

**A FOTOSZINTETIKUS FUNKCIÓK GÁTLÁSA ÉS
HELYREÁLLÍTÁSA FÉNNYEL**

Doktori (PhD) értekezés

Írta: Bernát Gábor

Témavezető: Dr. Demeter Sándor
biológiai tudományok doktora

MTA Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézet
Szeged 2000

Apám emlékének

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
Rövidítések jegyzéke	4
BEVEZETÉS, A TÉMA ELHELYEZÉSE	6
<i>Fotoszintézis és fény</i>	6
<i>A második fotokémiai rendszer</i>	7
<i>A vízbontó rendszer és a vízbontás</i>	9
<i>A fényaktiválás</i>	13
<i>A fénygátlás</i>	15
<i>Célkitűzés</i>	18
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19
<i>Kísérleti anyagok</i>	19
<i>Biokémiai módszerek</i>	20
<i>Biofizikai módszerek</i>	22
EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	23
<i>A Q TL-sáv eredete</i>	23
<i>A C TL-sáv eredete</i>	27
<i>A Q_A elsődleges kinon akceptor g=1,9 és g=1,82 ESR-jellel leírt formáinak fénygátlással szembeni érzékenysége</i>	33
<i>Fénygátlás és PS II heterogenitás</i>	36
<i>Fényaktiválás szintetikus Mn-komplexekkel: fluoreszcencia vizsgálatok</i>	43
<i>Fényaktiválás szintetikus Mn-komplexekkel: polarográfiás és TL vizsgálatok</i>	60
ÖSSZEFOGLALÁS	68
IRODALMI HIVATKOZÁSOK	69
AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT ÉS KAPCSOLÓDÓ	
KÖZLEMÉNYEK	77
Köszönetnyilvánítás	78
SUMMARY	79

Rövidítések jegyzéke

A _T -sáv	His ⁺ Q _A ⁻ töltésrekombinációból eredő TL-sáv
ATP	adenozin-trifoszfát
B-sáv	S ₂ Q _B ⁻ töltésrekombinációból eredő TL-sáv
C-sáv	Y _D ⁺ Q _A ⁻ töltésrekombinációból eredő TL-sáv
Car	karotinoid
Chl	klorofill
Cyt b ₅₅₉	citokróm b ₅₅₉
DCMU	3-(3,4-diklór-fenil)-1,1-dimetil-karbamid
DPIP	2,6-diklór-fenol-indofenol
ESR	elektronspin rezonancia
EXAFS	extended X-ray absorption fine structure
F _m	maximális fluoreszcencia
F _o	kezdeti fluoreszcencia
F _v	változó fluoreszcencia
F _v '	a változó fluoreszcencia növekedése fényaktiválás után
FTIR	Fourier-transzform infravörös spektroszkópia
His	hisztidin
HP	magas potenciálú forma
L ₁	szalicilaldoxim; 2-hidroxi-benzaldoxim
L ₂ = L ₃	3,5-di(<i>terc</i> -butil)-1,2-benzokinonmonoxim
L ₄	2-hidroxi-1,4-naftokinon
L ₅	2-hidroxi-3-metil-1,4-naftokinon; ftiokol
L ₆	acetyl-ftiokolmonoxim
L ₇	propionil-ftiokolmonoxim
L ₈	1,10-fenantrolin
L ₉	3-{{{(2-piridil)-metil}-imino}-metil}-benzol-1,2-diol
L ₁₀	3-{{{(2-(2-piridil)-etil)-imino}-metil}-benzol-1,2-diol
L ₁₁	3-{{{(2-(hidroxi-metil))-imino}-metil}-benzol-1,2-diol
L ₁₂	3-{{{(2-benzimidazolil)-metil}-imino}-metil}-benzol-1,2-diol
L ₁₃	3-{{{(2-piridil)-hidrazono}-metil}-benzol-1,2-diol

LHC II	a PS II fő Chla/b fénybegyűjtő rendszere
LP	alacsony potenciálú forma
M-1(L _x)	szintetikus Mn-monomér
M-2(L _x)	szintetikus Mn-dimér
M-3(L _x)	szintetikus Mn-trimér
M-4(L _x)	szintetikus Mn-tetramér
MES	2-N-morfolino-etánszulfonát
NADPH	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát
P680	a PS II elsődleges elektrondonora
Pheo	feofitin
PpQ	fenil-p-benzokinon
PQ	plasztokinon
PS II	második fotokémiai rendszer
Q-sáv	S ₂ Q _A ⁻ töltésrekombinációból eredő TL-sáv
Q _A	a PS II elsődleges kinon akceptora
Q _B	a PS II másodlagos kinon akceptora
RC	reakciócentrum
TL	termolumineszcencia
Tris	trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
WOC	vízbontó rendszer
XANES	X-ray absorption near edge structure
Y _D	a D2 fehérje Tyr160 oldallánca
Y _Z	a D1 fehérje Tyr161 oldallánca

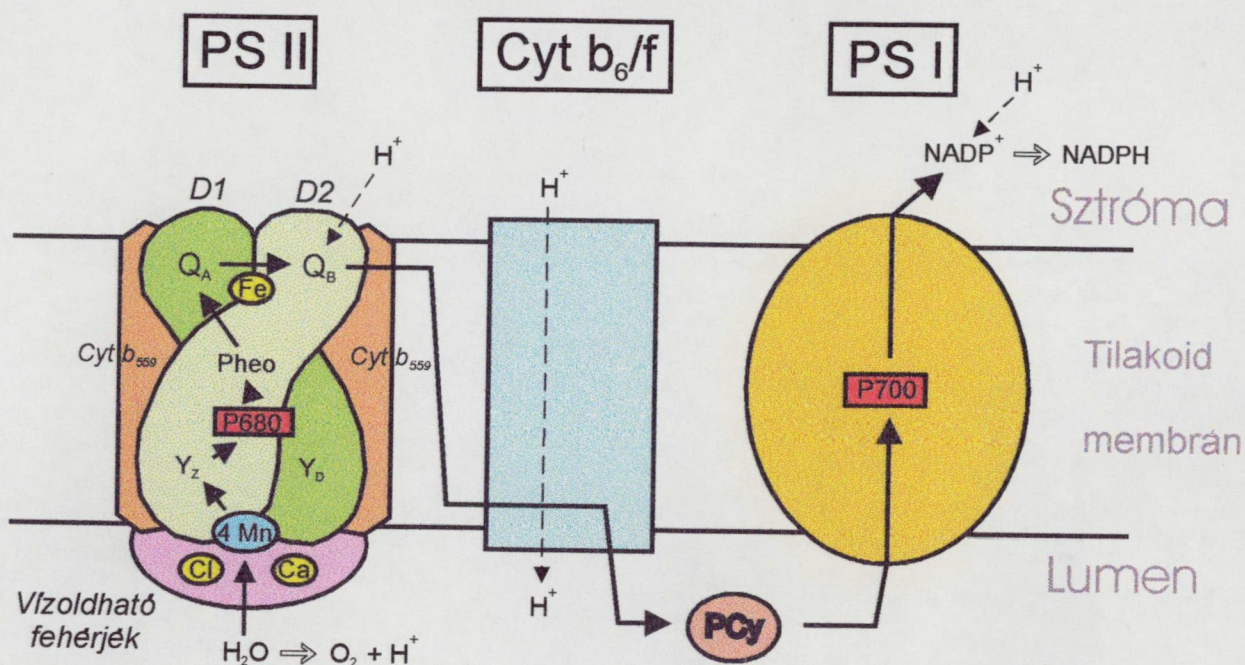
BEVEZETÉS, A TÉMA ELHELYEZÉSE

Fotoszintézis és fény

A Nap földfelszínre érő sugárzása tette és teszi lehetővé, hogy a víz évmilliárdokon keresztül folyadék halmazállapotban legyen jelen bolygónkon, ami alapvető fontosságú az élet kialakulása és fennmaradása szempontjából. Napfény szolgáltatja a biológiai körforgásban résztvevő szerves anyag képződéséhez szükséges szabadentalpiát is. Autotróf élőlények (magasabbrendű növények, algák, fotoszintetizáló baktériumok) a Nap által kibocsátott fényenergia segítségével CO_2 -ból és vízből szerves molekulákat szintetizálnak, ezt a folyamatot, amely voltaképpen egy bonyolult biofizikai-biokémiai eseménysor, **fotoszintézisnek** nevezzük. A biológiai körforgás a fotoszintézis során előállított biomassza (heterotróf élőlények általi) átalakításával és lebontásával (gombák, baktériumok révén) válik teljessé. A földi légkör összetétele is szorosan összefügg a fotoszintézissel, ugyanis a légkörben található mintegy $4 \cdot 10^{18}$ kg molekuláris oxigén annak egyfajta "melléktermékeként" keletkezett és - talán hangsúlyozni sem kell - ugyancsak lényeges a földi élet szempontjából. Az ember által felhasznált fosszilis tüzelőanyagok szintén fotoszintetikus eredetűek.

A fotoszintézis biokémiai folyamataiban kulcsszerepet játszik az adenozin-trifoszfát (ATP) és a nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH): előbbi mint átmeneti energiatároló, utóbbi pedig mint redukálószer. Mindkét vegyület képződése az ún. **fotoszintetikus elektrontranszport**hoz kapcsolódik, aminek hajtóereje a fény. A fotoszintetikus elektrontranszport a növényi sejtek **kloroplasztiszainak tilakoid membránjába** ágyazódó három nagy fehérjekomplexumon: a második fotokémiai rendszeren, a citokróm b/f komplexen, az első fotokémiai rendszeren valamint mobilis redox-aktív komponenseken keresztül zajlik (1. ábra). Terminális elektrondonora az ún. oxigénfejlesztő fotoszintézis esetében a víz, terminális elektronakceptora pedig a NADP^+ . Az ATP szintézise az elektrontranszportot kísérő, membránon keresztüli protontranszportozhoz kapcsolódik.

A fény az energetikai vonatkozásokon túl más pontokon is hat a fotoszintézisre, pl. fontos szerepet játszik a növények életében mint jelforrás és szabályozó faktor. Fény szükséges a fotoszintetikus pigmentek szintéziséhez és az oxigénfejlesztésért felelős



1. ábra. A fotoszintetikus elektrontranszport vázlata, különös tekintettel a második fotokémiai rendszerre. Magyarázat a szövegben. Egyéb jelölések: P700, a PS I primér elektrondonora; PCy, plasztocianin; PS I, első fotokémiai rendszer.

katalitikus hely, a második fotokémiai rendszer (PS II) lumen oldalán elhelyezkedő **vízbontó rendszer** működőképes összeállítódásához, a **fényaktiváláshoz** is. Ez a folyamat lejátsszódik mind frissen szintetizálódó, mind különféle stresszhatások után regenerálódó PS II esetén. Túlzott mennyiségű fény a fotoszintetikus funkciók (reverzibilis) csökkenéséhez majd a fotoszintetikus apparátus (irreverzibilis) sérüléséhez, az ún. **fénygátláshoz** vezet. A fénygátlás elsődlegesen szintén a második fotokémiai rendszert érinti.

Jelen dolgozat a fotoszintézis-fény kapcsolat két fontos aspektusáról: a fényaktiválásról és fénygátlásról szól.

A második fotokémiai rendszer

A második fotokémiai rendszer (PS II), amely a három elektronszállító fehérjekomplexum közül az elektrontranszport irányát tekintve sorrendben az első, (enzimatis) funkciója a víz molekuláris oxigénné történő oxidációja és a membránban oldott mobilis elektronszállító, a plasztokinon (PQ) redukciója [1-4]. A folyamat

kezdetén a PS II fénybegyűjtő rendszere elnyel egy fotont. Az így befogott energia néhány ps alatt, több lépésben a PS II reakciócentrum (RC) speciális klorofill-a molekulapárjára, a P680-ra jut [4-6]. A gerjesztett állapotba került P680 redukál egy feofitin-a (Pheo) molekulát: $P680^* + Pheo \rightarrow P680^+ + Pheo^-$. A $P680^+Pheo^-$ töltésrekombinációt gyors (200-500 ps) elektrontranszfer akadályozza meg, melynek során a negatív töltés az elsődleges kinon-akceptorra (Q_A) jut. A visszamaradt pozitív töltés ("lyuk") egy redox-aktív tirozin-oldalláncre (Y_Z -re), majd mintegy 100 μs - 1 ms alatt a vízbontó rendszerre kerül [1-3]. Hasonló időskálán (100-200 μs) megy végbe a Q_A -n átmenetileg stabilizálódó elektron másodlagos kinon akceptorra (Q_B -re) kerülése ($Q_A^- + Q_B \rightarrow Q_A + Q_B^-$). A vízbontó rendszer négy-, a Q_B kételektron-kapuként működik, azaz egymást követően ennyi számú elektront kell felvenniük ill. leadniuk (aminek előfeltétele megfelelő számú fotonelnyelés és töltésszétválasztódás) hogy a megfelelő katalitikus reakció lejátszódjon: a Q_B kétszeresen redukálódjon, protonálódjon és kikötődjön ($Q_B + 2e^- \rightarrow Q_B^{2-}$; $Q_B^{2-} + 2H^+ \rightarrow Q_BH_2$) ill. két molekula víz 4 proton leadása mellett oxigénné alakuljon ($2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$), így egy molekula oxigén felszabadulását két molekula plasztohidrokinon termelődése kíséri.

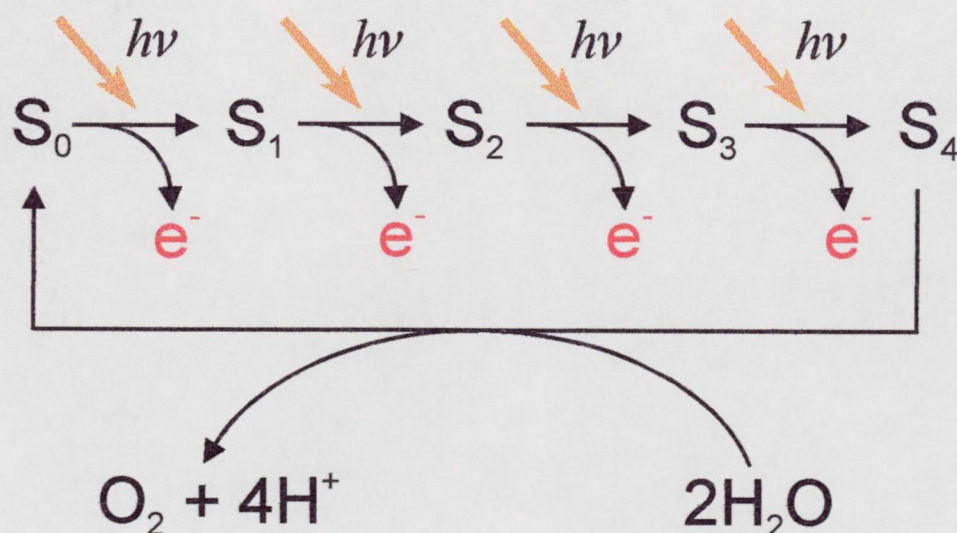
Az elektrontranszportlánc-komponenseken kívül fontos részei a PS II-nek inorganikus kofaktorok is, amelyek PS II-höz kötődése elengedhetetlen annak normális működéséhez: Ca^{2+} - és Cl^- -ion(ok) szükségesek a vízbontáshoz [7-9], a Q_A és Q_B között elhelyezkedő, bikarbonát-iont koordináló non-hem vas [10,11] pedig a $Q_A \rightarrow Q_B$ elektrontranszport szabályozásában vesz részt [11,12].

A második fotokémiai rendszer torzult C_2 -szimmetriával rendelkezik, a fehérje-komplexum központjában az ún. D1 és D2 fehérjék által alkotott heterodimér található, amely kitüntetett szereppel bír az elektrontranszport szempontjából, ugyanis a PS II valamennyi elektrontranszport-komponense hozzá kapcsolódik (a Q_A kivételével mindegyik a D1-hez) [1-4]. A két fehérje szekvenciája és sztróma oldali szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat a bakteriális reakciócentrum L és M alegységével. Működőképes PS II összeállítódásához további 5 membránkötött fehérje-alegység szükséges: a belső antennaként funkcionáló, szimmetrikusan elhelyezkedő CP47 és CP43 fehérjék, a két alegységből (α, β) felépülő, egy vagy két kópiában jelen levő citokróm b_{559} (Cyt b_{559}) és az ún. I-fehérje. Fontos szerepet játszik a vízbontó rendszer stabilizálásában 3 vízdoldható PS II fehérje: 33, 24 és 17 kDa molekulasúllyal; ezek a

membrán belső oldalán kötődnek [13]. Közülük a vízbontás szempontjából eszenciális a 33 kDa fehérje, mely védi és optimális konformációban tartja a vízbontó rendszer működésében kulcsszerepet játszó **mangán centrumot**. A másik két fehérje a Ca^{2+} - ill. Cl^- -ionok kötődését hivatott elősegíteni. A PS II *in vivo* felépítésében további fehérje-alegységek is részt vesznek, nagyrészüik szerepe még tisztázatlan.

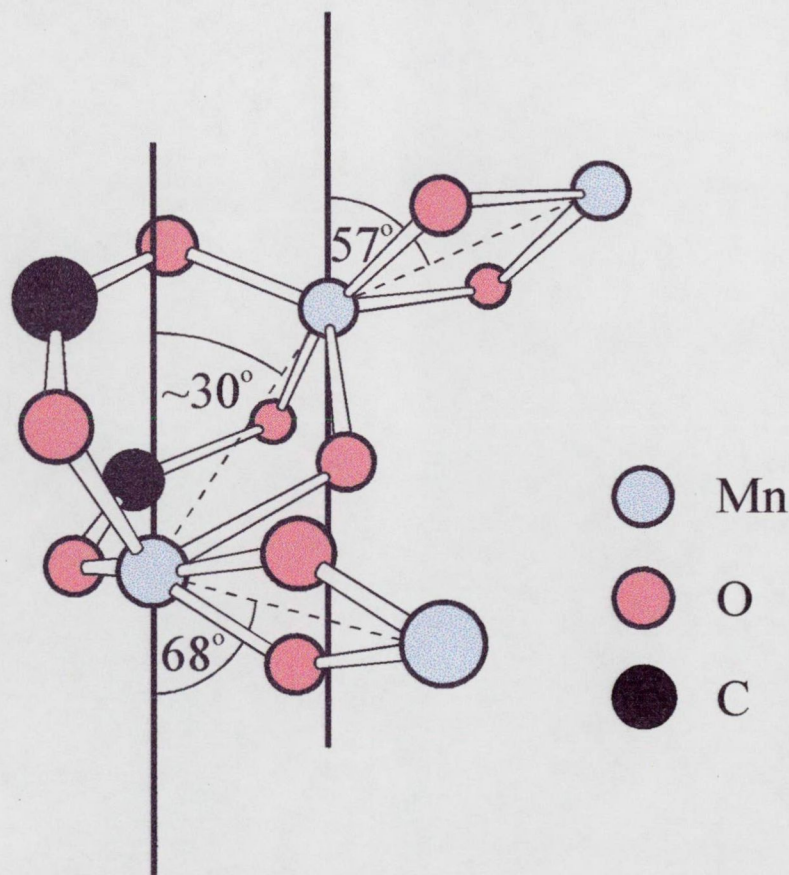
A vízbontó rendszer és a vízbontás

A vízbontás a PS II lumen oldalán elhelyezkedő, annak vízbontó rendszerként (WOC) aposztrofált részénél játszódik le. A folyamat során felszabaduló elektronok a fotoszintetikus elektrontranszportban vesznek részt, a protonok pedig az ATP-szintézishez szükséges pH-grádiens kiépítéséhez járulnak hozzá. Mivel egy foton elnyelése egy elektron átmenettel jár, továbbá egy molekula oxigén felszabadulása négy pozitív töltést igényel, ezért a töltések átmeneti tárolása szükséges - erre szolgálnak a WOC különböző ún. **S-állapotai** (S_n ; $n=0-4$) (2. ábra) [14]. A vízbontó rendszer legfontosabb része egy redox-aktív négymagvú Mn-centrum, amelynek nem ismeretes pontosan sem a szerkezete, sem az egyes S-állapotokhoz rendelhető töltés konfigurációja [7,8,15,16].



2. ábra. A vízbontó rendszer redox ciklusa. Magyarázat a szövegben.

EXAFS- (extended X-ray absorption fine structure-) vizsgálatok alapján a PS II-ben egy darab 3,3 Å-ös és két darab 2,7 Å-ös Mn-Mn kölcsönhatás található, ami legnagyobb valószínűséggel dimér + dimér szerkezetnek felelhet meg [17], egyúttal kizár olyan erősen szimmetrikus formákat, mint a kubán-, adamantán- vagy pillangó elrendeződés. Orientált minták alkalmazásával lehetővé vált a 2,7 Å-ös kölcsönhatásokhoz rendelhető vektorok membrán-normálissal bezárt átlagos szögének meghatározása [18], ill. a két 2,7 Å-ös kölcsönhatás megkülönböztetése [19]. Az irodalomban jelenleg elfogadott modell szerint a két dimér, melyekben a Mn-Mn távolság 2,7 Å (55° ill. 67°), torzult C-alakot formál úgy, hogy a dimérek egymáshoz közeli Mn-jai 3,3 Å-re helyezkednek el egymástól. Becslések szerint a 3,3 Å-ös kölcsönhatás kb. 30° szöget zár be a membrán normálisával [19]. A diméreket alkotó mangánok ill. maguk a dimérek oxigéntartalmú hidakon keresztül kapcsolódnak egymáshoz (3. ábra).



3. ábra. A vízbontó rendszer Mn-tetramérjének feltételezett szerkezete Dau és mtsai [19] szerint. A függőleges párhuzamosok a tilakoid membrán normálisát jelölik. Magyarázat a szövegben.

Integráns részét képezik a WOC-nek Ca^{2+} - és Cl^- -ionok is [7-9]. Számuk, funkciójuk és elhelyezkedésük ismeretlen. EXAFS- [20] és Fourier-transzform infravörös (FTIR) mérések [21] egyaránt a Ca^{2+} (feltehetően karboxilát-hídon keresztüli) Mn-hoz kapcsolódását mutatják, Cl^- -mentes minták XANES- (X-ray absorption near edge structure-) ill. Br^- -szubsztituált minták ESEEM- (electron spin echo envelope modulation-) vizsgálatai pedig Cl^- -ion(ok) Mn-hoz és/vagy Ca^{2+} -hoz közeli kötődését bizonyítják [9,22]. A vízbontó rendszer egyes modelljei a Ca^{2+} - és Cl^- -ion kapcsolódásának helyét és módját is feltüntetik, hangsúlyozni kell azonban ezek spekulatív jellegét [17,23,24]. Újabb adatok szerint nemcsak a PS II akceptor oldalán, hanem a vízbontó rendszernél is található fémionok (Mn^{n+} v. Ca^{2+}) által koordinált bikarbonát-ion, melynek jelenléte szükséges a WOC normális működéséhez [25-29]. Ezt a feltevést támasztja alá a PS II szénsav-anhidráz aktivitása, amelyet - annak Ca^{2+} - és Cl^- -igénye miatt - szintén a vízbontó rendszerhez kapcsolnak [30]. Tudománytörténeti érdekesség, hogy a bikarbonát-hatást kezdetben a PS II donor oldalához rendelték: úgy vélték, hogy a fotoszintézis során keletkező oxigén $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -ből származik [31]. A fenti hipotézis izotóp-jelzett HCO_3^- -val végrehajtott cáfolata [32], ill. a bikarbonát-ion akceptor oldali hatásának felfedezése [33] után - noha jelentek meg donor oldali hatásra utaló közlemények is [34] - széles körben elfogadottá vált, hogy a bikarbonát-effektust a PS II akceptor oldalához kell rendelni. Jelen álláspont szerint [35] mind a PS II akceptor-, mind donor oldalán koordinálódik bikarbonát-ion. Az utóbbi funkciója jelenleg még teljesen tisztázatlan (az akceptor oldali bikarbonát-ion szerepéről ld. az Eredmények és megvitatásuk c. fejezetet).

A vízbontó rendszer különböző oxidációs állapotaihoz tartozó töltéskonfiguráció meghatározásánál fontos körülmény, hogy a centrumok többsége azonos S-állapotban legyen. Ebből a szempontból az egyes S-állapotok közül legkönnyebb az S_1 állapotot vizsgálni - sötétadaptált mintákban ugyanis csak S_0 és S_1 állapotok fordulnak elő, kb. 1:3 arányban. XANES-, ESR- (elektronspin rezonancia-) mérések ill. elméleti számítások alapján az S_1 állapothoz rendelhető oxidációs állapot Mn(III)_4 -nek [8] vagy $\text{Mn(III)}_2\text{Mn(IV)}_2$ -nek [7,36,37] adódik. Viszonylag könnyű vizsgálni az S_2 állapotot is, az S-átmenetek közül ugyanis egyedül az $S_1 \rightarrow S_2$ átmenet nem jár a pozitív töltések felhalmozódását kompenzáló, konformációváltozást okozó deprotonációval, ezért alacsonyabb hőmérsékleten, más átmenetektől elkülönítve vizsgálható. A legvalószínűbb

oxidációs állapot itt $\text{Mn(III)}_3\text{Mn(IV)}$ [8] vagy Mn(III)Mn(IV)_3 [7,36,37]. Nincs konszenzus az irodalomban az $S_2 \rightarrow S_3$ átmenetet illetően: amíg számos röntgen-abszorpció-, ESR- és egyéb mérés alapján ezt nem kíséri Mn oxidációja [7-9,36] (noha nem kizárt, hogy a Mn-környezetben bekövetkező átrendeződések, vagy esetleges S_0 , S_1 szennyezések elfedik az oxidációs állapot változásait), addig UV abszorpcióváltozás [38] és egyes XANES-mérések alapján [37,39,40] az $\text{Mn(III)} \rightarrow \text{Mn(IV)}$ átalakulással jár. Az előbbi nézet szerint $S_2 \rightarrow S_3$ átmenetkor nem Mn, hanem valamely His (v. Tyr, esetleg Trp) oldallánc oxidálódik. Ezt erősítik meg FTIR-mérések eredményei is [41]. Így az S_3 állapotot a $\text{Mn(III)}_3\text{Mn(IV)His}^+$ vagy $\text{Mn(III)Mn(IV)}_3\text{His}^+$ ill. $\text{Mn(III)}_2\text{Mn(IV)}_2$ vagy Mn(IV)_4 írásmód szimbolizálhatja. Redukálószerrel S_1 -ből át lehet vinni a centrumok többségét S_0 állapotba, amihez a szerzők nagy része a Mn(II)Mn(III)_3 vagy $\text{Mn(II)Mn(III)Mn(IV)}_2$ konfigurációt rendel [7,8,36,37].

A vízbontás Mn-komplexen belüli lokalizációjára és mechanizmusára vonatkozóan csak hipotézisek léteznek. NH_3 - és H_2^{17}O -kötődési kísérletek egyaránt a vízmolekulák közvetlen Mn-hoz kötődését támasztják alá [7,8], míg újabb polarográfiás, fotoakusztikus és egyéb mérések ezzel ellentmondani látszanak [7]. Az ellentmondás egyik lehetséges feloldását jelenthetik azok az eredmények, amelyek szerint a két szubsztrát vízmolekulát igen eltérő kémiai környezet veszi körül, ami leginkább úgy magyarázható, hogy csak az egyiket koordinálja közvetlenül Mn-ion [42]. Rutherford és mtsai szerint a víz az $S_3 \rightarrow S_4$ átmenet során kötődik a Mn-hoz [8], addig a kötőhelye(ke)t Cl^- -ion tartja megszállva, védvén a molekulákat az oxidációtól alacsonyabb S-állapotokban [43].

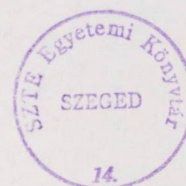
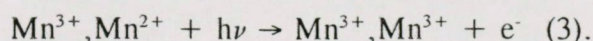
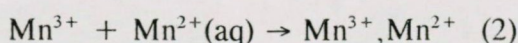
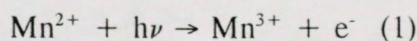
A víz oxidációja az $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ átmenet során megy végbe. Energetikai okokból feltételezik, hogy először egy kételektron-oxidáció játszódik le, ami peroxid köztitermék képződéséhez vezet, majd azt két gyors egyelektron-oxidáció követi [44,45]. Az a tény, hogy a vízbontó rendszer bizonyos körülmények között képes H_2O_2 -t termelni illetve H_2O_2 -ből O_2 -t fejleszteni [7,43] alátámaszthatja ezt a hipotézist, de utalhat a fenti, Rutherford és mtsai nevéhez fűződő elképzelés helyességére is: ha a vízmolekulák nem a megfelelő S-állapotban kötődnek a Mn-komplexhez, vagy a szükségesnél több férközhet közülük a katalitikus helyhez, akkor csak részleges oxidációjuk következik be [46].

Noha már korábban is feltételezték, hogy a víz valamely deprotonált formája oxidálódik [44], újabb eredmények az egész kérdéskört más megvilágításba helyezik. Mágneses rezonancia vizsgálatok ugyanis arra engednek következtetni, hogy a deprotonációért a P680 és a Mn-centrum között elhelyezkedő Y_z (= Tyr161 a D1 fehérjén) a felelős [45,47-52]; Babcock és mtsai szerint mind a négy S-átmenethez rendelhető egy-egy ilyen deprotonációs lépés [24,48,49,52]. Ha ez valóban így van, akkor az Y_z közvetlenül részt vesz a vízbontásban (nem csak egyszerű elektron-közvetítő, mint előzőleg gondolták), ezért újabb modellek a WOC részeként tüntetik fel [24,45,47-49].

