

Beszámoló jelentés a

Termo-optikai szerkezetváltozások fotoszintetikus rendszerekben

című, K 63252 sz. OTKA pályázatról (2006. február 1. – 2010. január 31)

*Témavezető: Garab Győző, tudományos tanácsadó, MTA Szegedi Biológiai
Központ, Növénybiológiai Intézet*

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés
 - 1.1. Előzmények: termo-optikai szerkezetváltozások LHCII-tartalmú fénybegyűjtő antenna rendszerekben
 - 1.2. Célkitűzések
 2. Termo-optikai szerkezetváltozások más fotoszintetikus rendszerekben
 - 2.1. Cianobakteriális antenna: a fikobiliszómát érintő változások
 - 2.2. Kovamoszatok antenna- és membránrendszerének szerkezete és szerkezetváltozásai
 - 2.3. Szerkezetváltozások az első fotokémiai rendszer (PSI) fénybegyűjtő antenna szerveződésében
 - 2.4. A második fotokémiai rendszer (PSII) reakciócentrum komplexét és oxigénfejlesztő komplexét (OEC) érintő változások
 3. Szerkezeti háttér
 - 3.1. A gránumos kloroplasztisz 3D membránszerkezete és belső szerveződése
 - 3.2. Az LHCII in vivo és in vitro szerkezetei; rekonstituált komplexek
 - 3.3. A tilakoid membrán lipid fázisainak meghatározása, nem-lamella-képző fázis(ok) jelenléte
 4. A termo-optikai szerkezetváltozások fizikai mechanizmusa
 - 4.1. A gerjesztési energia disszipációjából származó hőcsomagok megjelenése és szétterülése
 5. A szerkezetváltozások élettani jelentősége és a termo-optikai változásokat befolyásoló tényezők hatásai
 - 5.1. Az LHCII és más membránproteinek foszforilációja
 - 5.2. A xantofill ciklus hatása, stressz-válaszok
 - 5.3. A gerjesztési energia kioltási mechanizmusai
 6. Kitekintés
 7. Irodalomjegyzék
-

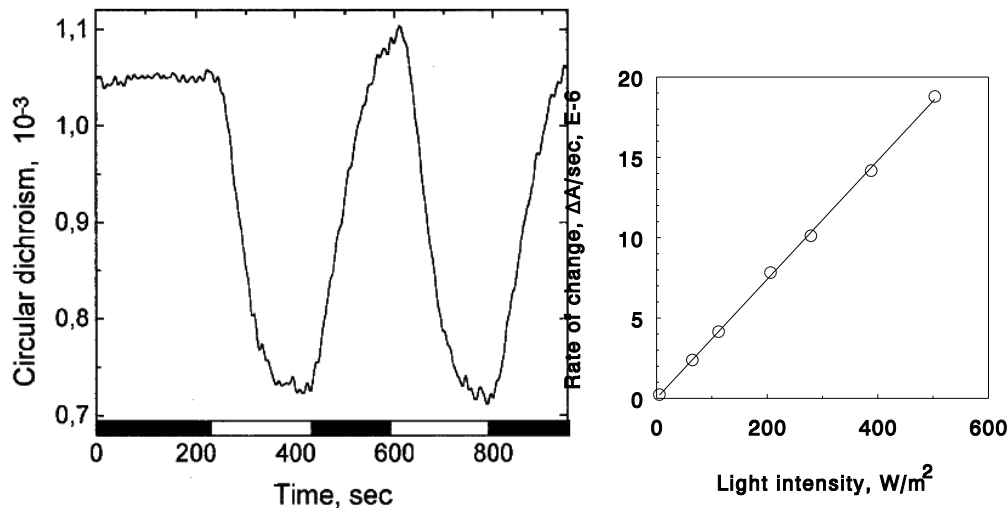
1. Bevezetés

A beszámolóban az OTKA támogatásával – a beszámolási időszak alatt - született eredmények ismertetése során az eredményeket ill. a vizsgálati szempontokat csoportosítottam. A vizsgálatok során – az eredeti ütemtervhez képest alkalmasint kisebb eltérésekkel – több feladat végrehajtását egymással párhuzamosan végeztük. Ezért, valamint a jobb áttekinthetőség érdekében, az eredmények ismertetése során nem követem a kronológiai sorrendet.

1.1. Előzmények: termo-optikai szerkezetváltozások LHCII-tartalmú fénybegyűjtő antenna rendszerekben

A magasabb rendű növények egyik fontos sajátossága, hogy képesek alkalmazkodni a külső környezet – mint például hőmérséklet és fény – rövid távú változásaihoz. Ezt többszintű szabályozó mechanizmusokon keresztül képesek megvalósítani, amelyek között a tilakoid membránon belüli szerkezetváltozások bizonyítottan fontos szerepet játszanak. A szerkezetváltozások ill. a szabályozó mechanizmusok egy jelentős része a második fotokémiai rendszer (PSII) klorofill *a/b* fénybegyűjtő komplexének, az ún. LHCII, részvételével zajlik. Ezek egy jelentős része – már a munka megkezdésekor is jól ismert volt és az irodalomban részletes jellemzése rendelkezésünkre állt.

Az irodalomban leírt rövid távú reguláló mechanizmusok mindegyike valamilyen módon összefüggésbe volt hozható a fotoszintetikus apparátus fotokémiai aktivitásával. Erre példa az ún. energia-függő nem fotokémiai kioltás (NPQ, ill. qE), amely a klorofill- a (Kl-a) szinglet gerjesztési állapotának kioltása révén egyfajta fotoprotektív szerepet tölt be. Ez függ a transzmembrán pH grádiens (ΔpH) felépülésétől és a (szintén ΔpH -függő) xantofill ciklus működésétől (Horton és mtsai 1996) valamint a PsbS protein jelenlétével is (Li és mtsai 2009). Ez a folyamat nyilvánvalóan közvetlenül - ill. a fotoszintetikus elektron ill. proton transzport működésén keresztül - függ a fotokémiai aktivitástól, ami magas fényen telítődik. Hasonlóképpen, a foszforiláció is, amely az LHCII és más membránproteinek foszforilációját szabályozza és ezzel befolyásolja a két fotokémiai rendszer gerjesztési energia ellátását, - redox-regulált kinázok és foszfatázok közbeiktatásával – közvetlenül függ a rendszer fotokémiai aktivitásától (Allen és mtsai 2001). Ezekkel szemben – amint azt több munkában kimutattuk, majd később mások is beszámoltak hasonló jelenségekről – a projekt megkezdése előtt is egyre több kísérleti bizonyíték állt rendelkezésünkre, amik azt mutatták, hogy a fotokémiai rendszer telítése feletti tartományban, a beeső fény intenzitásával arányos szerkezetváltozások következnek be. Ezek egy része a fotokémiai aktivitás gátlása mellett is megfigyelhető volt. Különös figyelmet érdemelnek azok a korábban nem ismert fény indukált reverzibilis változások, amik izolált LHCII komplexeken voltak megfigyelhetők (1. ábra)



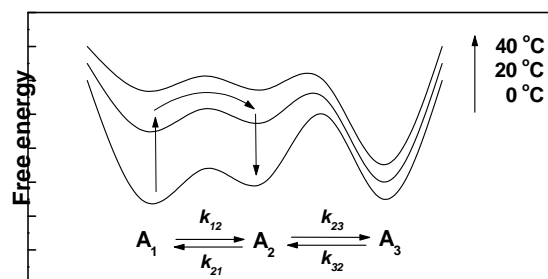
1. ábra

Ezek részletes tárgyalását itt mellőzöm; a legfontosabb – a termo-optikai mechanizmus felismeréséhez vezető eredmények megtalálhatók korábbi közleményeinkben (Garab és mtsai 1988, Barzda és mtsai 1996, Istokovics és mtsai 1997, Simidjiev és mtsai 1998).

A termo-optikai effektust ill. a szerkezetváltozások termo-optikai mechanizmusát – a terminológiát, több analógia alapján folyadékkristályos irodalomból kölcsönözve (Jánossy, 1991) – részletesen, egy egyszerű modellt használva, először 2000-ben írtuk le, majd a következő években részletesebben is jellemeztük. Korábbi munkáinkban gránumos kloroplastiszokban meghatároztuk a termo-optikailag indukálható szerkezetváltozások sorrendjét – a tapadt membránok szétválását, a királsisan szervezett makrodomének felbomlását és az LHCI trimérek monomerizálódását - ill. azok fő termikus és fény-indukált jellemzőit (Cseh és mtsai 2000, Garab és mtsai 2002, Dobrikova és mtsai 2003), ill. a javasolt fizikai mechanizmussal összhangban lévő nem-Arrhenius-i hőmérsékletfüggést (Cseh és mtsai 2005).

Az általunk javasolt biológiai termo-optikai mechanizmus lényege a következőképpen foglalható össze: a gerjesztési energia disszipációja lokális hőcsomagokat kelt a disszipáció helyén, amely – jóllehet nagyon gyorsan ($\ll 100$ ps) szétterül, elemi szerkezetváltozásokat (átmeneteket, A_1 - A_2 , A_2 - A_3) okozhat, ha a disszipáció közvetlen környezetében található egy termikus átmenetre képes szerkezeti elem (2. ábra).

A hő-indukálta szerkezetváltozást tehát így módon a fényenergia keltette lokális hő indukálja – értelemszerűen kizárólag a disszipáció helyén, ellentétben a termikusan létrehozható, a teljes rendszerre kiterjedt és (valószínűleg) ezért általában irreverzibilis változásokkal. Fény-indukció esetén a hő/disszipáció indukálta változások lokálisak maradnak; detektálásuk kumulatív indukciójuk révén lehetséges. A változások reverzibilitása, nem túlságosan erőteljes és nem-túlságosan hosszantartó kezelést követően, széles tartományban megfigyelhető. Ugyanakkor, a kétféle módon előidézett változások karaktere – ahogy azt spektroszkópiai (elsősorban CD, cirkuláris dikroizmus)



2. ábra

adatok jelzik - lényegében megegyezik. Erre alapozva, a termo-optikailag indukálható változások keresése során először a termikus instabilitásra utaló jeleket keresünk, pontosabban olyan hőmérsékleti átmeneteket, amik a denaturációs hőmérséklet alatti tartományban játszódnak le és amelyek specifikus átrendeződésekhez rendelhetők (pl. trimér-monomer átmenet, vagy a királis makrodomének felbomlása); ezt követően vizsgáltuk ill. vizsgáljuk, hogy ugyanazon átmenetek fényel is kiválthatók-e és kellően specifikusak.

1.2. Célkitűzések

A pályázat fő célkitűzése az volt, hogy feltárja a termo-optikai szerkezetváltozások fizikai-molekuláris mechanizmusának részleteit, a szerkezetváltozások pontos természetét és fiziológiai jelentőségét. Célunk volt annak a vizsgálata is, hogy a magasabbrendű növények fő fénybegyűjtő komplexein (LHCII) kívül milyen más egységekben ill. fotoszintetikus szervezetekben mutatható ki hasonló eredetű szerkezetváltozás. Kutatási feladatul tűztük ki a vizsgálatba vont szerkezetek feltárását ill. pontosabb leírását is. Speciális mérési módszerek bevezetését ill. egyes stressz körülmények tanulmányozását azért tartottuk fontosnak, mert ezek segítségével azonosíthatjuk a termo-optikai válaszreakciókat és/vagy jobban megérthetjük azok élettani szerepét.

