF THE STUDY

Plants, as well as animals, respond to ambient levels of nitric oxide (NO), and also generate NO themselves via various enzymatic and non-enzymatic pathways. Indeed, in the past years, a growing body of research has provided evidence for the multiple physiological roles of this gaseous free radical in plants including its involvement in metabolic and developmental processes as well as responses to various biotic and abiotic stressors.

Its small size and rapid turnover make NO an ideal signalling molecule. A key reason for its versatility is its interaction with calcium as well as other intracellular signalling molecules: NO readily reacts with molecular oxygen, hydrogen peroxide, superoxide and also thiol- and metal-containing proteins. Photosynthetic and mitochondrial electron transport chains are abundant in transition metal-containing complexes and previous *in vitro* and *in vivo* experiments suggest that NO modulates the photosynthetic processes and apparatus of plants. Electron paramagnetic resonance and chlorophyll fluorescence measurements on isolated thylakoid membrane complexes treated with NO gas have clearly demonstrated that NO can reversibly bind to several



## SUMMARY

sites in PSII and inhibit electron transfer. However, experiments carried out on isolated chloroplasts and intact leaves using different NO donor molecules report contradicting effects on fluorescence induction parameters.

NO donors are widely implemented tools for investigating the biological roles of NO, but the diverse chemical properties of donors potentially lead to differences in NO yield and the release of other reactive agents. These factors, together with difficulties of direct measurement of NO especially in an *in vivo* setting, may well account for these conflicting results.

Using three NO donor molecules (SNAP, SNP and GSNO) and two scavenger chemicals (PTIO and Hb), the purpose of this work is to examine the effect of exogenously applied NO on the photosynthetic electron transport of pea leaf disks. Our aim was to resolve previous contradictory results concerning the effect of NO on photosynthetic electron transport and to identify *in vivo* target sites of NO by chlorophyll fluorescence. The additional goal was to investigate the potential effect of NO on PSI photochemistry. The particular goals of this work are summarized by the following points:

- 1, NO donors applied in this work are characterised by diverse chemical properties. Are there differences in the NO yield of these donor molecules under our experimental settings? Do other photolytical degradation products or the oxidative degradation products of NO itself (nitrite and nitrate ions) influence our measurements by interfering with specific NO effects?

- 2, EPR measurements on isolated thylakoid membrane complexes have shown that NO inhibits electron transfer processes in PSII and have identified its target sites, such as the nonheme iron between the  $Q_A$  and  $Q_B$  binding sites, the  $Y_D$  tyrosine residue of the D2 protein, and the Mn cluster of the water-oxidizing complex. Can these effects be reproduced and the target sites identified *in vivo*?

- 3, Previous work on the effect of exogenous NO on photosynthetic parameters carried out on isolated chloroplasts and intact leaves using different NO donors has yielded conflicting results. In isolated thylakoid membranes, SNAP does not modify Fv/Fm values, but inhibits  $\Delta pH$  formation

## SUMMARY

across the thylakoid membrane. In intact leaves, however, SNP decreases Fv/Fm values, but does not modify  $\Delta\text{pH}$ -dependent (NPQ). To what extent are these differences due to NO donors and differences in experimental settings? With that resolved what are the direct effects of exogenously applied NO on photosynthetic parameters?

4, The effect of NO on the electron transfer processes of PSI has not yet been addressed. Does NO modify PSI photochemistry?

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material:** 15 mm leaf disks of the youngest fully expanded leaves of two-week-old *Pisum sativum* L. cv Petit Provençal plants.

**Treatment:** prior to measurements, leaf disks were individually incubated for 2 h under  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD white light in covered Petri dishes containing 4 ml distilled water as control, or 4 ml of different dilutions of NO donor molecules and scavenger chemicals in aqueous solution. The leaf disks were then dark adapted for 15 min.

**The concentration of NO was measured** amperometrically using a NO electrode (ISO-NOP, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA).