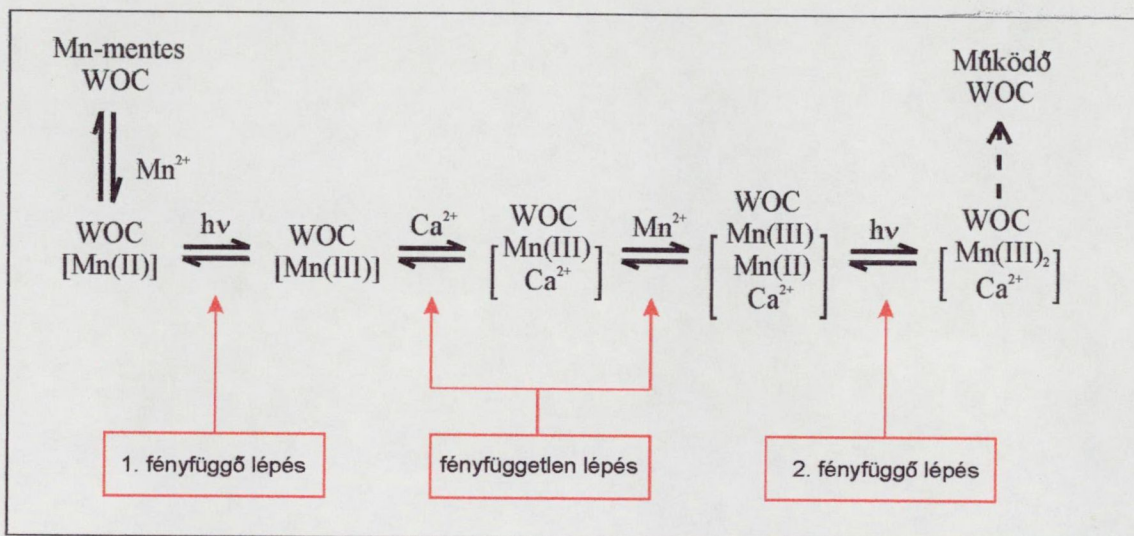
A fényaktiválás

A vízbontó rendszer, azon belül a Mn-centrum funkcionálisan aktív formában csak fény jelenlétében tud összeállítani. A fényaktiválásnak nevezett jelenség legjobb indikátora a fotoszintetikus oxigénkibocsátás megjelenése és növekedése a folyamat során. Az oxigénfejlődés Mn/fényfüggő aktiválódását megfigyelték olyan Mn-mentes körülmények között nevelt algákon és növényeken, amelyekhez Mn^{2+} -ionokat adtak, továbbá olyan sötétben ill. gyenge fényen, mangán jelenlétében nevelt algákon és növényeken, amelyeket fényre tettek [53-58]. Tris vagy NH_2OH kezeléssel Mn-mentesített kloroplasztiszok és membrán-fragmentumok oxigénfejlődésének visszaállítását (Mn-hozzáadással és megvilágítással) szintén megfigyelték [59-61]. A Mn-tetramér összeállítódásához (csakúgy mint működéséhez) Ca^{2+} - [62-64], Cl^- [65,66] valamint újabb adatok szerint bikarbonát-ion jelenléte is [67] szükséges.

A fényaktiválás kulcslépései két fényfüggő és egy középük ékelődő fényfüggetlen lépés [61,68]. Miller és Brudvig a fényfüggő lépéseket $Mn^{2+} + h\nu \rightarrow Mn^{3+} + e^-$ oxidációnak, a közbenső fényfüggetlen lépést pedig egy Mn^{2+} ligációjának azonosította [69]:



Kísérleti adatok szerint a második Mn^{2+} -kötőhely csak az első Mn^{2+} bekötődése után válik hozzáférhetővé, ami strukturális átrendeződéseket feltételez [61,68]. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint a fényaktiválás a Q_A redoxpotenciáljának csökkenésével jár együtt [70]. A fényaktiválás kvantumhatásfoka igen alacsony, ami azzal magyarázható, hogy az első két köztitermék meglehetősen instabil. Ezen egyszerű modell szerint a folyamat sebességmeghatározó szakasza a fényfüggetlen lépés, azaz a második Mn^{2+} ligációja.



4. ábra. A fényaktiválás kinetikai modellje Ananyev és mtsai nyomán [74]. Magyarázat a szövegben.

Ananyev és mtsai újabb eredményei részletesebb betekintést engednek a fényaktiválás folyamataiba [71-74]. A továbblépést kísérleti-technikai oldalról az tette lehetővé, hogy a korábbiaknál hatékonyabb Mn- és Ca-kivonási módszert tudtak bevezetni, illetve sikerült olyan, nagyérzékenységű oxigénelektrodot kifejleszteniük, amely segítségével tizedére-századára lehetett csökkenteni a fényaktiválásnál alkalmazott Mn^{2+} -koncentrációt, így a jelenség a $4\text{Mn}^{2+}/\text{RC}$ érték környezetében, azaz reakciókinetikailag is tanulmányozhatóvá vált. Kísérleti eredményeik alapján egy részletesebb modellt alkottak (4. ábra), mely mélyebb szinten értelmezi az első lépéseket és intermediereket, továbbá számot ad a Ca^{2+} fényaktiválásban betöltött szerepéről. A továbbfejlesztett modell szerint mindkét $\text{Mn}^{2+} \rightarrow \text{Mn}^{3+} + e^-$ oxidációnál protonleadás

kompenzálja a töltésfelhalmozódást; az ún. fényfüggetlen lépés pedig legalább két részre bontható: egy Ca^{2+} - és egy azt követő Mn^{2+} -kötődésre. Mivel Ca^{2+} jelenléte nélkül a második Mn^{2+} nem tud beépülni, ezért azt feltételezik, hogy a Ca^{2+} bekötődése indukál olyan szerkezeti változás(oka)t, ami hozzáférhetővé teszi a második Mn^{2+} kötőhelyét. Így a folyamat sebességmeghatározó lépése egy Ca^{2+} -indukált strukturális átrendeződés.

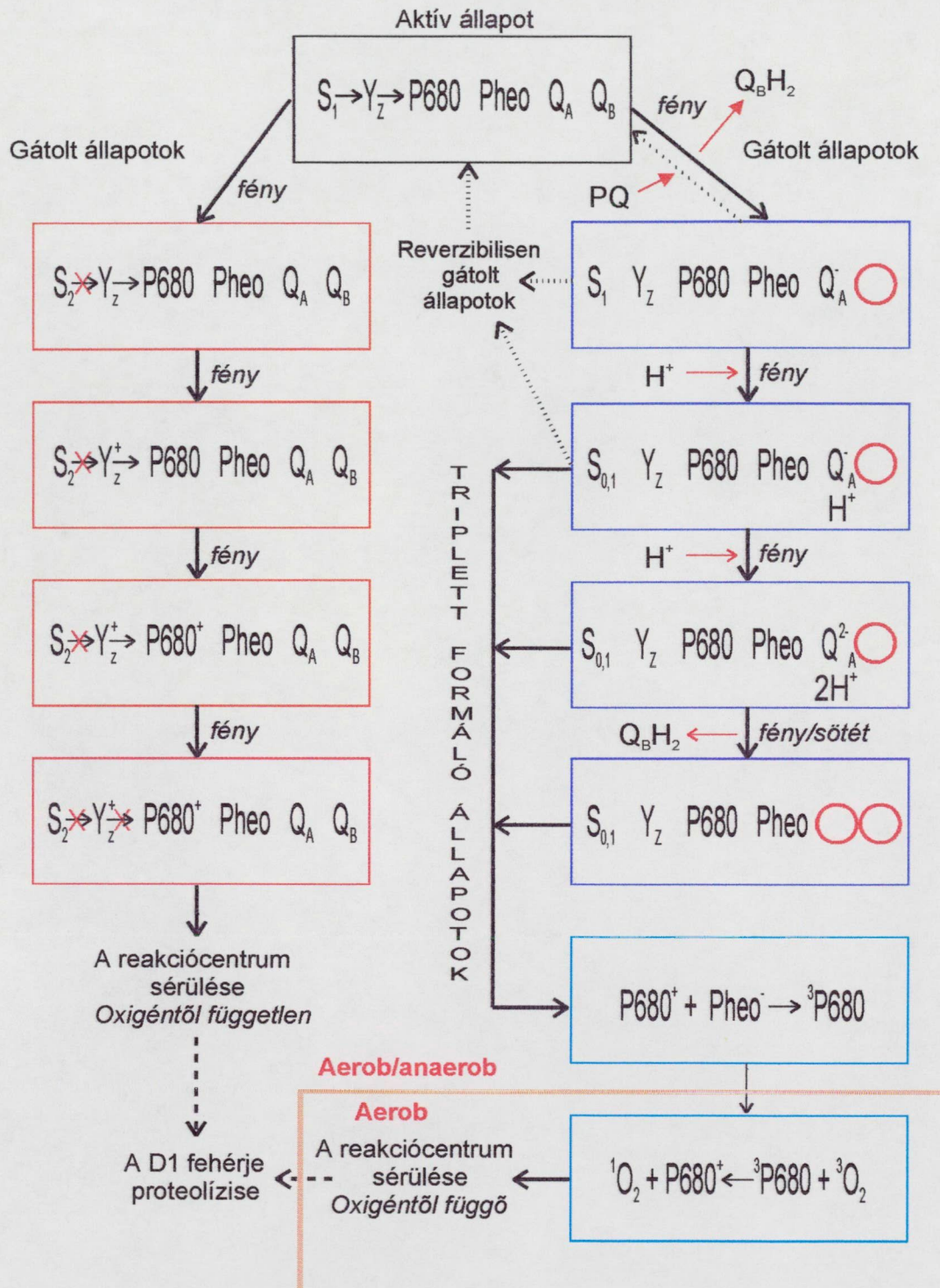
Számos laboratórium állított már elő 2-, 3- és 4-magvú Mn-komplexeket a vízbontó rendszer modellezése céljából [75-77]. A vizsgálatok során általában az előállított vegyületek és más Mn-tartalmú fehérjék fizikai (főleg mágneses) paramétereit vetették össze a PS II megfelelő jeleivel és a talált hasonlóságok alapján modellezték a Mn-tetramér szerkezetét. Allakhverdiev és mtsai binukleáris Mn-komplexeket használtak fotoaktivációs kísérleteikhez [78]. Eredményeik szerint az alkalmazott két vegyület sokkal nagyobb hatékonyságot mutat az oxigénfejlődés visszaállításánál és sokkal könnyebben donál elektronokat a P680 felé, mint a MnCl_2 [78,79], amit úgy magyaráznak, hogy - egyezésben egyes korábbi javaslatokkal [80,81] - a vízbontáshoz mindössze 2 Mn/PS II elegendő, a fennmaradó kettő más fémionokkal is helyettesíthető. Mivel ez ellentétben áll a jelenleg elfogadott képpel, érdemesnek láttuk további polinukleáris komplexek kipróbálását fényaktiválási kísérletekben.

A fénygátlás

Noha a fény a fotoszintézis abszolút előfeltétele, - paradox módon - a növényeket érő egyik fő stresszhatás is [82,83]. Túlzott mennyiségű fény hatására ugyanis reverzibilis elektrontranszport-gátlás majd a D1 reakciócentrum fehérje irreverzibilis sérülése következik be. Ha a sérülés mértéke meghaladja a helyreállító mechanizmusok kapacitását, fénygátlásról beszélünk. Sok más stresszhez hasonlóan a fénygátlás hatóhelye(i) is a második fotokémiai rendszerben található(k). Két típusát különböztetjük meg: donor- ill. akceptor oldali fénygátlásról szokás beszélni attól függően, hogy az elektrontranszport primér gátlása a P680 donor- vagy akceptor oldalán játszódik le (5. ábra). Akceptor oldali fénygátlás esetén a P680 több elektront pumpál az elektrontranszportláncba, mint amennyit a metabolikus folyamatok hasznosítani tudnak, ezért a plasztokinon teljes mennyisége kiredukálódik, amit a Q_A kétszeres redukciója, protonálódása és kikötődése követ. Újabb elektron ezután már

DONOR-OLDALI FÉNYGÁTLÁS

AKCEPTOR-OLDALI FÉNYGÁTLÁS



5. ábra. A donor- és akceptor-oldali fénygátlás modellje Aro és mtsai nyomán [83].
Magyarázat a szövegben.

csak a feofitinig juthat, a negatív töltés nem tud stabilizálódni, így a P680⁺Pheo⁻ töltérekombináció könnyen bekövetkezhet. Ennek eredményeként a P680 triplett állapotba (³P680) kerül, mely forma közönséges (triplett) oxigénnel reagálva reaktív szingulett oxigént eredményez: $^3\text{P680} + ^3\text{O}_2 \rightarrow \text{P680} + ^1\text{O}_2$ [84,85]. A szingulett oxigén ezután a D1 fehérje sérülését okozza. Részben vagy teljesen inaktív vízbontó rendszer esetén pozitív töltések (Y₂⁺, P680⁺) halmozódhatnak fel a donor oldalon, ami szintén reaktív termékek (Car⁺, Chl⁺) képződéséhez és a D1 sérüléséhez vezet. Ilyen esettel találkozhatunk, amikor nagy pH-grádiensnél, a lumen oldal savasodása miatt Ca²⁺-kiválás következik be a WOC-nál, ezáltal az részben inaktívvá válik [86]. Fényaktiváláskor, amikor kezdetben szintén teljesen inaktív a vízbontó rendszer, ugyancsak megfigyelhető donor oldali fénygátlás [87]. A D1 mindkét típusú sérülés hatására "triggerelődik", majd autoprotolízist szenved. Ez azt jelenti, hogy a fehérje hasadását nem közvetlenül az említett reaktív ágensek (¹O₂, Car⁺, Chl⁺) okozzák, amit azzal bizonyítottak, hogy megfelelő növényi mintát alacsony hőmérsékleten megvilágítva nem hasadt el a D1 fehérje, de ugyanazt a mintát ezután sötétben felmelegítve igen [88,89]. A "triggerelődés" valószínűleg a sérülés hatására bekövetkező speciális konformációváltozás. Hasítását követően a D1 kiválik a PS II-ből, ami ennek hatására részlegesen szétesik. Hogy ez a szétesés milyen fokú még nem tudni, de kétséget kizáróan magában foglalja a vízdoldható fehérjék leválását és a WOC mangánjainak kikötődését. A részlegesen szétesett PS II a tilakoid membrán gránum régiójából a sztróma régióba vándorol, ahol megtörténik a *de novo* szintetizálódott D1 beépülése [82,83]. Ezt követően az előbb leírt eseménysor fordítottja játszódik le: a csonka PS II visszavándorol a gránum régióba, ahol megtörténik végső összeállítódása és aktiválása. Ez utóbbi magában foglalja a vízbontó rendszer fényaktiválását is.

Ha a fénygátlás első lépéseit kívánjuk tanulmányozni, akkor igen praktikus megközelítés a jelenség anaerob körülmények közötti vizsgálata, így ugyanis a szingulett oxigén (és egyéb reaktív oxigénformák) zavaró (károsító) hatása nagyrészt kiküszöbölhető és az egyes elektrontranszport-komponensek látszólagos csökkenése nagyrészt a primér gátlással hozható összefüggésbe. Ezzel a megközelítéssel sikerült kimutatni a Q_A központi szerepét a PS II fény okozta sérülésénél, egyúttal cáfolni azt a korábban közkeletű nézetet, miszerint a fénygátlás elsődleges hatóhelye az üres Q_B-kötő zseb [90,91].

Egymástól elkülönítve vizsgálhatók a fotoszintetikus elektrontranszportlánc komponensei elektronspin rezonancia spektroszkópia [92,93] ill. termolumineszcencia (TL) módszer [94-96] segítségével. Az eredmények értelmezésénél problémát jelent, hogy a fényaktiválásban kulcsszerepet játszó Q_A -hoz mind ESR-ben ($g=1,82$ és $g=1,9$ $Fe^{2+}Q_A$ jelek [97]), mind TL-ben (Q- és C-sávok) több különböző jel tartozik. A $g=1,9$ jelhez a non-hem vas bikarbonát-iont koordináló, a $g=1,82$ jelhez bikarbonátmentes állapotát rendelik. Valójában, mivel a jel/zaj viszony javítása érdekében mindig formiátot adtak a mintához, amely kiszorítja a bikarbonát-iont kötőhelyéről, csak a $g=1,82$ ESR-jel fénygátlás okozta csökkenését vizsgálták [90]. A termolumineszcenciás vizsgálatoknál további problémát jelent, hogy TL-sávok egy részénél bizonytalan, hogy milyen donor-akceptor pár tartozik hozzá. Mivel mindkét módszerrel a fotoszintetikus elektrontranszportlánc fénygátlás szempontjából fontos komponenseiről nyerhetünk információkat, ezért a bizonytalanságok csökkentése ill. a jelenség újabb oldalról való tanulmányozása céljából - összehasonlító TL és ESR vizsgálatok végzését, továbbá a kérdéses TL-sávok ESR-mérésekkel történő azonosítását határoztuk el.

Célkitűzés

Amint az előző fejezetekben bemutatásra került, a fénygátlás és fényaktiválás tanulmányozása nagyban hozzájárult a fotoszintézis ill. azon belül a második fotokémiai rendszer és vízbontó apparátus megismeréséhez. A felmerülő új kérdések további ígéretes kutatási perspektívát nyújtanak. Munkánk kezdetén ezért három idevágó részterület tanulmányozását tűztük ki célul:

1. Összehasonlító elektronspin rezonancia és termolumineszcencia mérések segítségével a Q és C TL-sávok eredetének tisztázását. Kísérleteket végezni annak megállapítására, vajon a Q_A kinon akceptor $g=1,9$ vagy $g=1,82$ formája vesz-e részt ezen töltésrekombinációkban.
2. A TL-sávok eredetének tisztázása után összehasonlító ESR- és TL-vizsgálatokkal, anaerob körülmények között tanulmányozni a fénygátlás primér folyamatait. Meghatározni a többféle állapottal leírható elektrontranszport-

komponensek (Cyt b_{559} , $Fe^{2+}Q_A$) különböző formáinak fénygátlással szembeni érzékenységét.

3. Vizsgálni szintetikus Mn-komplexek elektrononálási és fényaktivási képességét. Összefüggéseket keresni a Mn-komplexek szerkezete, a komplexeket alkotó Mn-ionok száma, vegyértékállapota, a Mn-ionokkal koordinatív kötést kialakító atomok (O vagy N) milyensége és az elektrononálás/fényaktiválás hatékonysága között.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti anyagok

Növényi anyagok

A tilakoid membránok és PS II részecskék izolálásához használt fiatal borsó (*Pisum sativum* L. c.v. Rajnai törpe) növényeket üvegházban neveltük, a spenót (*Spinacea oleracea* L.) leveleket piacról szereztük be.

Mesterséges Mn-komplexek

A fényaktiválás során felhasznált 13-féle Mn-komplexet külföldi partnereink állították elő a Department of Chemistry, University of Poona (India) laboratóriumaiban prof. Subhash Padhye irányításával. A 13 komplex közül 10-nek a szintézise irodalomban közölt módszerek segítségével történt [98-101]. A további három vegyületet az alábbi módon állították elő:

M-1(L_2). Szintézise $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ és 3,5-di(*terc*-butil)-1,2-benzokinonmonoxim (= L_2) reakciójával történt 96%-os etanolban, 1:2 molarány mellett. A keletkező zöld színű csapadékot szűrték, mosták majd vákuumban szárították.

M-2(L_3). Előállítására hasonló módon történt, de itt mangán-klorid kristályvizes Mn-acetátból $\{Mn(OAc)_2 \cdot 2H_2O\}$ indultak ki ($L_3 = L_2$).

M-2(L₄/L₈). Mn-acetátot és 2-hidroxi-1,4-naftokinont (=L₄) 1:2 mólarányban reagáltattak metanol-víz közegben, nitrogén atmoszféra alatt. A keletkező [Mn(L₄)₂(H₂O)₂] komplexhez ezután 1,10-fenantrolint (=L₈) adták.

A kész komplexeket argon gáz alatt tároltuk. Az elektrondonálási és fényaktiválási kísérletekben frissen készített dimetil-szulfoxidos (DMSO) oldataikat használtuk.

Biokémiai módszerek

Tilakoid membránok izolálása

100 g megmosott borsó- v. (összedarabolt) spenótlevelet turmixgépben 10 s-ig törtünk 200 ml 0,4 M NaCl / 2 mM MgCl₂ / 20 mM Tricin (pH 8,0) pufferben [102]. A nyert szuszpenziót két réteg sajtruhán átszűrtük és 1000 g értéken egy percig centrifugáltuk. Az üledéket kidobtuk, a felülúszót 7 percig centrifugáltuk 3000 g-n. Az így kapott pelletet felszuszpendáltuk 150 ml térfogatú 150 mM NaCl / 5 mM MgCl₂ / 20 mM Tricin (pH 8,0) pufferben, majd ezt újabb 7 perces 3000 g-n végzett centrifugálás követte. Az üledéket 3-4 ml 0,4 M szacharóz / 15 mM NaCl / 5 mM MgCl₂ / 20 mM MES (pH 6,5) pufferben szuszpendáltuk.

PS II membránrészek (BBY részecskék) izolálása

A 0,4 M szacharóz / 15 mM NaCl / 5 mM MgCl₂ / 20 mM MES (pH 6,5) pufferben szuszpendált tilakoid membránokat Triton X-100 jelenlétében (Triton/Chl = 25:1 w/w; [Chl] = 2 mg/ml) 30 percig inkubáltuk 0°C-on [102]. A gránum régió membránjait 40 000 g-s 30 percig tartó centrifugálással ülepitettük. A méréseket zavaró keményítő-szennyeződéstől 8000 g-s centrifugálással szabadultunk meg, majd a felülúszót továbbvíve ismét egy 40 000 g-s ülepités következett. Esetenként a szuszpenzió pH-értékét 6,5 helyett 5,0-ra vagy 5,5-re állítottuk be. A végső koncentrációt [Chl] = 5-8 mg/ml-nek választottuk. A mintákat -80°C-on tároltuk a felhasználásig. A BBY részecskéket oxigénfejlődés és termolumineszcencia mérésével

valamint a Chl a/Chl b arány meghatározásával jellemeztük. A Chl-meghatározás 80 % acetoneban történt Arnon módszerével [103].

Mn-kivonás

A PS II membrándarabok Mn-mentesítése 30 perces 5 mM hidroxil-amin (a szuszpendáló pufferben feloldva) inkubációval történt 0,5 mg/ml Chl-koncentráció mellett sötétben, jégen [61]. A mintákat ezután lecentrifugáltuk, kétszer mostuk és az eredeti 0,4 M szacharóz / 15 mM NaCl / 5 mM MgCl₂ / 20 mM MES (pH 6,5) pufferben szuszpendáltuk, majd termolumineszcencia és oxigénfejlődés mérésével jellemeztük.

Fényaktiválás

A Mn-mentes PS II-részecskéket 100 μ M MnCl₂-dal ill. ekvivalens mennyiségű Mn-kompleksszel fényaktiváltuk 0,4 M szacharóz / 110 mM NaCl / 20 mM CaCl₂ / 20 mM MES (pH 6,5) pufferben, 10 μ M DPIP jelenlétében. A fényaktiválás 20 egymást követő 20 s időtartamú vörös, gyenge fényű megvilágítással (Walz 102L; λ = 650 nm; sáv-félszélesség: 25 nm; I = 1 W/m²) történt szobahőmérsékleten, 20 s-os (sötét) szünetekkel, 0,125 mg/ml Chl-koncentráció mellett. Anyagainkat ezután lecentrifugáltuk, kétszer mostuk és a szokásos 0,4 M szacharóz / 15 mM NaCl / 5 mM MgCl₂ / 20 mM MES (pH 6,5) pufferben szuszpendáltuk. A kapott mintákat biofizikai módszerekkel sokoldalúan jellemeztük.

Fénygátlás

A fénygátlás-kísérleteknél alkalmazott anaerob körülményeket úgy értük el, hogy az előállított PS II preparátumokat - higítás nélkül - ESR-csőbe töltöttük és 2 órán keresztül szobahőmérsékleten sötétben állni hagytuk. Megfigyeléseink szerint ezek a nagy töménységű minták - ismeretlen módon - spontán oxigénmentessé válnak, így semmilyen további kémiai adalékra (pl. ditionit v. glükóz/glükóz-oxidáz/kataláz elegy) nincs szükség. A minták fénygátlását különböző ideig tartó, szobahőmérsékleten

végrehajtott, 800 W/m^2 intenzitású, ESR-csőben végzett megvilágítással értük el. A fénygátlás által indukált, méréseket zavaró átmeneti változásokat 2 h időtartamú sötétadaptálással küszöböltük ki.

Biofizikai módszerek

Az oxigénfejlődés mérése

Az oxigénfejlődés sebességét Clark-elektóddal (Hansatech) mértük szobahőmérsékleten, telítési fehér fényen, $30 \mu\text{g/ml}$ Chl-koncentrációnál. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc különböző szakaszait exogén elektronakceptorok (fenil-p-benzokinon, dikloro-p-benzokinon, stb.) adásával vizsgáltuk, amelyek különböző endogén elektrontranszport-komponensektől képesek elektron átvételére. A flash-indukált oxigénfejlődés mértékét egy saját készítésű Joliot-típusú elektóddal mértük [104]. $100 \mu\text{l}$ mintát az elektóddal felületére rétegeztünk és öt perc sötétadaptálás után rövid fényimpulzusokkal világítottunk meg, miközben mértük a felszabaduló oxigén mennyiségét.

Fluoreszcencia indukció mérése

A fluoreszcencia indukciót PAM (Walz) spektrofluoriméterrel mértük. $10 \mu\text{g/ml}$ Chl-koncentrációjú mintát modulált vörös vagy fehér fényel világítottunk meg és mértük a kibocsátott fluoreszcens fény intenzitását. Elektrononálási kísérleteinknél $10\text{--}1000 \mu\text{M}$ MnCl_2 ill. ekvivalens mennyiségű komplex hozzáadása után mértük a fluoreszcencia felfutását. A berendezés felépítése lehetővé tette, hogy a fluoreszcencia indukciót nemcsak a PAM saját, hanem pl. az oxigénmérő mintatartójában mérjük, így lehetőség nyílt egyazon mintán egyidőben oxigénfejlődést és fluoreszcenciát mérni. A mérések vezérlése, a fluoreszcencia tranziensek kiértékelése egy erre a célra kifejlesztett gyári szoftverrel (FIP) történt.

Termolumineszcencia mérése

A termolumineszcencia méréseket házi építésű berendezésekkel végeztük. 0,4 ml térfogatú és 50 μg klorofillt tartalmazó mintákat 10 W/m^2 intenzitású fehér fénnel világítottunk meg 30 s-ig alacsony (-40° v. -80°C) hőmérsékleten. Megvilágítás után a mintákat $20^\circ\text{C}/\text{min}$ sebességgel $+80^\circ\text{C}$ -ig melegítettük miközben a hőmérséklet függvényében kibocsátott termolumineszcencia-fény intenzitását fotoelektron-sokszorozóval (EMI 9558 A vagy Hamamatsu R 2228) mértük. A kapott, több sávból álló hőmérséklet-fényintenzitás görbét termolumineszcencia görbének nevezzük. Az egymást átfedő TL-sávokat a legkisebb négyzetek módszerén alapuló görbeillesztő programmal bontottuk komponens-sávokra [105]. A Q- és C-sáv lecsengésének mérésekor a fűtést -25°C ill. $+25^\circ\text{C}$ -on különböző ideig megállítottuk, majd a spektrumokat továbbmérve mérési pontonként határoztuk meg az adott sávhoz és hőmérsékletéhez tartozó kinetikát.