2. Termo-optikai szerkezetváltozások más fotoszintetikus rendszerekben

Korábbi vizsgálataink során termo-optikai szerkezetváltozásokat LHCII-tartalmú rendszerekben, magasabbrendű növények izolált, gránumos kloroplastszáibaiban és azokból izolált LHCII preparátumokon mutattunk ki (v.ö Cseh és mtsai 2005 és referenciái). Annak eldöntésére, hogy ez a (korábban nem ismert) fotofizikai mechanizmus, ill. a termo-optikai effektus vagy termo-optikai eredetű szerkezetváltozás előfordul-e más antenna-rendszerekben, ill. kimutatható-e esetleg fotokémiai aktivitást is mutató fotoszintetikus rendszereken, az alább ismerttetendő vizsgálatokat végeztük.

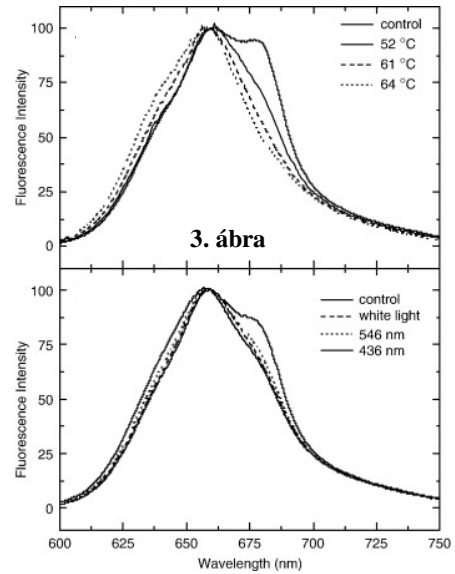
2.1. Cianobakteriális antenna: a fikobiliszómát érintő változások

Cianobaktériumokban a fő fénybegyűjtő komplex a fikobiliszóma (PBS), ami egy a tilakoid membránhoz (annak sztróma oldalához) csatolt nagy méretű multimér protein komplex. A PBS-k rendezett módon helyezkednek el a membrán felszínén és egy-egy egység (nagy méretének köszönhetően) több PSII reakciócentrumot is képes gerjesztési energiával ellátni. A magasabbrendű növényekhez hasonlóan (Horton és mtsai 2005), a cianobaktériumok is képesek fénybegyűjtő rendszerük működését a környezeti tényezők (hőmérséklet, fényintenzitás) függvényében finom-hangolni, amire több javasolt mechanizmus ill. modell található az irodalomban: az ún OCP protein segítségével történő kioltási mechanizmus (Rakhimberdieva és mtsai 2004, Wilson és mtsai 2006), a PBS mobilitására alapuló modellek (Mullineaux és mtsai 1997, Sarcina és mtsai 2001), és a PBS-k energetikai lekapcsolódása a membránról ill. a K1-a-ról (Schreiber, 1980). Ez utóbbi modellek mindegyike a PBS bizonyos fokú fizikai leszakadását ill. leválását feltételezik.

Vizsgálataink során *Synechocystis* PCC 6803 és (a termotoleráns) *Thermosynechococcus elongatus* cianobaktériumokat használva – abszorpció és fluoreszcencia spektroszkópiái

módszerekkel - tanulmányoztuk a leszakadás hőmérséklet-függését (20 és 80 °C között) ill. azt, hogy az előidézhető-e (ill. milyen körülmények között idézhető elő) magas fényintenzitású megvilágítással (fiziológiai hőmérsékleten, 10 min – 3 óra, 600 – 7 500 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foton flux denzitású (PFD) fehér vagy széles sávú monokromatikus megvilágítás mellett).

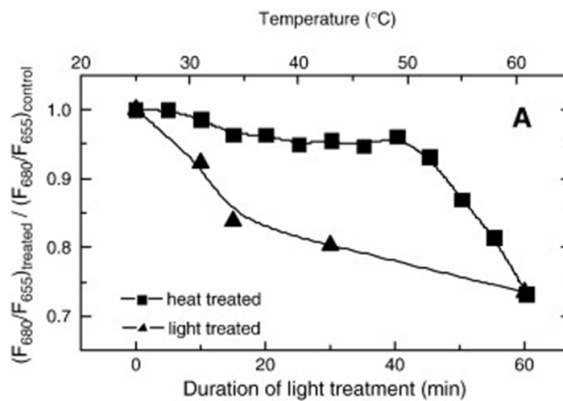
Az abszorpciós spektrumok tanúsága szerint 1500 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD mellett még 3 óra után sem, ill. 7500 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD mellett 1 óra után sem alakult ki jelentős pigment lebomlás (Synechocystis, 25 °C-on nevelt sejtek), ami jól mutatja ezen sejtek nagy mértékű toleranciáját magas fényvel szemben. Hő-stabilitásukat pedig az jelzi, hogy az antenna komplexek 60 °C-ig nem mutattak abszorpcióval kimutatható változást. Ezzel szemben, amint azt a szobahőmérsékltű fluoreszcencia mérések jelezték, 564 nm-es gerjesztés mellett (a PBS domináns abszorpciója) a hőkezelt sejtek fokozatosan 50 °C and 60 °C között elveszítik hosszú hullámhosszú emissziójukat, jelezve a PBS és a KI-a közötti energiaátadási folyamatok sérülését és/vagy megszakadását (3. ábra). Ugyanakkor, 435 nm-es (direkt KI-a) gerjesztés mellett ebben a tartományban lényegi változás nem következett be.



3. és 4. ábra

Amint azt a 4. ábra mutatja, viszonylag gyenge (de a nevelési fényintenzitásnál erősebb) megvilágítás (600 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD) nagyon hasonló hatást vált ki. Ez erősen valószínűsíti a termo-optikai mechanizmus fellépését – amivel a gerjesztési energia reakciócentrumok felé vándorlása így megszakítható vagy legalábbis gátolható. Összehasonlító vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a leszakadásért felelős disszipáció a tilakoid membránban is előidézhető.

77K fluoreszcencia méréseink megmutatták azt is, hogy a hőmérsékleti- és fény-kezelések, ismét nagyfokú hasonlóságot mutatva, a (véltőleg leszakadt) PBS-kben kisebb szerkezeti átrendeződések is bekövetkeznek (5. ábra).

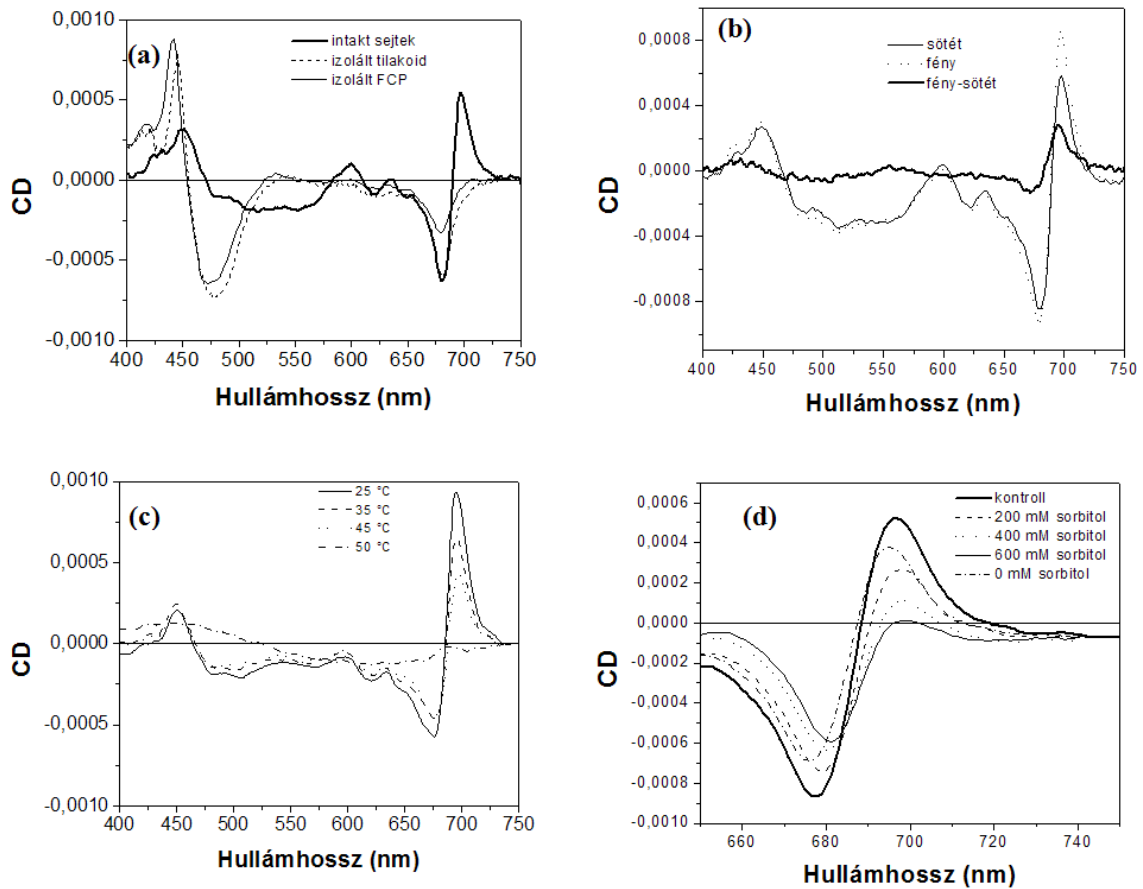


5. ábra

Vonatkozó folyóirat közlemény:
Stoitchkova és mtsai 2007 BBA-Bioenergetics

2.2. Kovamoszatok antenna- és membránrendszerének szerkezete és szerkezetváltozásai

Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia segítségével karakterizáltuk a pigment-pigment kölcsönhatásokat különböző szerveződési szinteken *Phaeodactylum tricornutum* kovamoszatok mintákon: egész sejteken, izolált tilakoid membránokon és izolált fotoszintetikus fénybegyűjtő pigment-protein antenna (fukoxantin-klorofill protein, FCP) komplexeken (6. ábra). Megállapítottuk, hogy egész sejtekben erős CD sáv figyelhető meg (+) 698 nm környékén, mely differenciális fényszórással társul. Ez a sáv psi (polimer és só-indukálta) típusú jellegzetességeket mutat. A sejtek CD spektrumában továbbá megfigyeltünk sávokat (-)679 nm, (+)445 nm és (-)470 nm-nél is, melyek jelen voltak izolált tilakoid membránokban és FCP komplexekben is. A (+)445 nm és (-)470 nm-nél található sávpár exciton CD jelnek tekinthető és a fukoxantin (Fx) és klorofill *a* és *c* pigmentekből ered, míg a (-)679 nm-es sáv valószínűleg egy erős, indukált intrinzikus CD jel. Megfigyeltük, hogy a sejtekben azonosított (+)698 nm-es CD sáv intenzitása reverzibilisen változott erős fényvel történő megvilágítás hatására, míg a többi CD sáv intenzitása nem, vagy alig változott (6b. ábra). Hasonló változásokat figyeltünk meg hőkezelés hatására (6c. ábra), illetve a közeg ozmotikus nyomásának változtatása esetén is (6d. ábra).