**$\text{Q}_\text{A}^-$  reoxidation was determined from** flash-induced decay of chlorophyll fluorescence yield monitored by a double-modulation fluorometer (PSI, Brno, Czech Republic).

**Fluorescence induction parameters were obtained** from chlorophyll fluorescence of pea leaves monitored by a PAM fluorometer (PAM-2000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany).

**PSI photochemistry was measured by monitoring** P700 absorbance using a Dual-PAM-100 P700 and chlorophyll fluorescence measuring system (Walz, Effeltrich, Germany) and a PAM fluorometer (PAM-101, Walz, Effeltrich, Germany) equipped with a dual-wavelength emitter-detector unit (ED-P700DW, Walz).

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1. NO donor molecules release different amounts of NO

Prior to examining the effect of our three NO donor molecules on photosynthetic electron transport we studied the NO emission characteristics of the NO donors under our experimental settings and checked whether their degradation products, or the oxidative degradation products of NO influence the photosynthetic parameters of the leaf disks.

The SNAP solution produced the least amount of NO throughout the two-hour incubation and, accordingly, failed to cause significant changes in the photosynthetic parameters of leaf disks, therefore SNAP is an unsuitable donor under our conditions.

The concentration of NO in the solutions of the other two donors – SNP and GSNO – is significant even after two hours of illumination and this NO yield is effectively quenched by both NO scavengers. In order to prove the NO specificity in the effects caused by these donors we examined the potential effects of nitrite and nitrate, and GSSG formed during the degradation of GSNO. Neither the nitrite and nitrate containing solutions, nor GSSG influenced the  $F_v/F_m$ , qP, and NPQ parameters of the leaf disks, but the SNP-induced changes are partly due to cyanide released simultaneously with NO during the photolysis of SNP. The effects of GSNO, on the other hand, are mediated exclusively by NO.

These findings highlight the importance of the correct choice of NO donor and justify the use of GSNO to study the effects of NO on photosynthetic electron transport *in vivo*.

## **2. NO causes donor and acceptor side inhibition of PSII electron transport *in vivo***

We identified the target sites of NO in PSII by measuring  $Q_A^-$  reoxidation kinetics of leaf disks treated with GSNO. GSNO treatment increased the amplitude and the time constant of the middle phase of the fluorescence decay curve, which indicates that NO reduces the rate of electron transfer between  $Q_A^-$  és  $Q_B$  providing circumstantial evidence in support for the competitive binding of NO to the non-heme iron (II) *in vivo*. In the presence of DCMU, GSNO prevents the total decay of fluorescence, which indicates that  $Q_A^-$  is unable to recombine with the  $S_2$  state, possibly because NO inactivates or reduces either the Mn cluster, or the  $Y_D$  residue. These findings suggest that NO inhibits electron transfer on both donor and acceptor sides in PSII in intact leaves.

Kautsky-curve kinetics also confirm significant donor and acceptor side inhibition of electron transport: GSNO-treatment causes an  $F_I$  increase and a significant decrease in  $F_P$  and the maximal slope of és  $F_I$ - $F_P$  section of the Kautsky-curve.

## **3. NO modifies chlorophyll fluorescence parameters**

Chlorophyll fluorescence measurements reveal that GSNO treatment decreases the  $F_v/F_m$  and qP values. These results are in good correlation with fluorescence decay kinetics measurements and demonstrate that NO increases the proportion of closed PSII reaction centers through the accumulation of  $Q_A^-$  molecules. NO also reduces NPQ values indicating a reduced flow of electrons in the intersystem chain. Taken together, these data provide strong *in vivo* evidence that a partial inhibition of PSII by NO is indeed the cause of impaired steady-state electron transport *in vivo*. Besides direct inhibition, indirect effects cannot be ruled out: NO may inhibit Rubisco activation and activity; in addition, the reaction of NO with superoxide leads to peroxynitrite, which may also impair photosynthetic electron transport as well as damaging tylakoid membranes.