Elektronspin rezonancia mérése

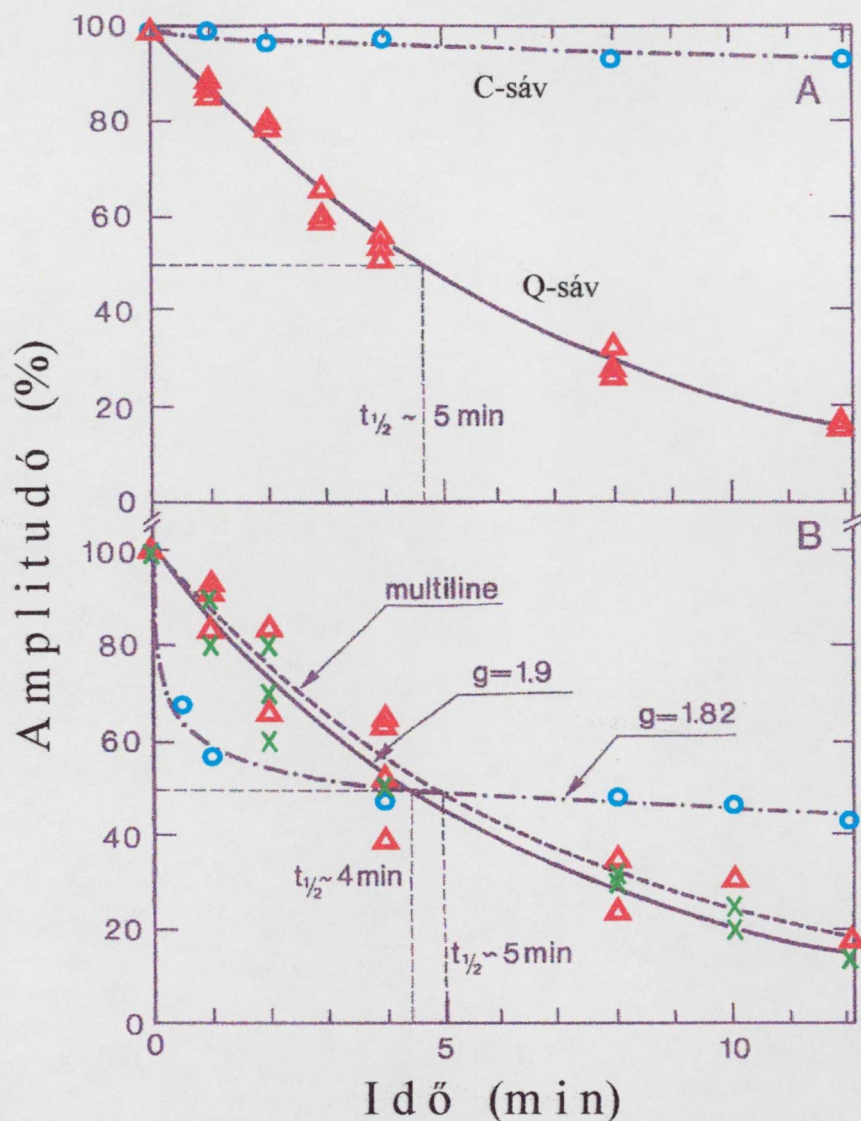
Az ESR-méréseket Bruker ER 200 D-SCR ill. JEOL RE1X típusú spektrométerekkel végeztük. Az alacsony hőmérsékletű mérések a spektrométer mágnespofái között elhelyezkedő Oxford ESR 9 kriosztátban történtek. 300 μl , 5-8 mg/ml Chl-koncentrációjú mintákat 3 mm belső átmérőjű ESR-csövekbe téve (ill. fénygátlás után abban hagyva) aceton/folyékony nitrogén fürdőben, vagy folyékony nitrogénben 1000 W/m^2 intenzitású fehér fénnel világítottunk meg 5 percig. Az ESR-spektrumokat PC segítségével átlagoltuk, tároltuk és analizáltuk.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

A Q TL-sáv eredete

Évek óta elfogadott tény az irodalomban, hogy az egész sejteknél, kloroplasztisz-szuszpenzióknál $+10^\circ\text{C}$ körül, PS II preparátumoknál 0°C -nál megjelenő, kinontípusú herbicidek hatására dominánssá váló, ún. Q TL-sávhoz az $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ töltésrekombináció rendelhető [94-96]. Hogy a kérdést lezártnak tekintett volta ellenére mégis revízió alá vettük, az tette indokolttá, hogy a Q_A kinon akceptor kétféle redukált formája (bikarbonátot kötő és bikarbonát-mentes non-hem vassal kölcsönhatva)

előkísérleteink szerint, a $Q_A \rightarrow Q_B$ elektrontranszport DCMU-val történő gátlásakor eltérő sebességgel rekombinálódik. A kérdés tisztázására a megfelelő ESR- és TL-jelek lecsengési kinetikájának vizsgálatát választottuk. A TL- és ESR-jelek relaxációját az okozza, hogy a PS II donor oldalán csapdázódott pozitív és akceptor oldalán csapdázódott negatív töltések (bizonyos valószínűséggel) visszajuthatnak a P680-ra, ahol megtörténik rekombinációjuk. Ennek eredményeként a P680 gerjesztett állapotba ($P680^*$) kerül, ahonnan többféle módon is visszakerülhet alapállapotba: (1) ismét töltésszétválasztódás következik be, (2) a gerjesztési energia hővé alakul (disszipálódik) vagy pedig (3) fénykissugárzás történik, amit késleltetett lumineszcenciának neveznek. A töltésrekombinációhoz szükséges gerjesztési energiát a környezet hője biztosítja, ezért a különböző TL-sávok exponenciális felfutásúak (a sávok jellegzetes asszimmetrikus alakját az okozza, hogy a hőmérséklet növelésével egyre nagyobb a rekombináció valószínűsége, viszont a bekövetkezett töltésrekombinációk miatt egyre kisebb a csapdázódott töltések száma). A fotoszintetikus elektrontranszportlánc működésének lényeges része, az elektronok áramlását az teszi lehetővé, hogy az egyes elektrontranszport-komponensek - a fény segítségével történő "energiapumpálástól" eltekintve - növekvő redoxpotenciáljuknak megfelelően követik egymást. Ez más szóval fogalmazva és a PS II-re vonatkoztatva azt jelenti, hogy minél távolabb stabilizálódnak a töltések a P680-tól, annál alacsonyabb oxidációs-redukciós potenciállal, energiaértékkel rendelkeznek. Így az egyes töltésrekombinációs reakciókhoz különböző, az adott rekombinációra jellemző aktiválási energiák és következésképpen - egyazon hőmérsékleten - különböző valószínűségek tartoznak (annál kisebb, minél távolabb található egymástól a pozitívan töltött (oxidált) donor és negatívan töltött (redukált) akceptor). Ennek megfelelően, a különböző donor-akceptor pároknak különböző - más-más csúcshőmérséklettel ill. lecsengési kinetikával jellemezhető - TL-sávok felelnek meg [94-96]. A különféle TL-sávok valamint ESR-jelek lecsengési kinetikái így elvileg bármely hőmérsékleten tanulmányozhatóak, célszerű volt azonban olyan hőmérsékletet választanunk, ahol a jelek mérhető sebességgel relaxálódnak (se túl lassan, se túl gyorsan). Ezt úgy lehetett elérni, hogy - képletesen fogalmazva - a Q TL-sáv "lábánál", azaz -25°C -on (ld. 7. ábra) állítottuk meg adott ideig a fűtést ill. ilyen hőmérsékletre melegítettük ugyanennyi időre a mélyhőmérsékleten tartott, ESR-méréshez előkészített mintát.



6. ábra. PS II részecskék Q- (Δ) és C (o) TL-sávjának (A) valamint "multiline" (Δ), $g=1,9$ (\times) és $g=1,82$ (o) ESR-jeleinek (B) sötétben való lecsengése -25°C -on $20 \mu\text{M}$ (A) ill. $150 \mu\text{M}$ DCMU jelenlétében ($\text{pH}=6,0$). A minták 200 K-es gerjesztését adott idejű sötét inkubálás követte -25°C -on. ESR-kondíciók: $4,4 \text{ K}$ ($\text{Fe}^{2+}\text{Q}_\text{A}^-$ -jelek) ill. 10 K ("multiline") mérési hőmérséklet; $9,42 \text{ GHz}$ mikrohullámú frekvencia; 31 mW mikrohullámú teljesítmény; $1,6 \text{ mT}$ moduláció.

A mérési sorozatok eredményét az 6. ábra mutatja. Az ábra A részén a Q-sáv és a DCMU-kezelés hatására $+45^\circ\text{C}$ -nál megjelenő másik fő TL-sáv, az ún. C-sáv intenzitása lett ábrázolva a -25°C -os (sötét) inkubálás függvényében, B részén pedig az $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ töltésrekombinációval kapcsolatba hozható elektrontranszport-komponensek ESR-jeleinek (szintén -25°C -os) lecsengési görbéi láthatók. A Q-sávhoz tartozó lecsengési félidő ($t_{1/2}$) 5 percnak adódott, jó egyezésben a vízbontó rendszer S_2 állapotában

megjelenő ún. "multiline" szignál félidejével ($t_{1/2} \approx 4$ min). A szintén az S_2 -re jellemző, különböző kationos ($Ca^{2+} \rightarrow Sr^{2+}$ csere) ill. anionos (F^- , I^- , NO_3^{2-} , stb.) kezelések hatására megnövekedő ún. $g=4,1$ jel lecsengése irodalmi adatok alapján [106] sokkal gyorsabb annál, hogy a Q-sávot okozó töltésrekombinációban részt vehessen. Noha nagy valószínűséggel kizárt kapcsolatuk a Q-sávval, érdemes megjegyezni, hogy a többi oxidált (a normál elektrontranszportban résztvevő vagy járulékos) donor ennél vagy sokkal gyorsabban (Y_Z , Chl^+), vagy sokkal lassabban (Y_D , [=Tyr160 a D2 fehérjén], Cyt b_{559} magas potenciálú formája [HP]) relaxálódik [93]. Szintén említést érdemel, hogy az irodalmi adatok lassúbb S_2 -lecsengésről számolnak be, mint amit kísérleti eredményeink mutatnak [107]. Ez annak tudható be, hogy a hivatkozott szerzők az S_2 félidejét DCMU nélkül mérték, amikor nem az általunk vizsgált $S_2Q_A^-$, hanem az (ún. B-sávot okozó) $S_2Q_B^-$ töltésrekombináció a domináns. Ez utóbbi magasabb aktiválási energiával rendelkezik, ezért ugyanazon a hőmérsékleten hosszabb S_2 élettartam tartozik hozzá.

Az elsődleges kinon akceptor kétféle formája közül a $g=1,9$ ESR-jelű, amely a bikarbonátot kötő non-hem vassal való mágneses csatolás eredményeként jelenik meg, a Q-sávval és a "multiline" szignállal megegyező kinetikával cseng le ($t_{1/2} \approx 5$ min), míg a bikarbonát-mentes vassal csatolt Q_A $g=1,82$ ESR-jele kétfázisú lecsengést mutat: a gyors fázis élettartama jóval rövidebb, a lassú fázis élettartama jóval hosszabb mint 5 perc. A redukált Q_A (Q_A^-) kétféle formájának eltérő rekombinációs sebessége azt jelenti, hogy a $g=1,9$ és $g=1,82$ szignálokkal jellemzett PS II populációk nemcsak a non-hem vas bikarbonátot kötő vagy bikarbonát-mentes állapotában térnek el egymástól, hanem valamilyen módon az elektrontranszport-folyamataik is különböznek.

Mivel a redukált Q_A nemcsak a Q-sáv, hanem pl. a C-sáv kialakításában is részt vesz/vehet, ezért ennek a sávnak a lecsengését is megvizsgáltuk $-25^\circ C$ -on. Mint az ábra A részén látható, a sáv a vizsgált időintervallum alatt (14 min) csak csekély mértékű csökkenést szenvedett, ami arra utal, hogy a Q_A^- ($g=1,9$) nem vesz részt ebben a töltésrekombinációban, tehát nagy részének a Q-sáv kialakításában kell szerepet játszania. A C-sáv és a Q_A^- ($g=1,82$) jel viselkedése, valamint a Q-sáv, "multiline" szignál és $g=1,9$ jel megegyező ütemű lecsengése alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a Q-sáv kialakulásánál a vízbontó rendszer S_2 -állapotával az elsődleges kinon akceptor $g=1,9$ -es formája hat kölcsön. Ez ekvivalens azzal a kijelentéssel, hogy

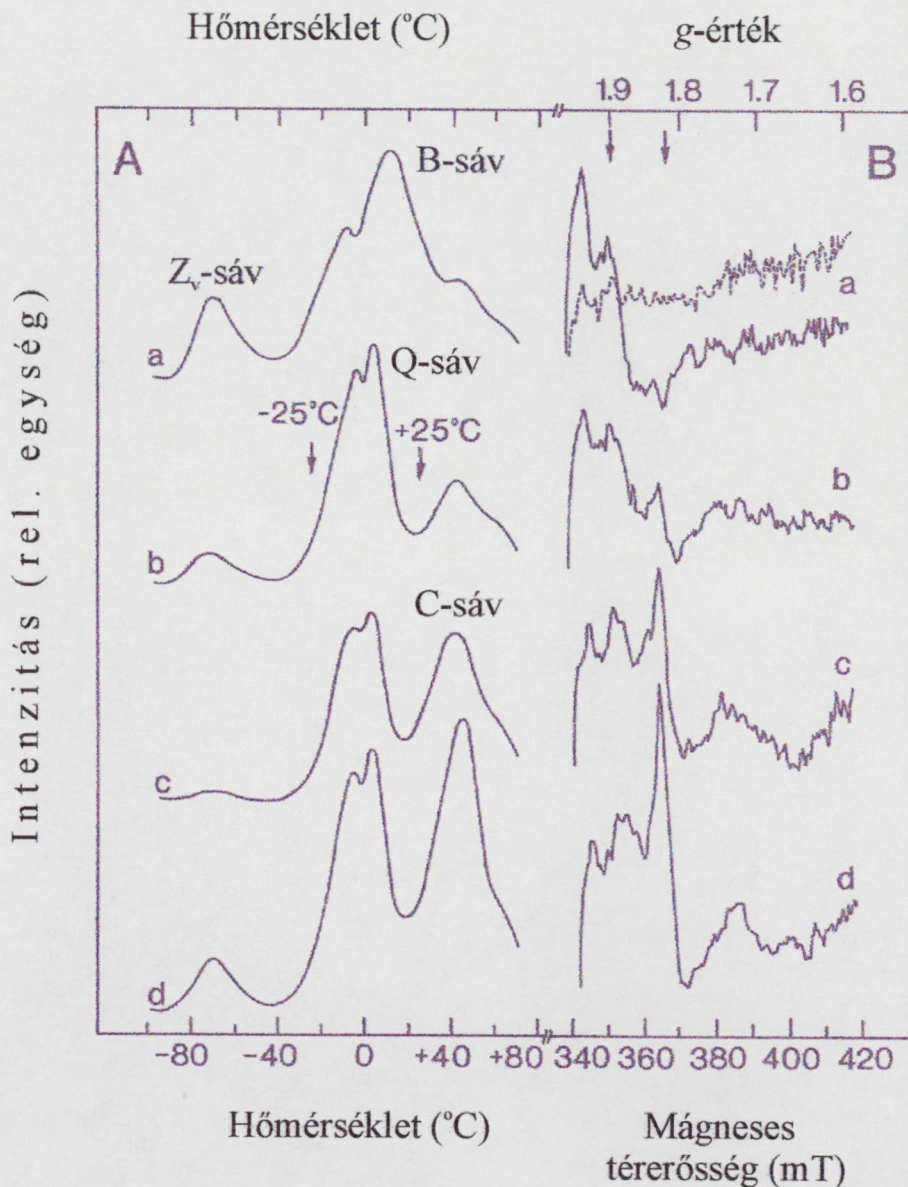
a non-hem vasnál bikarbonát-iont kötő PS II populációt alkotó centrumok (DCMU-kezelés utáni) töltésrekombinációs folyamatai Q-sávot eredményeznek. A lehetséges magyarázatokkal és fiziológiai vonatkozásokkal kapcsolatban ld. a következő fejezeteket.

A C TL-sáv eredete

Ez a kérdés több okból is érdekes volt számunkra. Vizsgálataink előtt a C-sáv eredetére vonatkozóan legalább háromféle - részben egymásnak ellentmondó - elképzelés létezett [96]: a redukált Q_A a vízbontó rendszer S_0 v. S_1 állapotával, egy közelebről nem azonosított D^+ donorról, vagy pedig a járulékos elektrondonor Y_D -vel rekombinálódik, amely az Y_Z -vel szimmetrikusan helyezkedik el a PS II donor oldalán. A vázolt lehetőségek közül az utóbbi hozzárendelés tűnt a legvalószínűbbnek. Tovább árnyalták a képet azok az eredmények, miszerint a C-sáv - közvetve vagy közvetlenül - a WOC Ca^{2+} -mentes állapotát tükrözi [108], aminek ellentmond, hogy Mn-mentes preparátumoknál is megfigyelhető. Az előző fejezetben leírt Q_A -heterogenitás, ami a $g=1,82$ és $g=1,9$ $Fe^{2+}Q_A^-$ formák eltérő lecsengésében jelentkezett az $S_2Q_A^-$ töltésrekombináció során, szintén indokoltá tették a sáv vizsgálatát. Mindezen okokból összehasonlító ESR- és TL-méréseket végeztünk a kérdés tisztázása céljából.

A 7. ábra A részén különféle kémiai kezeléseknél alávetett PS II preparátumok TL-spektrumai láthatók. A kezeletlen minták TL-spektrumán (a görbe) két fő sáv figyelhető meg: a $-70^\circ C$ -on jelentkező, ismeretlen eredetű ún. Z_V -sáv és az $S_2Q_B^-$ töltésrekombinációból származó, PS II részecskéknél $+15^\circ C$ -os csúcshőmérsékletű (intakt leveleknél, kloroplasztiszoknál $30^\circ C$ -nál megjelenő) B-sáv (a szintén B-sávot okozó $S_3Q_B^-$ töltésrekombinációtól eltekinthetünk, ugyanis a minták gerjesztése $-80^\circ C$ -on történt, ahol csak egy töltésszétválasztódás lehetséges). A B-sáv emelkedő szakaszában $0^\circ C$ -nál megfigyelhető váll műtermék, ami a mintákat alkotó, azok közegéül szolgáló víz (hőt igénylő, a fűtés sebességét átmenetileg lecsökkentő) megolvadásából származik. A B-sáv ereszkedő oldalán megfigyelhető vállaknak két további TL-sáv felel meg: a $+45^\circ C$ -on jelentkező, vizsgálat tárgyát képező C-sáv és egy $+65^\circ C$ csúcshőmérsékletű, a fotoszintetikus elektrontranszporthoz nem kapcsolható sáv. DCMU-kezelés hatására (b görbe) a B-sáv eltűnt, és helyette megjelent az $S_2Q_A^-$ töltésrekombinációból származó

Q-sáv. Ezzel egyidejűleg jelentősen megnőtt a C-sáv intenzitása. Amennyiben a DCMU-kezelést alacsonyabb pH-n (**c** görbe), vagy nátrium-oxalát jelenlétében (**d** görbe) hajtottuk végre, mely kezelések elősegítik a bikarbonát-ion disszociációját a non-hem vasról, a C-sáv növekedése még határozottabb volt.

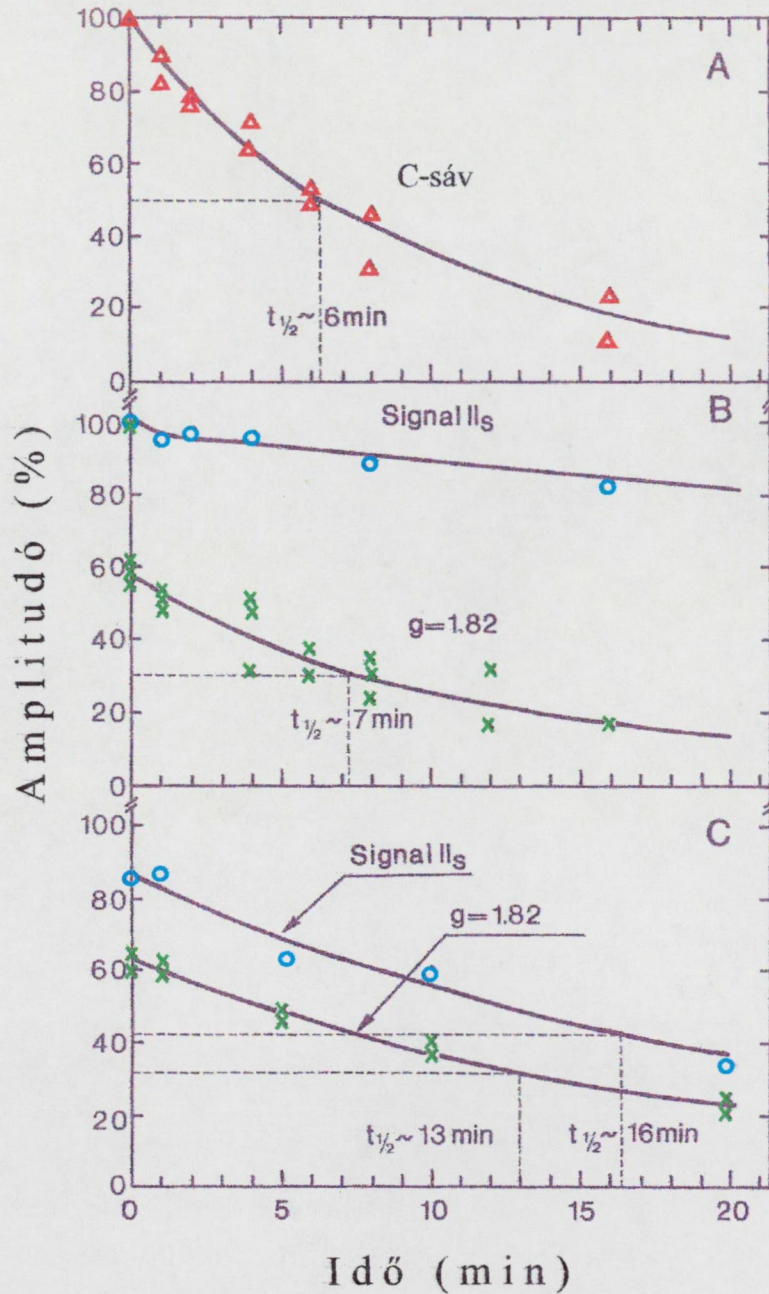


7. ábra. Különböző kezelések hatása PS II részecskék TL- (A) és ESR-spktrumára (B). (a) Kezelés nélkül, pH=6,0. (b) DCMU jelenlétében, pH=6,0. (c) DCMU jelenlétében, pH=5,5. (d) nátrium-oxalát + DCMU jelenlétében, pH=6,0. A (B) részen feltüntetett szaggatott vonal egy megvilágítás nélkül felvett ESR-spektrumot mutat. Koncentrációk: 20 μ M (A) ill. 150 μ M (B) DCMU; 50 mM nátrium-oxalát. ESR-kondíciók: 4,4K mérési hőmérséklet; 9,42 GHz mikrohullámú frekvencia; 31 mW mikrohullámú teljesítmény; 1,6 mT moduláció.

Ugyanezen kezelések $\text{Fe}^{2+}\text{Q}_A^-$ jelekre gyakorolt hatása a 7. ábra *B* részén van bemutatva. Sötétadaptált mintákat (szaggatott vonal) megvilágítva (a görbe) a már ismertett $\text{Fe}^{2+}\text{Q}_A^-$ jelet kaptuk, valamint egy ismeretlen eredetű sávot $g=1,95$ értéknél. Ez utóbbi jelet munkánk során nem vizsgáltuk, ugyanis a $g=1,9$ és $g=1,82$ jelekkel ellentétben már 200K-en is mérhető sebességű lecsengést mutatott, így valószínűleg nem hozható kapcsolatba a Q_A^- -val. A két $\text{Fe}^{2+}\text{Q}_A^-$ jel közül kezeletlen mintában a $g=1,9$ intenzitása sokkal nagyobb volt. Mintáinkat az *A* panelnél leírt kémiai kezeléseknél alávetve a C-sáv változásával párhuzamosan a $g=1,82$ jel (és a hozzá tartozó $g=1,67$ jelrészlet) folyamatos növekedése volt megfigyelhető, miközben a Q-sáv és a $g=1,9$ jel alig változott. Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a C-sávot okozó töltésrekombinációban a Q_A^- populáció $g=1,82$ ESR-jelet formáló része vesz részt, ami, mivel a csökkenő pH és az oxalát-kezelés elősegíti a bikarbonát-ion disszociációját a non-hem vasról, további megerősítése annak, hogy a $g=1,82$ $\text{Fe}^{2+}\text{Q}_A^-$ -jel a bikarbonát-mentes non-hem vashoz rendelhető.

Ezen elképzelésünk megerősítésére ill. a donor-oldali komponens azonosítása céljából lecsengési kísérleteket végeztünk $+25^\circ\text{C}$ -on is, ahol a C-sáv lecsengési félideje perces időtartományba esik. Méréseink eredményét a 8. ábra mutatja. A C-sáv felezési ideje (*A* panel) mintegy 6 percnél adódott, ami jól egyezett a $g=1,82$ jel lassú komponenséhez tartozó $t_{1/2} \approx 7$ min értékkel (*B* panel). Ezzel szemben a $g=1,9$ jel és Q-sáv kevesebb mint 1 perc alatt teljesen eltűnt, így megerősítést nyert, hogy a C-sáv kialakításában szerepet játszó akceptor-oldali komponens a redukált Q_A $g=1,82$ ESR-jellel jellemzett formája.

Nagyobb problémát jelentett a donor-oldali komponens azonosítása. A "multiline" szignál ezen a hőmérsékleten - a Q-sávhoz és $g=1,9$ jelhez hasonlóan - gyorsan eltűnt, míg a Cyt b_{559} HP ESR-jele semmiféle csökkenést nem mutatott. Lassú csökkenést mutatott viszont az Y_D^+ -hez tartozó ún. Signal II_s ESR-jel (*B* panel), kinetikája azonban jelentősen eltért a $g=1,82$ jelétől. Ezt azzal próbáltuk magyarázni, hogy az Y_D^+ populációja az adott körülmények között valószínűleg nagyobb mint a redukált Q_A bikarbonát-mentes vassal kölcsönható formájáé, ezért töltésrekombinációkor az Y_D^+ ESR-jel látszólag lassúbb lecsengést mutat mint a $g=1,82$. Így, ha a $g=1,82$ jelet megnöveljük, gyorsabb Signal II_s lecsengést kell kapnunk. Ennek igazolása látható a 8. ábra *C* panelén, ahol is a Signal II_s és $g=1,82$ ESR-jelek lecsengési kinetikája a



8. ábra. PS II részecskék C- (Δ) TL-sávjának (A) valamint "Signal II_s" (o) és $g=1,82$ (\times) ESR-jeleinek (B,C) sötétben való lecsengése $+25^\circ\text{C}$ -on $20 \mu\text{M}$ (A) ill. $150 \mu\text{M}$ DCMU jelenlétében ($\text{pH}=6,0$). (A,B): kezeletlen minták; (C) 100 mM nátriumformiáttal kezelt minták. A PS II részecskék 200 K-es gerjesztését adott idejű sötét inkubálás követte 25°C -on. ESR-kondíciók: $g=1,82$ jelnél mint az 5. és 6. ábrán; "Signal II_s: 13 K mérési hőmérséklet, 200 nW mikrohullámú teljesítmény, 0,4 mT moduláció.

PS II preparátumok formiát-kezelésének hatására már igen jó egyezést mutat ($t_{1/2} \approx 13$ ill. 16 min). A hosszabb élettartam a formiát-kezelés hatására a non-hem vas környezetében bekövetkező változásoknak tudható be. Ez a kísérleti megközelítés ugyan nem tette lehetővé a C-sáv lecsengésének paralel vizsgálatát - ugyanis a formiát, kioltja a TL-emissziót és csökkenti a Q- és C-sáv amplitudóját [109] - viszont nagy segítséget jelentett eredetének vizsgálatában. Ereményeink publikálása [110] után nem sokkal jelent meg Johnson és mtsai közleménye [111] a C-sáv eredetével kapcsolatban. Velünk összhangban ők is az $Y_D^+Q_A^-$ töltésrekombinációt hozták összefüggésbe a sáv kialakulásával, bár a Q_A két formája között nem tettek különbséget.

Érdeemes megvizsgálni a C-sáv eredetét energetikai szempontból is. Az egyes TL-sávok csúcspozíciói szoros korrelációban vannak a megfelelő donor-akceptor párok redoxpotenciáljainak különbségével. A Q-és C-sáv közötti kb. 30°C távolság redoxpotenciálban kifejezve mintegy 150 mV különbséget jelent [108]. Tehát, ha a Q_A^- $g=1,82$ és $g=1,9$ formáját azonos redoxpotenciálúnak tételezzük fel, akkor a donor-oldali komponens redoxpotenciáljának ennyivel kell alacsonyabbnak lennie. Irodalmi adatok szerint az Y_D^+/Y_D és S_2/S_1 redox párok közötti redoxpotenciál-különbség 170-180 mV [112], ami alátámasztja a C-sáv = $Y_D^+Q_A^-$ megfeleltetést.

Elméleti alapon nem lehet kizárni azt az eshetőséget sem, hogy mind a Q-, mind a C-sávnak az $S_2Q_A^-$ töltésrekombináció felel meg, Ca^{2+} -mentes (inaktív vízbontó rendszerrel rendelkező) mintákban ugyanis a Q_A redoxpotenciálja mintegy 120 mV-os eltolódást szenved [108], ami esetleg a $Q_A (g=1,9) \rightarrow Q_A (g=1,82)$ konverziót tükrözi. Ennek azonban ellentmond a C-sáv és S_2 -állapot eltérő kinetikája ill. azon további megerősítésre váró (nem publikált) eredményünk, mely szerint a $Q_A/Q_A^- (g=1,82)$ és $Q_A/Q_A^- (g=1,9)$ redoxpotenciálok értéke csak kb. 10 mV-tal tér el egymástól. Az ellentmondás fő oka az lehet, hogy Vass és Inoue javaslatának [96] megfelelően a (domináns) C-sávon kívül valószínűleg egyéb sáv is található az 50°C körüli tartományban. Ezt a feltevést igazolja a nagy pH-grádiens és kiredukált PS I esetén ebben a hőmérsékleti régióban megjelenő ún. "afterglow" sáv [113] ill. a cseh kutatók által nemrég leírt, 50°C-nál jelentkező ún. CL-sáv [114]. Az idézett szerzők szerint az előbbi az S_2Q_A és S_3Q_A töltésrekombinációból származik oly módon hogy a Q_A -t a PS I-ből "visszafolyó" elektronok redukálják, míg utóbbi nincs közvetlen kapcsolatban a

fotoszintetikus elektrontranszporttal: keletkezését stressz hatására keletkező aktív oxigénformákkal hozták összefüggésbe.

Felmerül a kérdés, ha a $g=1,82$ és $g=1,9$ Q_A -forma redoxpotenciálja alig tér el egymástól, akkor miért nem vesznek részt együtt (kompetitív módon) a Q- és C-sáv kialakításában. Erre két magyarázat is lehetséges, mindkettő donor-akceptor oldali kölcsönhatást feltételez. Egyrészt számos jel utal arra, hogy donor-oldali változások - valószínűleg konformációváltozás útján - akceptor-oldali változásokat indukálnak [70,108,115]. Inaktív vízbontó rendszer esetén tehát lehetséges, hogy a $g=1,9$ forma $g=1,82$ -vé alakul és a Q- és C-sáv tulajdonképpen a PS II teljes mennyiségének aktív és inaktív részét mutatja. Másrészt az a tény, hogy az Y_D^+ - populáció lecsengési kinetikája függ a Q_A^- ($g=1,82$) populáció méretétől arra utal, hogy akceptor-oldali változások a donor oldalon indukálhatnak eltéréseket. Ez utóbbihoz érdekes irodalmi adalék, hogy a Q_A^- ($g=1,82$) lecsengés félideje jó egyezést mutat az $Y_D^+ S_0$ általi redukciójának jellemző idejével [112,115]. Mindezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a Q- és C-sáv a teljes PS II-mennyiség két eltérő tulajdonságokkal rendelkező részét reprezentálja.

Noha a donor- és akceptor-oldali változások vizsgálataink szerint paralel játszódnak le, további kísérleteket végeztünk arra vonatkozóan, vajon a két hatás elválasztható-e egymástól. Előzetes (nem publikált) eredményeink szerint ez lehetséges, bizonyos körülmények között ugyanis sikerült $S_2Q_A^-$ ($g=1,82$) ill. $Y_D^+Q_A^-$ ($g=1,9$) töltésrekombinációt megfigyelni. Ezen esetekben a Q- és C-sáv csúcshőmérséklete a Q_A^- ($g=1,82$) és Q_A^- ($g=1,9$) kismértékben különböző redoxpotenciálja miatt néhány fokos eltolódást mutatott a normál értékhez képest.