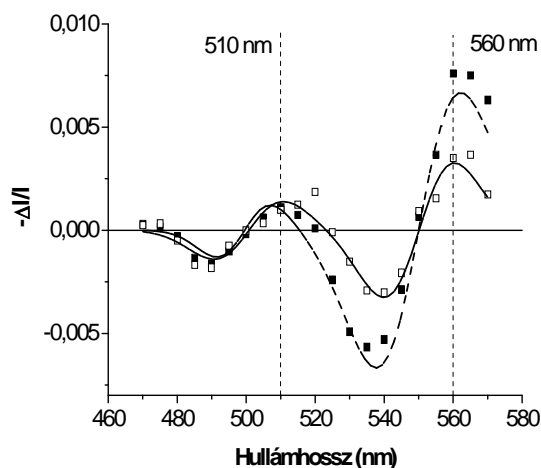


6. ábra

Izolált tilakoid membránok esetén a (+)698 nm-es sáv (mely eltűnt a sejtek feltörésének hatására) részben visszaállítható a közeg magnézium-koncentrációjának növelésével. A psi-típusú CD sáv visszaállítása jól korrelált a fotoszintetikus elektrontranszport hatékonyságára

utaló paraméterek, a PSII maximális kvantumhatásfokának (F_v/F_m) és a nem-fotokémiai kioltás mértékének (NPQ) emelkedésével. Az eredményekből arra következtettünk, hogy az FCP komplexek királis makro-szerveződése megvalósul intakt sejtekben, ahol a tilakoidok multilamelláris rendszerben rendeződnek el, izolált tilakoid membránokban azonban ez a hosszú távú szerveződés – szemben a magasabbrendű növények izolált tilakoid membránjaival – sokkal kevésbé figyelhető meg. A komplexek makro-szerveződése a sejtekben reverzibilis változásokat mutat a különböző környezeti tényezők hatására, ebből következőleg ez a rendezettség egy dinamikus rendszert biztosíthat a fényenergia hasznosításában és a fotoprotekcióban fontos folyamatok számára kovamoszatokban.

Egész *P. tricornutum* sejteken elvégzett elektrokróm abszorpcióváltozás-mérésekkel kimutattuk, hogy a Fx molekulák egy csoportja igen érzékeny a transzmembrán elektromos térre – erre utal a 560 nm környékén megfigyelhető igen erős abszorpció tranziens, míg a rövidebb hullámhosszon elnyelő Fx molekulák csak sokkal kisebb abszorpció tranzienseket mutatnak 515 nm környékén. Ezek alapján két fő Fx molekula-csoport jelenlétére következtethetünk, melyet alátámasztottak korábbi, Stark-spektroszkópiával elvégzett mérések izolált FCP komplexeken (Premvardhan és mtsai 2008). Megállapítottuk, hogy a magas és alacsony fényintenzitásokon növesztett kovamoszat sejtek jelentősen különböznek a térre érzékeny Fx molekulák mennyiségében (7. ábra).



7. ábra

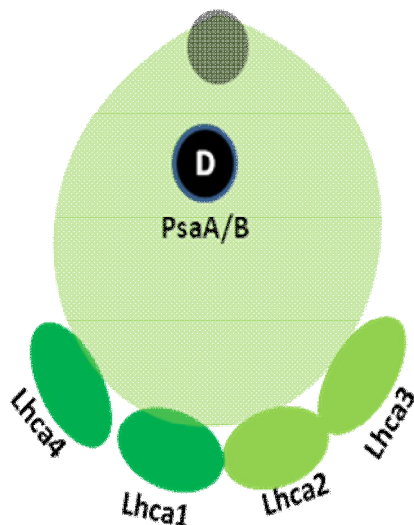
77K fluoreszcencia spektroszkópiai mérések is alátámasztották az Fx molekulák heterogenitását; noha mindkét fő Fx csoport igen hatékony gerjesztési energiátaszfert mutatott a kl *a* molekulákra, a vöröseltolódott forma inkább a PSII-t táplálta energiával a PSI-el szemben, míg a rövidebb hullámhosszú forma esetén ennek a fordítottja igaz. Lineáris dikroizmus (LD) spektroszkópiai mérésekkel megállapítottuk, hogy a két fő Fx forma membránban történő orientációja is különbözik. Hasonló eredményeket kaptunk egy másik kovamoszat faj (*Cyclotella meneghiniana*) esetén is, ami arra utal, hogy a Fx és a FCP szerkezeti és funkcionális heterogenitása általános jelenség kovamoszatokban.

Együttműködésben a Lipcsei Egyetem Növényélettani Tanszékével elvégeztük izolált FCP komplexek különböző oligomerizációs állapotainak biokémiai és spektroszkópiai karakterizálását is. Megállapítottuk, hogy az FCP komplexek magasabb oligomerizációs állapotában a pigmentek hatékonyabb gerjesztési energiátaszfert mutatnak, valamint a pigmentek közötti exciton kölcsönhatások is erősebbek. Ezért az oligomer állapotú FCP komplex reprezentálhatja a natív tilakoid membránokban jelenlevő antennaszerveződést

Vonatkozó folyóirat közlemények: *Lepetit és mtsai 2007 Biochemistry*, *Szabó és mtsai 2008 Photosynth Res*, *Szabó és mtsai 2010 Chem Phys*

2.3. Szerkezetváltozások az első fotokémiai rendszer (PSI) fénybegyűjtő antenna szerveződésében

A fotoszintézis fényhez kapcsolódó folyamatai a tilakoid membránokhoz kötöttek, melyeknek az egyik fő komponense az I. fotokémiai rendszer (PSI) és az ehhez kapcsolódó fénybegyűjtő komplex (antenna komplex vagy LHCI). A PSI kristályos szerkezete ismert (Ben-Shem és mtsai, 2003). A PSI core központi részét egy heterodimer protein komplex, a PsaA,B alkotja. A PSI disztális antennája az LHCI, melyet négyféle klorofill a/b-protein építi fel (Lhca1-4) és asszimerikusan (félhold alakúan) kapcsolódik a core-hoz (8. ábra).



8. ábra

Amíg PSII és az ahhoz kapcsolódó antenna (LHCII) szerkezete és funkciója jól ismert (flexibilitása révén több regulációs folyamatban vesz részt), addig a PSI-LHCI szuperkomplex szerkezet-funkció kapcsolata sokkal kevésbé ismert. Egy közelmúltban megjelent tanulmány szerint az LHCI is részt vesz fotoprotekciós mechanizmusokban az által, hogy hosszabb ideig taró megvilágítás során ledisszociál a PSI core-ról (Alboresi és mtsai, 2009). Levleken végzett hőstressz vizsgálatok szerint, hasonló disszociációs folyamatok játszódnak le hő hatására (Lípová és mtsai, 2010). Ezek az adatok az sugallják, hogy a PSI-LHCI szuperkomplexek szintén résztvesznek a regulációs folyamatokban.

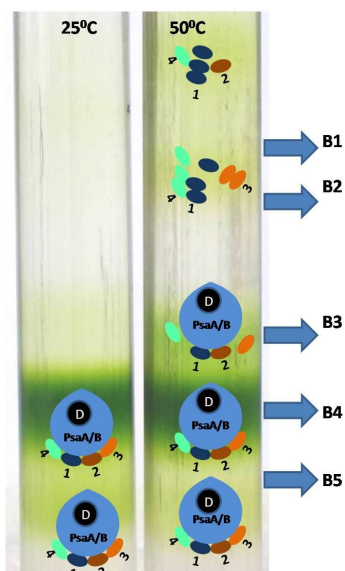
Munkánk során izolált, PSI-ben dús sztróma tilakoid membránokon és izolált PSI-LHCI szuperkomplexeken kerestünk választ a hő-és fény indukálta PSI reorganizációjára, regulációs folyamataira.

Izolált sztróma membránokon cirkuláris dikroizmus (CD) és differenciál pásztázó kalorimetria (DSC) méréseket végeztünk. A DSC adatok alapján négy hőmérsékleti átmenetet figyeltünk meg. A CD és a DSC mérések eredményiből arra a következtetésre jutottunk, hogy az első hőmérsékleti átmenet az LHCI disszociációjával és degradációjával, míg a másik három hőmérsékleti átmenet a PSI degradációjával van kapcsolatban. Az LHCI degradációja nagyban függ az alkalmazott hőmérséklettől és a kezelés idejétől. Fehér fényvel megvilágítva a PSI-LHCI szuperkomplexeket szintén az LHCI disszociációját figyeltük meg, ez a disszociáció kifejezettebb, mint a hő indukálta LHCI disszociáció. Ezeket az eredményeket közlésre előkészítettük. (Krumova, Várkonyi, Kovács, Lambrev, Todinova, Busheva, Taneva és Garab: Heat- and light-induced detachment of the light-harvesting antennae of photosystem I.) Adataink jól összeegyeztethetők a „biztonsági szelep” hipotézissel (Alboresi és mtsai, 2009).

Izolált PSI-LHCI szuperkomplexeken CD, mély hőmérsékletű (77K) fluoreszcencia, P700 és Western-blott méréseket végeztünk. A mintákat 10 percig kezeltük sötétben 4-90 °C között, a fénykezelés során 2000 foton m⁻² s⁻¹ PFD megvilágítást alkalmaztunk. A CD és 77K fluoreszcencia mérések eredményei alapján megállapítottuk, hogy 50 °C-on a PSI-LHCI szuperkomplex finom szerkezete megváltozik, az LHCI disszociációja figyelhető meg; ugyanakkor ezen a hőmérsékleten még nem következik be a PSI denaturációja. Hasonló LHCI disszociációt figyelhattunk meg a PSI core-ról a fénykezelés során is azzal a különbséggel, hogy a kezelés során feofitinizációt is megfigyeltünk.

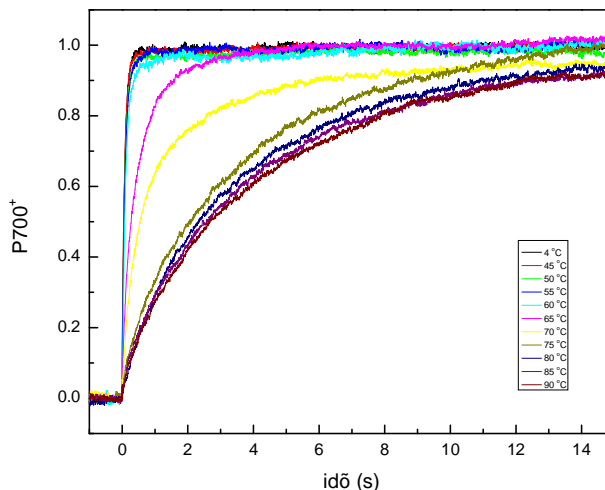
Annak eldöntésére, hogy az Lhca1-4 klorofill-protein komplexek milyen sorrendben válnak le Western-blott analízist végeztünk. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a

leggyorsabban illetve elsőként az Lhca1 komplex disszociál le a PSI core-ről. Míg az Lhca3 magas hőmérsékleteken és csak részlegesen válik le (9. ábra).