## SUMMARY

In addition, GSNO changed the length and amplitude of an NPQ transient, which arises upon the onset of illumination of dark-adapted leaves at low light intensities, and it is relaxed rapidly after a few minutes of illumination. NO might bring about such an increase through stimulating cyclic electron transport or delaying the activation of the Calvin cycle.

### **4. NO moderately enhances PSI photochemistry**

Although NO failed to modify  $\Phi_{\text{PSI}}$  values, it slightly increased the number of electrons in the intersystem chain probably by stimulating PSI cyclic electron transport.

In summary, data gathered in this work provide *in vivo* confirmation of the existence of target sites of NO in PSII and further evidence on the inhibitory effect of NO on PSII electron transport in intact leaves. We trust that this work inspires new questions and ignites further research to explore the perspective of NO as a potential regulator of photosynthetic electron transport yet to be discovered.

## Publikációs lista

(\* az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények)

### Folyóiratcikkek:

Hertel B, Horváth F, **Wodala B**, Hurst A, Moroni A, Thiel G. (2005) KAT1 inactivates at sub-millimolar concentrations of external potassium. *Journal of Experimental Botany*. **56**: 3103-10. IF: 3,336

Horváth F, Erdei L, **Wodala B**, Homann U, Thiel G. (2002) K<sup>+</sup> outward rectifying channels as targets of phosphatase inhibitor deltamethrin in *Vicia faba* guard cells. *Journal of Plant Physiology*. **159**: 1097-103. IF: 1,149

**\*Wodala B**, Deák Z, Vass I, Erdei L, Altorjay I, Horváth F. (2008) Involvement of NO in the regulation of photosynthetic electron transport *in vivo* studied by chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Physiology*. **146**: 1920-7. IF: 6,367

### Referált folyóiratban megjelent összefoglalók

Horváth F, Erdei L, **Wodala B**, Homann U, Thiel G. (2002) Deltamethrin rescues run down of K<sup>+</sup> outward rectifying channels in *Vicia faba* guard cells. *Acta Biologica Szegediensis*. **46**: 19-20.

Horváth F, **Wodala B**, Erdei L, Moroni A, Van Etten J, Thiel G. (2002) pH-dependent regulation of a potassium channel protein encoded by a *Chlorella* virus PBCV-1. *Acta Biologica Szegediensis*. **46**: 21-2.

Ördög A, **Wodala B**, Horváth F. (2008) Investigating the role of potassium channel KAT1 in NO mediated stomatal closure. *Acta Biologica Szegediensis*. **52**: 163-5.

**\*Wodala B**, Deák Z, Vass I, Erdei L, Horváth F. (2005) Nitric oxide modifies photosynthetic electron transport in pea leaves. *Acta Biologica Szegediensis*. **49**: 7-8.

**\*Wodala B**, Horváth F. (2008) The effect of exogenous NO on PSI photochemistry in inact pea leaves. *Acta Biologica Szegediensis*. **52**: 243-5.

## PUBLIKÁCIÓK

### Poszterek

**\*Wodala B**, Deák Z, Vass I, Erdei L, Horváth F. (2005) Nitric oxide targets photosynthetic electron transport in pea leaves. "Photosynthesis and Stress" Central European Conference on Biophysical and Biochemical Methods in Photosynthesis Research, 2005. szeptember 15-16., Brno, Csehország.

**\*Wodala B**, Horváth F, Deák Z, Vass I, Erdei L. (2006) Nitric oxide hinders photosynthetic electron transport in pea leaves. XV. FESPB Congress, 2006. július 17-21., Lyon, Franciaország.

### Konferencia előadások

**Wodala B**, Horváth F, Erdei L, Thiel G. (2005) pH-dependent regulation of the virus-encoded miniature potassium channel, Kcv. 5<sup>th</sup> International Conference of PhD Students, 2005. augusztus 14-20., Miskolc, Magyarország

**Wodala B**, Horváth F, Moroni A, Thiel G. (2003) pH-dependent regulation of potassium channel protein encoded by Chlorella virus, PBCV-1. XXXIII. Membrán-transzport konferencia, 2003. május 20-23., Sümeg, Magyarország.