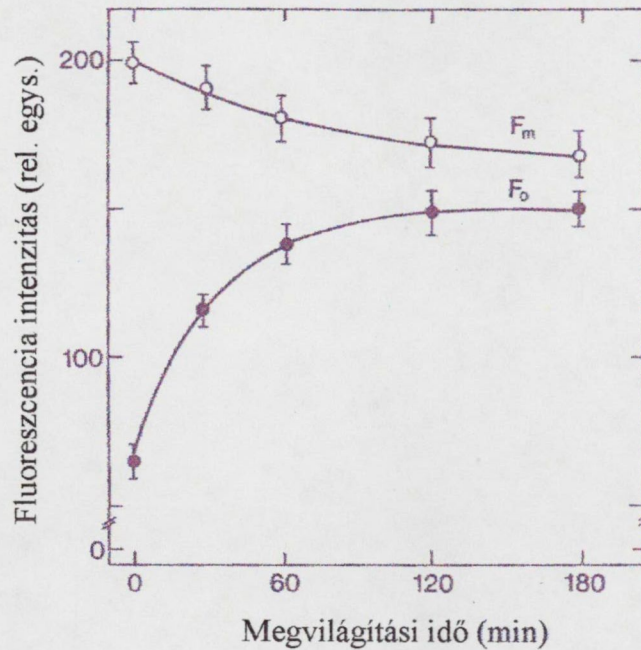
A C-sáv megjelenése ill. amplitudójának növekedése igen gyakran valamilyen stresszhatáshoz (alacsony pH, CO_2 -kivonás, stb.) kapcsolható [108]. Ugyanezek a stresszhatások a $g=1,82$ Q_A -forma arányának növekedését okozzák [97,116,117], tehát a stressz hatása vagy a stresszre adott fiziológiai válasz - legalábbis részben - a non-hem vas bikarbonát-mentessé alakulása lehet. CO_2 -mentes körülmények, amikor a non-hem vas szintén bikarbonát-mentessé válik, kedveznek az algák fénygátlás elleni védekezésében [118], feltehetően részben a $Q_A \rightarrow Q_B$ elektrontranszport sebességének, részben a donor-oldali elektrontranszport (WOC v. Y_D felőli) irányának szabályozása révén. Elképzelhető, hogy a WOC ΔpH -indukált Ca^{2+} -mentessé válása, majd az azt

követő akceptor-oldali változások is tulajdonképpen a $Q_A \rightarrow Q_B$ elektrontranszport sebességének - bikarbonát kikötődésével járó - leszabályozását hivatottak elősegíteni [108,115].

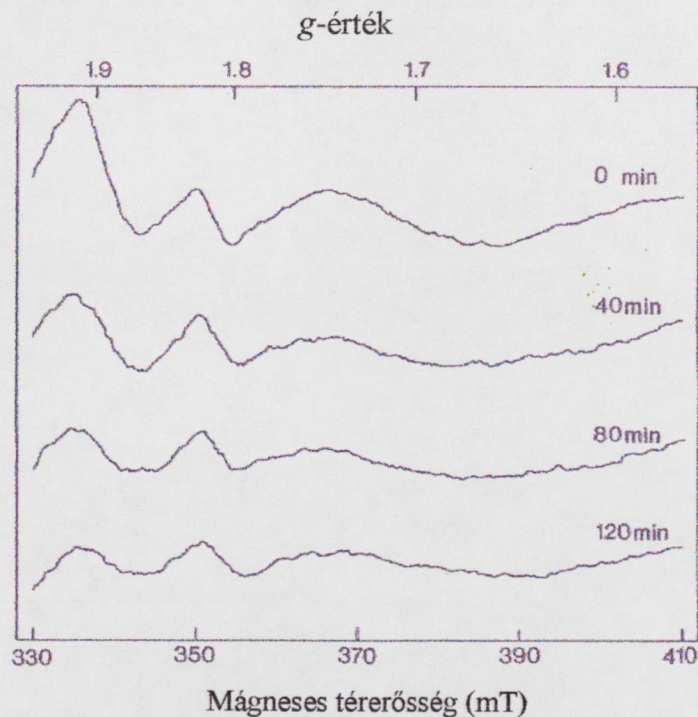
A Q_A elsődleges kinon akceptor $g=1,9$ és $g=1,82$ ESR-jellel leírt formáinak fénygátlással szembeni érzékenysége

Mint a bevezetőben már volt róla szó, a növényeket érő fénystressz során a Q_A elsődleges kinon akceptor kétszeres redukciója, protonációja és kötőhelyéről való kiválása következik be [82,83,90,91]. Az ezután lejátszódó irreverzibilis folyamatok vezetnek el a D1 fehérje sérüléséhez. Tekintettel a Q_A fénygátlásban játszott központi szerepére, felmerül a kérdés, van-e valamiféle különbség kétféle formájának fénygátlás során mutatott viselkedése között, vagy általánosabban fogalmazva: eltérő érzékenységgel rendelkezik-e a PS II két [Q_A ($g=1,82$)-t és Q_A ($g=1,9$)-et tartalmazó ill. Q- és C-sávval jellemzett] formája a fénygátlással szemben?

A kérdés legjobban anaerob körülmények között tanulmányozható, ilyen körülmények között ugyanis nem keletkezhet szingulett oxigén, ami a D1 fehérje gyors degradációját okozná, elfedve ezzel a folyamat primér lépéseit. Fontos, hogy a vízbontó rendszer intakt legyen, ellenkező esetben ugyanis alacsony fényintenzitásnál, oxigén hiányában is lejátszódó donor-oldali fénygátlás következne be [82,83]. Hogy az adott kísérleti körülmények között a donor- vagy az akceptor-oldali fénygátlás-e a domináns, az legegyszerűbben a fluoreszcencia jellemzők (F_0 = kezdeti fluoreszcencia és F_m = maximális fluoreszcencia) nyomon követésével dönthető el. Mint a 9. ábrán látható, a fénygátlás előrehaladtával az F_0 viszonylag gyors felfutást mutatott, ami a Q_A kétszeres redukciójával és protonációjával magyarázható [119]. Ekkor ugyanis nincs mód töltésstabilizálódásra (más szóval a reakciócentrumok zártak), ezért az elnyelt fényenergia kisugárzódik. Az F_m lassú csökkenése a $P680^+Pheo^-$ töltésrekombináció során keletkező 3P680 -nak tulajdonítható [91,120], ami kisebb valószínűséggel emittál fényt. Mivel a donor-oldali fénygátlásnál keletkező Chl^+ - és Car^+ -kationok (agresszív kémiai természetük miatt) az F_m gyors csökkenését okozták volna [86], így megállapítottuk, hogy annak mértéke kísérleteinknél elhanyagolható.

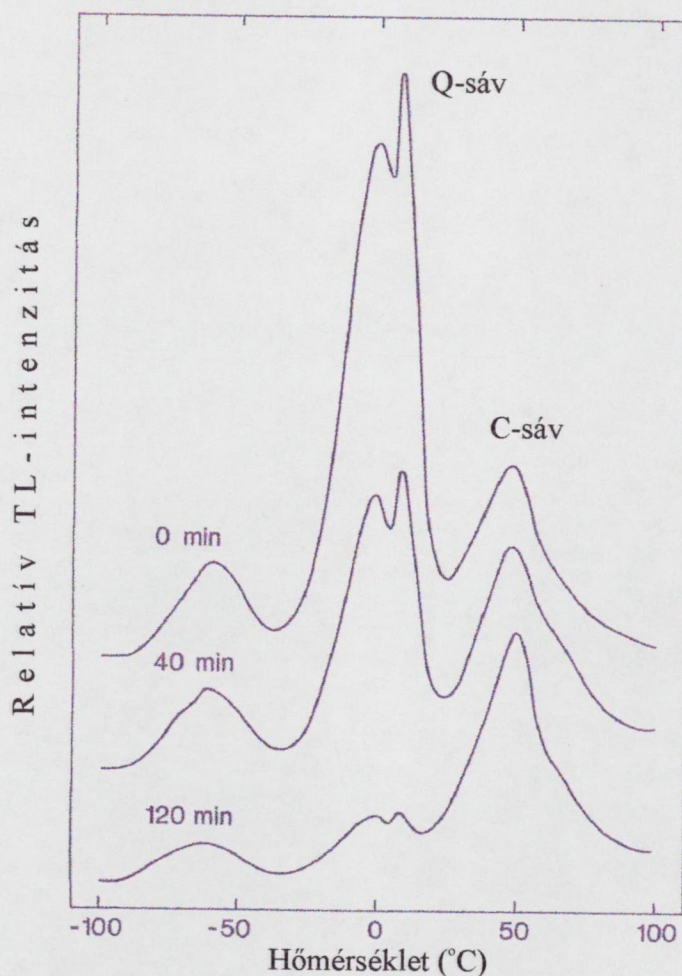


9. ábra. Anaerob fénygátlás F_m és F_o fluoreszcencia paraméterekre gyakorolt hatása. Mérések előtt a PS II preparátumot $10 \mu\text{g Chl/ml}$ koncentrációra hígítottuk és két órán keresztül szobahőmérsékleten sötétben állni hagytuk.



10. ábra. Anaerob fénygátlás $g=1,9$ és $g=1,82$ ESR-jelekre gyakorolt hatása. Mérések előtt a mintákat két órán keresztül szobahőmérsékleten sötétben állni hagytuk. ESR-kondíciók: 77 K megvilágítási hőmérséklet; 4,2 K mérési hőmérséklet; 20 mW mikrohullámú teljesítmény; 1,6 mT moduláció; 9,055 GHz mikrohullámú frekvencia.

A 10. ábrán a $g=1,9$ és $g=1,82$ $\text{Fe}^{2+}\text{Q}_A^-$ ESR-jelek amplitudójában fénygátlás hatására bekövetkező változások követhetők. Natív körülmények között egy viszonylag nagy $g=1,9$ és egy kisebb $g=1,82$ jel volt megfigyelhető. Kétórás fénygátlás hatására a $g=1,9$ forma jelentős, a $g=1,82$ forma csekélyebb mértékű csökkenést szenvedett el; a kezelés végére a két jel intenzitása hozzávetőleg megegyezett. A két Q_A -forma (pontosabban az azokhoz tartozó PS II centrumok) így eltérő érzékenységgel bír a fénygátlással szemben; a két típus közül a bikarbonát-mentes változat bizonyult rezisztensebbnek. A $\text{Fe}^{2+}\text{Q}_A^-$ jelek eltűnése ESR-inaktív Q_A -formák (Q_AH , Q_A^{2-} , Q_AH_2) keletkezésével, ill. a kétszeresen redukált, protonálódott Q_AH_2 kikötődésével magyarázható.



11. ábra. Anaerob fénygátlás Q- és C TL-sávra gyakorolt hatása. Mérések előtt a mintákat $125 \mu\text{g Chl/ml}$ koncentrációra hígítottuk és két órán keresztül szobahőmérsékleten sötétben állni hagytuk. Gerjesztési hőmérséklet: 200 K . A mérés $10 \mu\text{M DCMU}$ jelenlétében történt.

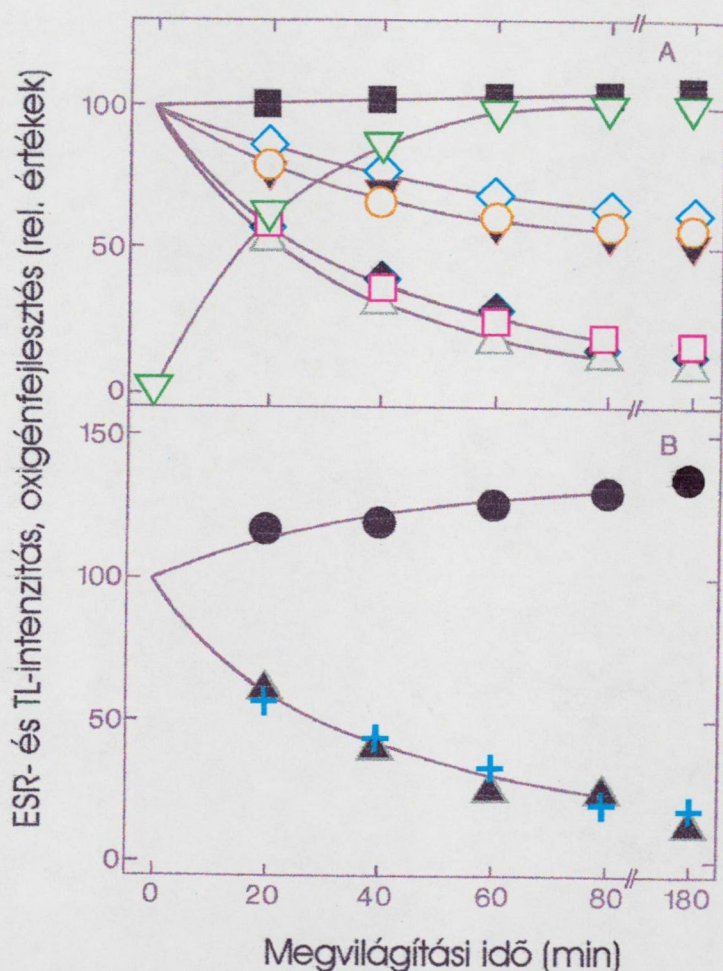
Amint az előző két fejezetben bemutatásra került, a Q_A^- $g=1,9$ formája inkább az $S_2Q_A^-$ töltésrekombinációban (Q-sáv), $g=1,82$ formája pedig az $Y_D^+Q_A^-$ töltésrekombinációban (C-sáv) vesz részt. Ezért megvizsgáltuk e két sáv anaerob fénygátlás során mutatott viselkedését is (11. ábra). 120 perces fénygátlás hatására a Q-sáv, a $g=1,9$ jellel paralel módon, csaknem teljesen eltűnt, miközben a C-sáv intenzitása, ellentétben a $g=1,82$ jel viselkedésével, látszólag kismértékben megnövekedett. Az 50°C-os TL-sáv és a $g=1,82$ $Fe^{2+}Q_A^-$ jel eltérő viselkedése legkönnyebben és legnagyobbbrészt azzal magyarázható, hogy fénygátlás hatására megjelenik a stresszindukált, sötétben órákig stabil CL-sáv [114], amelyet közel azonos csúcspozíciója miatt igen nehéz a C-sávtól megkülönböztetni. Így a fénygátlásnak alávetett PS II részecskék TL-görbéin 50°C-nál nem tisztán a C-sáv, hanem annak a CL-sávval alkotott szuperpozíciója figyelhető meg. Azt sem lehet kizárni, hogy a vizsgált mintákban az $S_2Q_A^-$ töltésrekombinációban kis mértékben (< 10%) a Q_A ($g=1,82$) forma is részt vett, azonban a vízbontó rendszer tönkremenetele miatt az S_2 helyét fokozatosan az Y_D^+ vette át. Ehhez járul még, hogy sötétadaptált mintákban a centrumok nem elhanyagolható hányada ($\approx 25\%$) S_0 -állapotban van, így töltésszeparáció után nem tud rekombinációban részt venni (nincs S_1 -ből származó TL-sáv), viszont a vízbontó rendszer gátlódása és az Y_D belépése után (az $Y_D^+Q_A^-$ kölcsönhatás miatt) TL-aktívvá válik.

Ezen eredményeink szerint tehát nemcsak a Q_A két formája, hanem a velük kölcsönható vízbontó rendszer és Y_D is eltérő látszólagos érzékenységgel bír a fénygátlással szemben. Ez az eltérés azért látszólagos, mert akár a donor-, akár az akceptor oldal gátlódik gyorsabban, a töltésstabilizálódás lehetőségének csökkenése maga után vonja a töltésszétválasztódás gátlódását, következésképpen a lánc másik oldalán sem lesznek csapdázható töltések. Mivel az akceptor-oldali fénygátlás primér lépései a Q_A -hoz rendelhetők, ezért valószínűleg a donor-oldali komponensek oxidált/oxidálható (jelet adó) részét is a Q_A gátlása (teljes redukciója, protonálódása, kikötődése) szabja meg.

Fénygátlás és PS II heterogenitás

A 12. ábrán a PS II különböző donor- és akceptor-oldali komponenseihez ill. a tripllett P680-hoz tartozó ESR-jelek intenzitásának a fénygátlás időtartamától való

függése látható. Az elektrontranszport-komponensek jeleinek csökkenő intenzitásával szemben a $^3\text{P680}$ -jel monoton növekedett, jó egyezésben a fluoreszcencia indukciós mérések eredményével (9. ábra). A feofitin ESR-jele gyakorlatilag nem változott, ami arra utal, hogy az elsődleges töltésszétválasztódás nem gátlódik és a D1 fehérje lebomlása anaerob körülmények között nem számottevő. A töltéssztabilizálásban résztvevő négy elektrontranszport-komponens közül kettő-kettő közel megegyező kinetikával rendelkezik: az S_2 és Q_A^- ($g=1,9$) ESR-jele viszonylag gyorsan, az Y_D^+ és



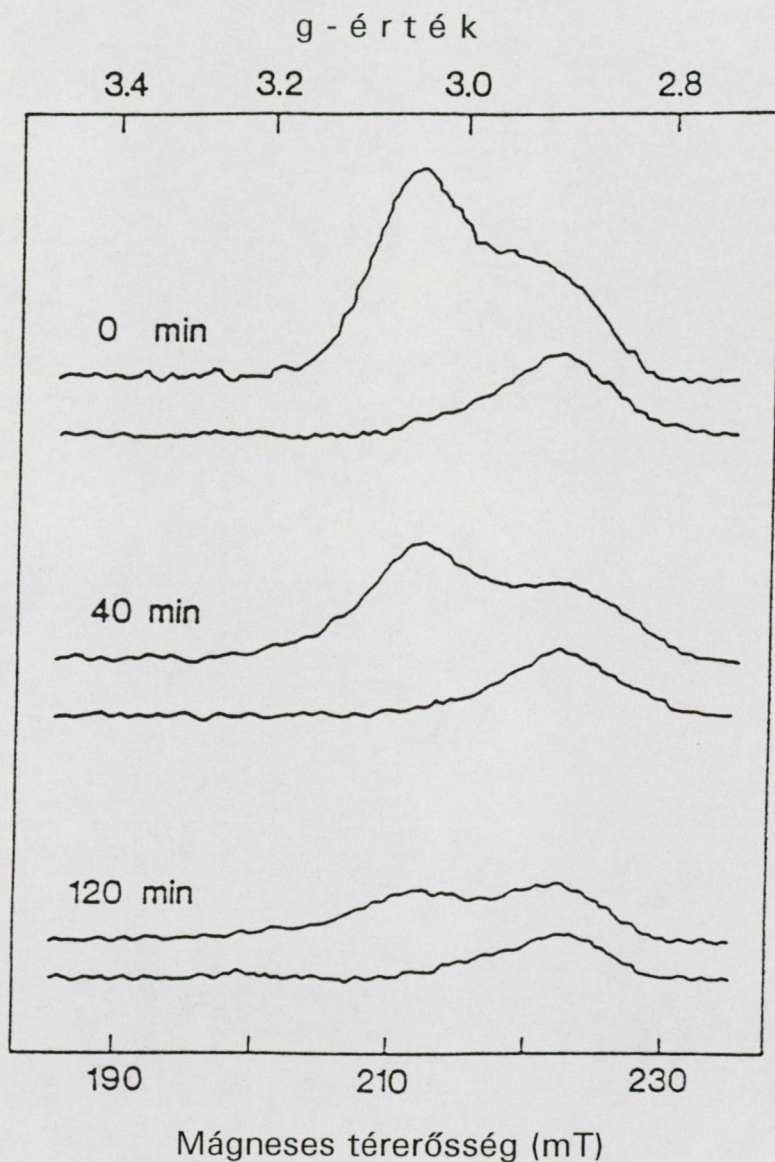
12. ábra. Anaerob fénygátlás hatása különböző PS II ESR-jelekre (A), TL-sávokra és a fotoszintetikus oxigénfejlesztésre (B) gyakorolt hatása. (A) Pheo⁻ (■); $^3\text{P680}$ (▽); $g=1,82$ (◇); "Signal II_s" (○); Cyt b₅₅₉ LP (▼); Cyt b₅₅₉ HP (□); $g=1,9$ (◆); "multiline" (△). ESR-kondíciók: $g=1,82$ és $g=1,9$ jelnél mint a 10. ábrán; "multiline" jelnél mint a 6. ábrán. Pheo⁻: 15 K mérési hőmérséklet; 1 μM teljesítmény; 0,25 mT moduláció. $^3\text{P680}$: 4 K mérési hőmérséklet, eközben folyamatos megvilágítás; 50 μW teljesítmény; 2,0 mT moduláció. A mikrohullámú frekvencia valamennyi esetben 9,055 GHz volt. (B) C-sáv (●); Q-sáv (+); oxigénfejlődés (▲). Mérések előtt a mintákat két órán keresztül szobahőmérsékleten sötétben állni hagytuk.

Q_A^- ($g=1,82$) jele lassabban csökkent. Összehasonlítás céljából a 12. ábra *B* részén van feltüntetve a Q- és C-sáv intenzitásának függése a fénygátlás időtartamától. A Q-sáv a "multiline" és $g=1,9$ jelekkel valamint a fotoszintetikus oxigénfejlődéssel megegyező ütemben degradálódott, a C-sáv - korábban részletezett okok miatt - kismértékű növekedést mutatott. Figyelemre méltó, hogy a megfelelő donor-oldali jelek ("multiline" jel és Signal II_s) valamivel gyorsabban csökkentek, mint a velük rekombinálódó komponensekből származó akceptor-oldali szignálok ($g=1,9$ és $g=1,82$). A $g=1,9$ jel így relatív többségbe került az S_2 -vel szemben, ami csekély mértékben szintén hozzájárulhatott a C-sáv megfigyelt növekedéséhez, hiszen egy részének az Y_D^+ -vel kellett rekombinálnia. (Az, hogy az Y_D^+ mennyisége is csökkent, ezt nem befolyásolja, hiszen, mint korábban a 8. ábrán láttuk, jelentős feleslegben volt a Q_A^- ($g=1,82$) mennyiségéhez képest.)

A "multiline" és $g=1,9$ ESR-jelek valamint a Q-sáv csökkenésének megegyező kinetikája ill. az ettől eltérő, de szintén azonos Signal II_s és $g=1,82$ -kinetika arra utal, hogy a PS II két típusba sorolása helytálló és e két típus eltérő érzékenységgel rendelkezik a fénygátlással szemben: az aktív centrumok (működő WOC, bikarbonátot kötő Fe^{2+}) könnyebben sérülnek, mint az inaktív centrumok (inaktív WOC, bikarbonátmentes Fe^{2+}). Ezzel összefüggésben érdekesnek és érdemesnek tartottuk megvizsgálni a Cyt b_{559} magas és alacsony potenciálú formájának (LP) változását a fénygátlás során, a kérdéssel foglalkozó szerzők egy része ugyanis a HP-formát natív, az LP-formát inaktív (stresszindukált vagy aktiválódás előtti) változatnak tekinti [121,122], a HP→LP és LP→HP konverzióknak pedig szabályozó, védekező szerepet tulajdonítanak [122,123]. (A felmerülő ellentmondásokat [a Cyt b_{559} HP és LP környezetének eltérő hidrofóbicitása, redox sajátosságok] feltételezett konformációváltozással és a PS II körüli ciklikus elektrontranszporttal magyarázzák.)

Styring és mtsai arról számoltak be, hogy aerob fénygátlás során a Cyt b_{559} HP a stressz korai szakaszában oxidált LP-formává konvertálódik [90] (ami megvilágítás nélkül is ad ESR-jelet). Ezzel ellentétben, saját méréseinknél, anaerob körülmények között nem figyeltünk meg HP→LP konverziót; a két forma eltérő kinetikájú csökkenést mutatott (13. ábra). A HP-forma fénygátlás által kiváltott csökkenése teljesen megegyezett az S_2 és Q_A^- ($g=1,9$) jel ugyanakkor mért kinetikájával, az LP-forma pedig az Y_D^+ és Q_A^- ($g=1,82$) jelekkel paralel csengett le (12. ábra). Az irodalmi és saját

eredmények közötti ellentmondás úgy oldható fel, ha (1) az idézett közleményben szereplő ESR-spektrumot, annak sokkal rosszabb jel/zaj viszonya miatt fenntartással fogadjuk, vagy (2) annak figyelembevételével, hogy egyik esetben aerob, másik esetben anaerob fénygátlás történt. Amennyiben az utóbbi feltételezést fogadjuk el, akkor a HP→LP konverzióhoz oxigén jelenléte szükséges, pl. oly módon, hogy azt az akceptor-



13.ábra. Anaerob fénygátlás hatása a citokróm b_{559} HP ($g=3,06$) és LP ($g=2,94$) formájára. A mintákat a fénygátlás után két óráig sötétben inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 200 K-en 5 percig megvilágítottuk. Az összetartozó görbepárok a megvilágítás előtti (alsó görbék) és megvilágítás utáni (felső görbék) állapotot reprezentálják.

oldali fénygátlás során keletkező $^1\text{O}_2$ által okozott (feltehetően a D1 fehérjéhez kapcsolódó) konformációváltozás indukálja. Hangsúlyozni kell, hogy ez a mérés nem a Cyt b_{559} teljes mennyiségének csökkenését mutatja, hanem csak annak oxidált (LP) és (foto)oxidálható (HP) részét. A Cyt b_{559} teljes mennyisége feltehetően nem csökken jelentősen anaerob fénygátlás során, hiszen a reakciócentrum sérülése kísérleteink során elhanyagolható volt (ld. a 12A. ábrán a spin-polarizált feofitin-jelhez tartozó görbét).

Nem eldöntött tény, hogy a Cyt b_{559} HP- és LP-formájának két különböző hem felel meg, vagy a két forma egyazon hem két állapotát jelöli. Akármelyik változat az igaz, a Cyt b_{559} HP-formája (járulékos elektrondonorként, vagy a PS II-körüli ciklikus elektrontranszport komponenseként) a töltésszétválasztódás után oxidációt szenved. A Cyt b_{559} 13. ábrán látható csökkenése így feltehetően közvetve szintén a Q_A gátlódását mutatja (gátolt Q_A esetén nincs mód töltésstabilizációra). A Cyt b_{559} LP oxidált formájához tartozó ESR-jel sötétadaptált mintákban is megfigyelhető. Mivel a megvilágítás előtti és utáni jel amplitudója nem különbözik jelentősen, ezért - legalábbis az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között - részvétele a primér töltésszétválasztódás utáni elektrontranszport-folyamatokban nem jelentős. A Cyt b_{559} LP oxidált formájának csökkenése magyarázható egyrészt azzal, hogy a Q_A egyszeres vagy kétszeres redukciója után kis valószínűséggel a Cyt b_{559} LP redukálódhat [123] (a redukált Cyt b_{559} ESR-inaktív), másrészt a Q_A és Q_A -kötő zseb állapotában bekövetkező változások konformációváltozást indukálhatnak, amelyek módosíthatják a Cyt b_{559} LP redox egyensúlyát. Mivel a Cyt b_{559} HP gátlódásának mértéke nagyon hasonló az aktív PS II megfelelő jeleinek ("multiline" szignál, $g=1,9 \text{ Fe}^{2+}Q_A^-$ -jel, Q-sáv, oxigénfejlődés) degradációjához, az LP-forma pedig paralel csökken az inaktív centrumokra jellemző jelekkel (Signal II_s, $g=1,82$), ezért úgy véljük, aktív második fotokémiai rendszer esetén a HP-, inaktív PS II-nél pedig az LP-forma a domináns.

Többféle értelemben szokás PS II heterogenitásról beszélni. A heterogenitás érintheti a PS II fénybegyűjtő rendszerét (pl. State I/State II átmenet), a reakciócentrum donor- (aktív/inaktív WOC) és akceptor oldalát [124], vagy egyéb redox-aktív komponensét (Cyt b_{559} HP/LP). A reakciócentrum vonatkozásában legnagyobb irodalma az akceptor-oldali heterogenitásnak van, ami részben azzal függ össze, a non-hem vashoz kapcsolódó bikarbonát-ionnak hosszú idő óta regulációs szerepet jósolnak. Az alkalmazott módszertől függően többféle PS II-felosztás létezik, melyek részben átfedik

egymást [124]. Így a Q_A redox-titrálási sajátosságai alapján beszélhetünk Q_H és Q_L centrumokról, a fluoreszcencia indukciós görbe feletti terület növekedési sebessége alapján PS II $_{\alpha}$ -ról és PS II $_{\beta}$ -ről, egyszeres töltésszétválasztódás utáni fluoreszcencia kibocsátás alapján Q_1 -ről és Q_2 -ről, a Q_B redukciós sebessége alapján Q_B - és nem- Q_B típusú centrumokról, míg bizonyos mesterséges elektronakceptorokat (pl. dimetil-benzokinont) redukáló képessége alapján "aktív" és "inaktív" PS II-ről. Az általunk alkalmazott összehasonlító ESR- és TL-vizsgálat újabb felosztást eredményezett. A rendelkezésre álló adatok alapján nem tudjuk megállapítani, hogy az eme módszerekkel leírt két PS II-forma mennyiben felel meg és mekkora átfedéssel fedi le a korábban leírt PS II-formákat.

Neale és Melis *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalga fénygátlásának tanulmányozása során azt találták, hogy a PS II $_{\alpha}$ és a Q_B -t nem redukáló PS II $_{\beta}$ centrumok eltérő sebességgel sérülnek [125]. Javaslatuk szerint a Q_B -t nem redukáló, részlegesen LHC II-mentes, a fénygátlásnak jobban ellenálló inaktív reakciócentrumoknak a fénygátlás elleni védekezésben van szerepe: egyfajta tartalékot képeznek, hogy a sérült PS II $_{\alpha}$ centrumok gyorsabban pótolhatók legyenek. A PS II $_{\beta}$ fénygátlással szembeni nagyobb rezisztenciáját kisebb antennaméretével magyarázták. Az antennaméret szabályozása a fényviszonyokhoz való adaptáció egyik igen fontos eszköze a növényeknél, ami (valószínűleg a kloroplasztisz ATP-szintjétől függő) foszforáció okozta részleges LHC II-leválás és defoszforiláció okozta visszarendeződés révén működik [126]. Kísérleteinket izolált PS II részecskéket vizsgáltunk, ahol ilyen fokú szervezettséget igénylő szabályozási mechanizmusok nem tudnak működni. A két PS II populáció arányát egyszerű kémiai kezelésekkel (pH-érték változtatása, bikarbonát-iont kiszorító sóvegyületek hozzáadása) változtattuk meg, amelyek hatása az LHC II-re nem kizárt ugyan, de nem is túl valószínű.