9. ábra

A P700 oxidációs kinetika lassulása jól tükrözi a PSI abszorpciós hatáskeresztmetszetének csökkenését ami az antenna komplexek leválásának következménye, majd pedig a PSI fokozatos károsodását jelzi (10. ábra).



10. ábra

2.4. A második fotokémiai rendszer (PSII) reakciócentrum komplexét és oxigénfejlesztő komplexét (OEC) érintő változások

A termo-optikai szerkezetváltozások kimutatására elsősorban az antennakomplexekben van jó esély. Ezekben a komplexekben ugyanis könnyen ellenőrizhető, hogy fotokémiai reakciók nem játszanak szerepet. A termo-optikai effektus ismertetése során (külföldi konferenciákon és intézeti szeminárium előadásokon) gyakorta felmerült az a kérdés, hogy vajon szerepet játszhat-e ez az effektus a fotokémiai reakciócentrumok vagy ahhoz kapcsolódó egységek reverzibilis vagy irreverzibilis változásaiban is. Jóllehet ezekre a kérdésekre – a megkezdett kutatások eredményei alapján – nem tudunk határozott választ adni, röviden ismertetem az ebben az irányban tett lépéseinket és eredményeinket, melyek mindazonáltal más vonatkozásban is érdeklődésre tarthatnak számot.

A fotoszintetikus fotokémiai reakciócentrumok közül elsősorban a PSII tart számot érdeklődésre. Jól ismert, hogy ez a reakciócentrum hőstabilitása viszonylag alacsony hőmérsékleten, 40 °C fölött, könnyen inaktíválható; magas fényen pedig ez a fotoinhibíció primér targetje. Ezért könnyen elképzelhető, hogy a – fotoszintetikus hasznosulni nem képes, fölös ('excess') gerjesztési energia disszipációja, ami a töltések rekombinációja során keletkezik, hozzájárul a reakciócentrum károsításához. Természetesen, nem feledkezhetünk meg a reaktív oxigén szpecieszek (ROS) ismert

szerepéről sem (Melis TIPS 1999). Mindazonáltal, a közvetlen hőhatás szerepe sem zárható ki – már csak a hőmérséklet okozta károsodás miatt sem. A PSII reakciócentrumnál is érzékenyebb a hozzá kapcsolódó Mn-tartalmú vízbontó rendszer (OEC), amely (magasabbrendű növényekben) már 40 °C környékén szétesik. Hasonló módon, rendkívül érzékeny ez a komplex - a Mn komplex magas UV abszorpciója miatt - UV-B indukálta ún. donor-oldali fotoinhibícióra (Zsiros és mtsai 2006, Hakala és mtsai 2005).

Vizsgálataink során alapvetően három különböző megközelítést alkalmaztunk. Hő impulzusokkal (később hőstressz körülmények között) inaktiváltuk az OEC-t. Kimutattuk, hogy az OEC teljes inaktiválását követően is jelen van egy nagy méretű elektron donor 'pool', amit később aszkorbátként azonosítottunk és kimutattuk, hogy ez a PSII reakciócentrumok hatékony elektron donoraként tud működni, ami (amint azt még nem közölt eredményeink mutatják) késlelteti a donor oldali fénygátlás fellépését ill. a PSII reakciócentrum inaktiválódását.

Egy másik megközelítésben (amit Norio Murata-val együttműködésben végeztünk, de közlemény egyelőre nem született belőle) különböző cianobakteriális OEC protein mutánsokat vizsgáltunk, amikben – méréseink egyértelműen igazolták – a termikus instabilitás szoros összefüggést mutatott a fény-instabilitással. Ezek a kísérletek (inkonklúzív voltak mellett is – ennek részletes taglalástól eltekintek) arra bátorítanak bennünket, hogy a termo-optikai hatásmechanizmus legalábbis figyelmet és részletesebb vizsgálatot érdemel, amin tovább dolgozunk.

A harmadik megközelítésben a PSII reakciócentrum – fluoreszcencia indukciós kinetikával detektálható – konformáció-változásait tanulmányozzuk (Alfred Holzwarth és Gert Schansker közreműködésével). Ez esetben sem találtunk egyértelmű bizonyítékot a termo-optikai effektus fellépésére, de kizárni itt sem tudtuk, hogy a tranziens elektromos tér hatása mellett számolni kell a disszipáció okozta termikus tranziensek jelenlétével is. Ez a projekt részét képezi – ill. elvezetett – egy Gert Schansker által elnyert projekthez. Bejövő Mobilitás NKTH-OTKA-EU 7KP (Marie Curie akciók) által közösen finanszírozott 'MOBILITÁS' pályázat (HUMAN-MB08) részeként: MB08-B 82403 „Fényindukált konformációváltozások a második fotokémiai rendszer reakciócentrumában és következményei az in vivo klorofill a fluoreszcencia tranziensekre értelmezésére” címmel.) Az előzetes eredményeket több rangos nemzetközi konferencián bemutattuk ill. bemutatjuk – a közlemény jelenleg előkészületi fázisban van (Schansker G, Kovács L, Tóth SZ, Jávorfí T, Holzwarth AR, Garab G (2010) A light-driven conformational change in photosystem II reaction centers affects the fluorescence yield and determines part of the fluorescence rise. In preparation).

Vonatkozó folyóiratcikk közlemények: *Tóth és mtsai 2007 BBA – Bioenergetics, Tóth és mtsai 2009 Plant Physiol*

3. Szerkezeti háttér

A szerkezetváltozások természetének feltárásához szükség van a szerkezet lehetőleg minél pontosabb ismeretére. Ebben az irányban is több vizsgálatot folytattunk – különböző módszerekkel, köztük elektron mikroszkópiával (EM), elektron tomográfiával (ETM), pásztázó transzmissziós EM-al (STEM), kisszögű szórás technikákkal és

különböző spektroszkópai módszerekkel, mely vizsgálatok a hierarchikusan felépített szerkezetek különböző szervezetségi szintjeiről nyújtanak információt.

Valamennyi szerkezet vizsgálatában használtuk a CD és LD (lineáris dikroizmus) spektroszkópia módszerét. A szerkezetvizsgálatokban, különösen anizotróp biológiai szerkezetek feltárásában, így a kloroplasztiszok erős kettőtörésének feltárásában is, használtuk a DP-LSM módszerét, ami használható többek között cirkulárisan poláros luminszcencia (CPL) vagy fluoreszcencia detektált lineáris dikroizmus (FDLD) leképezésekben is. A differenciál-polarizációs lézersugárpásztázó mikroszkóp (DP-LSM) berendezést ill. a DP kiegészítő egységet szabadalmi eljárás alá vontuk.

Vonatkozó folyóiratközlemények: *Steinbach és mtsai 2008, Cytometry, Gombos és mtsai 2008 Cytometry, Steinbach és mtsai 2009 Acta Histochem, Steinbach és mtsai 2010 J. Fluor*

Szabadalmi bejelentés: *Garab és Pomozi 2007 P0700635*

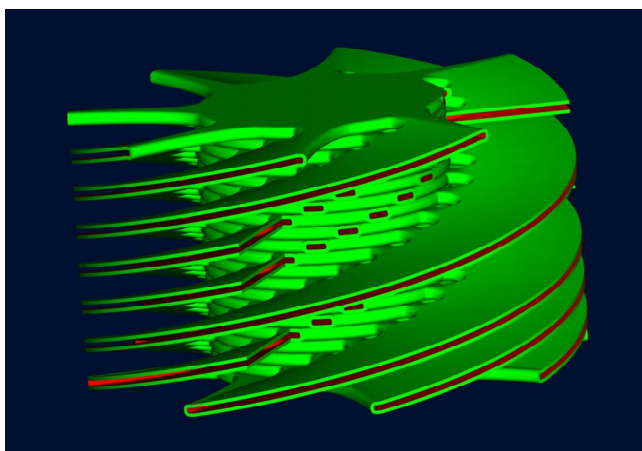
3.1. A gránumos kloroplasztisz 3D membránszerkezete és belső szerveződése

Korábbi vizsgálataink – elsősorban CD spektroszkópai módszerekkel, biokémiai analitikai és EM segítségével (Barzda és mtsai 1994, Simidjiev és mtsai 1997, 2000) valamint DP-LSM (kettőtörés) leképezéssel (Garab és mtsai 2005) - megmutattuk, hogy a gránumos tilakoid membránok és az LHCI lamelláris aggregátumai magas fokú rendezettséget mutató királsan szervezett makrodoméneket tartalmaznak (Garab és Mustárdy 1999); kvázi-kristályos szerkezeti részek kimutatásával hasonló következtetésre jutottak fejlett EM technikák alkalmazásával is (Dekker és Boekema 2005). Spektroszkópai vizsgálataink, az EM-mel szemben, megengedik, hogy ezen szerkezetek flexibilitását és dinamikus szerkezetét is vizsgálni tudjuk (v.ö Garab és van Amerongen 2009 és referenciái). A spektroszkópai sajátságok fontosak a 3-dimenziós membránszerkezet megértéséhez is, A membránszerkezet - 'state-of-the-art' állása szerinti - modelljét 2003-ban publikáltuk (Mustárdy és Garab 2003). Ennek értelmében a gránumokban a lapos, egymáshoz tapadó zárt vezikulum membránok multilamelláris rendszerét, sztróma tilakoidok veszik körül helikális rendben. Összeköttetéseket és a membrán rendszer és a belső vizes fázis folytonosságát a marginális régiók nyílásai biztosítják (11. ábra). A modell felülvizsgálatát – kiderült, finomítását – újabb modellek megjelenése tette szükségessé. (Shimoni és mtsai 2005).