Felvetődik a kérdés, ha nem az antennaméret, akkor vajon mi és hogyan védi a Q_A $g=1,82$ formáját tartalmazó PS II centrumokat a fénygátlással szemben. Mint láttuk, a fénygátlásban az elsődleges kinon akseptornak kitüntetett szerepe van. A fénygátlással szemben eltérő érzékenységgel rendelkező kétféle reakciócentrum akceptor oldala abban különbözik, hogy a Q_A és Q_B között lokalizálódó non-hem vas koordinál-e bikarbonát-iont vagy sem, ezért kézenfekvőnek tűnik, hogy a fénygátlás elleni nagyobb ellenállóképességet a non-hem vas bikarbonát-mentességében kell keresni. A bikarbonát-

ion PS II-ben betöltött szerepét a kérdéssel foglalkozó szerzők abban látják, hogy hiányában lelassul a $Q_A \rightarrow Q_B$ elektrontranszport [11,12]. Ebben az esetben viszont, mivel így a Q_A és Q_B között feltorlódnak az elektronok az elsődleges kinon akceptort még könnyebb kétszeresen redukált állapotba vinni, ami a megfigyelt ellentétében, azaz nagyobb fokú fénystressz okozta sérülésben mutatkozna meg. Hogy ez mégsem következik be, annak több oka is lehetséges. (1) A $Q_A \rightarrow Q_B$ közötti elektrontranszport lelassulása csak akkor okozza elektronok felhalmozódását a Q_A -n, ha azok azonos sebességgel érkeznek a donor-oldal felől. Irodalmi adatok alapján az Y_D sokkal lassabban redukálja a $P680^+$ -t, mint a vízbontó rendszer [127], tehát a fénygátlás szempontjából a donor oldal állapota a meghatározó. Ebben az esetben tehát ismét szimultán lejátszódó donor-akceptor oldali változásokat kell feltételezni, amelyek indukáló tényezője a non-hem vas bikarbonát-mentessége. (2) Másrészt a Q_A két formájának eltérő ütemű sérülése szempontjából lényeges, hogy gátlás magában foglalja a kétszeresen redukált Q_A protonációját ($Q_A^{2-} + 2H^+ \rightarrow Q_AH_2$). van Rensen és mtsai eredménye szerint a bikarbonát-ion részt vesz a kétszeresen redukált másodlagos kinon akceptor (Q_B^{2-}) protonációjában [128]. Mivel a Q_A és Q_B nagyjából szimmetrikusan helyezkedik el a PS II sztróma oldalán, ezért igen valószínű, hogy a bikarbonát-ion a Q_A^{2-} protonációjában is szerepet játszik. Feltevésünk szerint tehát a Q_A ($g=1,9$) és Q_B ($g=1,82$) PS II centrumok fénygátlással szembeni különbségében az is lényeges, hogy a kétszeresen redukált Q_A tud-e protonálódni vagy sem.

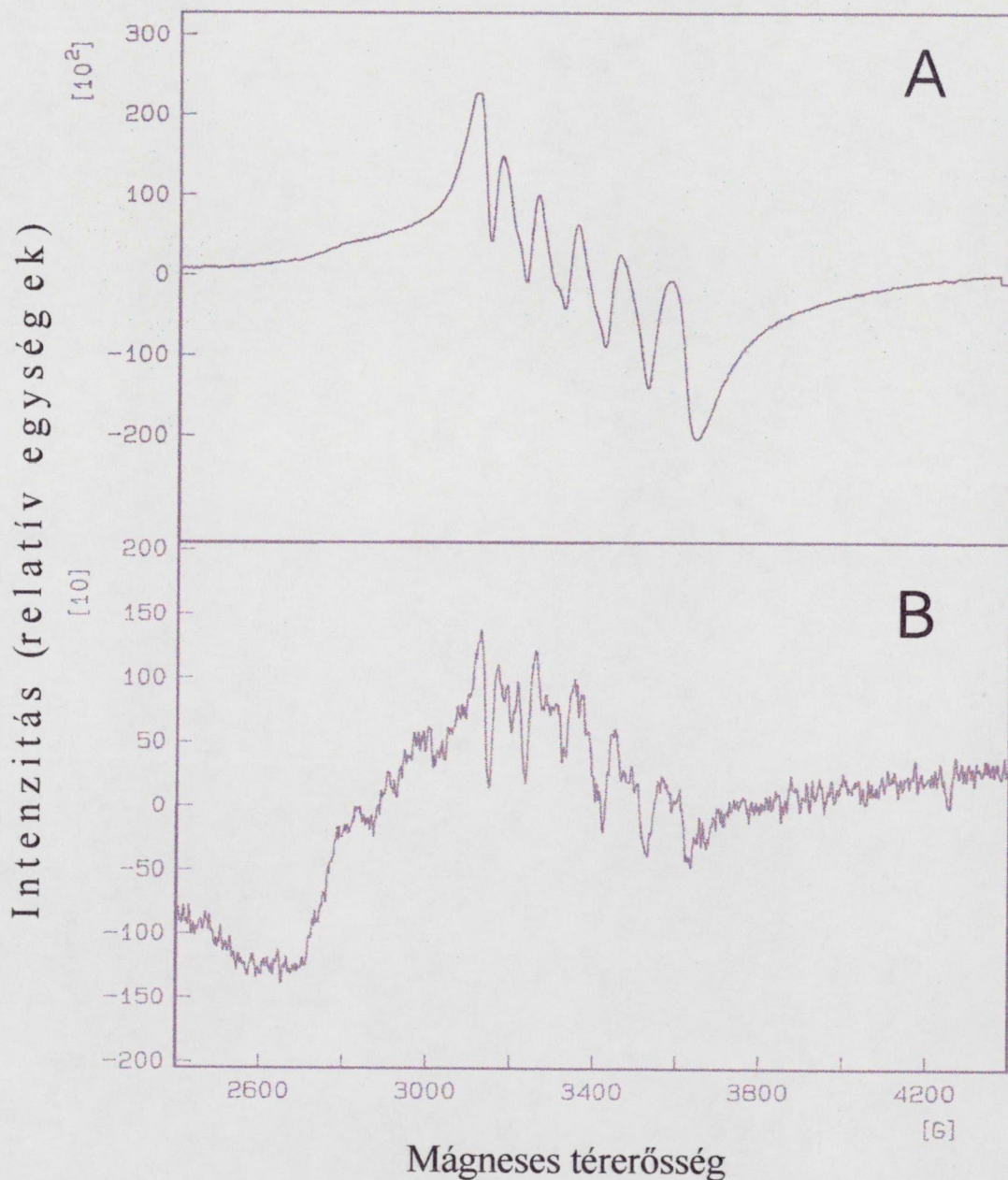
Újabb kérdés, hogy van-e valamiféle fiziológiai jelentősége a bikarbonát-mentes és bikarbonátot kötő centrumok eltérő fénystressz-érzékenységének. Összefoglaló munkájában mind Diner, Petrouleas és Wendoloski [12], mind van Rensen, Xu és Govinjee [35] felveti, hogy zárt légzőnyílásoknál (pl. száraz, meleg időben) az intracelluláris és kloroplasztiszon belüli CO_2 -koncentráció annyira lecsökkenhet, ami a non-hem vas bikarbonát-mentessé válását eredményezi. Napfényes, forró időjárás esetén, nagy algakoncentrációnál sekély vizű tavakban is korlátozott lehet a CO_2 -hozzáférés a különféle algák számára, ami szintén ugyanezzel az eredménnyel járhat. A bikarbonát kikötődése lecsökkenti a $Q_A \rightarrow Q_B$ elektrontranszport sebességét, amire nyilvánvalóan azért van szükség, hogy az elektrontranszport sebessége és a fotoszintézis szénforrásául szolgáló CO_2 mennyisége összhangban legyen. A bikarbonát-mentes állapot a bemutatott eredményeink szerint csökkentette a fénygátlás lehetőségét (algák vonatkozásában ld.

[118]), így, paradox módon az aktív centrumok érzékenyebbnek bizonyultak a fénygátlással szemben mint az inaktívak. Az a tény, hogy a fényaktiválást a Cyt b_{559} LP \rightarrow HP konverziója kíséri [123], szintén az inaktív centrumok fénygátlással szembeni védelmére utal, hiszen, mint láttuk, a Cyt b_{559} LP formája a Q_A ($g=1,82$) formájával jár együtt. Egyes fotoszintézis-kutatók (a disszertáció szerzőjét is beleértve) ezért hajlamosak arra, hogy a fénygátlást valamiféle szükséges rossznak tekintsék: tehát, ha a körülmények jók (van elég fény és CO_2), akkor "pörögjön" a PS II amilyen gyorsan csak tud, még ha ez a fénygátlás viszonylag nagy valószínűségével jár is együtt. Ha nem áll elegendő CO_2 rendelkezésre, akkor az elektrontranszport sebessége lecsökken, aminek a növények számára kellemes mellékhatása az, hogy ez esetben kevésbé vannak a fénygátlás káros hatásainak kitéve.

Fényaktiválás szintetikus Mn-komplexekkel: fluoreszcencia vizsgálatok

A fénygátlás és a fényaktiválás a növények életében összekapcsolódó folyamatok. Érdeklődésünk ezért néhány évvel ezelőtt a jelenségcsoport másik oldala, a fényaktiválás felé fordult. Hogy az egyre szofisztikáltabb technikákkal dolgozó külföldi laboratóriumok mellett is tudjunk újat mondani, vizsgálati módszerül (indiai partnereink által szintetizált) mintegy 13-féle komplex mangánvegyület elektrononálási és fényaktiválási kísérletekben való alkalmazását választottuk. Az elektrononálási és fényaktiválási kísérletek között az a különbség, hogy míg előbbi esetben a Mn-komplexeket egyszerűen hozzáadjuk a tilakoid-szuszpenzióhoz - tehát a vegyületek részleges vagy teljes beépülésére nincs mód -, addig a fényaktiválás során olyan procedúrát hajtunk végre, amely lehetővé teszi Mn-ionok vagy komplexek beépülését a vízbontó rendszerbe. Külsődleges elektrononáláskor a fotoszintetikus elektrontranszport részlegesen helyreáll, így lehetőség van a Mn-komplex \rightarrow P680 elektronátadás - pl. fluoreszcencia indukciós mérésekkel történő - tanulmányozására, de nincs oxigénfejlődés és reverzibilis töltéssztabilizálódás a vízbontó rendszerben. Értelemszerűen, fényaktiválásnál az aktív PS II-re jellemző funkciók állnak vissza. Hangsúlyozni kell, hogy az elektrononálási és fényaktiválási kísérletekkel tanulmányozni kívánt exogén és endogén elektrontranszport során a (természetes vagy mesterséges) Mn-komplexek elektrononálása nem feltétlenül azonos módon (hatóhelyen) megy végbe.

Mindazonáltal, a vizsgálataink megkezdése előtt rendelkezésre álló szerény mennyiségű adat arra utalt, hogy korreláció van a Mn-komplexek elektrondonálási és fényaktiválási kísérletekben mutatott hatékonysága között, így az előbbi típusú vizsgálatokkal is értékes információkat nyerhetünk a különböző Mn-komplexek fényaktiválásával kapcsolatban.



14. ábra. MnCl_2 (A) és M-1(L₂) (B) vizes oldatának ESR-spektruma. Koncentráció: 100 μM . ESR-kondíciók: 10 K mérési hőmérséklet; 9,42 GHz mikrohullámú frekvencia; 31 mW mikrohullámú teljesítmény; 1,6 mT moduláció.

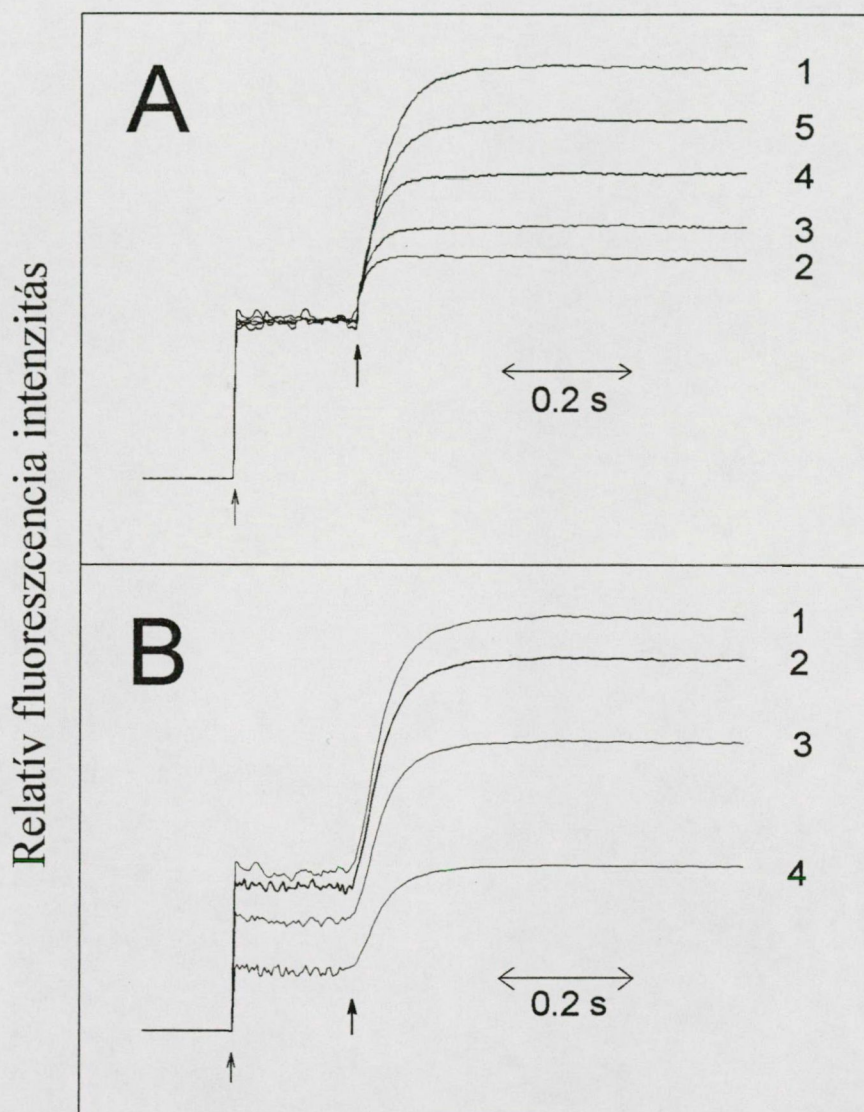
A kooperációs partnerünk által előállított vegyületek nagy változatosságot mutattak mind az őket alkotó Mn-ionok számában (mono-, di-, tri- és tetramérek) és oxidációs állapotában [Mn(II), Mn(III)], mind pedig a ligandumok típusában és a Mn-ionokhoz kapcsolódó donor-atomok milyenségében (O, N). Így a rendelkezésre álló komplexek hatékonyságát többféle szempontból is összehasonlíthattuk.

A Mn-vegyületek vizes oldatainak stabilitását ESR-mérésekkel ellenőriztük. A méréseket a 14. ábra illusztrálja. Az ábra A részén a szabad Mn(II)-ből származó hatvonalas ESR-jel látható. Ez a jel különböző Mn-komplexek esetén hozzávetőlegesen két nagyságrenddel lecsökkent; a 14B. ábra az M-1(L₂) komplexhez tartozó spektrumot mutatja. Több vegyület esetében nemcsak a jel intenzitása, hanem szélessége is megváltozott (az M-1(L₂) komplex esetén pl. 54 mT széles jelet kaptunk a szabad Mn(II) 57 mT széles jele helyett), ami arra utal, hogy a komplexek vizes oldatai esetén megfigyelhető alacsony intenzitású jelek sem feltétlenül szabad mangán-ionokból származnak. A vegyületek ill. azok oldatainak részletesebb kémiai elemzésére/jellemzésére nem vállalkozhattunk, ezért megelégedtünk annak megállapításával, hogy a vizsgálatainkhoz kapott komplexek stabilak vízben, ami lehetővé teszi azok kipróbálását a tervezett kísérletekben.

Vizsgálatainkat az egyszerűbb esettel, a komplexek exogén elektrononálásának tanulmányozásával kezdtük. Referenciaként MnCl₂-dot használtunk, amelynek mangánmentes tilakoid membránok fluoreszcencia indukciós görbéjére gyakorolt hatását a 15. ábra A része mutatja. Egyezésben az irodalmi adatokkal [78,80], a Mn-mentes minták (2-es görbe) F_v (= F_m - F_o) értéke jelentősen kisebb, mint a kontroll minták (1-es görbe) hasonló paramétere. Az inaktív vízbontó rendszer ellenére megmaradó kis változó fluoreszcencia feltehetően az Y_D-ből, Cyt b₅₅₉-ből és (kisebb mértékben) az Y_Z-ből jövő elektrontranszportot tükrözi [129]. 10 μM MnCl₂ hozzáadására (3-as görbe) az F_v megemelkedik. A MnCl₂ mennyiségének emelkedésével (4-es és 5-ös görbék) tovább nő az elektrononálás valúszínűsége, ami így további F_v-növekedést eredményez.

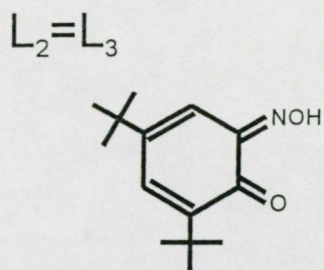
Mielőtt hasonló kísérleteket végeztünk volna szintetikus Mn-komplexekkel is, megvizsgáltuk, van-e valamilyen gátló hatásuk aktív minták esetén. Ellentétben a MnCl₂ hatásával, ami a 10 μM - 5 mM koncentrációtartományban semmiféle változást nem okozott, a kapott vegyületek (eltérő mértékben) csökkentették mind az F_o-, mind az F_m-szintet. A 15B. ábra egy tetszőleges Mn-komplex [M-1(L₂)] oxigénfejlesztésre képes

tilakoid membránok fluoreszcencia indukciós görbéjére gyakorolt hatását mutatja. Az eredeti F_v/F_m arány ($F_v/F_m = 0,67$) [kísérleteink szempontjából szerencsés módon] valamennyi komplex esetében változatlan maradt; a csökkenést a (színes) ligandumok fényelnyelésének ill. az LHC II csökkent fénybegyűjtő képességének tudtuk be.

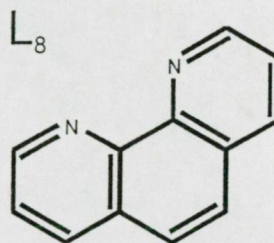


15. ábra. (A) Mn-kivonás majd azt követő Mn-hozzáadás hatása tilakoid membránok fluoreszcencia indukciójára. (1) Kontroll; (2) Mn-mentes minta; ugyanaz (3) $10 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$ (4) és 5 mM MnCl_2 hozzáadása után. (B) M-1(L_2) hatása kontroll minták fluoreszcencia indukciójára. (1) Kontroll; ugyanaz (2) $10 \mu\text{M}$, (3) $100 \mu\text{M}$ és (4) $500 \mu\text{M}$ M-1(L_2) hozzáadása után. A vékony nyíl a mérő- ($0,1 \text{ W/m}^2$), a vastag nyíl az aktinikus fény (10 W/m^2) bekapcsolását jelzi. Az utóbbit követő jel/zaj viszonyt az egyidejűleg bekapcsolódó 100 kHz moduláció okozza.

A

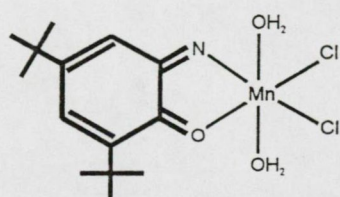


3,5-di(terc-butil)-
1,2-benzokinonmonoxim

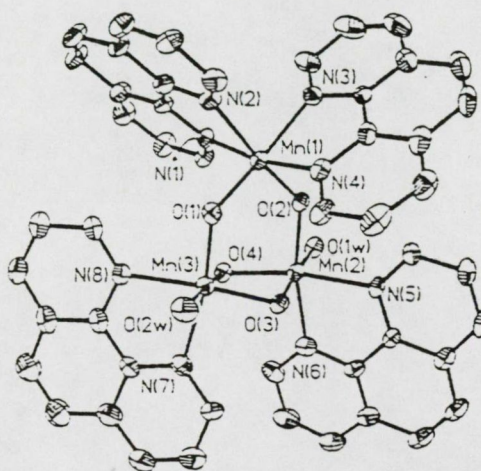


1,10-fenantrolin

B



$[Mn^{II}(L_2)Cl_2(H_2O)_2]$

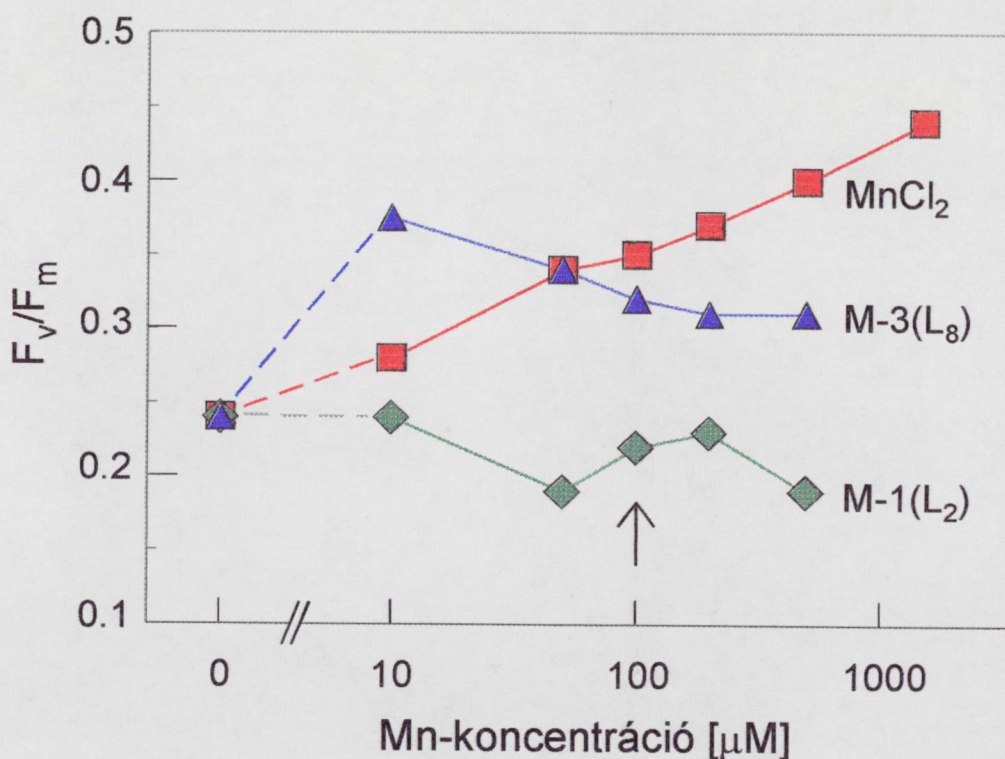


$[Mn^{III}_3O_4(L_8)_4(H_2O)_2](NO_3)_4 \cdot 2,5H_2O$

16. ábra. (A) A felhasznált szintetikus Mn-monomér és Mn-trimér ligandumainak konstitúciós képlete és elnevezése. (B) A Mn-monomér és Mn-trimér szerkezete prof. S. Padhye személyes közlése ill. Reddy és mtsai publikációja [100] alapján.

A vizsgálatainkhoz megkapott (egy-egy) Mn-monomér és -trimér (melynek összegképlete, szerkezete a 16B., a megfelelő szerves ligandumok elnevezése és konstitúciós képlete a 16A. ábrán van feltüntetve) mangán-mentes tilakoidok F_v/F_m arányára gyakorolt hatása (exogén elektrononálás) a 17. ábrán látható. Az M-3(L_8) trimér - hasonlóan a $MnCl_2$ -hoz - az F_v/F_m arány növekedését okozta, az M-1(L_2) monomér ellenben semmiféle változást nem okozott. Ez az eredmény több szempontból

is érdekes. A két komplex közül ugyanis az $[M-3(L_8)]$ bizonyult jobb elektrondonornak, amelyben a mangán vegyértékszám magasabb, mérete nagyobb, ligandumként pedig olyan vegyületet - 1,10-fenantrolint ($=L_8$) - tartalmaz, amely a fotoszintézis egyik ismert gátlószere. Az első két tény arra utal, hogy mind a Mn(II)-t, mind Mn(III)-at tartalmazó Mn-komplexek képesek a P680 felé elektrondont donálni, és ez a képesség a vártnál kevésbé függ a komplex méretétől és a Mn-ionok oxidációs állapotától. A fenantrolint tartalmazó trimér jó elektrondonálási képessége a komplex stabilitását (is) mutatja, egyezésben az ESR-mérések jelen fejezet elején ismertetett eredményével. Noha a mangánt tartalmazó mintákban sem a monomér, sem a trimér nem csökkentette az F_v/F_m arányt, mangán-mentes körülmények között magas koncentrációnál ($500 \mu M$) gátlást fejtettek ki, ami abban jelentkezik, hogy F_v/F_m hányadosuk ebben a régióban a koncentráció növelésének hatására csökkenést mutatott. A két komplex eltérő elektron-

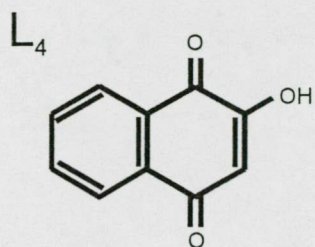


17. ábra. $MnCl_2$, továbbá szintetikus Mn-monomér és Mn-trimér hatása mangán-mentes tilakoid membránok F_v/F_m -arányára. (\square) $MnCl_2$; (\diamond) $M-1(L_2)$; (Δ) $M-3(L_8)$. A nyíl a fényaktiválásnál alkalmazott koncentrációt jelöli.

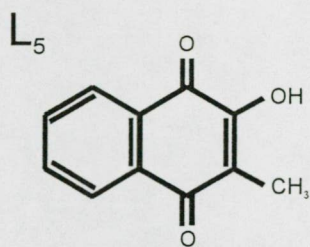
donálási képessége (különösen alacsony koncentrációknál) azok eltérő redoxpotenciál-értékeivel és/vagy sztérikus okokkal (pl. az elektrondonálás helyéhez való hozzáférhetőség, szerkezet) magyarázható. Meglepő módon, a vizsgált Mn-trimér alacsony koncentrációnál ($10 \mu\text{M}$) nagyobb hatásfokkal adott át elektronokat a P680-nak, mint a MnCl_2 .

Hasonló kísérleteket végeztünk dimérekkel és tetramérekkel is. A rendelkezésre álló öt Mn-dimér összegképlete, szerkezete a 18B. $[\text{M}-2(\text{L}_3) - \text{M}-2(\text{L}_5)]$ és 19B. $[\text{M}-2(\text{L}_6), \text{M}-2(\text{L}_7)]$, a ligandumok elnevezése és konstitúciós képlete a 16A. (L_3 és L_8), 18A. (L_4, L_5) és 19A. (L_6, L_7) ábrán van feltüntetve. A 20. ábra az 5 dimér mangán-mentes tilakoid membránok fluoreszcencia jellemzőire gyakorolt hatását mutatja. Alacsony koncentrációknál valamennyiük elfogadható elektrondonálási képességgel rendelkezett; magas ($> 100\text{-}200 \mu\text{M}$) koncentrációknál itt is jelentkezett a vizsgált mono- és trimérnél leírt gátlás, ami alól csak az $\text{M}-2(\text{L}_4)$ komplex képezett kivételt. Ez az eredmény azért érdekes, mert az $\text{M}-2(\text{L}_4)$ Mn-dimér a 2-hidroxinaftokinonon ($=\text{L}_4$) kívül (az $\text{M}-3(\text{L}_8)$ komplexhez hasonlóan) szintén tartalmaz 1,10-fenantrolint, méghozzá a vizsgált triméréhez (4:3) közeli molarányban (2:2), a két komplex elektrondonálásának koncentrációfüggése mégis jelentősen eltér: az $\text{M}-2(\text{L}_4)$ a teljes vizsgált koncentrációtartományban a MnCl_2 -dal hasonló módon ad át elektronokat a PS II-nek (ami - tekintettel a ligandum kémiai természetére - szintén a komplex vizes oldatának stabilitására utal), míg az $\text{M}-3(\text{L}_8)$ komplex alacsony koncentrációknál meghaladja, addig magas koncentrációknál elmarad tőle. E két komplex eltérő viselkedését nem lehet az őket alkotó mangán-ionok eltérő vegyértékállapotával magyarázni (ami $\text{M}-3(\text{L}_8)$ esetén +3, $\text{M}-2(\text{L}_4)$ esetén pedig +2), ugyanis magasabb koncentrációknál, egy kivétellel az eddig bemutatott valamennyi komplexnél, - a Mn-ionok vegyértékállapotától függetlenül - csökkent az elektrondonálási képesség. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a Mn-komplexek elektrondonálási sajátosságainak formálásában nemcsak a ligandum milyenségének, hanem a komplex szerkezetének is fontos szerepe van.