Megjegyzendő, hogy ez a kérdéskör, a gránumos kloroplasztiszok tilakoid membránrendszerének

szerveződése önmagában is figyelmet érdemel, hiszen ez a

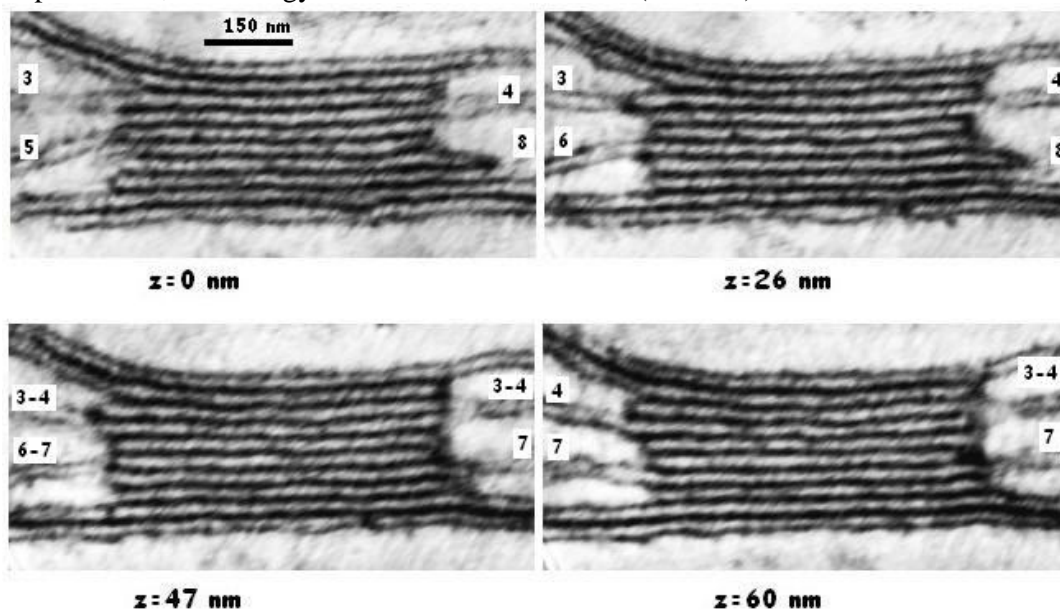
szerkezet – bár az evolúció egy viszonylag kései, 'mindössze' néhány száz millió éves



11. ábra

terméke, de - rendkívül sikeres terméke, amely szinte kivétel nélkül valamennyi magasabbrendű növény leveleiben megtalálható. Ezért a gránumos tilakoid membrán szerkezet a Bioszféra legelterjedtebb - de egyúttal minden bizonnyal az egyik legbonyolultabb - háromdimenziós membránrendszere. Ennek megismerése alapvető fontosságú a fotoszintetikus fényenergiahasznosítás mechanizmusainak megértéséhez, és nélkülözhetetlen a termo-optikai szerkezetváltozások értelmezéséhez is.

Elektron tomográfiai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a korábban javasolt helikális modell alapvető szerkezeti elemei helytállóak, bár a helicitás közel sem olyan szabályos és periódikus, mint ahogy azt korábban hittük/hittük (12. ábra).



12. ábra

A közleményben részletesen kifejtett kvázi-helikális modell kielégítő magyarázatot ad a szerkezet önszerveződő kialakulására is. Ehhez figyelembe kell venni (i) az LHCII és PSII komplexek makrodomén-szerveződő képességét (ami a két fotoszisztéma laterális szétválasztásának is alapja), (ii) ezen domének hajlandóságát összetapadásra (ami kedvező, sztróma oldalon viszonylag lapos, egymáshoz jól illeszthető szerkezetüknek is köszönhető), továbbá (iii) a tilakoid membránok fúziós képességét (ami összefügg azzal a sajátosságukkal, hogy nagy mennyiségben tartalmaznak ún nem-lamella-képző lipideket – l. 3.3.).

A gránumos szerkezet flexibilitásának, fényindukált szerkezetváltozásainak és általában dinamikus sajátosságainak megértésében sok segítséget nyújthatnak – a projekt keretei között megkezdett – kisszögű neutron szórás vizsgálataink is. Ezek jelenleg adatgyűjtési fázisban vannak ill. eredményeink több nemzetközi konferencián már előzetes formában bemutatásra kerültek (pl. Nagy, Kovács, Lambrev, Miloslavina, Székely, Porcar, Callow, Holm, K. Kirksensgaard, Rosta, Peters, Posselt, Garab: Structure and flexibility of thylakoid membranes in plants and in algal cells revealed by small angle neutron scattering, 2010, Tianjin, Kína). Ezeknek a vizsgálatoknak a folytatására és kiterjesztésére nyújt módot az NKTH-OTKA “Önszerveződő lamelláris molekuláris szerkezetek struktúrája és dinamikai sajátosságai” c. pályázatunk (CNK 80345).

Vonatkozó folyóiratcikkek: Mustárdy és mtsai 2008 *The Plant Cell*, Garab és Mannella 2008 *The Plant Cell*.

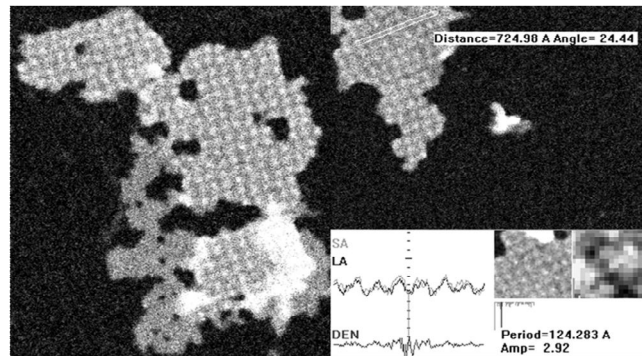
3.2. Az LHCII *in vivo* és *in vitro* szerkezetei; rekonstruált komplexek

Amint azt a gránumos szerkezettel összefüggésben megjegyeztem (l. 3.1.) az izolált LHCII aggregátumai a gránumos szerkezethez hasonló multilamelláris szerkezeteket vesznek föl, amelyek spektrális sajátágaikban is nagyon hasonlítanak a gránumos szerkezetekhez. További nagyon fontos hasonlóságuk szerkezeti flexibilitásuk ill. képességük termo-optikai szerkezetváltozásokra (Holm és mtsai 2005, Cseh és mtsai 2005 és referenciáik). A spektrális sajátások legmarkánsabb hasonlósága az ún. psi-típusú CD jel jelenléte. Ennek pontosabb eredetét szeretnénk volna feltárni. Számos vizsgálati eredményünk van, melyek azonban a projekt keretein nem voltak lezárhatók. Pl. STEM segítségével is sikerült kimutatnunk a multilamellaritás létét és azonosítanunk periódikus struktúrák jelenlétét és fő szerkezeti elemeit (13. ábra).

Ezeket az eredményeket a soron következő Light Harvesting Antenna konferencián mutatjuk be (Tianjin, Kína 2010. augusztus 18-22: Miloslavina, Lambrev, Kovács, Várkonyi, Jávorfí, Wall, Hind, Garab. Magnetic CD and CD of oriented thylakoids and LHCII samples). Ezen eredmények alapján jó okkal hisszük, hogy (Norbert Krauss-tól, London, kapott) mikrokristályokon, azaz sokkal jobban definiálható anyagon, hasonló CD eredmények nyerhetők és akkor a közel atomi szerkezetű struktúra (Liu és mtsai 2004) segítségével a psi-típusú CD eredete – elsőként az ilyen aggregátumok közül – meghatározhatóvá válik. Mivel a psi típusú CD számos magasan szervezett rendszer sajátja (Tinoco és mtsai 1987), és mert ezen a

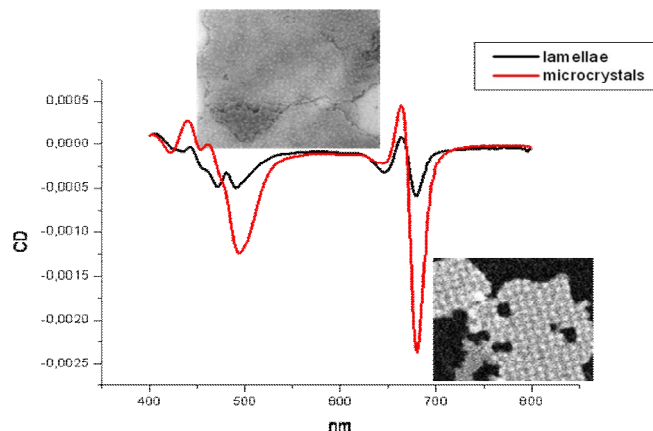
szerkezeti szinten számos élettanilag fontos átrendeződés mehet végbe (pl. sejtmagokban, protein aggregátumokban, gránumos kloroplasztiszokban), a spektrális paraméterek pontos szerkezethez rendelése nagyon fontos előrelépés lenne. A feladat megoldása vagy

LHCII microcrystals (STEM)



LHCII

— microcrystals and — lamellae



13. ábra

legalábbis pontosabb megközelítő megoldása lehetővé válik az OTKA CNK projekt keretei között.

Rekonstitúciós kísérleteink LHCI-n több szempontból érdekesek. Ezzel a módszerrel jobban definiált komplexek hozhatók létre – ui. egyébként, természetes körülmények között az LHCI trimerek heterogén természetűek. Másfelől, ilyen módon állíthatók elő *in vitro* LHCI mutánsok és pigment összetételben különböző komplexek. Az így előállítható komplexek vizsgálata fényt deríthet arra is, hogy milyen tényezők befolyásolják a trimerek hőmérsékleti- és fény-stabilitását ill. a trimér-monomer átmenetet. Az előállított mutánsok, amikben a lumen oldali negatívan töltött csoportokat cseréltük ki – várakozásainkkal ellentétben – nem mutattak lényeges eltérést a trimér-monomer átmenetben. Vizsgálataink ugyanakkor megmutatták, hogy a lumenbe nyúló polipeptid loop - jóllehet távol van a pigmentkötő régiótól - jelentősen befolyásolhatja a pigment-tartalmat és a komplex konformációját. Hosszabb távon rekonstitúciós mutánsok alkalmasak lehetnek arra, hogy a disszipációs hőcsomagok sorsát követhessük. Erre vonatkozó projekt-javaslatunk befogadást nyert az Amszterdami Egyetemen (VU) működő Európai Lézer Centrum fs-os feloldású mid-IR készülékére.

LHCI aggregátumokat és szolubilizált trimereket CD és LD spektroszkópiával és időfelbontású fluoreszcencia spektroszkópia segítségével tanulmányoztuk. Az eredményeket összevetettük a tilakoid membránokban megfigyelttel, hogy képet kapjunk a LHCI natív állapotáról *in vivo*. Megfigyeltük, hogy a lamelláris aggregátumok CD spektrumai nagymértékben hasonlóak a nem kapcsolt tilakoid membránokéihoz, míg a n-dodecyl- β ,D-maltoside-dal, n-octyl- β ,D-glucopyranosid-dal és Triton X-100-zal szolubilizált trimerek spektruma jelentősen különbözött a Soret tartományban. Detergenssel szolubilizált tilakoid membránok és LHCI aggregátumok CD spektrumai hasonlóak az izolált trimerekéihez. LHCI szolubilizálása nagymértékű változásokat idézett elő a spektrumokban és a fluoreszcencia élettartam megnövekedéséhez vezetett. Ezek az eredmények alátámasztják azt a feltételezést, hogy a LHCI lamelláris aggregátumai képviselik a LHCI native szerveződését a tilakoid membránokban. Az eredmények azt is mutatják, hogy a LHCI szupramolekuláris szerveződésének – valószínűleg specifikus trimer-trimer kölcsönhatások miatt – jelentős hatása van a pigment-kölcsönhatásokra a komplexekben.