Hasonlóan az $\text{M}-3(\text{L}_8)$ trimérhez, alacsony koncentrációnál ($\sim 10 \mu\text{M}$) két dimér $[\text{M}-2(\text{L}_6), \text{M}-2(\text{L}_7)]$ is hatásosabbnak bizonyult elektrondonálási kísérletekben, mint a MnCl_2 . Ezekben a hasonló szerkezetű Mn-dimérekben a két Mn-ion vegyes oxidációs állapotban $[\text{Mn}(\text{II})$ és $\text{Mn}(\text{III})]$ fordul elő. Lehetséges tehát, hogy az alacsony kon-

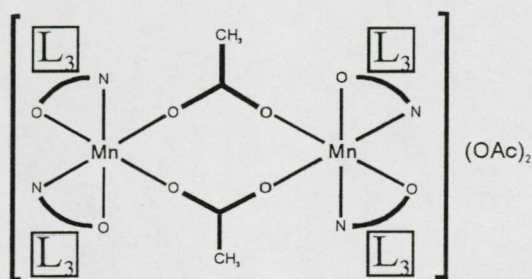


2-hidroxi-1,4-naftokinon

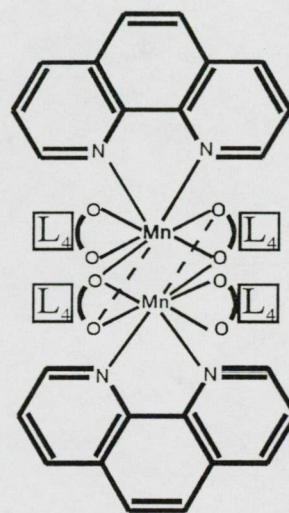


2-hidroxi-3-metil-1,4-naftokinon
(ftiokol)

A

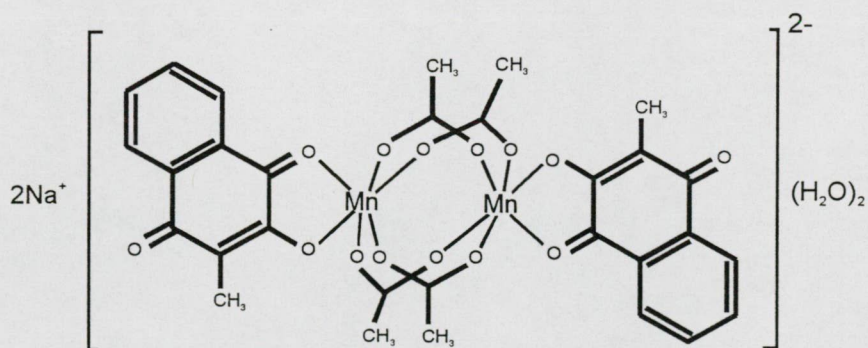


$[Mn^{II}(L_3)(OAc)_2](OAc)_2$



$[Mn^{II}(L_4)_2(L_6)]_2$

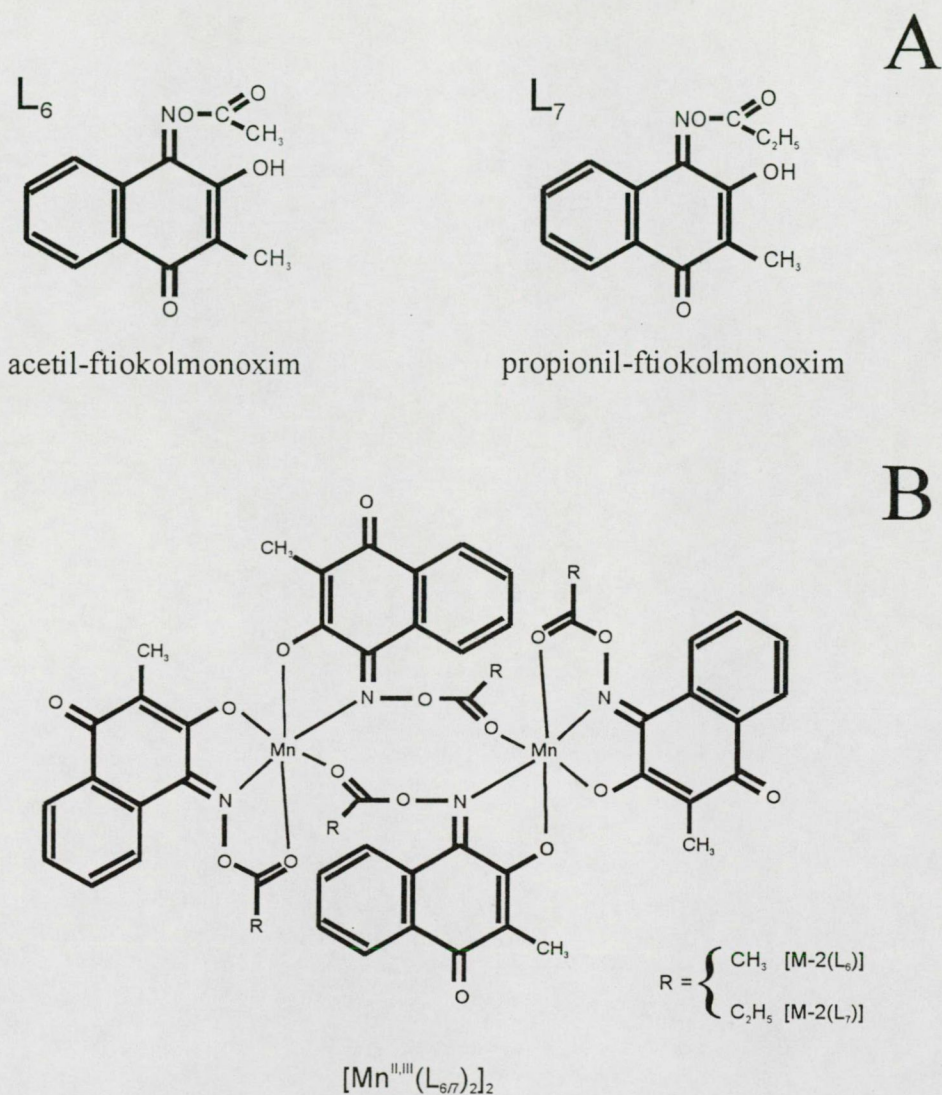
B



$Na_2[Mn^{II}(L_5)(OAc)_2](H_2O)_2$

18. ábra. (A) Az L_4 és L_5 ligandumok konstitúciós képlete és elnevezése. (B) Az M-2(L_3) - M-2(L_5) komplexek szerkezete prof. S. Padhye személyes közlése alapján. Az L_3 ligandum képletét ld. a 16A. ábrán.

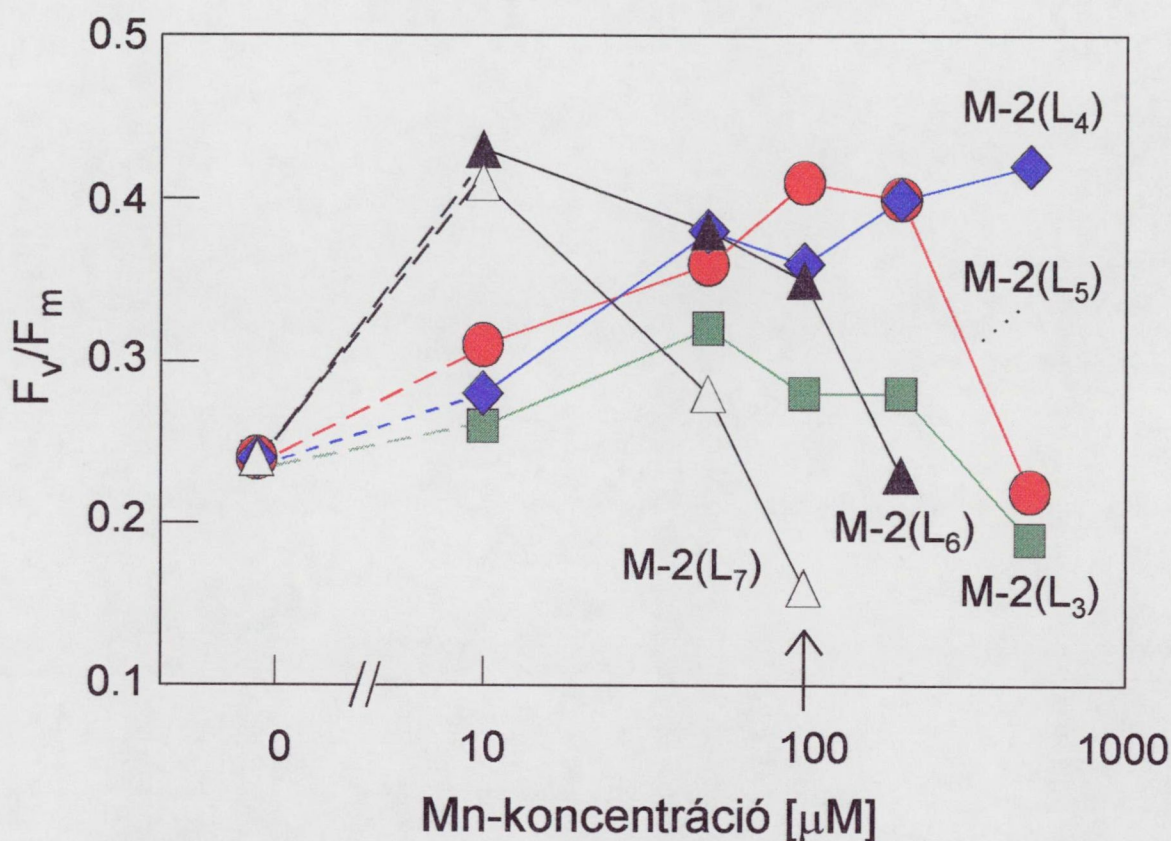
centrációknál megfigyelhető, rendellenesen magas elektrondonálás oka esetleg az ezen komplexeket alkotó Mn-ionok magasabb oxidációs állapotában keresendő. (A kérdésre a későbbiekben még visszatérünk.)



19. ábra. (A) Az L_6 és L_7 ligandumok konstitúciós képlete és elnevezése. (B) Az $M-2(L_6)$ és $M-2(L_7)$ komplexek szerkezete prof. S. Padhye személyes közlése alapján.

A kísérleteinkhez kapott Mn-dimérek között az $M-2(L_4)$ -en kívül még egy olyan komplex található, amelynek liganduma megtalálható valamely nem dimér Mn-komplexben is: az $M-2(L_3)$ komplexet alkotó 3,5-di(*terc*-butil)-1,2-benzokinonmonoxim (= $L_2 = L_3$) az $M-1(L_2)$ komplexnek is építőeleme. A 17. és 20. ábra megfelelő

görbéit összehasonlítva látható, hogy az M-2(L₃) komplex elektrononálási képessége - mely ugyan elmarad a többi Mn-dimér esetében megfigyellettől - sokkal jobb, mint az M-1(L₂) monoméré (amely gyakorlatilag zérus). Ez az eltérés is a Mn-komplexek szerkezetének és elektrononálási képességének összefüggésére hívja fel a figyelmet.

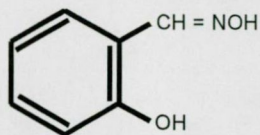


20. ábra. Szintetikus Mn-dimérek hatása Mn-mentes tilakoid membránok F_v/F_m arányára. (□) M-2 (L₃); (◇) M-2 (L₄); (○) M-2 (L₅); (▲) M-2 (L₆); (△) M-2 (L₇). A nyíl a fényaktiválásnál alkalmazott koncentrációt jelöli.

Az M-2(L₆) és M-2(L₇) dimérek elektrononálása, hasonló szerkezetük ellenére (az L₆ és L₇ ligandum mindössze egy metil-csoportban különbözik), valamelyest eltérő koncentrációfüggést mutat: a nagyobb ligandummérettel (következésképpen nagyobb összmérettel) rendelkező M-2(L₇) komplex F_v/F_m értékei a 10 μM-nál jelentkező csúcs után sokkal gyorsabban csökkennek. Ez az adat arra enged következtetni, hogy nemcsak szerkezeti tényezők, hanem egyszerű méret-faktorok is kihatnak a Mn-komplexek elektrononálási képességére.

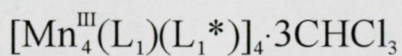
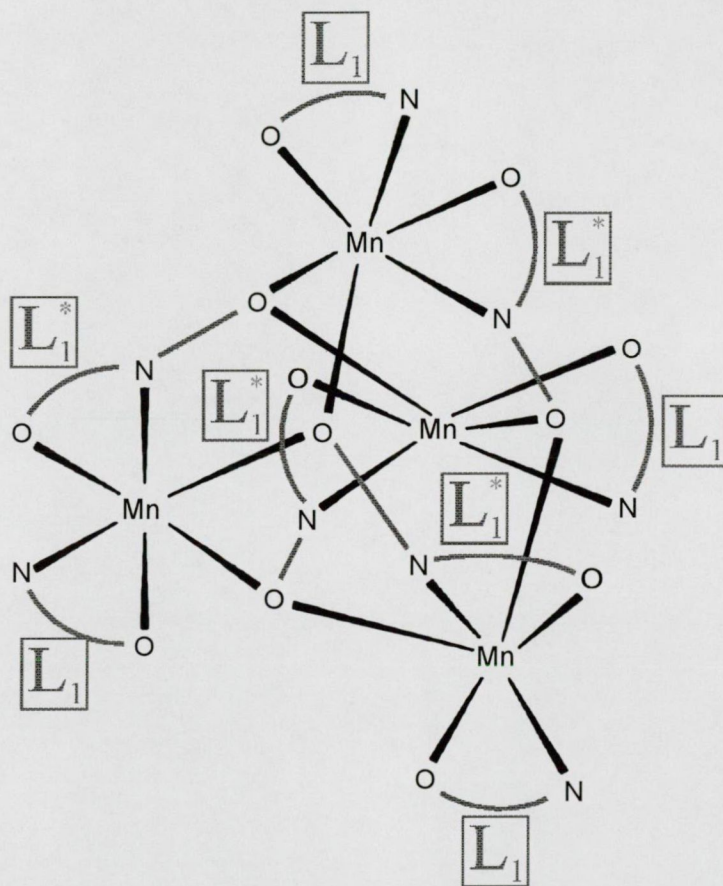
L₁

A



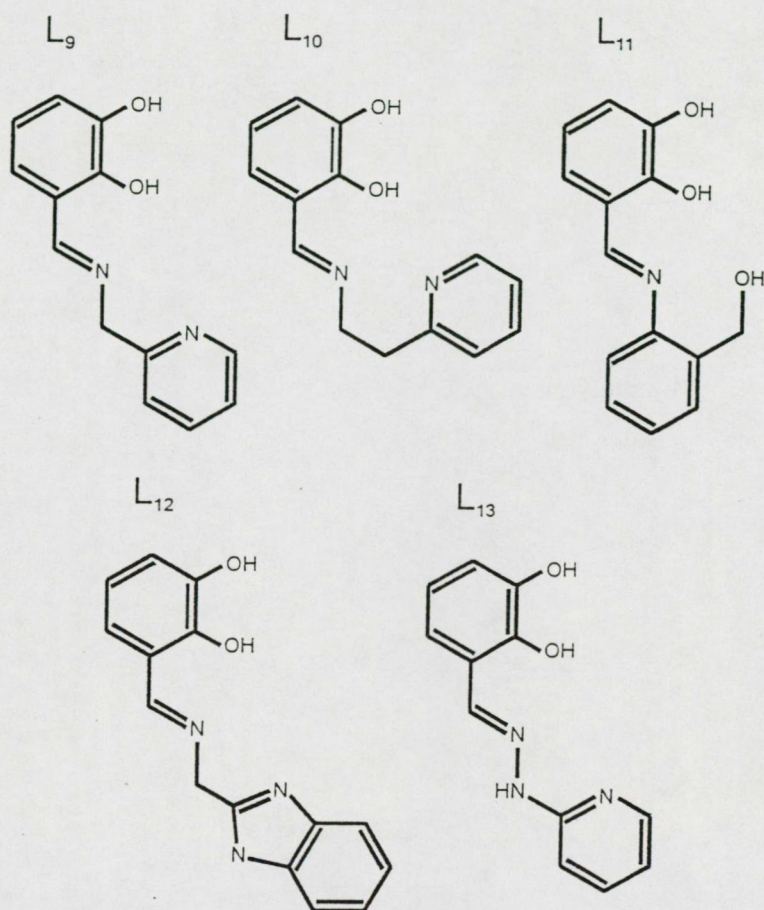
szalicil-aldoxim

B

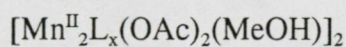
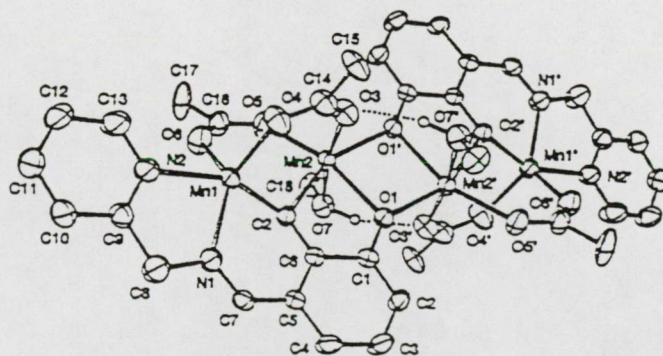


21. ábra. (A) Az L₁ ligandum konstitúciós képlete és elnevezése. (B) Az M-4(L₁) komplex szerkezete prof. S. Padhye személyes közlése alapján. Az egyenletesen széles szürke vonalak a ligandumok donor atomjainak kovalens kapcsolódásait, a változó szélességű fekete vonalak a koordinatív kötéseket reprezentálják. Az L₁^{*} deprotonált ligandumot jelöl.

A

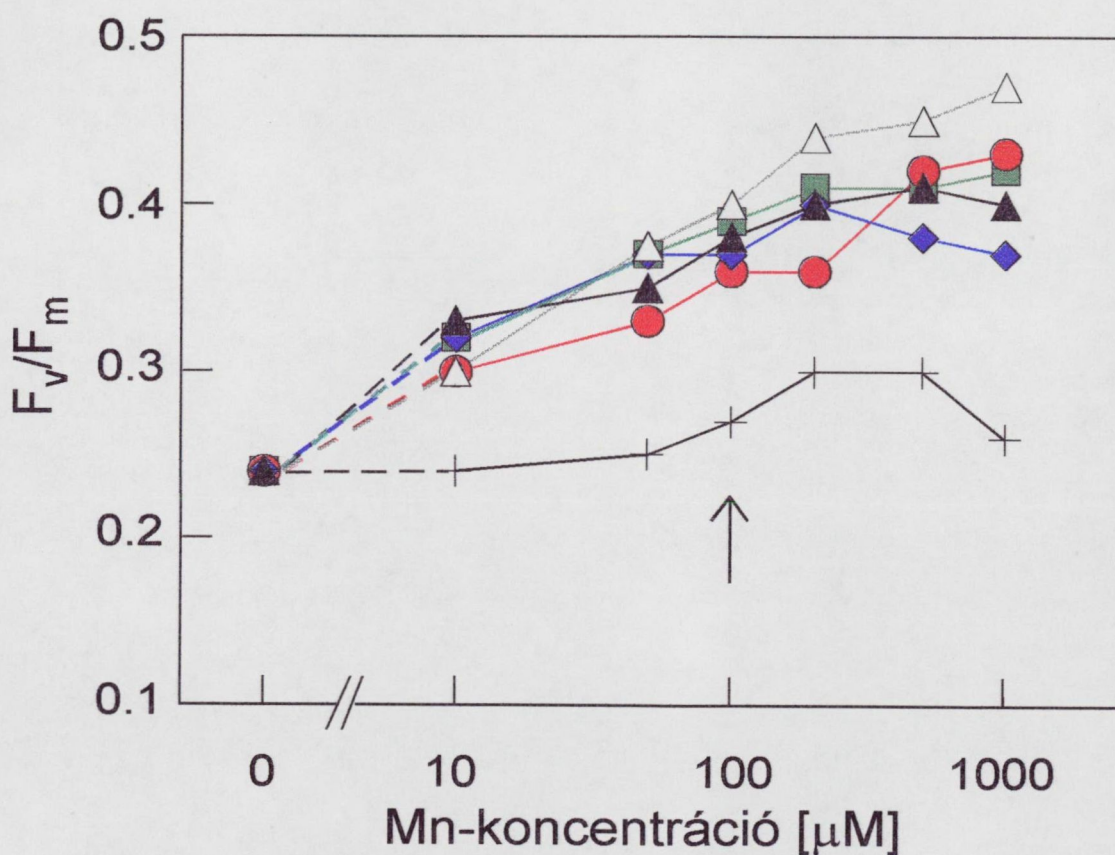


B



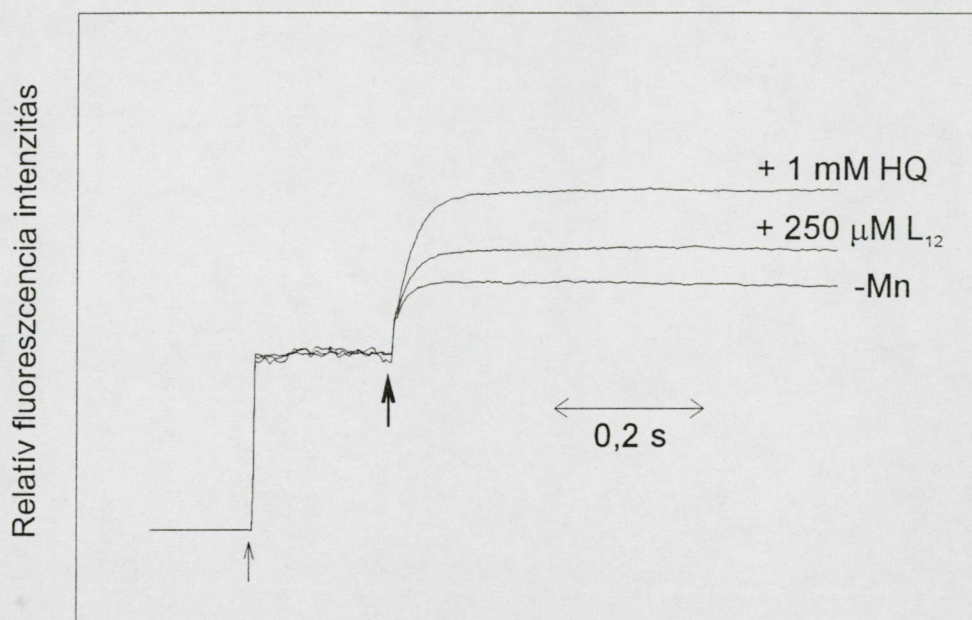
22. ábra. (A) Az L_9 - L_{13} ligandumok konstitúciós képlete. L_9 : 3-{{{(2-piridil)-metil}-imino}-metil}-benzol-1,2-diol; L_{10} : 3-{{{(2-(2-piridil)-etil)-imino}-metil}-benzol-1,2-diol; L_{11} : 3-{{{(2-(hidroxi-metil)-imino)-metil}-benzol-1,2-diol; L_{12} : 3-{{{(2-benzimidazolil)-metil}-imino}-metil}-benzol-1,2-diol; L_{13} : 3-{{{(2-piridil)-hidrazono}-metil}-benzol-1,2-diol. (B) Az M-4(L_9) - M-4(L_{13}) komplexek szerkezete Theil és mtsai szerint [101].

A vizsgálatainkhoz megkapott 13-féle komplex között a legnagyobb csoportot a tetramérek alkották. Ezek két csoportba voltak sorolhatók: a szalicilalldoximot (=L₁) tartalmazó M-4(L₁) komplex tetraédes, a különböző katekolimin-származékokat tartalmazó öt komplex pedig lineáris, dimér+dimér szerkezettel rendelkezett. A komplexek összegképletét és szerkezetét a 21B. és 22B., a ligandumok képletét és elnevezését a 21A. és 22A. ábrák tüntetik fel. A 23. ábráról ezen tetramérek elektron-donálási képességének koncentrációfüggése olvasható le. A diméreknél mefigyelt változatossággal ellentétben -a komplexek szerkezetéhez hasonlóan - itt is mindössze két típus volt megkülönböztethető: az M-4(L₁) komplex viszonylag gyenge, a katekolimin-komplexek igen jó elektrondonornak bizonyultak. Az utóbbi csoport tagjaihoz tartozó görbék tendenciája nagyon hasonló volt és az egyes koncentrációkhoz



23. ábra. Szintetikus Mn-tetramérek hatása Mn-mentes tilakoid membránok F_v/F_m arányára. (+) M-4(L₁); (□) M-4(L₉); (o) M-4(L₁₀); (◇) M-4(L₁₁); (Δ) M-4(L₁₂); (▲) M-2(L₁₃). A nyíl a fényaktiválásnál alkalmazott koncentrációt jelöli.

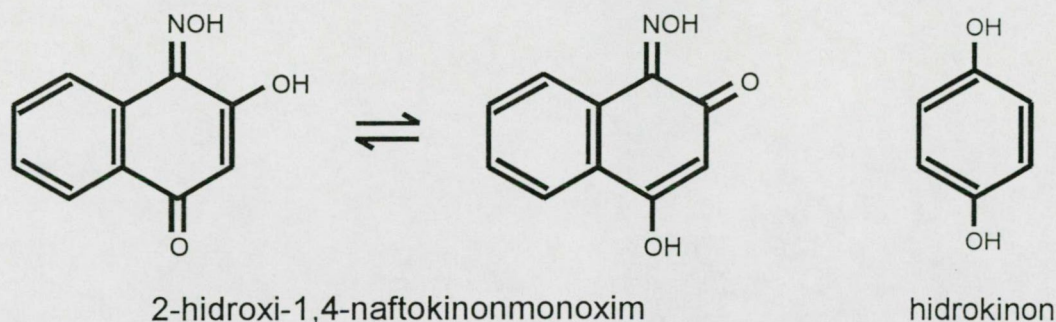
tartozó értékek is közel megegyeztek, aminek magyarázata nyilvánvalóan a komplexek és az azokat alkotó ligandumok hasonló szerkezete. Ezen a homogén csoporton belül legjobb elektrondonornak az M-4(L₁₂) komplex bizonyult, amely F_v/F_m aránya magas koncentrációnál (200 μM fölött) meghaladta a MnCl₂ esetében mért értéket is. Erre két magyarázat is lehetséges. Az első abból indul ki, hogy az L₁₂ ligandum kémiai szerkezete jelentősen eltér a többi L_x (x = 9,10,11,13) ligandumétól: pirimidil- (L₉, L₁₀, L₁₃) vagy szubsztituált fenil-csoport (L₁₁) helyett benzimidazolil-csoportot tartalmaz, ami módosulást okozhat az M-4(L₁₂) komplex redoxpotenciáljában. A másik, valószínűbb magyarázat szerint maga az L₁₂ ligandum is donál elektronokat a PS II-be, amit kísérletileg is igazoltunk (24. ábra). Ez az eredmény átértékeli Allakhverdiev és



24. ábra. Az L₁₂ ligandum és hidrokinon (HQ) hatása Mn-mentes tilakoid membránok fluoreszcencia indukciójára. Mérési körülményekről ld. a 15. ábránál leírtakat.

mtsai idézett közleményét [78], melyben szintén a MnCl₂-hoz tartozó F_v/F_m-hányados mangán-komplexek (dimérek) általi túlszárnyalásáról számoltak be. Véleményünk szerint az általuk használt 2-hidroxi-1,4-naftokinon-monoxim (amely sajnos nem állt rendelkezésünkre) szintén hathat elektrondonorként. Állításunkat arra alapozzuk, hogy az oxim 4-hidroxi-2-oxo tautomér formája (25. ábra) nagyon hasonlít az 1,4-kinolok

kémiai szerkezetére, amelyek szintén donálhatnak elektronokat mangán-mentes PS II részecskébe (24. ábra).

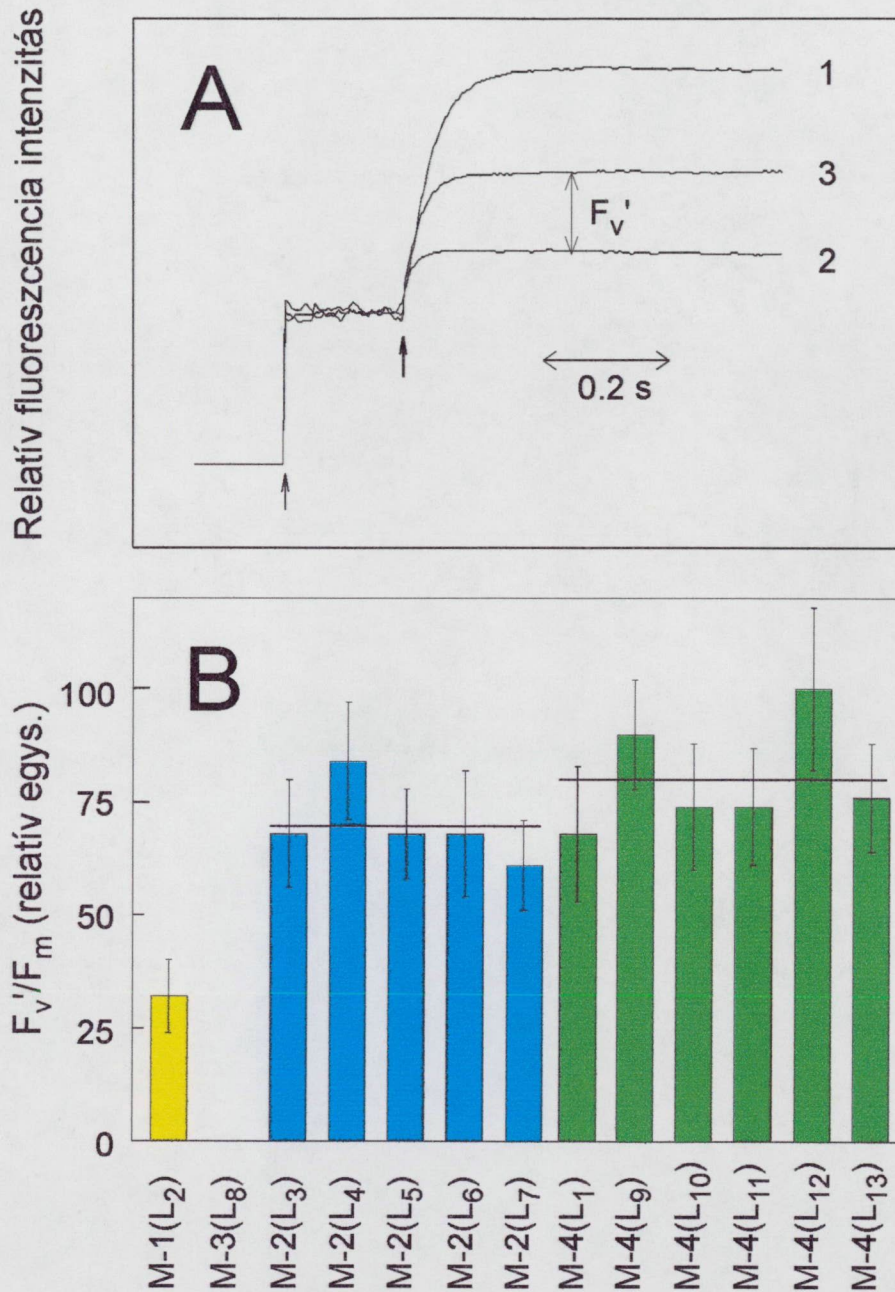


25. ábra. A 2-hidroxi-1,4-naftokinonmonoxim tautomér formái és a hidrokinon szerkezeti képlete.

Az öt mangán-katekolimin komplex közül leggyengébb (de még így is igen kiváló) elektrondonornak az M-4(L₁₁) komplex bizonyult, amire a magyarázatot ismét csak a ligandum szerkezetében kell keresni. Mint a 22A. ábrán látható, az L₁₁ ligandum, a többi katekolimin-származékkal ellentétben nem heteroaromás gyűrűt, hanem hidroxi-metil csoporttal szubsztituált fenil-csoportot tartalmaz. Így a Mn-tetramér kialakításában a ligandum nem O-O-N-N, hanem O-O-N-O donor-atomokkal vesz részt. (A donor-atom elnevezés nem az elektrontranszportban való részvételre, hanem a koordinatív kötés kialakulásakor lejátszódó elektrópár-donálásra utal: a koordinatív kötés úgy jön létre, hogy bizonyos - nagy elektronegativitású és kis méretű [O, N, F] - atomok nemkötő elektrópárja megfelelő fémion üres d-pályájára kerül.)

Az M-4(L₁) komplex nemcsak szerkezetében, hanem a Mn-ionok oxidációs állapotában is eltér a többi tetramértől, ugyanis kialakításában Mn(III)-ionok vesznek részt. Elektrondonálási képessége sem kis, sem nagy koncentrációnál nem haladja meg a MnCl₂ hatékonyságát, így elvethető az a korábbiakban felvetett elképzelés, miszerint a M-3(L₈) trimér ill. az M-2(L₆) és M-2(L₇) dimérek esetében alacsony koncentrációnál megfigyelt magas elektrondonálási készség magyarázata pusztán az ezen komplexek Mn(III)-ion tartalma lenne. Lehetséges ugyanakkor, hogy a jelenség kialakításához valóban elengedhetetlen feltétel a Mn-ionok magasabb oxidációs állapota (a kilenc csak Mn(II)-t tartalmazó komplexnél egy esetben sem volt megfigyelhető

ilyenfajta elektrononálás, míg a négy vizsgált Mn(III)-tartalmúnál három esetben igen), de ezen kívül szükség van még a komplex egyéb sajátosságainak meglétére is.



26. ábra. Fényaktiválás hatása Mn-mentes tilakoid membránok fluoreszcencia indukciós görbéjére. (A) (1) Kontroll; (2) Mn-mentes minta; (3) $MnCl_2$ -dal fényaktivált minta. Mérő- és aktinikus fény, moduláció mint a 15. ábrán. (B) Fényaktivált minták normalizált F_v'/F_m arányai ($MnCl_2 = 100\%$). Sárga oszlop: Mn-monomér; kék oszlopok: dimérek; zöld oszlopok: tetramérek. Az oszlopok fölötti vízszintes vonalak a két vegyületszám (dimérek, tetramérek) átlagát reprezentálják. Az egyes értékek három mérés átlagából lettek képezve (szórás feltüntetve).

Az előállított tizenhárom komplexet fényaktiválásban is kipróbáltuk. A jelenség szintén követhető fluoreszcencia indukcióval. Fontos hangsúlyozni, hogy, hasonlóan az elektrondonálási kísérletekhez, itt is a változó fluoreszcencia visszaállása figyelhető meg, de ebben az esetben nem a szabad Mn-komplexek exogén elektrondonálása, hanem azok részleges vagy teljes beépülése és (endogén) elektrondonálása következtében. A fényaktiválási Mn-koncentrációt $100 \mu\text{M}$ -nak választottuk (nyíllal reprezentálva a 17., 20. és 23. ábrán). A mérést a 26. ábra A része szemlélteti, ami igen hasonló a 15A. és 24. ábrán bemutatottakhoz. A fotoszintetikus aktivitás helyreállítását a fényaktivált és Mn-mentes minták F_v értékeinek különbségével (F_v') jellemeztük; a normalizált értékek a 26. ábra B részén vannak bemutatva. A viszonyítási alapul vett MnCl_2 esetében a mangán-mentes minták átlagos F_v'/F_m hányadosa 0,24-ről mintegy 0,48-ra növekedett. Az, hogy a visszaállítás csak részleges, a fényaktiválást kísérő fénygátlással magyarázható [87].

A kipróbált vegyületek fényaktiválásban mutatott hatásossága az $\text{M-3(L}_8) < \text{M-1(L}_2) < \text{dimérek} < \text{tetramérek}$ sorrendet követi. Egy kivétellel [$\text{M-3(L}_8)$ -cal nem sikerült semmilyen fokú visszaállást elérni] a csoportokon (dimérek, tetramérek) belüli sorrend ugyanaz, mint amit az elektrondonálási kísérleteinknél $100 \mu\text{M}$ -nál megfigyelünk (17., 20. és 23. ábrák). Ez a tény egyáltalán nem magától értetődő, hiszen az elektrondonálás helye nem feltétlenül egyezik meg az *in vivo* mangán-kötő hellyel, különösen nem annak figyelembe vételével, hogy a PS II lumen oldala fényaktiválás során strukturális átrendeződés(ek)e)t szenved [61,68,71-74]. Mindazonáltal, Ghirardi és mtsai javaslata szerint a DPC (PS II elektrondonor) hatóhelye megegyezik a WOC fiziológiai mangán-kötő helyével [130].

Hasonlatosság fedezhető fel az elektrondonálási kísérletek eredményével abból a szempontból is, hogy a Mn(III)-ionot tartalmazó komplexek fényaktiválási hatékonysága az egyes csoportokon belül kismértékben elmarad a csak Mn(II)-t tartalmazókkal szemben. Ennek oka lehet a Mn(III)-tartalmú komplexek valószínűsíthetően eltérő kémiai természete, ami megnehezítheti ezeknek a komplexeknek a vízbontó rendszerbe történő beépülését. Ez az eltérő kémiai természet megnyilvánulhat akár az egyes Mn-ionok szintjén, pl. úgy, hogy a Mn-mentes WOC Mn-kötő helye nagyobb affinitással köthet a Mn(II)-, mint a Mn(III)-iont, akár az egész komplex szintjén: vagy úgy, hogy annak (strukturális, redox) sajátosságai tesznek lehetővé kisebb mértékű beépülést, vagy

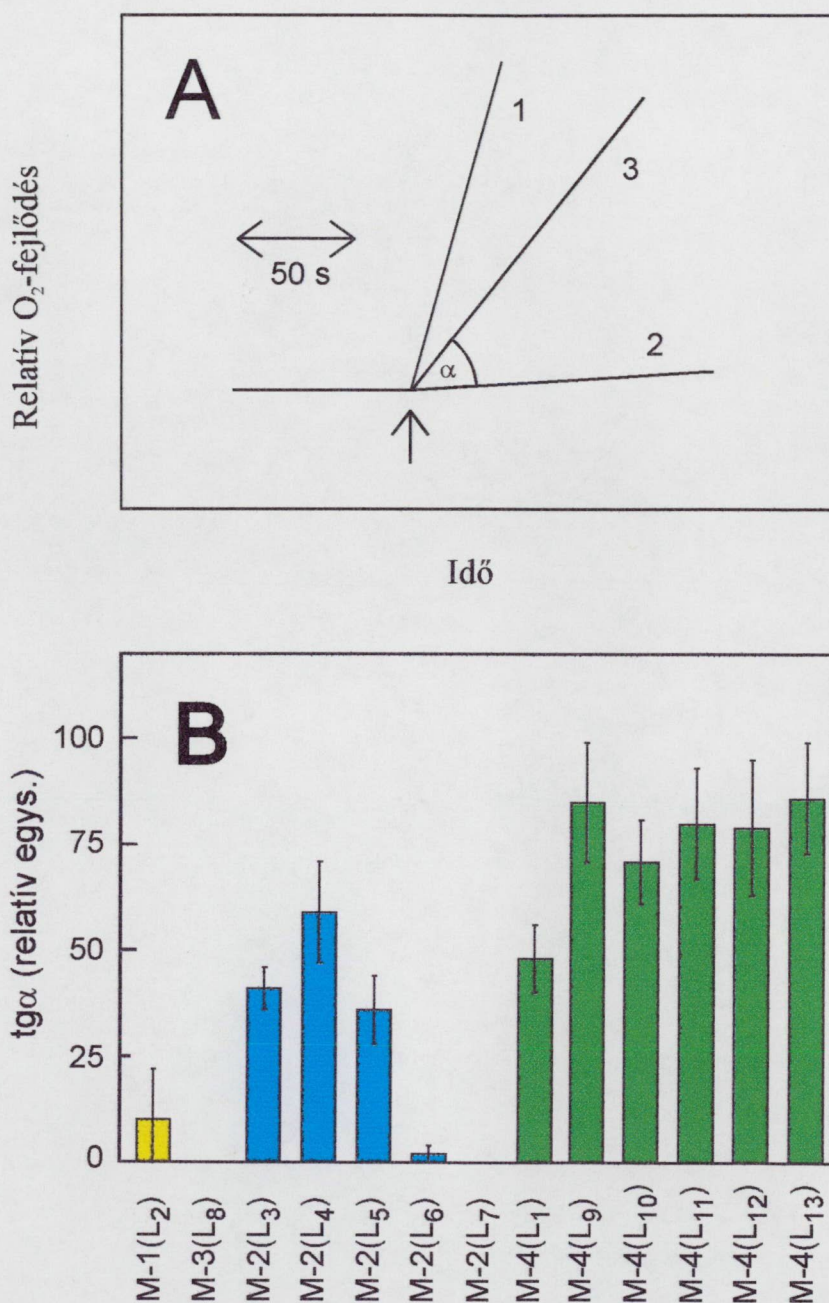
úgy, hogy (részleges vagy teljes beépülés esetén) módosult vízbontó rendszer alacsonyabb hatékonysággal tud elektronokat donálni a P680 felé mint a természetes WOC. További egyezést tapasztaltunk az elektrondonálási kísérletek eredményeivel az azonos ligandumot tartalmazó monomér [M-1(L₂)] és dimér [M-2(L₃)] esetén is: a két, azonos építőelemekből felépülő komplex fényaktiválási képességében szignifikáns különbség volt tapasztalható (a dimér javára). Ez arra utal, hogy nemcsak az (exogén) elektrondonálás hatékonysága függ a komplex szerkezetétől, hanem a vízbontó rendszerbe való beépülés és/vagy a létrejött (módosult vagy nem módosult) vízbontó rendszer működése is.

Az exogén elektronnalással kapcsolatos eredmények ismertetésénél szó esett a két fenantrolint tartalmazó komplex - alacsony koncentrációnál [M-3(L₈)] ill. a teljes vizsgált koncentrációtartományban [M-2(L₄)] megfigyelhető - jó elektrondonálási képességéről. Az M-3(L₈) komplex a fényaktiválásban nem bizonyult hatásos ágensnek, ellenben az M-2(L₄) dimér reaktiválás utáni fluoreszcencia-paraméterei a vizsgált öt dimér közül a legjobbnak bizonyult. Ez azt mutatja, hogy az M-2(L₄) komplex nem csak vizes oldatában stabil, de a komplex beépülése is többé-kevésbé intakt módon zajlik (ellenkező esetben - a fenantrolin gátló hatása miatt - nem lenne visszaállás megfigyelhető).

Fényaktiválás szintetikus Mn-komplexekkel: polarográfiás és TL vizsgálatok

A fényaktiválás hatására bekövetkező fotoszintetikus aktivitás-változást oxigénfejlődés mérésével is követtük. A Mn-kivonás hatására megszűnő oxigénfejlődés fényaktiválás hatására részlegesen visszaállt (27A. ábra): 100 μ M MnCl₂-dal az eredeti érték 70%-ka volt elérhető, ami hasonló az irodalmi értékekhez [131].

A 27B. ábrán a különböző vegyületekkel végrehajtott fényaktiválás hatására bekövetkező relatív helyreállások vannak ábrázolva (MnCl₂ = 100%). A relatív aktivitások valamennyi esetben elmaradtak a fluoreszcencia indukcióval mérttől, ami az oxigénfejlesztés jóval bonyolultabb (és az *in vivo* állapothoz sokkal közelebb álló) voltával magyarázható. Nem kaptunk detektálható oxigénmennyiséget az M-3(L₈) ill. M-2(L₇) esetben és igen csekély oxigénfejlesztő képességgel rendelkeztek az M-2(L₆) dimérrel helyreállított centrumok. Ezért fényaktiválási kísérleteket hajtottunk végre

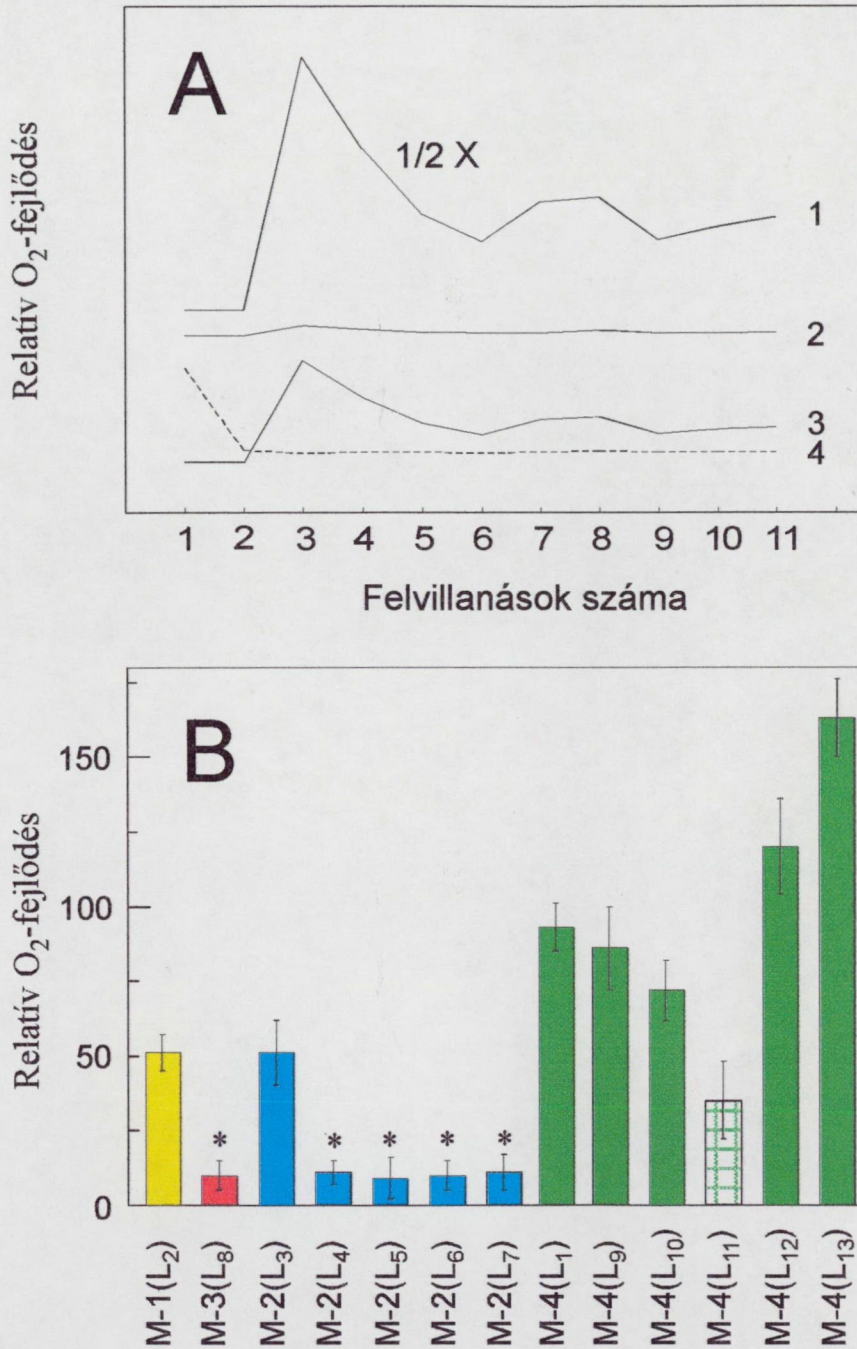


27. ábra. Fényaktiválás hatása Mn-mentes tilakoid membránok Clark-elektroddal mért oxigénfejlesztésére. (A) (1) Kontroll; (2) Mn-mentes minta; (3) $MnCl_2$ -dal fényaktivált minta. A nyíl a telítési fehér fény bekacsolását jelzi. Elektronakceptorként $500 \mu M$ PpQ lett használva. A kontroll oxigénfejlesztése: $170 \mu mol \cdot mg^{-1} Chl \cdot h^{-1}$. (B) Fényaktivált minták normalizált oxigénfejlesztése ($MnCl_2 = 100\%$). Sárga oszlop: Mn-monomér; kék oszlopok: dimérek; zöld oszlopok: tetramérek. Az egyes értékek három mérés átlagából lettek képezve (szórás feltüntetve).

ezekkel a komplexekkel alacsonyabb koncentrációnál is, ahol elektrondonálási képességük (ld. 17. és 20. ábra) sokkal határozottabb volt, de ott sem sikerült jobb eredményt elérni. Az egyes csoportok oxigénfejlesztő képességének sorrendje megegyezett a fluoreszcenciás méréseknél megállapítottakkal: a tetramérek jobbnak bizonyultak, mint a mono-, di- és trimérek. A diméreken és tetraméreken belül a csak Mn(II)-t tartalmazó komplexek fénygátlásban mutatott hatékonysága jobb volt, mint azoké amelyek Mn(III)-at (is) tartalmaztak, a tetraédes Mn-tetramér gyengébbnek bizonyult a lineáris komplexeknél.

Mélyebb betekintés céljából akivítás-méréseket végeztünk Joliot-típusú oxigén-elektóddal is. A kontroll minta oxigénfejlesztése rövid felvillanások (ahol csak egy elektronátmenet lehetséges) hatására a jól ismert négyes oszcillációt mutatta (28A. ábra, 1-es göbe), a 3., 7., stb. felvillanások utáni maximumokkal [104]. A polarográfiás jel mangán-kivonás hatására teljesen eltűnt (2-es görbe), majd fényaktiválás hatására részlegesen ismét megjelent (3-as és 4-es görbék).

Valamennyi tetramér, monomér és az öt közül egy dimér ($M-2(L_3)$) esetében a normális négyes periódusú mintázat állt vissza (3-as görbe). A tilakoid membránban rendelkezésre álló a PQ korlátozott volta miatt az abszolút értékek alacsonyabbak ($\approx 20\%$) voltak mint amit Clark-elektóddal kaptunk (Joliot-elektódnál nem tanácsos exogén elektronakceptorokat alkalmazni); a $MnCl_2$ -ra vonatkoztatott relatív értékeket a 28B. ábra mutatja. Ezt referenciának tekintve, a fejlődő oxigén mennyisége egy kivétellel [$M-4(L_{11})$] arányos volt a Clark-elektóddal mérttel vagy meg is haladta azt. A tetramérek által helyrállított centrumok aktivitása itt is meghaladta a vizsgált monomérét és az ebbe a csoportba tartozó dimérét [$M-2(L_3)$]. Az $M-4(L_{11})$ komplexnél légzés volt megfigyelhető (aminek oka talán a ligandum többi katekolimin ligandumtól eltérő donor-atom konfigurációban [O-O-N-O] keresendő), így valószínűleg nagyobb oxigénfejlesztés tartozik hozzá, mint ami az ábráról leolvasható. Két tetramérnél [$M-4(L_{12})$ és $M-4(L_{13})$] a megfigyelt oxigénfejlesztés a mérési hibahatárnál nagyobb mértékben haladta meg a $MnCl_2$ -reaktívált centrumok aktivitását. Ez az eredmény indirekt bizonyítékot nyújt arra vonatkozóan, hogy nemcsak disszociált Mn^{2+} -ionok, hanem - teljesen vagy részlegesen - intakt komplexek is képesek beépülni a vízbontó rendszerbe. Hasonlóan, ugyanezek a tetramérek izolált PS II részecskéknél (ahol a vízdoldható fehérjék nem képeznek akadályt) a folyamatos oxigénfejlesztést a $MnCl_2$ -ot

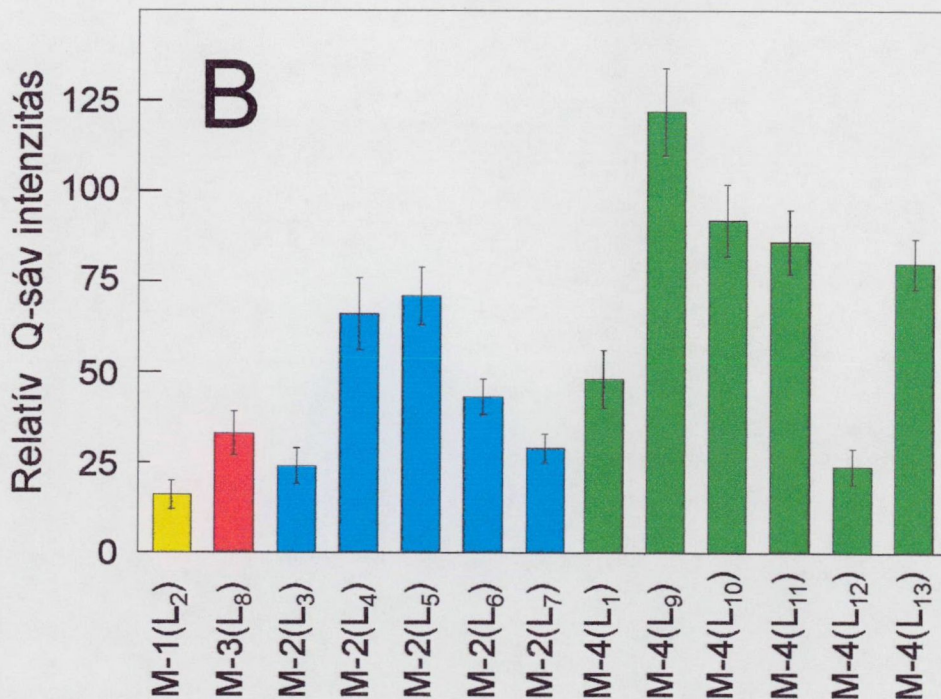
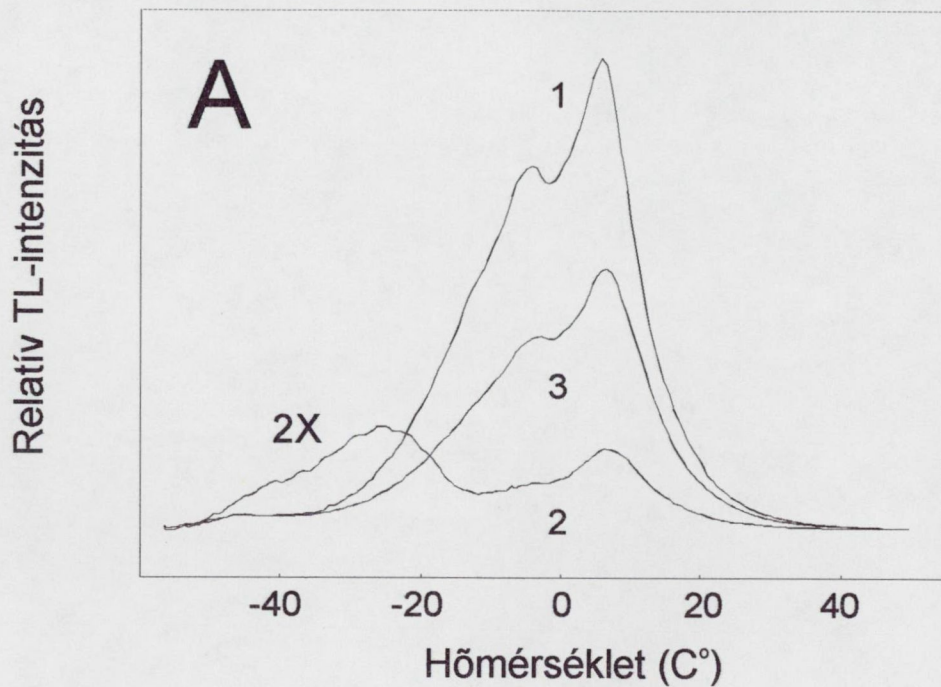


28. ábra. Fényaktiválás hatása Mn-mentes tilakoid membránok Joliot-elektroddal mért oxigénfejlesztésére. (A) (1) Kontroll; (2) Mn-mentes minta; (3) MnCl₂-dal fényaktivált minta; (4) M-3(L₈)-cal fényaktivált minta. (B) Fényaktivált minták normalizált oxigénfejlesztése a harmadik felvillanás után (MnCl₂ = 100%). Sárga oszlop: Mn-monomér; piros oszlop: trimér; kék oszlopok: dimérek; zöld oszlopok: tetramérek. A rendellenes oxigénfejlesztési mintázatok csillaggal jelölve. A kockás mintázattal jelölt oszlophoz tartozó oxigénfejlesztés légzés miatt fenntartással kezelendő. Az egyes értékek három mérés átlagából lettek képezve (szórás feltüntetve).

meghaladó mértékben állították vissza (nincs bemutatva). Ebből arra következtettünk, hogy ezek a komplexek energetikailag vagy kinetikailag jobbak a visszaállításnál, mint a MnCl_2 , de a PS II lumen oldalán kötődő vízdioxidat fehérjék a bekötődést gátol(hat)-ják. Ehhez további adalék, hogy *Synechocystis* ΔpsbO mutánsában (ami mentes a 33 kDa vízdioxidat fehérjétől) a kötőhely könnyebben hozzáférhető Mn^{2+} számára mint a vad típusban [132].

A fennmaradó négy dimér és az egyetlen előállított trimér nagyon furcsa oxigénfejlődési mintázatot produkált (28A. ábra, 4-es görbe), mindenféle oszcilláció nélkül: az első felvillanás után megfigyelt nagy oxigénfejlődés a második felvillanást követően jelentősen lecsökkent és intenzitása később sem változott. Ez arra utal, hogy ezek a reaktivált centrumok sötétadaptálás után módosult, stabil S_3 -állapotban vannak, és a ciklus egy vagy több későbbi lépése ($S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$) gátolt. Az irodalomból ismeretes, hogy kéalgák szintén bocsátanak ki oxigént az első felvillanás után, amely oxigénfejlődést metastabil S_3 -állapothoz rendelik [133,134]. Speciális PS II preparátumokból is leírtak már ilyen típusú (első felvillanás utáni) oxigénfejlődést [135]. Érdekes tény, hogy a négy Mn(III) -tartalmú szintetikus Mn-komplexből három produkált ilyen rendellenes oxigénfejlődési mintázatot, tehát azok a komplexek, melyekben a mangán-ionok magasabb oxidációs állapottal szerepel, beépülésük után nagyobb valószínűséggel alakítanak ki olyan vízbontó rendszert, amelynek valamely magasabb S-állapotban (oxidációs állapotban) is viszonylagos stabilitással bír. Szintén figyelemre méltó, hogy ezt a jelenséget csak diméreknél és az $\text{M-3(L}_8\text{)}$ trimérnél tapasztaltuk, de nem figyeltük meg Mn-tetramérek esetében. Úgy véljük, ennek az a magyarázata, hogy a hat tetramér közül öt meglehetősen hasonló szerkezettel rendelkezik, amely szerkezet közel áll a természetes WOC szerkezetéhez. Mindezek alapján arra a következtésre jutottunk, hogy a fenti jelenséget (abnormális oxigénfejlődést) produkáló négy mesterséges dimér és egy trimér is képes beépülni a vízbontó rendszerbe, de nem képes a normál fotoszintézist visszaállítani (egyfajta módosult vagy perturbált WOC-t alakít ki).

Különösen érdekes, hogy a szokatlan oxigén-mintázatot kiváltó öt komplex közül három [$\text{M-3(L}_8\text{)}$, $\text{M-2(L}_6\text{)}$ és $\text{M-2(L}_7\text{)}$] magasabb elektrononálási képességgel rendelkezik, mint a MnCl_2 (17. és 20. ábra), de folyamatosan nem képes oxigént fejleszteni (27B. ábra). Mindhárom komplexben található Mn(III) -ion. Ez arra utal, hogy a mangán-ionok vegyérékállapota (teljesen magától értetődő módon) jelentősen



29. ábra. Fényaktiválás hatása Mn-mentes tilakoid membránok TL-karakterisztikájára. (A) (1) Kontroll; (2) Mn-mentes minta; (3) MnCl₂-dal fényaktivált minta. (B) Fényaktivált minták normalizált Q-sáv intenzitása (MnCl₂ = 100%). Sárga oszlop: Mn-monomér; piros oszlop: trimér; kék oszlopok: dimérek; zöld oszlopok: tetramérek. Az egyes értékek három mérés átlagából lettek képezve (szórás feltüntetve).

befolyásolja a komplexek redox sajátosságait. Mindazonáltal a ligandumok vagy szerkezet szerepét sem lehet kétségbevonni [ld. az M-2(L₄) és M-2(L₅) komplexekkel reaktivált centrumok rendellenes vagy az M-4(L₁) komplex oxigénfejlődési mintázata].

A WOC redoxpotenciáljában bekövetkező esetleges változások nyomon követésére a fényaktiválás utáni és előtti állapotokat termolumineszcenciával is megvizsgáltuk. (A Q TL-sáv, hasonlóan az oxigénfejlesztéshez, csak akkor figyelhető meg, ha a Mn²⁺-ion vagy Mn-komplexek beépültek a WOC-be.) A fényaktiválást kísérő TL-változásokat szemlélteti a 29A. ábra. Mn-kivonás hatására (2-es görbe) a Q-sáv eltűnt, és -25°C környékén megjelent az ún A_T TL-sáv melynek eredetét a His⁺Q_A⁻ töltésrekombinációhoz rendelik [136,137]. Fényaktiválás hatására a Q-sáv részlegesen visszaállt, az A_T-sáv pedig teljesen eltűnt (3-as görbe), hasonlóan Tamura és mtsai eredményéhez [137]. A Q-sáv pozíciója egyik esetben sem változott, tehát normál S₂-állapotot tükröz, ami azt jelenti, hogy a rendellenes oxigénfejlődést kiváltó öt komplexszel reaktivált centrumok is lehetnek stabilak S₁-állapotban (kísérleti körülményeink között csak egy töltésszétválasztódás lehetséges).