Vonatkozó folyóiratcikkek: *Lambrev és mtsai 2007 BBA – Bioenergetics*, *Yang és mtsai 2008 BBA – Bioenergetics*, *Garab és Amerongen 2009 Photosynth Res*

3.3. A tilakoid membrán lipid fázisainak meghatározása, nem-lamella-képző fázis(ok) jelenléte

A tilakoid membránok és általában az energiakonvertáló membránok egyik sajátosága, hogy nagyon magas bennük az ún. nem-lamella-képző lipidek aránya. Ilyen lipidek minden ismert biológiai membránban előfordulnak de pontos szerepük nem ismert – ez a biológiai membránok máig egyik fontos alapkérdése. A 'bulk' fázisban, amint azt egy korábbi munkahipotézis formájában javasoltuk, fontos szerepet tölthetnek be a lipid:fehérje arány beállításában (Garab és mtsai 2000). Ennek értelmében a nem-lamella-képző (vagy nem-bilayer) lipidek szegregációs képességükkel biztosítják a megfelelő lipid:protein arányt, adott esetben, a tilakoidokban, a magas, kb 50%-os relatív nem-

bilayer lipid tartalomnak köszönhető a magas 70-80%-os protein koncentráció. (Tilakoidokban a nem-bilayer lipid az MGDG, monogalaktozil diacilglicerol, fontos galaktolipid még a DGDG (digalaktozil diacilglicerol) is, amely kb 30%-át teszi ki a lipid mennyiségnek). Hipotézisünk másik része volt, hogy a szegregáció és potenciális újraelépések miatt hozzájárulnak a membrán flexibilitásához, ill. a membrán-dinamikához. (Más módon, egy frusztrált állapot fenntartásával de Kruijff (1997) is javasolta korábban, hogy ezek a lipidek fontos szerepet tölthetnek be a membrán dinamikai sajátságainak megszabásában. Hipotézisünk ezzel szemben a ki- és belépést is megengedi.)

A kérdéskör membrándinamikával, és közelebbről a termo-optikailag indukált reverzibilis szerkezetváltozásokkal való összefüggését – lipid-LHCII lamelláris aggregátumokon és specifikusan MGDG:LHCII rendszereken - korábbi kísérleteink erősen valószínűsítették (Simidjiev és mtsai 1998, 2000).

Hipotézisünk egyik – kísérletileg is ellenőrizhető - következménye, hogy a lipidek nem-bilayer fázist is alkotnak, tehát az általánosan elfogadott nézettel szemben (l. pl. Lee 2000) a lipidek nem csak kettősréteg struktúrákban találhatóak funkcionális tilakoid membránokban. Ezt ellenőrizendő, szisztematikus vizsgálatokat végeztünk vad típusú és mutáns kloroplasztisz tilakoid membránokon – széles hőmérsékleti tartományban.

P-NMR vizsgálatok segítségével sikerült kimutatnunk, hogy izolált, funkcionálisan aktív kloroplasztisz tilakoid membránok lipidjei nem kizárólag kettősréteg szerkezetet vesznek fel. A nem-kettősréteg struktúrák - nagy valószínűséggel - a tilakoid lumenban a kettősréteg membránnal asszociált szerkezetek. Merocyanin (MC540) fluoreszcens lipid marker festékkel kapott stacionárius és ultragyors spektroszkópiai eredményeik is azt mutatják, hogy a lipidek leírása egyetlen fázissal nem lehetséges. Ezek az eredmények ugyan nem tájékoztatják a heterogenitás lipid-fázishoz köthető természetét, de összhangban vannak az NMR adatokkal. DGDG-ben hiányos (és így MGDG-ben relatíve földúsult membránok) - CD, MC540 ultragyors spektroszkópiai mérések, fluoreszcencia élettartam és a membránpermeabilitásra jellemző elektrokróm abszorpciós tranziensek segítségével meghatározott – hőstabilitása, vélhetőleg a lipid-keverék túlságosan magas nem-lamellaképző hajlamának köszönhetően, szignifikánsan alacsonyabb, mint a vad típusú membránoké. Ezen munkák képezték Sashka Krumova, holland-magyar 'szendvics program keretében, Wageningenben megvédett doktori értekezésének alapját.

Vonatkozó folyóiratközlemények: *Krumova és mtsai 2008a,b BBA – Biomembranes, 2010 Photosynth Res*

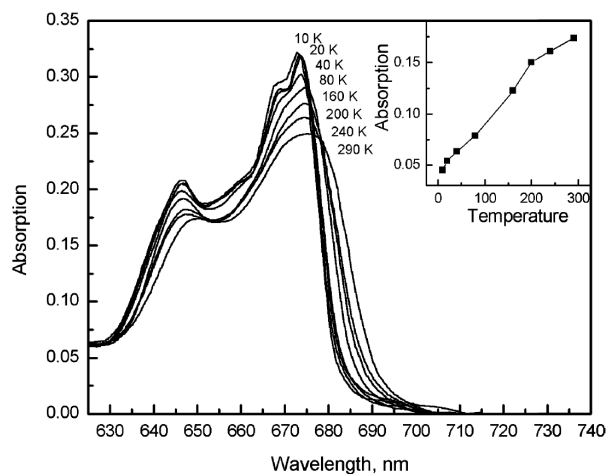
4. A termo-optikai szerkezetváltozások fizikai mechanizmusa

A fizikai mechanizmus feltárására irányuló kísérleteink közül itt elsősorban az ultragyors lézerspektroszkópiai eredményeinkről számolok be, röviden vázolom optikai hullámvezetőkön kapott eredményeinket. Több más vizsgálat előkészítése folyamatban van (l. 6.).

4.1. A gerjesztési energia disszipációjából származó hőcsomagok megjelenése és szétterülése

A hőcsomagok fellépését és szétesését korábban a hőcsomag egyszerű model segítségével írtuk le, ami azt mutatta, hogy a disszipációt követően mintegy 20 ps-os időállandóval lecseng (szétoszlik) (Cseh és mtsai 2000). Kísérletes úton ezt a kérdést úgy közelítettük meg, hogy kiaknáztuk azt a tényt, hogy a LHCII abszorpciós sávjainak termikus kiszélesedése 4K és 300K között jól kalibrálható molekuláris hőmérőként használható (14. ábra). A hőcsomagok – instans módon ultragyors lézerspektroszkópiai módszerrel – exciton-exciton annihilációval generálhatók.

Az LHCII tranziens spektrumában jelenlevő nem-egyensúlyi lokális hőemelkedést különböző gerjesztési fényintenzitások alkalmazásával széles hőmérsékleti tartományban tanulmányoztuk, 10K-től szobahőmérsékletig. Szobahőmérsékleten nem volt megfigyelhető a lokális hőemelkedés, míg 10K-en a lokális hőemelkedés kinetikáját úgy tudták felvenni, hogy több mint 10 excitont pumpáltunk LHCII trimerenként és impulzusonként. Ilyen körülmények között a gerjesztési energia hővé konvertálódik az exciton-exciton annihiláció eredményeként. A hőenergia eredetileg a klorofill a molekulákon lokalizálódik, többszáz fokot elérve a legmagasabb gerjesztési intenzitásokon, amely kb. 100 excitonnak felel meg LHCII trimerenként, melyet egy gerjesztési impulzus generál. A nem-egyensúlyi hőmérséklet lecsengése jól leírható két exponenciálissal. A lehűlés kezdeti fázisa, melyet valószínűleg a hő fehérjéken való tovaterjedése okoz, kb. 20 ps időállandóval rendelkezik. Később a lehűlés mértéke lelassul, a kb. 200 ps-os komponens megjelenése a médiumra történő hőátadással magyarázható.



14. ábra

Vonatkozó folyóiratközlemény: *Gulbina és mtsai 2006 Biochemistry*

4.2. Szerkezetváltozások detektálása optikai hullámvezetőkkel

Optikai hullámvezetőre ültetett LHCII hosszabb megvilágítás hatására jól azonosítható törésmutató változásokat mutatnak. A törésmutató növekedése és/vagy a réteg vastagság csökkenése jelenti a szerkezetváltozásokat.

Vonatkozó folyóiratközlemény: *Lukács és mtsai 2006 Biosens Bioelectronics*

5. A szerkezetváltozások élettani jelentősége ill. a termo-optikai változásokat befolyásoló tényezők hatásai

5.1. Az LHCII és más membránproteinek foszforilációja

Magasabbrendű növények tilakoid membránjaiban található egy protein kináz, mely foszforilálja a LHCII bizonyos treonin aminosavait és egyéb foszfoproteineket. Míg az jelenleg már tisztázott, hogy a foszforiláció konformációs változásokat indukál az LHCII és a tilakoid membrán szerveződésében nem ismert, hogy a foszforiláció hogyan hat a tilakoid membránok dinamikus sajátságaira. Annak érdekében, hogy a kérdés bizonyos részleteit tisztázzuk, megvizsgáltuk a duroquinol-indukálta foszforiláció membrán ultrastruktúrára, a királis makrodomének fény- és hőstabilitására és a LHCII trimer szerveződésére gyakorolt hatásait. Amint azt kisszögű neutronszórás mérésekkel kimutattuk tilakoid membránokon, a duroquinol kezelés kismértékű (~10%-os) emelkedést okozott a sztróma membránok távolságaiban, és a foszforiláció együttjárt a fény- és hőszórás-intenzitás csökkenéssel, mely valószínűleg a gránum membránok részleges szétkapcsolódásával van összefüggésben. CD mérések szintén csak kismértékű változásokat fedtek fel a komplexek királis makroszerveződésében és a LHCII oligomerizációs állapotában. A jellegzetes CD sávok hőmérsékletfüggése azonban azt mutatta, hogy a foszforiláció jelentősen lecsökkentette a királis makrodomének hőstabilitását a foszforilált mintákban a nem-foszforilált mintákhoz képest (levelekben és izolált tilakoid membránokban 48.3 °C-ról 42.6 °C-ra, illetve 47.5 °C-ról 44.3 °C-ra). Amint azt tilakoid membránok nem denaturáló poliakrilamid gélelektroforézisével és EDTA mosott membránok CD spektroszkópiájával kimutattuk, a foszforiláció mintegy 5 °C-kal csökkentette az LHCII trimerek monomerré történő átalakulásának hőmérsékletét. Továbbá elősegítette a királis makrodomének fényindukált szétesését és a LHCII trimerek monomerizálódását 25 °C-on. Eredményeink arra utalnak, hogy a membránok foszforilációja jelentősen megkönnyíti

a hő- és fényindukált átrendeződéseket a tilakoid membránokban és ezáltal a membránszerveződés szerkezeti flexibilitását.

Vonatkozó folyóirat: *Várkonyi és mtsai 2009 Photosynthesis Res,*

5.2. A xantofill ciklus hatása, stressz-válaszok

Korábbi stressz-élettani vizsgálataink valószínűsítették, hogy különböző biotikus és abiotikus stresszek hatására az antenna fényindukált szerkezetváltozásai erőteljesebbek, mint a stresszmentes mintákon. Ez indokolta azokat (a termo-optikai mechanizmus szempontjából előkészítő jellegű egyébként pedig magában is érdekes) kísérleteket, amiket nehézfém stresszhatások tanulmányozására terveztünk (ill. már korábban megkezdtünk).

A xantofill ciklus (XC) pigmentjei (violaxanthin-antheraxanthin-zeaxanthin, zöld algákban és zöldnövényekben ill. diadinoxanthin (Ddx) és diatoxanthin (Dtx) kovamoszatokban) epoxidációs/deepoxidációs enzimek segítségével egymásba alakulnak - a környezeti tényezőkhöz (elsősorban a megvilágítási viszonyokhoz) igazítva a fotoszintetikus szervezetek antennarendszerét. A xantofil ciklus ill. a Ddx → Dtx átalakulás fontos különböző stressz-válaszreakciókban is. A zeaxanthin ill. a diatoxanthin jelenlétében a disszipáció mértéke növekszik. Egyes feltételezések szerint az epoxidációs állapot befolyásolja a membrán permeabilitását és a komplexek átrendeződését. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy a XC módosítja membránok és közvetlenül az antennarendszer szerkezeti flexibilitását (Havaux és mtsai 2006). Erre alapozva, méréseket végeztünk mesterségesen ΔpH-val indukált V_x→Z_x konverzióknak alávetett tilakoid membránokon. CD spektroszkópiai kísérleteink

azonban azt mutatják, hogy a Zx jelenléte (relatív feldúsulása) nem volt hatással sem a makrodomének szerkezeti flexibilitására sem pedig a trimer-monomer átmenetre.

A diadino- és diatoxantin a magasabbrendű növények VAZ ciklusához hasonlóan a xantofill ciklus komponensei. Azonban a ciklus szabályozásában résztvevő enzimek, azok működéséhez szükséges kofaktorok jelentősen különböznek a VAZ-ciklustól (Lavaud, 2007). A deepoxidációt végző diadinoxantin deepoxidáz (DDE) pH optimuma jóval magasabb mint a VDE enzimé, ezért a reakció már a lumen enyhe savanyodására – melyet pl. okozhat a kloroinspiráció - is beindulhat. Továbbá, a DDE enzim kisebb aszkorbát és MGDG koncentrációt igényel a hatékony működéshez. A diatoxantin epoxidáz (DEP) enzim ugyanazokkal a kofaktorokkal működik mint a ZEP, azonban a reakció szabályozása eltér. A reakció teljes mértékben gátolt megvilágítás során, ezért – ellentétben a VAZ ciklussal - csak a deepoxidációs folyamatok zajlanak ebben az esetben. (Goss et al. 2006). Ez a tulajdonság biztosítja a Ddx gyors és hatékony epoxidációját Dtx-ná, mely a NPQ egy fő meghatározó komponense kovámoszatokban. Hatásának részletesebb jellemzése jelenleg is folyamatban van.

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

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

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

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

Fotoszintetikus aktivitás méréseink megmutatták, hogy a Cd 40 µM koncentrációban, rövid időn belül drasztikusan csökkenti az intact sejtek fotoszintetikus aktivitását, az oxigén

fejlődés sebessége 10-20 percen belül csaknem teljesen megszűnik. Ugyanakkor a Cd kezelést követően mesterséges elektronakceptorok segítségével mérve sem az első, sem a második fotokémiai rendszer aktivitásában nem látunk akkora változást, amivel a teljes fotoszintetikus aktivitásban megfigyelt gátlás magyarázható lenne. A P700 oxidációs kinetika mérések ezzel párhuzamosan kimutatták, hogy a P700 kinetika ferredoxin-oxodoreductáz függő gyors komponensét nem, de a lassabb calvin-ciklussal összefüggésben álló gyors komponensét a Cd nagymértékben befolyásolja. A P700 sötét redukciója Cd kezelést követően gyorsul, ami a NADPH felhalmozódását mutatja. PAC (Perturbed Angular Correlation of gamma ray) spektroszkópiás vizsgálatokkal egy a kadmiumot specifikusan kötő fehérje jelenlétét tudtuk intakt sejteken kimutattuk már rövid idejű (15-20 perces) inkubáció után. A fehérje PAC spektroszkópiás jellemzői egy szénsav-anhidrázra utalnak. A szénsav anhidrázok kulcsfontosságú szerepet játszanak a CO₂ koncentráló mechanizmusokban, mely folyamat biztosítja az optimális CO₂ koncentrációt a RUBISCO működéséhez. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a Cd gyors hatásáért a Calvin-ciklus, vagy az ahhoz kapcsolódó CO₂ koncentráló mechanizmus gátlása okozza. Ezt a gyors gátlást, egy időben elhúzódó, lassabb fázis követi, amelynek során a PSII aktivitás fokozatos elvesztését figyelhetjük meg termolumineszcencia ill. a PSII mesterséges elektronakceptorainak jelenlétében mért oxigénfejlesztő aktivitás mérésével. Immunoblott segítségével a PSII reakciócentrum fehérjének a D1 proteinnek a degradációját is megfigyeltük. Ez a második, lassú szakasz fényfüggő. A PSII aktivitás csökkenés fény hatására sokkal gyorsabbá válik a sötétben tartott, kadmiummal kezelt mintákhoz hasonlítva. A két fázis Cd koncentráció függése nagyon hasonló, mindkettő esetén az I₅₀ érték 20 µM körülnek adódott. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a Cd és fény kombinált hatása egy kaszkád mechanizmuson keresztül a PSII gátlását váltja ki. A Cd közvetlen, elsődleges hatásként gátolja a fő NADPH fogyasztó calvin-ciklust, ami a NADPH felhalmozódásához vezet. Megvilágítás hatására a NADPH felhalmozódás az elektrontranszportlánc komponenseinek redukciójához, majd a redukciós nyomás fokozódása a PSII inaktiválásához ill. degradációjához vezet.

Vonatkozó folyóiratcikk: *Hörscik és mtsai 2007 Photosynthetica, Sas és mtsai 2006 Journal of Biological Inorganic Chemistry*

5.3. A gerjesztési energia kioltási mechanizmusai

A klorofill fluoreszcencia nem-fotokémiai kioltásának (NPQ) kinetikáját tanulmányoztuk borsó levelekben különböző hőmérsékleteken 5 és 25 °C között valamint a levelek hőmérsékletének ugrásszerű megváltoztatása során. 5 °C-on a NPQ igen lassan relaxálódott sötétben és 30 percig fennmaradt. Ez független volt attól a hőmérséklettől, amelyen a NPQ indukálódott. A hőmérséklet 25 °C-ra történő emelésével a kioltott állapot megszűnt 1 percen belül, amely tipikus a qE, az NPQ energiafüggő komponense esetén. A sötétadaptált és megvilágított levelek membrán-permeabilitásának (ΔA_{515}) és az NPQ dithiothreitol jelenlétében történő mérési eredményei arra utalnak hogy az alacsony hőmérséklet NPQ-ra gyakorolt hatása nem a lumen pH vagy a xantofilok deepoxidációs állapotának limitációjából ered. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a megállapítással, hogy a kioltott állapot átalakulása a nem-kioltott állapotba (és fordítva) a fotoszintetikus apparátus szerkezeti átrendeződéseivel jár. Egy nyolcállapotú modellt

javasoltunk, amely a Horton és mtsai (2005) által javasolt model kiterjesztése, és egy hipotézist állítottunk fel a qE-val együttjáró konformációs változások értelmezésére.

Magasabbrendű növények LHCII oligomereinek időfelbontású fluoreszcencia mérései arra utalnak, hogy az in vitro oligomerizáció gyengén kapcsolt inter-trimer klorofill-klorofill exciton állapotot eredményez, amely néhány 10 ps alatt olyan állapotá alakul, mely spektrálisan kiszélesedett és távoli vörösbe eltolódott fluoreszcencia spektrummal rendelkezik. Mind az élettartama mind pedig a spektruma nagy hasonlóságot mutat az Arabidopsis levelekben megfigyelhető 400 ps fluoreszcencia komponenssel, mely akkor jelenik meg, ha a NPQ indukálódott. A magas távoli vörös/vörös arányú fluoreszcencia komponens így a NPQ állapot jellegzetes markere in vivo. A távoli vörös emittáló állapot egy emisszív klorofill-klorofill töltéstranszfer állapot, mely kulcsszerepet játszik a kioltásban.

Vonatkozó folyóiratcikk: *Miloslavina és mtsai 2008 FEBS Letters, Lambrev és mtsai 2007 Photosynthesis Research*

6. Kitekintés

Az OTKA támogatásával most lezárt projekt egyúttal több, a témával szoros kapcsolatban álló kutatási tervünk előtt nyitott új utakat ill. a megkezdett munkát folytatni tudjuk. Ezek a következők:

(i) Az OTKA-NKTH CNK 80345sz. projekt keretében tanulmányozzuk a multilamelláris LHCII-tartalmú természetes és mesterséges membránok szerkezetét, spektroszkópiáját és szerkezeti dinamikáját, melynek keretében a psi-típusú CD eredetéről is további fontos információt, reményeink szerint egy jó közelítésű modellt nyerhetünk. A multilamelláris szerkezetek fizikai paraméterei és annak változásait európai nagyberendezések (neutron és röntgen források) segítségével határozzuk meg.

(ii) Az EU FP7 Marie Curie Initial Training Program 'Harvest' c. projekt keretein belül több vezető európai laboratóriummal működünk együtt, amelyekben a termo-optikai mechanizmus kérdéseit is tovább vizsgáljuk, köztük pl. a lipidek szerepét a szerkezeti átrendeződésekben. Tanulmányozzuk a kioltás mechanizmusát (NPQ) és vizsgáljuk a reakciócentrum konformáció változásait.

(iii) Kétoldalú (pl. TÉT, akadémiák közti) együttműködés támogatásával tovább tanulmányozzuk a termo-optikai effektus további élettani szerepét. A wageningeni NMR Centrumban – közös PhD program támogatásával – lipid mutánsok fázis viselkedését tanulmányozzuk.

(iv) Egyedi lehetőségek révén speciális nagy műszeres mérések végzése. Jelenleg elfogadott projektünk amszterdami VU Lézer Centrumban a hőcsomagok kiváltotta proteinmozgások feltárására irányul. Ehhez (lengyel és kínai együttműködésben) Ni-Bkl és Ni-Kl tartalmú rekonstituált fénybegyűjtő komplexeket használunk a prompt disszipáció kiváltásához. A tranzienseket ultragyors, szubpikoszekundumos feloldási mid-IR spektroszkópiával vesszük fel.