A 29B. ábra a különböző komplexekkel végrehajtott reaktiválás utáni normalizált Q-sáv intenzitásokat mutatja. A legjobb visszaállítás [M-4(L₉)], hasonlóan a polarográfiás mérések eredményéhez, 70% körülinek adódott; ez egyúttal azt is jelenti, hogy az M-4(L₉) komplex hatásosabb volt a Q-sáv visszaállításában mint a MnCl₂. Az egyes vegyületcsoportok hatásossága a fluoreszcenciás és polarográfiás méréseknél ismertetett monomér, trimér < dimér < tetramér sorrendet követi. Meglepő módon, a Q-sávot részlegesen helyre lehetett állítani azokkal a dimérekkel és trimérrel is, amelyek a folyamatos oxigénfejlődést egyáltalán nem tudták visszaállítani. Ez azt mutatja, hogy itt az S₂→S₃ átmenet jobban, az S₁→S₂ átmenet kevésbé gátlódott, ami jól összeegyeztethető ezen vegyületek kiváló elektrondonálási képességével (17. és 20. ábra).

A fluoreszcencia indukciós, polarográfiás és TL vizsgálatok eredményeit összehasonlítva megállapítható, hogy a tetramérek valamennyi kísérlet típus esetén nagyobb hatékonyságot mutattak a mono-, di- és triméreknél. Véleményünk szerint ez arra utal, hogy a vízbontó rendszer normális működéséhez mind a négy mangán szükséges, ellentétben Klimov és mtsai, Saygin és Witt valamint Allakhverdiev és mtsai javaslatával [78,80,81]. Egyes dimérek [M-2(L₃), M-2(L₄), M-2(L₅)] viszonylag jó visszaállítási képessége két dimér kooperációjával magyarázható. Az előállított trimér

rendkívül rossz hatékonysága alátámasztja ezt az elképzelést. Lényeges, hogy a fényaktiválásban nagy hatékonyságot mutató négy tetramér Mn-ionjai a természetes vízbontó rendszeréhez hasonló, dimér + dimér elrendeződést mutattak.

Összehasonlíthatjuk az egyes komplexek fényaktiválásban mutatott hatékonyságát a ligandumok típusa szerint is. A 13 kipróbált komplex zömében a központi mangán-ionokat 4-6 oxigénatom és 0-2 nitrogénatom vette körül. Ez alól csak két kivétel akadt: az M-1(L₂) monomér, ahol a N- és O-atomokon kívül Cl⁻-ionok is szerepeltek ligandumként ill. az M-3(L₃) trimér, ahol a nitrogénatomok voltak többségben az oxigénatomokkal szemben (4:2). Mindkét vegyület kis hatékonyságúnak bizonyult kísérleteinknél, így a nuklearitáson kívül a donor atomok milyensége és aránya is szerepet játszhat a Mn-komplexek fényaktiválásban mutatott hatékonyságában. A természetes vízbontó rendszer mangán-ionjait kötő aminosavak, donor-atomok pontosan nem ismeretesek, bár a D1 és D2 fehérjék szekvenciájának analízise és különféle pontmutánsok biofizikai jellemzése alapján azokra vonatkozóan számos javaslat létezik [7]. Valószínűnek tűnik, hogy a donor atomok többsége oxigén, ugyanis olyan donor-atomokra van szükség, amelyek ellenállnak a magasabb S-állapotokban előforduló, agresszív(ebb) kémiai természetű Mn(IV) hatásainak is. Mindazonáltal vannak arra utaló adatok, hogy a Mn-ionok ligációjában His ligandumok (N donor-atomok) is rész vesznek [7]. Így a kísérleteinkben jónak bizonyult komplexek és a természetes WOC valószínű donor-atom eloszlása közel állhat egymáshoz.

Elektrondonálási és fényaktiválási kísérleteink során mintegy 13-féle különböző Mn-komplexet próbáltunk ki. Ezeket a komplexeket a központi Mn-ionok száma és vegyértékállapota, a komplex donor-atom eloszlása és szerkezete alapján többféleképpen csoportosíthattuk. A rendelkezésre álló komplexek (13) és a variálható paraméterek (legalább 3: nuklearitás, vegyértékállapot, donor-atomok típusa) számát összevetve látható, hogy következtetéseinket szűk számú mintából kellett levonnunk, ami miatt nem is mindig volt eldönthető (pl. ha egyszerre több paraméter változott vagy egy típusból csak 1-2 vegyület állt rendelkezésünkre), hogy a megváltoztatott paraméterek közül melyik bír nagyobb fontossággal. Mentségünkre szóljon, komplex vegyületek összetétele nem választható meg szabadon és nem változtatható folytonosan. Úgy gondoljuk hogy újabb Mn-komplexek előállítására és kipróbálására az elektrondonálásban/fényaktiválásban

további értékes információkat szolgáltatathatna a Mn-komplexek fényaktiválásáról és a vízbontó rendszer szerkezetéről.

ÖSSZEFOGLALÁS

A földi élet fenntartásához szükséges energia végső forrása a Nap fénye, amely a fotoszintézis során kémiai energiává alakul át. Ezen az alapvető szerepen túl, fény szükséges a fotoszintetikus pigmentek szintéziséhez és a fotoszintetikus oxigén-fejlesztésért felelős katalitikus hely, a második fotokémiai rendszerben elhelyezkedő vízbontó rendszer összeállítódásához, a fényaktiváláshoz is. Noha a fény alapvető a fotoszintetikus energiátalakításhoz, túlzott mennyiségű fény a PS II sérüléséhez, az ún. fénygátláshoz vezet. Vizsgálataink a fénygátlásnak és fényaktiválásnak a jobb megértéséhez szolgáltatottak újabb adatokat, egyúttal értékes információkat nyújtottak a PS II heterogenitásáról és a vízbontó rendszer szerkezetéről is. Munkánk során a következő fő eredményeket értük el:

I. Fénygátlás

- (1) Összehasonlító ESR- és TL-vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy a C TL-sávot az oxidált járulékos elektrondonor Y_D és a redukált Q_A elsődleges kinon akceptor $Y_D^+Q_A^-$ töltésrekombinációja okozza. Kimutattuk, hogy a Q-sáv ($S_2Q_A^-$ töltésrekombináció) és C-sáv kialakításában a Q_A kétféle formája vesz részt: a Q-sáv kialakításában túlnyomórészt bikarbonátot kötő ($g=1,82$), a C-sáv kialakításában bikarbonát-mentes non-hem vassal kölcsönható ($g=1,9$) formája. A $Y_D^+Q_A^-$ ($g=1,82$) és $S_2Q_A^-$ ($g=1,9$) töltésrekombinációk prioritása a $Y_D^+Q_A^-$ ($g=1,9$) és $S_2Q_A^-$ ($g=1,82$) töltésrekombinációkkal szemben arra utal, hogy az akceptor oldal bikarbonátot kötő vagy bikarbonát-mentes volta kihat a donor-oldali töltésstabilizációra.
- (2) Megállapítottuk, hogy az elsődleges kinon akceptor kétféle formájához eltérő fénystressz-érzékenység tartozik. Megfigyeltük, hogy a Q_A ($g=1,9$) gátlódásával azonos ütemben gátlódik a vízbontó rendszer és a cyt b_{559} magas potenciálú formája, a Q_A ($g=1,82$) fénygátlás okozta csökkenése pedig az Y_D^+ és az

alacsony potenciálú Cyt b_{559} változásával azonos lefutást mutat. Ezek az eredmények jó egyezésben vannak azon irodalmi adatokkal, melyek szerint a bikarbonát-ion fontos szerepe játszik a fénygátlás elleni védekezésben.

II. Fényaktiválás szintetikus mangán-komplexekkel

- (1) A jelenségcsoport másik oldalára vonatkozóan sikeres fényaktiválási kísérleteket hajtottunk végre mintegy 13-féle szintetikus Mn-kompleksszel; a fényaktiválás hatékonyságát fluoreszcencia indukció, oxigén polarográfia és termolumineszcencia módszerekkel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy igen szoros korreláció van a különböző komplexek elektrononálási és oxigénfejlesztést helyreállító képessége között.
- (2) Megállapítottuk, hogy a nagyméretű ligandumok nem akadályai a fényaktiválásnak. A különböző komplex mangán-vegyületek részleges vagy teljes beépülése a PS II donor oldalának flexibilitását mutatja.
- (3) Kimutattuk, hogy a különböző Mn-komplexek fényaktiválásban mutatott hatásossága függ a komplexet alkotó Mn-ionok számától, vegyértékállapotától, a donor-atomok milyenségétől és számától. Legjobbnek azok a komplexek bizonyultak, amelyekben (i) négy mangán-ion található dimér+dimér elrendezésben, (ii) a mangán-ionok vegyértékállapota +2, (iii) donor atomként 4-6 oxigén- és 0-2 nitrogénatomot tartalmaz. (iv) Mindezeket túl, a fényaktiválás határfoka nagyban függött a komplexek szerkezetétől is. Adataink egyezésben állnak azzal a széleskörűen elfogadott nézettel, mely szerint a vízbontás működéséhez a vízbontó rendszer (mind a) négy mangán-ionjának megfelelő térbeli elhelyezkedése és összehangolt működése szükséges és cáfolja azt a szűkebb körben elfogadott álláspontot miszerint a vízbontáshoz mindössze két Mn-ion is elégséges.
- (4) Bizonyos vegyületekkel végrehajtott fényaktiválás után redellenes "flash"-oxigén mintázatot figyeltünk meg, melyet a létrejött vízbontó rendszer természetétől eltérő sajátágaival hoztunk összefüggésbe.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Hansson Ö & Wydrzynski T (1990) *Photosynth. Res.* 23, 131-162

- [2] Vermaas W (1993) *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 44, 457-481
- [3] Nugent JHA (1996) *Eur. J. Biochem.* 237, 517-531
- [4] Hankamer B & Barber J (1997) *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 48, 641-671
- [5] Renger G (1992) in *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology* (Barber J ed) pp 46-99, Elsevier, Amsterdam
- [6] van Grondelle R, Dekker JP, Gillbro T & Sundstrom V (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 1-65
- [7] Debus R (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1102, 267-352
- [8] Rutherford AW, Zimmermann J-L & Boussac A (1992) in *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology* (Barber J ed) pp 179-229, Elsevier, Amsterdam
- [9] Boussac A & Rutherford AW (1994) *Bioc. Soc. Trans.* 22, 352-358
- [10] Diner BA & Petrouleas V (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 895, 107-125
- [11] Blubaugh DJ & Govindjee (1988) *Photosynth. Res.* 19, 85-128
- [12] Diner BA, Petrouleas V & Wendoloski JJ (1991) *Physiol. Plant.* 81, 423-436
- [13] Seidler A (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1277, 35-60
- [14] Kok B, Forbush B & McGloin M (1970) *Photochem. Photobiol.* 11, 457-475
- [15] Britt RD (1996) in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort DR & Yocum CF eds) pp 137-164, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- [16] Renger G (1997) *Physiol. Plant.* 100, 828-841
- [17] Yachandra VK, DeRose VJ, Latimer MJ, Mukerji I, Sauer K & Klein MP (1993) *Science* 260, 675-679
- [18] George GN, Prince RC & Cramer SP (1989) *Science* 243, 789-791
- [19] Dau H, Andrews JC, Roelofs TA, Latimer MJ, Liang W, Yachandra VK, Sauer K & Klein MP (1995) *Biochemistry* 34, 5274-5287
- [20] Latimer MJ, DeRose VJ, Mukerji I, Yachandra VK, Sauer K & Klein MP (1995) *Biochemistry* 34, 10898-10909
- [21] Noguchi T, Ono T-A & Inoue Y (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1228, 189-200

- [22] Ono T, Noguchi T, Inoue Y, Kusunoki M, Yamaguchi H & Oyanagi H (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 6386-6387
- [23] Liang W, Latimer MJ, Dau H, Roelofs TA, Yachandra VK, Sauer K & Klein MP (1994) *Biochemistry* 33, 4923-4932
- [24] Babcock GT (1995) in *Photosynthesis: from Light to Biosphere* (Mathis P ed) Vol. II. 209-215, Kluwer, Dordrecht
- [25] Wincencjusz H, Allakhverdiev SI, Klimov VV & van Gorkom HJ (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1273, 1-3
- [26] Allakhverdiev SI, Yruela I, Picorel R & Klimov VV (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5050-5054
- [27] Klimov VV, Baranov SV & Allakhverdiev SI (1997) *FEBS Lett.* 418, 243-246
- [28] Yruela I, Allakhverdiev SI, Ibarra JV & Klimov VV (1998) *FEBS Lett.* 425, 396-400
- [29] Hulsebosch RJ, Allakhverdiev SI, Klimov VV, Picorel R & Hoff AJ (1998) *FEBS Lett.* 424, 146-148
- [30] Moubarak-Milad M & Stemler A (1994) *Biochemistry* 33, 4432-4438
- [31] Warburg O & Krippahl (1960) *Z. Naturforsch.* 156, 367-369
- [32] Stemler A & Radmer R (1975) *Science* 190, 457-458
- [33] Wydrzynski T & Govindjee (1975) 403-408
- [34] Stemler A (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 593, 103-112
- [35] van Rensen JJS, Xu C & Govindjee (1999) *Physiol. Plant.* 105, 585-592
- [36] Roelofs TA, Liang W, Latimer MJ, Cinco RM, Rompel A, Andrews JC, Sauer K, Yachandra VK & Klein MP (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3335-3340
- [37] Iuzzolino L, Dittmer J, Dörner W, Meyer-Klaucke W & Dau H (1998) *Biochemistry* 37, 17112-17119
- [38] Kretschmann H & Witt HT (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1144, 331-345
- [39] Ono T, Noguchi T, Inoue Y, Kusunoki M, Matsuhita T & Oyanagi H (1992) *Science* 258, 1335-1337

- [40] MacLachlan DJ, Nugent JHA & Evans MCW (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1185, 103-111
- [41] Berthomieu C & Boussac A (1995) *Biochemistry* 34, 1541-1548
- [42] Messinger J, Badger M & Wydrzynski T (1995) *Proc. Natl. Sci. USA* 92, 3209-3213
- [43] Fine PL & Frasch WD (1992) *Biochemistry* 31, 12204-12210
- [44] Krishtalik LI (1990) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 23, 249-263
- [45] Hoganson, C. W. & Babcock, G. T. (1997) *Science* 277, 1953-1956
- [46] Wydrzynski T, Hillier W & Messinger J (1996) *Physiol. Plant.* 96, 342-350
- [47] Gilchrist ML, Ball JA, Randall DW & Britt RD (1995) *Proc. Natl. Sci. USA* 92, 9545-9549
- [48] Tommos C, Tang XS, Warncke K, Hoganson CW, Styring S, McCracken J, Diner BA & Babcock GT (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10325-10335
- [49] Hoganson CW, Lydakis-Simantiris N, Tang XS, Tommos C, Warncke K, Babcock GT, Diner BA, McCracken J & Styring S (1995) *Photosynth. Res.* 46, 177-184
- [50] Tang X-S, Randall DW, Force DA, Diner BA & Britt RD (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7638-7639
- [51] Caudle MT & Pecoraro VL (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 3415-3416
- [52] Blomberg MRA, Siegbahn PEM, Styring S, Babcock GT, Åkermark B & Korall P (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 8285-8292
- [53] Cheniae GM & Martin (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 253, 167-181
- [54] Cheniae GM & Martin (1973) *Photochem. Photobiol.* 17, 441-459
- [55] Remy R (1973) *Photochem. Photobiol.* 18, 409-416
- [56] Inoue Y, Kobayashi Y, Sakamoto E & Shibata K (1975) *Plant Cell Physiol.* 16, 327-336
- [57] Oku T & Tomita G (1976) *Physiol. Plant.* 38, 181-185
- [58] Kamachi H, Tamura N, Yoshihira T & Oku T (1994) *Physiol. Plant.* 91, 747-753

- [59] Yamashita T & Tomita G (1974) *Plant Cell Physiol.* 15, 69-82
- [60] Yamashita T & Tomita G (1976) *Plant Cell Physiol.* 17, 571-582
- [61] Tamura N & Cheniae G (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 890, 179-194
- [62] Tamura N, Inoue Y & Cheniae GM (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 976, 173-181
- [63] Miller A-F & Brudvig GW (1989) *Biochemistry* 28, 8181-8190
- [64] Chen C, Kazimir J & Cheniae GM (1995) *Biochemistry* 34, 13511-13526
- [65] Yamashita T & Ashizawa A (1985) *Arch. Biochim. Biophys.* 238, 549-557
- [66] Miyao M & Inoue Y (1991) *Biochemistry* 30, 5379-5387
- [67] Klimov VV, Hulsebosch RJ, Allakhverdiev SI, Wincencjusz H, van Gorkom HJ & Hoff AJ (1997) *Biochemistry* 36, 16277-16281
- [68] Ono T-A & Inoue Y (1987) *Plant Cell Physiol.* 28, 1293-1299
- [69] Miller A-F & Brudvig GW (1990) *Biochemistry* 29, 1385-1392
- [70] Johnson GN, Rutherford AW & Krieger A (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 202-207
- [71] Ananyev GM & Dismukes GC (1996) *Biochemistry* 35, 4102-4109
- [72] Ananyev GM & Dismukes GC (1996) *Biochemistry* 35, 14608-14617
- [73] Zaltsman L, Ananyev G, Bruntrager E & Dismukes GC (1997) *Biochemistry* 36, 8914-8922
- [74] Ananyev GM, Zaltsman L, McInturff RA & Dismukes GC (1998) in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Garab G ed) Vol. II. pp 1347-1350, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- [75] Wieghardt K (1989) *Angew. Chem. Eng.* 28, 1153-1172
- [76] Wells W, Harton A & Vincent JB (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1144, 346-352
- [77] Frapart Y-M, Boussac A, Albach R, Anxolabéhère-Mallart E, Delroisse M, Verlhac J-B, Blondin G, Girerd J-J, Guilhem J, Cesario M, Rutherford AW & Lexa D (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 2669-2678

- [78] Allakhverdiev SI, Karacan MS, Somer G, Karacan N, Khan EM, Rane MY, Padhye S, Klimov VV & Renger G (1994) *Biochemistry* 33, 12210-12214
- [79] Allakhverdiev SI, Karacan MS, Somer G, Karacan N, Khan EM, Rane MY, Padhye S, Klimov VV & Renger G (1994) *Z. Naturforsch.* 49c, 587-592
- [80] Klimov VV, Allakhverdiev SI, Shuvalov VA & Krasnovsky AA (1982) *FEBS. Lett.* 148, 307-312
- [81] Saygin Ö & Witt HT (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 893, 452-469
- [82] Prašil O, Adir N & Ohad I (1992) in *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology* (Barber J ed) pp 295-348, Elsevier, Amsterdam
- [83] Aro E-M, Virgin I & Andersson B (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 113-134
- [84] Macpherson AN, Telfer A, Barber J & Truscott TG (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 301-309
- [85] Hideg É, Spetea C & Vass I (1994) *Photosynth. Res.* 39, 191-199
- [86] Spetea C, Hideg É & Vass I (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1318, 275-283
- [87] Rova M, McEwen B, Fredriksson P-O & Styring S (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 28918-28924
- [88] Aro E-M, Hundal T, Carlberg I & Andersson B (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1019, 269-275
- [89] Shipton CA & Barber J (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1099, 85-90
- [90] Styring S, Virgin I, Ehrenberg A & Andersson B (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1015, 269-278
- [91] Vass I, Styring S, Hundal T, Koivuniemi A, Aro E-M & Andersson B (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1408-1412
- [92] Hoff AJ (1987) in *New Comprehensive Biochemistry: Photosynthesis* (Amesz J ed) pp 97-123, Elsevier, Amsterdam
- [93] Miller A-F & Brudvig GW (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1056, 1-18
- [94] Sane PV & Rutherford AW (1986) in *Light Emission by Plants and Bacteria* (Govindjee, Amesz J & Fork DC eds) pp 329-360, Academic Press, New York
- [95] Demeter S & Govindjee (1989) *Physiol. Plant.* 75, 121-130

- [96] Vass I & Inoue Y (1992) in *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology* (Barber J ed), pp 259-294, Elsevier, Amsterdam
- [97] Rutherford AW & Zimmermann J-L (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 767, 168-175
- [98] Aggarwal RC, Singh NK & Singh RP (1984) *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.* 14, 637-650
- [99] Padhye SB, Rane SY & Gupta SG (1978) *Inorg. Nucl. Chem. Lett.* 14, 83-86
- [100] Reddy KR, Rajasekharan MV, Arulsamy N & Hodgson DJ (1996) *Inorg. Chem.* 35, 2283-2286
- [101] Theil S, Yerande R, Chikate R, Dahan F, Bousseksou A, Padhye S & Tuchagues JP (1997) *Inorg. Chem* 36, 6279-6286
- [102] Völker M, Ono T, Inoue Y & Renger G (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 806, 25-34
- [103] Arnon DI (1949) *Plant Physiol.* 24, 1-15
- [104] Joliot P & Joliot A (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153, 625-634
- [105] Vass I, Horváth G, Herczeg T & Demeter S (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 634, 140-152
- [106] Zimmermann J-L & Rutherford AW (1986) *Biochemistry* 25, 4609-4615
- [107] Brudvig GW, Casey JL & Sauer K (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 723, 366-371
- [108] Krieger A, Weis E & Demeter S (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1144, 411-418
- [109] Wiessner W, Mende D & Demeter S (1992) *Photosynth. Res.* 34, 279-285
- [110] Demeter S, Goussias Ch, Bernát G, Kovács L & Petrouleas V (1993) *FEBS Lett.* 336, 352-356
- [111] Johnson GN, Boussac A & Rutherford AW (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1184, 85-92
- [112] Vass I & Styring S (1991) *Biochemistry* 30, 830-839
- [113] Miranda T & Ducruet J-M (1995) *Plant Physiol. Biochem.* 33, 689-699
- [114] Skotnica J, Fiala J, Ilík P & Dvořák L (1999) *Photochem. Photobiol.* 69, 211-217

- [115] Krieger A & Weis E (1993) *Photosynth. Res.* 37, 117-130
- [116] Vermaas WFJ & Rutherford AW (1984) *FEBS Lett.* 175, 243-248
- [117] Bowden SJ, Hallahan BJ, Ruffle SV, Evans MCW & Nugent JHA (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1060, 89-96
- [118] Demeter S, Janda T, Kovács L, Mende D & Wiessner W (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 166-174
- [119] Setlik I, Allakhverdiev SI, Nedbal L, Setlikova E & Klimov VV (1990) *Photosynth. Res.* 23, 39-48
- [120] van Mieghem FJE, Nitschke W, Mathis P & Rutherford AW (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 977, 207-214
- [121] Iwasaki I, Tamura N & Okayama S (1995) *Plant Cell Physiol.* 36, 583-589
- [122] Barber J & De Las Rivas J (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10942-10946
- [123] Mizusawa N, Ebina M & Yamashita T (1995) *Photosynth. Res.* 45, 71-77
- [124] Govindjee (1990) *Photosynth. Res.* 25, 151-160
- [125] Neale PJ & Melis A (1990) *Plant Physiol.* 92, 1196-1204
- [126] Allen JF & Nillson A (1997) *Physiol. Plant.* 100, 863-868
- [127] Buser CA, Thompson LK, Diner BA & Brudvig GW (1990) *Biochemistry* 29, 8977-8985
- [128] van Rensen JJS, Tonk WFJ & de Bruijn SM (1988) *FEBS Lett.* 226, 347-351
- [129] Magnuson A, Rova M, Mamedov F, Fredriksson P-O & Styring S (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1141, 180-191
- [130] Ghirardi ML, Lutton TW & Seibert M (1996) *Biochemistry* 35, 1820-1828
- [131] Miyao M & Inoue Y (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1056, 47-56
- [132] Burnap RL, Quian M & Pierce C (1996) *Biochemistry* 35, 874-882
- [133] Bader KP, Thibault P & Schmid GH (1983) *Z. Naturforsch.* 38c, 778-792
- [134] Bader KP (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1188, 213-219
- [135] Lavorel J & Seibert M (1982) *FEBS Lett.* 144, 101-103

- [136] Ono T-A & Inoue Y (1991) *FEBS Lett.* 278, 183-186
- [137] Allakhverdiev SI, Klimov VV & Demeter S (1992) *FEBS Lett.* 297, 51-54
- [138] Tamura N, Inoue Y & Cheniae M (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 976, 173-181

AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT ÉS KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények:

Demeter S, Goussias Ch, **Bernát G**, Kovács L & Petrouleas V (1993) Participation of the $g = 1.9$ and $g = 1.82$ EPR forms of the semiquinone-iron complex, $Q_A^-Fe^{2+}$ of photosystem II in the generation of the Q and C thermoluminescence bands, respectively. *FEBS Lett.* 336, 352-356

Demeter S, Nugent JHA, Kovács L, **Bernát G** & Evans MCW (1995) Differential sensitivity of the photosystem II reaction centers against photoinhibition under anoxic conditions. *Photosynth. Res.* 46, 213-218

Bernát G, Padhye S & Demeter S (1996) Chemical probes for water-oxidation: synthetic tetranuclear manganese complexes in photoactivation of water oxidizing complex and as exogen electron donors to photosystem II. *B. Soc. Roy. Sci. Liège* 65, 352

Bernát G, Padhye S, Barta Cs, Kovács L & Demeter S: Chemical Probes for Water-Oxidation: Synthetic Manganese Complexes in Photoactivation of Water Oxidizing Complex and as Exogenous Electron Donors to Photosystem II. Submitted to *Z. Naturforsch.*

Kapcsolódó közlemények:

Labádi I, **Bernát G**, Párkányi L, Kenessey G & Liptay Gy (1992) Preparation and characterization of parent and mixed-ligand complexes in 1,2-ethanediol-water-zinc sulphate systems. X-ray crystal structure of $Zn(1,2\text{-ethanediol})_2(H_2O)_2(SO_4)$. *Polyhedron* 11, 2975-2981

Kovács L, Hegde U, Padhye S, Bernát G & Demeter S (1996) Effects of potassium-(picrate)-(18-crown-6) on the photosynthetic electron transport. Z. Naturforsch. 51c, 539-547

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok dr. Dudits Dénes akadémikusnak, amiért lehetővé tette, hogy a disszertáció alapjául szolgáló munkát az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetében elvégezhessem.

Külön köszönettel tartozom dr. Demeter Sándor tudományos tanácsadónak, a Fotoszintézis Bioenergetikája Csoport vezetőjének, iránymutatásaiért, szakmai segítségéért és emberi hozzáállásáért.

Hálás vagyok az MTA SzBK Növénybiológiai Intézetében tartott házivédés opponenseinek, dr. Garab Győző tudományos tanácsadónak és dr. Vass Imre intézetigazgatónak a disszertációra vonatkozó hasznos tanácsaikért.

Köszönetemet fejezem ki valamennyi kollégámnak, akikkel az elmúlt évek során együtt dolgozhattam.

Végül, de nem utolsósorban, hálámat fejezem ki családtagjaimnak, akik odaadó támogatása nélkül ez a disszertáció nem jöhetett volna létre.

SUMMARY

The ultimate source of energy for maintaining the biosphere on the Earth is sunlight which is converted to chemical energy by photosynthesis. In addition to this basic role, in higher plants light is also necessary for the synthesis of photosynthetic pigments and for photoactivation of the water splitting complex (WOC) of photosystem II (PS II). WOC is the catalytic site responsible for the photosynthetic oxygen evolution. Even though light is the ultimate substrate for photosynthetic energy conversion it can also harm plants, especially via degradation of the reaction center of PS II. We studied photoinhibition of intact thylakoid membranes isolated from pea and spinach and photoactivation of WOC with synthetic manganese complexes on Mn-depleted thylakoid membranes. The main results are summarized as follows:

I. Photoinhibition of PSII

- (1) Based on comparative electron paramagnetic resonance (EPR) and thermoluminescence (TL) measurements, we have found that the C TL-band at around 45-50 °C originates from a charge recombination of the oxidized auxiliary electron donor Y_D and the reduced primary quinone acceptor Q_A of bicarbonate-depleted PSII centers ($Y_D^+Q_A^-$ charge recombination); these centers exhibit a $g=1.82$ $Fe^{2+}Q_A^-$ EPR signal. On the other hand, bicarbonate-containing centers give rise to the Q TL band that is found at 10 °C and a $g=1.9$ $Fe^{2+}Q_A^-$ EPR signal. The preferential recombination pathways, $S_2Q_A^-$ ($g=1.9$) and $Y_D^+Q_A^-$ ($g=1.82$) in bicarbonate-containing and bicarbonate-depleted centers, respectively suggest that binding of bicarbonate also affects the stabilization of charges at the donor side.
- (2) We have found that the two types of the primary quinone acceptor were associated with two different populations of PSII which had very different sensitivity against light stress. As characterized by the time courses of the corresponding EPR signals, photoinhibition of the bicarbonate-containing centers, which contain Q_A ($g=1.9$), intact WOC (S_2 multiline signal), and high

potential form of cytochrome b_{559} (Cyt $b_{559}HP$), progressed much faster than the photoinhibition of the bicarbonate-depleted centers with Q_A ($g=1.82$), Y_D^+ and low potential form of Cyt b_{559} . These results are in agreement with literature data showing that the bicarbonate ion bound to PSII reaction centers play an important role in the protection against light stress.

II. Photoactivation of WOC with synthetic manganese complexes

- (1) Photoactivation of the water splitting enzyme was performed with 13 different synthetic manganese complexes and characterized by oxygen evolution induced by single turnover flashes, TL and chlorophyll fluorescence induction kinetics. A comparison revealed that the efficiency of different compounds in photoactivation correlated the rate of linear electron transport in the presence of these compounds.
- (2) We have found that the organic ligands that are associated with the manganese ions do not prevent the photoactivation of WOC. Incorporation of the manganese complexes with different sizes and structures suggest an inherent structural-functional flexibility at the donor side of PS II reaction centers.
- (3) Photoactivation with different manganese complexes depended on the number of the Mn-ions in the complex, their valence state and the nature of their donor atoms. The most efficient restorations were achieved by using tetrameric complexes having dimer+dimer structure, complexes containing Mn(II) ions, complexes having 4-6 oxygen and 0-2 nitrogen atoms, as donor atoms. Further, the effectiveness of the complexes in photoactivation depended largely on the structure of the complexes. Our data support the notion that WOC in intact thylakoids requires the cooperation and well determined arrangement of all four manganese ions, and argue against the hypothesis that two manganese ions are sufficient for splitting the water.
- (4) Photoactivation by some complexes have led to anomalous flash-oxygen patterns, which are explained by modified/perturbed water splitting complex.