IRODALOMJEGYZÉK

- Allen JF and Forsberg J (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function
Trends Plant Sci 6: 317-326
- Barzda V, Istokovics A, Simidjiev I and Garab G (1996) Structural flexibility of chiral macroaggregates of light-harvesting chlorophyll a/b pigment-protein complexes. Light-induced reversible structural changes associated with energy dissipation. *Biochemistry* 35: 8981-8985
- Cseh Z, Rajagopal S, Tsonev T, Busheva M, Papp E and Garab G. Thermo-optic effect in chloroplast thylakoid membranes. Thermal and light stability of pigment arrays with different levels of structural complexity. *Biochemistry* 39: 15250-15257. 2000
- Cseh Z, Vianelli A, Rajagopal, S, Krumova S, Kovács L, Papp E, Barzda V, Jennings R and Garab G. Thermo-optically induced reorganizations in the main light harvesting antenna of plants. I: non-Arrhenius type of temperature dependence and linear light-intensity dependencies. *Photosynth. Res.* 86: 263-273, 2005
- Dekker JP, Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1706: 12-39
- Dobrikova AG, Várkonyi Z, Krumova SB, Kovács L, Kostov GK, Todinova SJ, Busheva MC, Taneva SG and Garab G. Structural Rearrangements in chloroplast thylakoid membranes revealed by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. Thermo-optic effect. *Biochemistry* 42: 11272- 11280. 2003
- Garab G, Leegood RC, Walker DA, Sutherland JC and Hind G. Reversible changes in macroorganization of the light-harvesting chlorophyll a/b pigment protein complex detected by circular dichroism. *Biochemistry* 27: 2430-2434. 1988
- Garab G, Mustardy L. Role of LHCII-containing macrodomains in the structure, function and dynamics of grana. *AUST J PLANT PHYSIOL* 26: 649-658, 1999
- Garab G, Cseh Z, Kovács L, Rajagopal S, Várkonyi Z, Wentworth M, Mustárdy L, Dér A, Ruban AV, Papp E, Holzenburg A and Horton P. Light-induced trimer to monomer transition in the main light-harvesting antenna complex of plants: Thermo-optic mechanism. *Biochemistry* 41: 15121-15129. 2002
- Garab G, Galajda P, Pomozi I, Finzi L, Praznovszky T, Ormos P, van Amerongen H. Alignment of biological microparticles by a polarized laser beam. *Eur Biophys J* 34: 335-343, 2005
- Garab G, Mannella CA: Reply: on 3D models of higher plant thylakoid networks - elements of consensus, controversies, future experiments, *Plant Cell*, 20: 2549-2551, 2008
- Garab G, van Amerongen H: Linear dichroism and circular dichroism in photosynthesis research, *PHOTOSYNTH RES* 101: (2-3)135-146 (2009), 2009

- Gombos I, Steinbach GB, Pomozi I, Balogh A, Vamosi G, Gansen A, Laszlo G, Garab G, Matko J Some new faces of membrane microdomains: A complex confocal fluorescence, differential polarization, and FCS imaging study on live immune cells CYTOM. PART A 73A: (3)220-22, 2008
- Hakala M, Tuominen I, Keränen M, Tyystjärvi T and Tyystjärvi E (2005) Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II. BBA - Bioenergetics 1706: 68–80.
- Havaux M, Dall'Osto L, Cuine S, Giuliano G, Bassi R (2004) The Effect of Zeaxanthin as the Only Xanthophyll on the Structure and Function of the Photosynthetic Apparatus in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 279: 13878-13888
- Holm JK, Varkonyi Z, Kovacs L, Posselt D, Garab G. Thermo-optically induced reorganizations in the main light harvesting antenna of plants. II. Indications for the role of LHCII-only macrodomains in thylakoids PHOTOSYNTH RES 86: 275-282 (2005)
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996) Regulation of light harvesting in green plants. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 655-684
- Horton P, Wentworth M, Ruban A (2005) Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. FEBS Letters 579: 4201-4206
- Hörtsik Z.T, Kovács L, Láposi R, Mészáros I, Lakatos G and Garab G (2007) Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*. Photosynthetica 45 (i): 65-69
- Istokovics A, Simidjiev I, Lajkó F and Garab G (1997) Characterization of the light induced reversible changes in the chiral macroorganization of the chromophores in chloroplast thylakoid membranes. Temperature dependence and effect of inhibitors. Photosynth Res 54: 45-53
- Jánossy I (1991) in Optical Effects in Liquid Crystals (Jánossy, I. Ed.) pp 1-27, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Krumova SB, Dijkema C, de Waard P, Van As H, Garab G, van Amerongen H (2008) Phase behaviour of phosphatidylglycerol in spinach thylakoid membranes as revealed by P-31-NMR. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES 1778: 997-1003
- Krumova SB, Koehorst RBM, Bota A, Pali T, van Hoek A, Garab G, van Amerongen H (2008) Temperature dependence of the lipid packing in thylakoid membranes studied by time- and spectrally resolved fluorescence of Merocyanine 540 BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES 1778: 2823-2833
- Krumova SB, Laptенок SP, Kovács L, Tóth T, van Hoek A, Garab G, Amerongen H (2010) Digalactosyl-diacylglycerol-deficiency lowers the thermal stability of thylakoid membranes Photosynthesis research in press, DOI: 10.1007/s11120-010-9581-5

- Lambrev PH, Tsonev T, Velikova V, Georgieva K, Lambreva MD, Yordanov I Kovacs L, Garab G (2007) Trapping of the quenched conformation associated with non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence at low temperature. *Photosynthesis Research* 94: 321-332
- Lambrev PH, Varkonyi Z, Krumova S, Kovacs L, Miloslavina Y, Holzwarth AR, Garab G (2007) Importance of trimer-trimer interactions for the native state of the plant light-harvesting complex II. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics* 1767: 847-853
- Lavaud (2007) Fast Regulation of Photosynthesis in Diatoms: Mechanisms, Evolution and Ecophysiology. *Functional Plant Science and Biotechnology* 2: 267-287
- Lepetit B, Volke D, Szabó M, Hoffmann R, Garab G, Wilhelm C, and Goss R (2007) Spectroscopic and Molecular Characterization of the Oligomeric Antenna of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochemistry* 46: 9813-9822
- Lee AG (2000) Membrane lipids: it's only a phase. *Curr. Biol.* 10, 377-380
- Li Z, Wakao S, Fischer BB, Niyogi KK (2009). Sensing and responding to excess light. *Annu Rev Plant Biol* 60: 239-260.
- Liu Z, Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gui L, An X, Chang W (2004) Crystal structure of spinach light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428: 287–292
- Melis A (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends in Plant Science* 4: 130-135
- Miloslavina Y, Wehner A, Lambrev PH, Wientjes E, Reus M, Garab G, Croce R, Holzwarth AR (2008) Far-red fluorescence: A direct spectroscopic marker for LHCII oligomer formation in non-photochemical quenching. *FEBS Lett* 582: 3625-3631
- Mullineaux CW, Tobin MJ and Jones GR (1997) Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes. *Nature* 390: 421-424
- Mustardy L, Garab G. Granum revisited. A three-dimensional model - where things fall into place. *TRENDS PLANT SCI* 8: 117-122 (2003)
- Mustardy L, Buttle K, Steinbach G, Garab G: The Three-Dimensional Network of the Thylakoid Membranes in Plants: Quasi-helical Model of the Granum-Stroma Assembly, *The Plant Cell*, Vol. 20: 2552–2557
- Rakhimberdieva MG, Stadnichuk IN, Elanskaya TV, Karapetyan NV (2004) Carotenoid-induced quenching of the phycobilisome fluorescence in photosystem II-deficient mutant of *Synechocystis* sp. *FEBS Letters* 574: 85-88
- Sarcina M, Tobin MJ and Mullineaux CW (2001) Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* 7942: effects of phycobilisome size, temperature and membrane lipid composition. *J. Biol. Chem.* 276: 46830-46834

- Sas KN, Kovacs L, Zsiros O, Gombos Z, Garab G, Hemmingsen L, Danielsen E (2006) Fast cadmium inhibition of photosynthesis in cyanobacteria in vivo and in vitro studies using perturbed angular correlation of gamma-rays. *J. Of Biol. Inorg. Chem.* Volume:11, 725-734
- Schreiber U (1980) Reversible uncoupling of energy-transfer between phycobilins and chlorophyll in *Anacystis nidulans* – light stimulation of cold-induced phycobilisome detachment. *Biochimica et Biophysica Acta* 591: 361-371
- Simidjiev I, Barzda V, Mustardy L, Garab G (1998) Role of Thylakoid Lipids in the Structural Flexibility of Lamellar Aggregates of the Isolated Light-harvesting Chlorophyll a/b Complex of Photosystem II. *Biochemistry-US* 37: 4169-4173
- Stoitchkova K, Zsiros O, Javorfi T, Pali T, Andreeva A, Gombos Z, Garab G (2007) Heat- And Light-induced Reorganizations in The Phycobilisome Antenna of *Synechocystis* sp Pcc 6803. Thermo-optic Effect. *BBA-Bioenergetics* 1767: 750-756
- Shimoni E, Rav-Hon O, Ohad I, Brumfeld V, Reich Z (2005) Three-dimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography. *Plant Cell* 17: 2580-2586
- Steinbach G, Pomozi I, Zsiros O, Páy A, Horváth VG, Garab G.: Imaging Fluorescence Detected Linear Dichroism of Plant Cell Walls in Laser Scanning Confocal Microscope, *Cytometry Part A* 73: 202-208, 2008
- Steinbach G, Pomozi I, Zsiros O, Menczel L, Garab G: Imaging anisotropy using differential polarization laser scanning confocal microscopy, *ACTA HISTOCHEM* 111: (4)317-326, 2009
- Steinbach G., Pomozi I., Jánosa D.P., Makovitzky J., Garab G.: Confocal Fluorescence Detected Linear Dichroism Imaging of Isolated Human Amyloid Fibrils. Role of Supercoiling, *Journal of Fluorescence*, 2010 in press
- Stoitchkova K, Zsiros O, Javorfi T, Pali T, Andreeva A, Gombos Z, Garab G (2007) Heat- and light-induced reorganizations in the phycobilisome antenna of *Synechocystis* sp PCC 6803. Thermo-optic effect. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics* 1767: 750-756
- Szabó M, Lepetit B, Goss R, Wilhelm C, Mustárdy L and Garab G (2008) Structurally flexible macro-organization of the pigment–protein complexes of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Photosynthesis Research* 95: 237-245
- Szabó M, Premvardhan L, Lepetit B, Goss R, Wilhelm C and Garab G (2010) Functional heterogeneity of the fucoxanthins and fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatom cells revealed by their electrochromic response and fluorescence and linear dichroism spectra. *Chemical Physics* 373: 110-114
- Tinoco I, Mickols W, Maestre MF Bustamante C (1987) Absorption, Scattering and imaging of biomolecular structures with polarized light. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 16: 319-349

- Tóth SZ, Schansker G, Garab G, Strasser RJ (2007) Photosynthetic Electron Transport Activity in Heat-treated Barley Leaves: The Role of Internal Alternative Electron Donors to Photosystem II. *BBA-Bioenergetics* 1767: 295-305
- Tóth SZ, Puthur JT, Nagy V, Garab G (2009) Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. *Plant Physiol* 149: 1568-1578
- Varkonyi Z, Nagy G, Lambrev P, Kiss AZ, Szekely N, Rosta L, Garab G (2009) Effect of phosphorylation on the thermal and light stability of the thylakoid membranes. *Photosynth Res* 99: 161-171
- Wilson A, Ajlani G, Verbavatz JM, Vass I, Kerfeld CA and Kirilovsky D (2006) A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. *Plant Cell* 18: 992–1007
- Yang C, Lambrev P, Chen Z, Jávorfí T, Kiss AZ, Paulsen H and Garab G (2008) The negatively charged amino acids in the lumenal loop influence the pigment binding and conformation of the major light-harvesting chlorophyll a/b complex of photosystem, *Biochimica et Biophysica Acta* 1777: 1463–1470
- Zsiros O, Allakhverdiev SI, Higashi S, Watanabe M, Nishiyama Y, Murata N (2006) Very strong UV-A light temporally separates the photoinhibition of photosystem II into light-induced inactivation and repair. *BBA-Bioenergetics* 1757: 123-129